



RECEP TAYYİP
ERDOĞAN
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

BAKLA (*Vicia faba* L.) POLİFENOL OKSİDAZININ
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Canan UZUN DURGUN

Danışman
Doç. Dr. Nimet BALTAŞ

RİZE
2022

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalında, Doç. Dr. Nimet BALTAŞ danışmanlığında, Canan UZUN DURGUN tarafından hazırlanan *Bakla (Vicia faba L.) Polifenol Oksidazının Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi* adlı bu tez çalışması, 31.08.2022 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği/oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Doç. Dr. Zehra CAN	
Üye	: Doç Dr. Nimet BALTAŞ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özlem SARAL	

ETİK BEYAN

Kimya Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Bakla (*Vicia faba L.*) Polifenol Oksidazının Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılacak bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

31/08/2022

Canan UZUN DURGUN

ÖN SÖZ

Bakla (*Vicia faba* L.) Polifenol Oksidazının Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi amacıyla yapılan bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalında “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlandı.

Yüksek lisans tez çalışmamı öneren, çalışmam boyunca bilgisini, tecrübesini, hoşgörüsünü eksik etmeyen, yardımını her zaman üzerimde hissettiğim, çalışmama bilgi ve tecrübesi ile ışık tutan örnek aldığım canım danışman hocam sayın Doç. Dr. Nimet BALTAŞ’a çok teşekkür ederim. Ayrıca, bana kendisi ile çalışma fırsatı verdiği için sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

Benden maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman başaracağıma sonsuz inancı olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme sonsuz minnattarım. En büyük destekçim olan eşim Hakan DURGUN ve annem Asiye UZUN’a teşekkür ederim. Bu tezi annem ve oğlum Metehan DURGUN’a ithaf ederim.

Canan UZUN DURGUN
2022/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR.....	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. Çalışmanın Amacı ve Önemi	3
1.2. Baklanın (Vicia faba L.) Morfolojik Özellikleri ve Kullanım Alanları.....	4
1.3. PFO Enziminin Yapısı, Reaksiyon Mekanizması ve Substratları	5
1.4. Polifenol Oksidaz İle İlgili Literatürde Yapılan Çalışmalar	10
2. ARAŞTIRMA	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	19
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bazı Çözeltiler	19
2.2. Deneysel Çalışmalar	20
2.2.1. Ham Ekstraktın Hazırlanması.....	20
2.2.2. Protein Tayini	20
2.2.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Substrat Boyaması	20
2.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tayini	21
2.2.5. Bakla PFO'sunun Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi	21
2.2.6. Bakla PFO Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi	21
2.2.7. Bakla PFO Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	22
2.2.8. Farklı Substratlar İçin Bakla PFO Kinetiğinin İncelenmesi.....	22

2.2.9. Bakla PFO'sunun Isıl Kararlılığının İncelenmesi	22
2.2.10. Bakla PFO'sunun pH Kararlılığının İncelenmesi.....	22
2.2.11. Bakla PFO'sunun Bazı İnhibitörlere Karşı Davranışının İncelenmesi23	
2.2.12. Bazı Metal İyonlarının Bakla PFO'su Üzerine Etkisinin İncelenmesi23	
2.3. Bulgular	24
2.3.1. Bakla PFO'sunun Doğal Poliakrilamid Jel Elektroforezi	24
2.3.2. Bakla PFO'sunun Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Tayini.....	24
2.3.3. Bakla PFO'su Üzerine pH' ın Etkisi	25
2.3.4. Bakla PFO'su Üzerine Sıcaklığın Etkisi	26
2.3.5. Bakla PFO'su Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi	28
2.3.6. Bakla PFO'sunun pH Kararlılığının İncelenmesi.....	30
2.3.7. Bakla PFO'sunun Isıl Kararlılığının İncelenmesi	31
2.3.8. Bazı İnhibitörlerin Bakla PFO'su Üzerine Etkisi.....	32
2.3.9. Bazı Metal İyonlarının Bakla PFO'su Üzerine Etkisi	34
3. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKÇA.....	43

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ana Bilim Dalı : Kimya Anabilim Dalı
Tez Türü : Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Doç. Dr. Nimet BALTAŞ
Hazırlayan : Canan UZUN DURGUN
Yıl : 2022
Sayfa Sayısı : 47

ÖZET

BAKLA (*Vicia faba* L.) POLİFENOL OKSİDAZININ BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Bu çalışmada, Antalya İlinden toplanan Bakla'dan (*Vicia faba* L.) kısmen saflaştırılan polifenoloksidazın (PFO) biyokimyasal özellikleri incelendi. Bakla PFO' sunun doğal elektroforezde 2 tane izoenziminin olduğu tespit edildi. Enzimin en çok ilgi duyduğu substrat hidrokafeik asiti takiben 4-metilkatekol ve katekol olarak belirlendi. Hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları varlığında enzimin optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak bulundu. Bakla PFO' sunun optimum pH değeri hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları varlığında, sırasıyla 8,0; 4,0 ve 4,0 olarak tespit edildi. Hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları varlığında Bakla PFO' sunun K_m değeri, Lineweaver-Burk eğrisi ile, sırasıyla 0,172 mM; 7,133 mM ve 9,158 mM olarak hesaplandı. Enzimin ısıl kararlılık profili incelendiğinde, hidrokafeik asit substratı varlığında 10 günün sonunda, 30 °C'de 10 gün sonra aktivitesinin % 77' sini koruduğu gözlemlendi. En yaygın PFO inhibitörleri olan askorbik asit, benzoik asit, sodyum azid ve sodyum metabisülfid için IC_{50} değeri sırası ile 8,25 µM; 11,00 mM; 60,00 mM ve 116,00 µM olarak belirlendi. Na^+ , K^+ , Ba^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} ve Fe^{+2} iyonlarının 1 mM; 5 mM ve 10 mM' lik son konsantrasyonda Bakla PFO'su üzerine inhibisyon etkisi incelendi.

Anahtar Kelimeler: Polifenol oksidaz, Bakla (*Vicia faba* L.), Karakterizasyon

Recep Tayyip Erdoğan University Graduate School of Education Institute
Department : Department of Chemistry
Thesis Type : Master Thesis
Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Nimet BALTAŞ
Author : Canan UZUN DURGUN
Year : 2022
Pages : 47

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF POLYPHENOL OXIDASE FROM BROAD BEAN (*Vicia faba* L.)

In this study, the biochemical properties of partially purified polyphenoloxidase from broad bean (*Vicia faba* L.) were investigated, collected from Antalya Province. It was determined that the broad bean PPO had 2 isoenzymes in native electrophoresis. The substrate of greatest interest for the enzyme was determined as hydrocaffeic acid, followed by 4-methylcatechol and catechol. The optimum temperature value of the enzyme was found to be 30 °C, in the presence of hydrocaffeic acid, 4-methylcatechol and catechol substrates. The optimum pH value of broad bean PFO was determined as 8,0; 4,0 and 4,0 in the presence of hydrocaffeic acid, 4-methylcatechol and catechol substrates, respectively. The K_m values of the Broad bean PPO, for hidrocaffeic acid, 4-methylcatechol and catechol substrates were determined 0,172 mM; 7,133 mM and 9.158 mM, by Lineweaver-Burk curve, respectively. When the thermal stability profile of the enzyme was examined, at the end of 10 days, it was observed that, for hydrocaffeic acid substrate the enzyme retained over 77% of its original PPO activity at 30 °C. IC_{50} values of ascorbic acid, benzoic acid, sodium azide and sodium metabisulfite, the most common PFO inhibitors, were determined as 8,25 μ M; 11,00 mM; 60,00 mM and 116,00 μ M, respectively. It was examined that the effect of the Na^+ , K^+ , Ba^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} and Fe^{+2} , on the PPO activity, at the 1 mM; 5 mM and 10 mM final concentrations.

Keywords: Polyphenol Oxidase, Broad bean (*Vicia faba* L.), Characterization.

KISALTMALAR

APS	: Amonyum Persulfat
BSA	: Bovin serum albümin
DMF	: Dimetil formamid
EU	: Enzim ünitesi
EU/mg	: Enzim ünitesi
Kcal	: Kilo kalori
kDa	: Kilodalton
K_m	: Michaelis-Menten sabiti
L- Dopa	: L- 3,4-Dihidroksifenilalanin
MBTH	: 3-metil-2-benzotiyazolinonhidroklorürhidrat
MOPS	: 3-(N-morfolino)propan sülfonik asit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforez
PFO	: Polifenol Oksidaz
PMSF	: Fenilmetilsülfonoflorid
PHPPA	: 3-(4 Hidroksifenil propyonik asit)
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
Tris	: Tris(hidroksimetil)aminometan
V_{maks}	: Maksimum hız
UV	: Ultraviole

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları.	21
Tablo 2. Bakla PFO' sunun farklı substratlar varlığında aktivite değerleri.	25
Tablo 3. Bakla PFO' sunun kinetik parametreleri.	29
Tablo 4 Bakla PFO aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi.....	32
Tablo 5. Bazı metal iyonlarının PFO aktivitesi üzerine etkisi.	34



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Baklanın (<i>Vicia faba</i> L.) görüntüsü.....	4
Şekil 2. Polifenoloksidazın Monofenolaz ve Katekolaz aktivitesi	6
Şekil 3. <i>Malus domestica</i> L. PFO'sunun aktif bölgesi ve substratın yerleşmesi.....	6
Şekil 4. PFO için önerilen difenolaz çevrimi.	7
Şekil 5. Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri.	8
Şekil 6. PFO'nun çeşitli moofenolik ve difenolik substratları.	10
Şekil 7. Çalışmada Kullanılan Bakla (<i>Vicia faba</i> L.)	20
Şekil 8. Doğal PAGE elektroforezi.	24
Şekil 9. Bakla PFO'su üzerine hidrokafeik asit varlığında pH'ın etkisi.	25
Şekil 10. Bakla PFO'su üzerine 4-metilkatekol varlığında pH'ın etkisi.	26
Şekil 11. Bakla PFO'su üzerine katekol varlığında pH'ın etkisi.....	26
Şekil 12. Bakla PFO'su üzerine hidrokafeik asit varlığında sıcaklığın etkisi.	27
Şekil 13. Bakla PFO'su üzerine 4-metilkatekol varlığında sıcaklığın etkisi.....	27
Şekil 14. Bakla PFO'su üzerine katekol varlığında sıcaklığın etkisi.	28
Şekil 15. Hidrokafeik asit substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.	29
Şekil 16. 4-Metilkatekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.	29
Şekil 17. Katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.	30
Şekil 18. Bakla PFO'sunun +4 °C' deki pH kararlılığının zamana göre değişimi.	31
Şekil 19. Bakla PFO' sunun 30 °C'de ısı kararlılığının zamana göre değişimi.	31
Şekil 20. PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.	32
Şekil 21. PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.	33
Şekil 22. PFO'nun sodyum metabisülfid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi..	33
Şekil 23. PFO'nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.	33

GİRİŞ

Son yıllarda biyoteknoloji alanındaki gelişmelerin artması sonucu, endüstriyel gıda enzimleri tüketici tarafından talep edilen ve besleyici değeri yüksek olan gıdaların geliştirilmesinde büyük önem arz etmeye başlamıştır. Sebze ve meyvelerde meydana gelen kimyasal ve enzimatik olayların kontrol altına alınması ve durdurulabilmesi gıdaların korunması, ürünün renginin bozulmaması ve daha da önemlisi besin değerinin düşmemesi açısından oldukça önemlidir.

Sebze ve meyvelerin taşınması ve istiflenmesi sırasında çarpma, ezilme, kesme gibi ekonomik kayıplara yol açan zedelenmeler ile birlikte polifenol oksidazın (PFO) havadaki oksijen ile etkileşmesiyle oluşan ve ürünün parlaklığında pembeden siyah renke doğru ilerleyen renk değişimi gözlenir. Bu değişim enzimatik esmerleşme sonucu meydana gelir. Buda meyve ve sebzenin görünümünü, tadını ve besleyici değerini bozan bir oksidasyon reaksiyonudur. Sıcaklık, pH, hücrelerdeki oksijen miktarı, aktif PFO (E. C. 1.10.3.2) miktarı ve ortamın metal iyon konsantrasyonu enzimatik esmerleşmeyi etkileyen en önemli faktörler arasında yer almaktadır.

Meyve, sebze ve diğer bazı besin ürünlerinde besinin üretim sürecinde ya da sonrasında meydana gelen esmerleşme olayı, zararlı etkilerinin yanısıra bazı besinlerde bu istenen bir durum haline gelebilir. Birçok ülkede bolca tüketilen çay, kahve ve kakao gibi besinlerde enzimatik esmerleşme oldukça önemlidir. Siyah ve yeşil çay ile kakaonun renk ve tat gelişimi, kuru meyvelerden üzüm, erik, incir gibi meyvelerin kendilerine özgü renk almalarını sağlayan enzimatik fermantasyon ürünleri, kurutma döneminde meydana gelen esmerleşmeye bağlıdır. (Marshall vd., 2000).

Ayrıca polifenol oksidazların enzimatik reaksiyonu sonucu oluşan kinonlar polimerleşerek melaninleri oluşturur. Bu melaninler, böcek ve mikroorganizmaların bitkilere saldırmasını engelleyerek, yani antibakteriyal ve antifungal aktivite göstererek sebze ve meyvelerin sağlıklı kalmasına yardımcı olurlar (Marshall vd., 2000).

Besinlerin bileşimindeki esmerleşme kaynaklı değişimlerin besinsel ve enzimatik açıdan tanımlanmasına, meyve ve sebzelerdeki istenmeyen esmerleşme reaksiyonlarının durdurulmasına ilaveten yararlı olan esmerleşme reaksiyonlarının aydınlatılmasına ve optimize edilmesine ihtiyaç vardır. İnsan beslenmesi ve sağlık açısından besinlerde çeşitli sebeplerle meydana gelen esmerleşme reaksiyonlarının anlaşılması, etkilerinin ortaya konulması ve besinlerin albenisini azaltan enzimatik esmerleşmeye çözümler bulunması oldukça önemlidir. PFO aktivitesinin kontrol edilmesi, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin iyi bilinmesi ve enzimin biyokimyasal olarak karakterize edilmesi enzimatik esmerleşmenin önlenmesinde kullanılan ve tercih edilen en geçerli yöntemdir.

Meyve ve sebzelerin üretimi, toplanması, depolanması ve işlenmesi sırasında meydana gelebilecek esmerleşmeyi ve kararmayı yeni teknolojilerle birlikte azaltıp, tüketicinin istemediği ve üretici için ise büyük bir ekonomik problem olan bu durumu ortadan kaldırıp, tüketilen besin miktarındaki artış ile birlikte ülke ekonomisine büyük katkı sağlanabilir (Önez, 2006).

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Çalışmanın Amacı ve Önemi

Özellikle Akdeniz ve Ege bölgesinde yetiştirilen Bakla (*Vicia faba* L.) zeytinyağlı yemeklerde ve salatalarda bolca tüketilmektedir. Ürünün toplama sırasında zedelenmesi, yemek yapımında ya da derin dondurucuda saklama sırasında oluşabilecek renk değişimleri dikkate alınarak, Bakla (*Vicia faba* L.) bitkisinin tümünün bulunduğu ham ekstrat kullanılarak polifenol oksidaz enziminin biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve aydınlatılması amaçlandı. Çalışmada ilk olarak enzimin varlığı doğal poliakrilamid jel elektroforezinde görüldü. Polifenol oksidazın substrat ilgisi, aktivite gösterdiği substratların optimum pH, optimum sıcaklık değerleri ve enzimin kinetik parametreleri belirlendi. Bunlara ilaveten, enzimin pH ve ısıl kararlılık, metal-iyon etkisi ve yaygın kullanılan inhibitörlerinin PFO aktivitesi üzerine etkisi incelendi.

Meyve ve sebzelerde meydana gelen ve esmerleşme olarak bilinen renk değişimleri ürünlerin erken bozulmasına ve çürümesine neden olmaktadır. Bu bozulmalar depolanma ve satışta kalacağı süreyi kısaltarak kalitenin düşmesine ve büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bu durum hem üretici hemde tüketici tarafından istenmeyen bir durumdur (Creumiere, 2000).

Ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde üretimi ve tüketimi yaygın olan bakla, bakladan üretilen ürünler, onların saklama koşulları ve raf ömrü açısından PFO enziminin karakterizasyonu oldukça önemlidir. Bakla polifenol oksidazının karakterizasyonu ve biyokimyasal özelliklerinin aydınlatılması endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir olması açısından önem arz etmektedir.

1.2. Baklanın (*Vicia faba L.*) Morfolojik Özellikleri ve Kullanım Alanları

Bakla (*Vicia faba L.*), *Fabales* takımının *Fabaceae* (kelebek çiçekliler) familyasının *Vicia* cinsine ait, ekonomik değeri yüksek bir baklagil bitkisidir (Karaköy vd., 2015). (Şekil 1).



Şekil 1. Baklanın (*Vicia faba L.*) görüntüsü

Bakla iyi bir protein, diyet lifi, nişasta, mineral ve vitamin kaynağıdır (Kutos vd., 2003). Avrupa’ da daha çok hayvan beslemesinde kullanılan bakla, gelişmekte olan ülkelerde en çok insan gıdası olarak kullanılmaktadır. Hem Türkiye’ de hem de birçok Afrika ve Asya ülkelerinde taze bakla, bakla konservesi, salata ve çeşitli yemeklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakla üretimi geniş bir alanı kaplamakta olup, Batı’da Atlas Okyanusu’ ndan, Doğu’ da Himalayalar’ a kadar uzanmaktadır (Karaköy vd., 2015). Bu kadar geniş alana hitap eden baklanın adaptasyon kabiliyetinin yüksek olması birçok ülkede yetiştiriciliğinin yapılmasına olanak sağlamıştır. Dünya çapında yaklaşık 2,5 milyon hektarlık alanda yetiştiriciliği yapılan baklanın üretimi en fazla Çin’de yapılmaktadır. Akdeniz Bölgesi, Batı Marmara Bölgesi ve Ege Bölgesinde 4,3 hektarlık ekim alanı ile Türkiye’de en fazla bakla yetiştirilen yerlerdir. Üretim açısından bakla; kuru fasulye, bezelye ve nohuttan sonra Dünya’ da dördüncü, Avrupa’ da ise ikinci sırada yer almaktadır (İdikut vd., 2018).

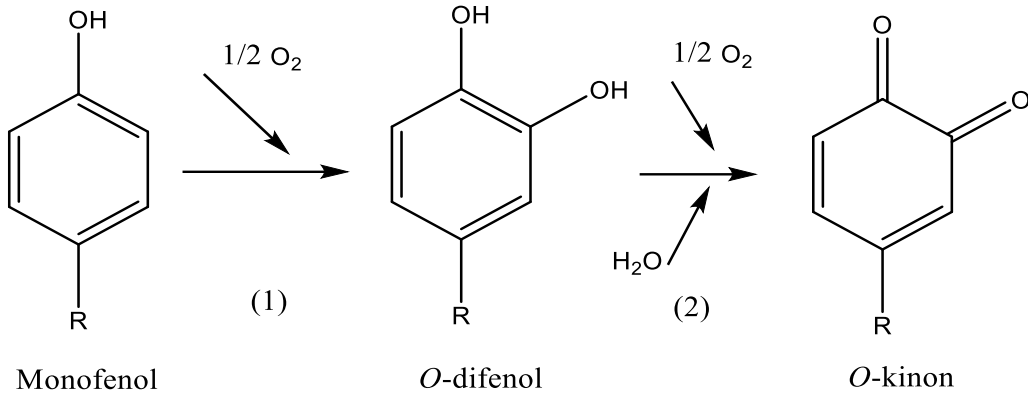
Baklanın karbohidrat içeriği %42-56 civarında, toplam lif oranı % 13,8 ve protein içeriğinin % 28 oranında olduğu rapor edilmiştir (Prabhu ve Rajeswari, 2018; Millar vd., 2019). Et ve balıktan sonra en bol protein içeren baklanın toplam protein oranı yetiştirme koşulları ve genetik yapıya göre farklılık göstermektedir. Zengin vitamin ve mineral deposu olarak bilinen baklanın bol miktarda A, B1, B2, B3, B6, B9, C ve K vitaminleri içermektedir. Ayrıca yüksek demir içeriği ile anemik kişilerin bolca tüketmesi tavsiye

edilen baklanın Al, B, Ba, Co, Cr, Cu, Ga, Li, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn gibi mikro besin maddelerini (iz elementler) de içerdği bildirilmiştir (Luo ve Xie, 2012). Başka bir çalışmada, baklanın stres durumunda artan kan basıncı, kalp atış hızı, ağrı ve endişe gibi durumlarını hafifletmeye yardımcı olan γ -aminobutirik asit (GABA) içerdği rapor edilmiştir (Yang vd., 2013). Fenolik bileşenler bakımından zengin olan baklanın (Chaieb vd., 2011), % 8-9 oranında tanen ve % 1,80 oranında fitik asit içerdği bildirilmiştir (Topal ve Bozoğlu (2016). Bazı bakla genotiplerinin L-dopa içeriklerinin belirlenmesi üzerine yapılan bir çalışmada; bakla yapraklarının 10,88 mg; 33,41 mg kg⁻¹, çiçeklerinin 40,95 mg; 96,37 mg kg⁻¹ ve meyvelerinin ise 4,16 mg; 54,29 mg kg⁻¹ L-dopa içerdği saptanmıştır. L-dopa potansiyel olarak hipertansiyon ve parkinson gibi hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılabilir (Ray ve Georges, 2010). Baklanın bol miktarda biyoaktif bileşenler içerdği ve bunlar sayesinde serbest radikallerin tahribatını azalttığı (Chaieb vd., 2011), diyabetin kontrol altında tutulmasına yardımcı olduğu (Hussein., 2012) ve kolon kanseri üzerinde olumlu etki gösterdiği (Lima vd., 2016) rapor edilmiştir.

Bakla zengin protein, lif, vitamin ve mineral içeriğiyle insan ve hayvan beslenmesinde ve günlük alınması gereken makro ve mikro besin ihtiyaçlarının karşılanmasında biyo-yararlılık açısından önemli rol oynamaktadır.

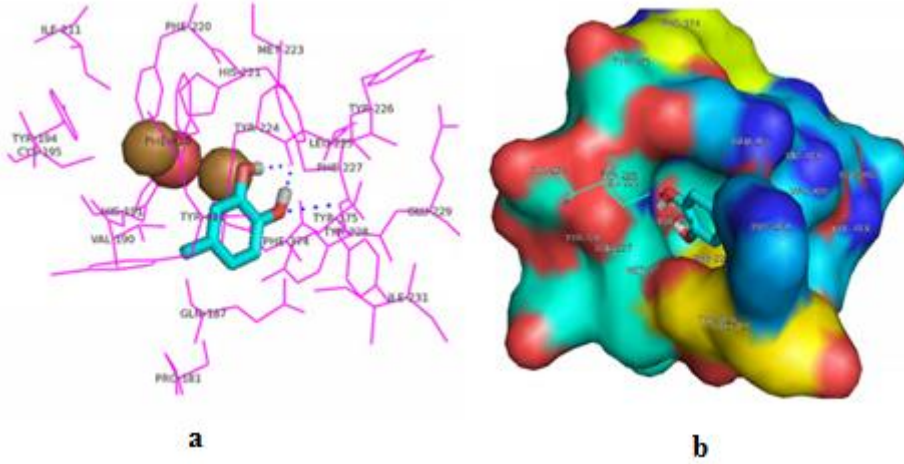
1.3. PFO Enziminin Yapısı, Reaksiyon Mekanizması ve Substratları

Enzim komisyonu tarafından yapılan sınıflandırmaya göre oksidoredüktazlar sınıfında yer alan polifenol oksidaz monofenolaz ve difenolaz olmak üzere iki çeşit aktivite katalizler. Tirozinaz (E.C.1.14.18.1) aktivitesi olarak tanımlanan monofenolaz aktivitesinde *o*-hidroksillenme reaksiyonu ile monofenoller, *o*-difenollere katalizlenir (Şekil 2, Şekil 4). Katekolaz (E.C.1.10.3.2) olarak bilinen difenolaz aktivitesinde ise, *o*-difenoller *o*-kinonlara (Şekil 2, Şekil 4) okside olur (Espin vd., 1997; Brooks vd., 2004).



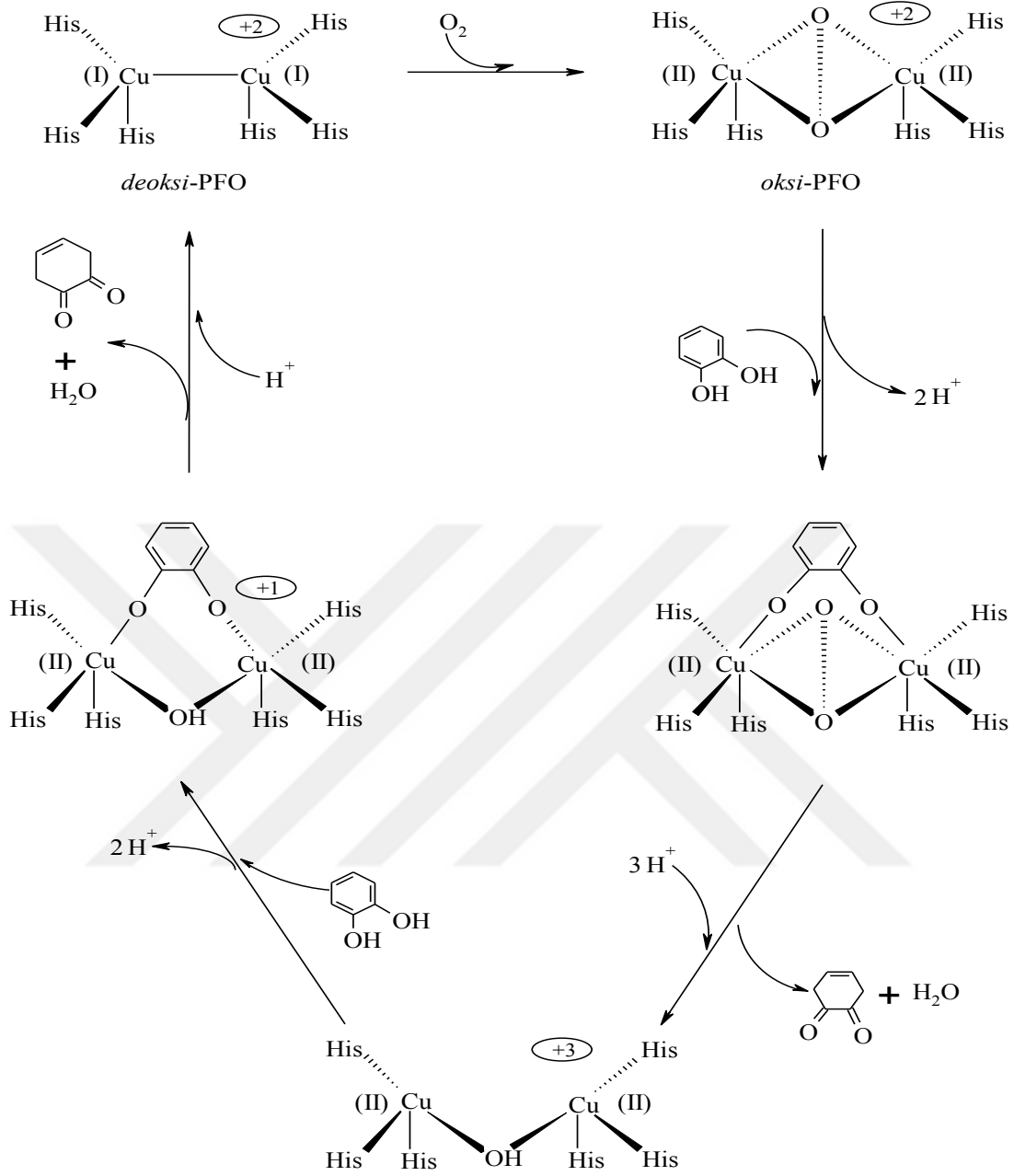
Şekil 2. Polifenoloksidazın, Monofenolaz (1) (hidroksilasyon),ve (2) Katekolaz aktivitesi (oksidasyon) (Cemeroğlu vd., 2001).

Şekil 3'te *Malus domestica* L. PFO'sunun aktif bölgesine substrat olarak 4-metilkatekolün yerleştiği enzim-substrat kompleksinin görüntüsü, aktif bölgedeki Cu^{+2} atomları (Şekil 3a) ve enzimin aktif bölgesinin üç boyutlu yapısı gösterilmiştir.



Şekil 3. *Malus domestica* L. PFO'sunun aktif bölgesi ve substratın yerleşmesi (Liu vd., 2015). (a) 4-metilkatekol bağlanma yeri, (b) Enzimin üç boyutlu aktif bölgesi (4-metilkatekol bağlanma bölgesi) (Liu vd., 2015).

Kimyasal ve spektroskopik araştırmalar, polifenol oksidazın binükleer bakır kompleksi içeren bir aktif bölgeye sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5).

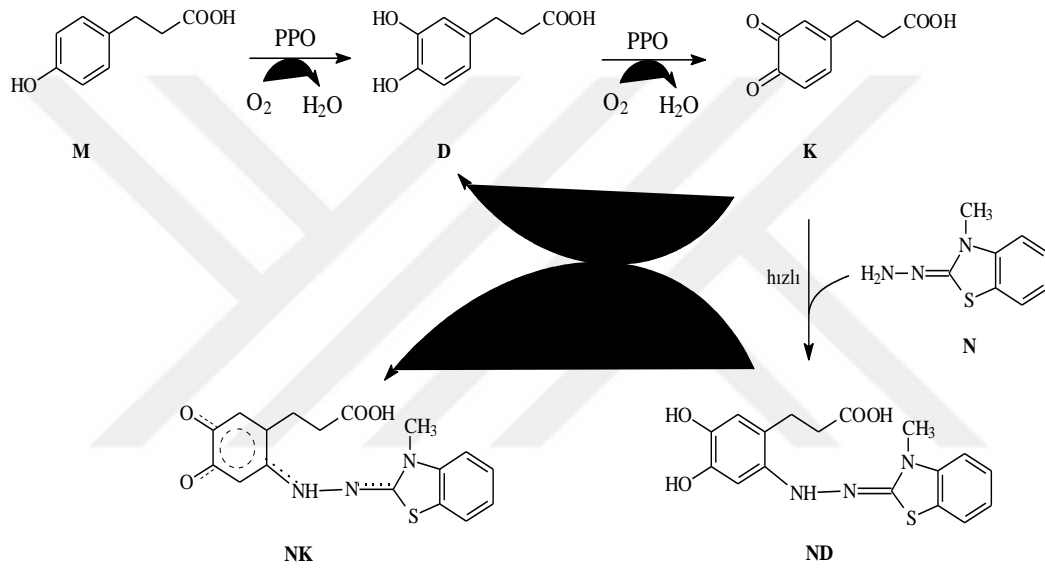


Şekil 4. PFO için önerilen difenolaz çevrimi (Siegbahn, 2003).

Polifenol oksidaz birbiri ile ilişkili olan monofenolaz ve difenolaz enzimatik aktivitesini gerçekleştirirken, ilk olarak monofenolazın izlediği basamakta difenol oluşur ve oluşan difenol difenolazın izlediği basamakta (katekolaz reaksiyonu) kullanılır (Şekil 2, Şekil 4, Şekil 5). *Orto*-benzokinon ürünü molekül içi elektron transferi sonucu oluşur ve yeni bir katalitik çevrime girmek üzere enzimin *deoksi*-formu hazır hale gelir.

Enzimatik reaksiyonla oluşan ve canlılardaki en aktif ara ürünlerden olan *o*-kinon bileşikleri kolayca polimerleşerek, esmerleşme reaksiyonunun karakteristiği olan koyu kahverengi suda az çözünen polimerik pigmentler oluşur.

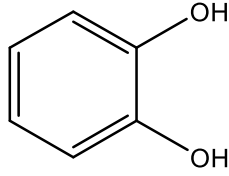
PFO'nun monofenolaz ve difenolaz aktivitesi sonucu, kromojenik bir nükleofil olan 3-metil-2- benzotiyazolinon hidrazon (MBTH) ile *o*-kinonların verdiği katılma ürünlerini oldukça duyarlı ve doğru bir şekilde 500 nm civarındaki karakteristik absorpsiyonlar (Espin vd., 1997; Brooks vd., 2004) ile spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Şekil 5).



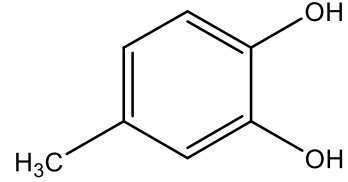
Şekil 5. Polifenol oksidazın kromojenik bir nükleofil (MBTH) varlığında monofenolaz ve difenolaz aktiviteleri (M: monofenol, D: difenol, K: *o*-kinon, N: kromojenik nükleofil, ND: nükleofil-difenol renksiz katılma ürünü, NK: nükleofil-kinon kromoforik katılma ürünü).

Sebze ve meyvelerde bulunan basit yapıları fenoller, klorojenik asit ve türevleri, kateşinler ve flavonoid tipi fenoller PFO'ya substrat olabilmektedir (Şekil 6). Bunlara ilaveten katekol ve kresol gibi bileşiklerin yanısıra tirozin ve türevleri ile sinamik asit türevleri de substrat olarak kullanılır (Şekil 6). Bitkinin büyüdüğü çevresel şartlara ve olgunlaşma dercesine göre miktarı değişen fenolik bileşikler, türevleri ve oksidasyonu ile oluşan ürünler aynı zamanda bitkinin rengine ve tadına da katkıda bulunmaktadır (Marshall vd., 2000).

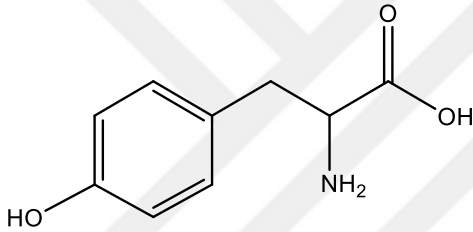
Bitkinin kök, doku, yaprak ve meyve kısımlarında farklı oranlarda bulunabilen flavonoidler aynı fenolik bileşikler de olduğu gibi esmerleşme reaksiyonlarına katkıda bulunmaktadır. Esmerleşme reaksiyonları sonucu oluşan kinon bileşikleride oldukça reaktif olup aminoasitler, proteinler, karbohidratlar ve yağ asitleri gibi biyomoleküllerle farklı kompleks bileşikler oluşturabilirler (Marshall vd., 2000).



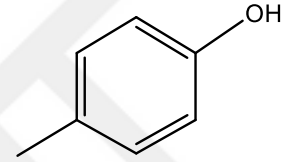
Katekol



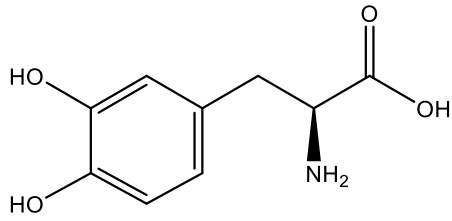
4-metil katekol



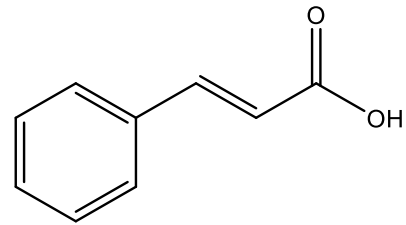
Tirozin



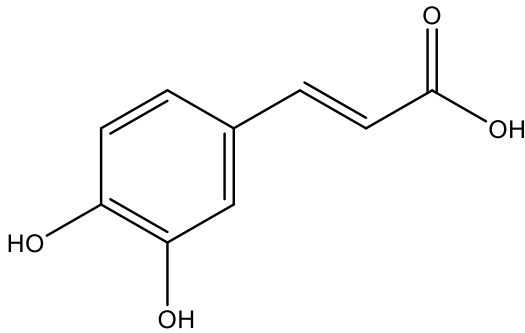
p-kresol



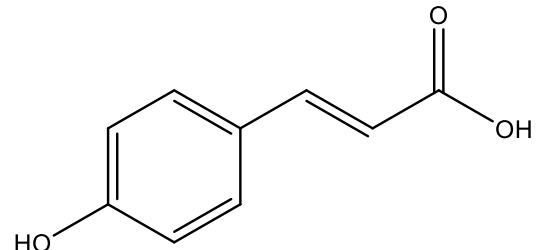
L-dopa



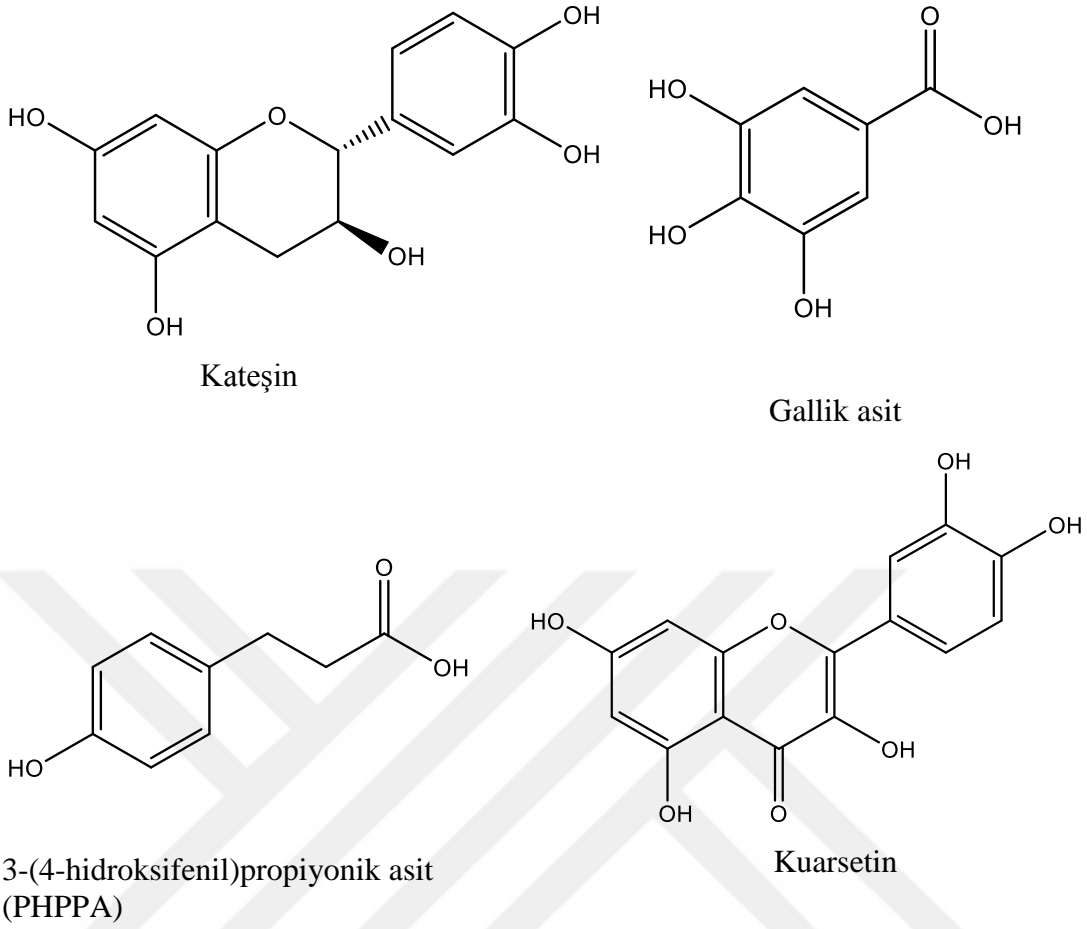
Sinnamik asit



Kafeik asit



p-kumarik asit



Şekil 6. PFO'nun çeşitli moofenolik ve difenolik substratları.

1.4. Polifenol Oksidaz İle İlgili Literatürde Yapılan Çalışmalar

İlk defa 1856 yılında yemeklik mantarlarda, Schoenbein tarafından keşfedilen polifenol oksidaz enzimi (Whitaker, 1972), günümüzde de halen birçok araştırmacının ilgi odağı ve çalışma konusunu oluşturmaktadır. PFO birçok meyve ve sebze karakterize edilerek, optimum pH, optimum sıcaklık, ilgi duyduğu substratlar, inhibitörleri, metal iyonları varlığında sergiledikleri davranışları, izoenzim sayıları, molekül ağırlıkları ve diğer bazı fizikokimyasal parametreleri incelenmiştir.

Yabani bir erik türü olan *Prunus spinosa* L. subsp. *dasphylla* polifenol oksidazı karakterize edilmiş ve en kuvvetli aktiviteyi sırası ile 4-metilkatekol, katekol, kafeik asit, kateşin ve epikateşin substratları varlığında gösterdiği bulunmuştur. K_m ve V_{maks} değeri 4-metilkatekol için 0,97 mM; 4753 U/mg protein, katekol için 2,35 mM; 3964 U/mg protein, kafeik asit için 2,49 mM; 7628 U/mg protein, kateşin için 4,26 mM;

1686 U/mg protein ve epikateşin varlığında ise 6,04 mM; 2093 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. 4-Metilkatekol, katekol, kafeik asit, kateşin ve epikateşin substratı varlığında enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değeri sırası ile 40 °C; 30 °C; 60 °C; 60 °C ve 60 °C olarak bulunmuştur. 4-Metilkatekol, katekol, kafeik asit, kateşin ve epikateşin substratı varlığında enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri ise sırası ile 7,0; 7,0; 4,0; 6,0; 5,0 ve 5,0 olarak tespit edilmiştir. Polifenol oksidaz enzimlerinin en etkili inhibitörleri arasında yer alan sodyum metabisülfid, askorbik asit, sodyum azid, benzoik asit ve tiyüüre için IC₅₀ değeri sırası ile 0,01mM; 0,04 mM; 50,02 mM; 5,92 mM ve 3,95 mM olarak bulunmuştur. Enzimin pH kararlılık çalışmasında pH 5,0 ve 7,0' de yedi gün boyunca inkübe edildiğinde aktivitesini %80 ve %75 oranında koruduğu gözlenmiştir. Yapılan doğal-PAGE elektroforezi sonucunda altı tane izoenziminin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca enzimin farklı metal iyonları varlığında 1 mM; 5 mM ve 10 mM son konsantrasyonlarda aktivite çalışmaları da yapılmıştır (Baltaş vd., 2017).

Yabani bir armut türü olan *Pyrus elaeagnifolia subsp. elaeagnifolia Pallas* PFO' su karakterize edilerek, 4- metilkatekol substratı varlığında optimum pH ve sıcaklık değeri sırasıyla 7,0 ve 30 °C olarak bulunmuştur. Enzimin, 4-metilkatekol substratı varlığında K_m ve V_{maks} değeri sırasıyla, 3,57 mM ve 4781 U/mg protein olarak saptanmıştır. Ayrıca doğal-PAGE substrat boyamasında enzimin difenolaz aktivitesine sahip iki tane izoenziminin olduğu tespit edilmiştir. PFO'nun en yaygın inhibitörlerinden birisi olarak bilinen askorbik asit (IC₅₀= 0,036 mM) en etkili inhibitor olarak rapor edilmiştir (Baltaş, 2017).

Yapılan başka bir çalışmada *Diospyros lotus* L. (yabani hurma) polifenol oksidazı aseton ile çöktürme işleminin ardından affinite kromatografisi kullanılarak 15 kat saflaştırılmıştır. SDS-PAGE elektrofrezinde saf enzimin molekül ağırlığı 16.5 kDa olarak saptanmıştır. Enzim en yüksek aktiviteyi 4-metilkatekol substratı varlığında göstermiştir ve bu substrat için K_m ve V_{maks} değeri sırası ile 3,8 mM ve 1250 U/mg protein olarak bulunmuştur. Ayrıca Fe⁺², Sr⁺², Zn⁺² ve K⁺ iyonlarının 1 mM lık son konsantrasyonunda enzimi ciddi derecede inhibe ettiği gözlenmiştir. IC₅₀ değeri 0,121 µM olan askorbik asit ise en etkili inhibitör olarak bulunmuştur. Ayrıca bu meyvenin sulu ekstraktının üreaz ve asetilkolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon çalışması

yapılmış ve IC₅₀ değeri sırası ile 1,55 mg/mL ve 16,75 mg/mL olarak hesaplanmıştır (Faiz ve Baltaş, 2017).

Öztürk ve diğerleri (2020), çay yaprağından polifenol oksidaz enzimini affinite kromatografisi yöntemini kullanarak %2,67 verimle 19,77 kat saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile saf enzimin molekül ağırlığını 50 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği katekol substratı için K_m ve V_{maks} değerini 3,782 mM; 1,676 μ mol/L ve 4-metilkatekol substratı için ise 3,881 mM; 1,912 μ mol/L olarak hesaplamışlardır. Enzimin katekol substratı varlığında optimum pH değerini 9,0; 4-metilkatekol substratı varlığında ise 8,5 olarak bulmuşlardır. Her iki substrat varlığında enzimin optimum sıcaklık değeri 10 °C olarak rapor edilmiştir. Sodyum metabisülfid, sodyum sülfid, askorbik asit ve glutatyon inhibitörleri için IC₅₀ değerini sırasıyla 21,65 μ M; 23,90 μ M; 69,31 μ M ve 99,08 μ M olarak hesaplamışlardır.

Tropikal iklim meyvesi olan tarçın elmasından (*Annona muricata* L.) PFO hidrofobik etkileşim ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri kullanılarak 160 kat saflaştırılmıştır. Saf enzimin iki altbirimden oluştuğu ve molekül ağırlığının 112 kDa olduğu bulunmuştur. Enzimin en çok aktivite gösterdiği substratlar kafeik asiti takiben şu şekilde sıralanmıştır; 4-metil katekol > katekol > pirogallol (trihidroksifenol) > L-dopa. Kafeik asit, 4-metil katekol, trihidroksifenol ve katekol substratları varlığında saf enzimin K_m değeri sırası ile 0,47 mM; 0,86 mM; 1,42 mM ve 3,16 mM olarak belirlenmiştir. 4-metilkatekol, katekol, trihidroksifenol ve kafeik asit substratları için V_{maks}/K_m ($U\ mM^{-1}\ dak^{-1}$) değerleri ise sırası ile 1067; 866; 631 ve 385 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen K_m değerlerine bakıldığında enzimin kafeik asite olan ilgisinin en yüksek olduğu, fakat kafeik asit varlığında reaksiyon yavaş gerçekleştiğinden, V_{maks}/K_m ($U\ mM^{-1}\ dak^{-1}$) değerine bakıldığında en etkili difenolik substratın 4-metilkatekol olduğu rapor edilmiştir. Enzimin katekol substratı varlığında optimum pH' sı 6,5 ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 25 °C olarak bulunmuştur. Enzimin ısıl kararlılığını incelemek amacı ile 30 dakika boyunca 10 °C ile 70 °C sıcaklık aralığında aktivite çalışmaları yapmışlardır. 30 dakika sonunda 30 °C' de enzim aktivitesinin %20 azaldığını, 60 °C' de ise neredeyse aktivitenin tamamen bittiğini belirtmişlerdir (Palma-Orozco vd., 2019).

Yapılan başka bir çalışmada, çin maydonozu polifenol oksidazı %50 amonyum sülfat çöktürmesinin ardından jel filtrasyon (sefades G-100) kromatografisi yöntemi kullanılarak %11 verimle 6,5 kat saflaştırılmıştır. Kısmen saflaştırılan ve SDS-PAGE te iki tane izoenzimden oluştuğu görülen PFO'nun molekül ağırlığı yaklaşık 46 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin en etkin aktivite gösterdiği substratlar katekol ve 4-metil katekol olarak belirtilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri katekol varlığında 40 °C ve 4-metil katekol substratı varlığında 35 °C olarak bulunmuştur. Katekol ve 4-metilkatekol substratları varlığında enzimin optimum pH değeri ise sırası ile 7,0 ve 8,0 olarak belirtilmiştir. Kısmen saflaştırılan enzimin katekol ve 4-metilkatekol substratı için K_m değeri sırası ile 31 Mm ve 37,43 mM olarak bulunmuştur. Katekol ve 4-metilkatekol substratları varlığında enzimin V_{maks} değeri sırası ile 2000 EU/mL ve 1428 EU/mL olarak hesaplanmıştır. Bilinen en etkili PFO inhibitörlerinden olan sitrik asitin yarışmalı ve L-sisteinin yarışmasız inhibisyon gösterdiği ifade edilmiştir (Lin vd., 2016).

Sultaniye üzümü (*Vitis vinifera* L.) polifenol oksidazı affinite kromatografisi kullanılarak %1,76 verimle 61,23 kat saflaştırılmıştır. Saf enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE elektroforezi ile 38,1 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin 4-metilkatekol substratı varlığında optimum sıcaklık değeri 30 °C ve optimum pH değeri 5,0 olarak bulunmuştur. Yine 4-metilkatekol substratı varlığında enzimin K_m ve V_{maks} değeri sırasıyla 4,8 mM ve 2000 EU/mL olarak hesaplanmıştır. Katekol substratı varlığında PFO'nun K_m ve V_{maks} değeri sırasıyla 18,3 mM ve 1666 EU/mL olarak belirlenmiştir. Na^+ iyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında, 1Mm'lık son konsantrasyonda enzim aktivitesinin %44,19' unu koruduğu, 10 mM da ise aktivitesinin %49,45' ini koruduğu rapor edilmiştir. K^+ , Mg^{+2} , Cu^{+2} ve Al^{+3} iyonlarının her iki konsantrasyonda da enzim aktivitesini ciddi derecede azalttığı gözlenmiştir. Özellikle 10 mM Cu^{+2} varlığında enzim aktivitesinin %99,16' sını kaybettiği gözlenmiştir. PFO enzimlerinin en yaygın ve en etkin inhibitörlerinden olan askorbik asit, sodyum bisülfid, sitrik asit ve benzoik asit için IC_{50} değeri sırası ile 0,0086; 0,286; 27,3 ve 7,75 mM olarak hesaplanmıştır. Askorbik asit ve benzoik asit inhibitörlerinin yarışmalı inhibisyon gösterdiği sodyum bisülfid ve sitrik asit inhibitörlerinin ise yarışmasız inhibisyon gösterdiği ifade edilmiştir (Kaya ve Bağcı, 2021).

Yapılan başka bir çalışmada, Afrika mangosu (*Irvingia gabonensis*) kabuğundan amonyum sülfat tuzu ile çöktürülen polifenol oksidaz enzimi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri kullanılarak, %20 verimle 685 kat saflaştırılmıştır. Toplam aktivitesi 973 U olarak belirlenen saf enzimin sipesifik aktivitesi ise 432 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Saf enzimin molekül ağırlığı 53,22 kDa olarak bildirilmiştir. Tirozin, vanilin, katekol, kafeik asit, kateşin, L-dopa, gallik asit, pirogallol ve tannik asit substratları içerisinde enzimin en yüksek aktiviteyi katekol varlığında gösterdiği tespit edilmiştir. Enzimin katekol için optimum pH değeri 7,0 optimum sıcaklık değeri ise 50 °C olarak rapor edilmiştir. Enzimin katekol, L-dopa ve tirozin substratları varlığında K_m değeri sırası ile 14,34 mM; 17,84 mM ve 20,32 mM olarak hesaplanmıştır. Enzimin katekol, L-dopa ve tirozin substratları varlığında V_{maks} değeri ise sırası ile 0,46 U/dak; 0,42 U/dak ve 0.39 U/dak olarak bulunmuştur (Adeseke vd., 2021).

Bravo ve Osorio (2016), altın çilek meyvesi polifenol oksidazını aseton ile çöktürüp kısmen saflaştırdıktan sonra, enzimin en çok ilgi duyduğu substratların klorojenik asit, 4-metilkatekol ve katekol olduğunu belirtmişlerdir. Klorojenik asit substratı için K_m ve V_{maks} değerleri sırasıyla 0,56±0,07 mM ve 53,15±2,03 U (mL⁻¹ min⁻¹) olarak verilmiştir. Klorojenik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları için, optimum sıcaklık değerlerini sırasıyla 20 °C; 25 °C ve 40 °C olarak bulmuşlardır. Optimum pH değeri klorojenik asit substratı için 5,0; 4-metilkatekol ve katekol substratları için ise 5,5 olarak hesaplamışlardır. İnhibisyon çalışmalarında en kuvvetli inhibitor askorbik asit ve onu takiben L-sistein ve quarsetin olarak bulunmuştur.

Rezene çekirdeği polifenol oksidazı, polivinilpolipirrolidon ile çöktürmenin ardından amonyum sülfat ile gradientli çöktürme uygulanarak %100 verimle 20 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 27,8 kDa olarak saptanmıştır. Enzimin çok ilgi duyduğu katekol, 4-teriyerbütül katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları için optimum sıcaklık değeri 30 °C, optimum pH değerinin ise 5,0 ile 7,0 arasında değiştiği bulunmuştur. Enzimin sodyum metabisülfid, askorbik asit, benzoik asit, L-sistein, β-merkaptöetanol, tiyoüre ve glutatyon inhibitörleri için katekol, 4-teriyerbütül katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol substratları varlığında K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Organik çözücülerin enzimlerin fizikokimyasal özelliklerini nasıl değiştirdiğini incelemek amacıyla asetonitril, aseton, etanol, methanol,

dimetilsülfoksit ve tetrahidrofuran çözücülerinin varlığında enzimatik aktivite ölçümleri yapılmıştır. Bu çözücüler içerisinde enzim aktivitesini en çok tetrahidrofuran varlığında kaybettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca Cu^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Ba^{+2} , Fe^{+2} , Cd^{+2} ve Al^{+3} iyonlarının 0,1 mM ve 5 mM'lık son konsantrasyonunda inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Özellikle Fe^{+2} , Cd^{+2} ve Al^{+3} iyonlarının 5 mM'lık son konsantrasyonunda enzimin ciddi derecede inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir (Karakuş vd., 2021).

Benaceur ve diğerleri (2020) çikolata mantarı (*Terfezia arenaria*) polifenol oksidazını, polivinilpolipirrolidon içeren tampon ile homojenize ettikten sonra amonyum sülfat ile çöktürmenin ardından iyon değişim kromatografisi ile %34 verimle, 59,1 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığı 67 kDa olarak hesaplanmıştır. En yüksek difenolaz aktivitesini katekol substratı varlığında gözlemişlerdir. 4-Metilkatekol, L-tirozin, pirogallol ve katekol substratları varlığında enzimin optimum sıcaklık değerini sırası ile 30 °C; 35 °C; 40 °C ve 45 °C olarak bulmuşlardır. 4-Metilkatekol, L-tirozin, pirogallol ve katekol substratları varlığında enzimin optimum pH değeri sırası ile 4,0; 6,0; 6,5 ve 7,0 olarak rapor etmişlerdir. Cu^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cd^{+2} ve Al^{+3} iyonlarının 2 mM ve 5 mM'lık son konsantrasyonunda ve katekol ve L-tirozin substratları varlığında inhibisyon çalışmaları yapmışlardır. 5 mM'lık Al^{+3} iyonlarının son konsantrasyonunda enzimin aktivitesinin %78'ini kaybettiğini bildirmişlerdir.

Saki ve diğerleri (2018) yabani bir mantar türü (*Lepiota procera*) PFO'sunu gradientli amonyum sülfat ile çöktürmenin ardından butanol ile tekrar çöktürerek %164 verimle 8,4 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile 35 kDa olarak hesaplanmışlardır. Enzimin L-dopa, kafeik asit ve 4-metilkatekol substratları için K_m değerini sırası ile 0,12 mM; 0,27 mM ve 0,46 mM olarak bulmuşlardır. Enzimin en çok ilgi duyduğu substrat olan L-dopa varlığında optimum sıcaklık değerini 40 °C, optimum pH değerini ise 7,0 olarak rapor etmişlerdir.

Erik (*Prunus domestica*) PFO'su sırası ile amonyum sülfat ile çöktürme, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak %3,04 verimle 32,81 kat saflaştırılmıştır. Saf PFO'nun molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 65 kDa olarak belirlenmiştir. Katekol, kateşin, 4-metilkatekol, klorojenik asit ve L-3-4-dihidroksi fenilalanin substratları varlığında oldukça etkin aktivite gösterdiği;

kafeik asit, ferulik asit, *p*-kumarik asit, *p*-kresol ve L-tirozin substratları varlığında aktivite sergilemediği gözlenmiştir. Enzimin klorojenik asit, kateşin, 4-metilkatekol, katekol ve L-dopa substratları için K_m değeri sırası ile 0,091 mM; 1,57 mM; 15,5 mM; 26,3 mM ve 77,5 mM olarak hesaplanmıştır. Enzimin klorojenik asit için optimum pH ve sıcaklık değeri sırası ile 6,0 ve 25 °C olarak belirlenmiştir. Enzimin pH 6,0' da 25 °C ile 65 °C değişen sıcaklık aralığında aktivitesini çok iyi koruduğu, yani oldukça kararlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca enzimin sodyum metabisülfid, sitrik asit, okzalik asit, askorbik asit, L-sistein, glisin, sodyum klorür ve EDTA inhibitörlerinin 0,5 mM; 5 mM ve 50 mM son konsantrasyonlarında inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. 50 mM askorbik asit varlığında enzim aktivitesinin %100' ünün, 50 mM L-sistein varlığında %99' unun, 50 mM sitrik asit varlığında %46' sının inhibe olduğu gözlenmiştir (Lonita vd., 2017).

Gül ve diğerleri (2017), semizotu (*Portulaca oleracea*) polifenol oksidazını amonyum sülfat ile çöktürmenin ardından jel filtrasyon kromatografisi yöntemini kullanarak %31,3 verimle 23,5 kat saflaştırmışlardır. Saf PFO'nun molekül ağırlığını 163 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin katekol substratı varlığında optimum pH ve sıcaklık değerini sırası ile 7,0 ve 50 °C olarak bulmuşlardır. Enzimin katekol, L-dopa ve 4-metilkatekol substratları için K_m ve V_{maks} değerini sırası ile 4,40 mM/5503 U_{dak}^{-1} ; 4,60 mM/1655 U_{dak}^{-1} ve 6,75 mM/4504 U_{dak}^{-1} olarak hesaplamışlardır. Polifenol oksidaz enziminin en etkili inhibitörlerinden olan askorbik asit, sitrik asit ve sodyum azit için K_i değerini sırası ile 0,36 mM; 4,47 mM ve 2,76 mM olarak hesaplamışlardır. Askorbik asit ve sodyum azidin yarışmasız, sitrik asitin ise karışık inhibisyon gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Peng ve diğerleri (2019), mor patates (*Dioscorea alata*) PFO'sunu iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemlerini kullanarak %3,54 verimle 4,58 kat saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını 32 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin en spesifik substratı olan katekol için K_m değerini 27,82 mmol/L, V_{maks} değerini ise 1,464 U_{dak} olarak hesaplamışlardır. Katekol substratı varlığında enzimin optimum pH değerini 6,0 optimum sıcaklık değerini ise 35 °C olarak bulmuşlardır. Ayrıca L-sistein den sonra en etkili inhibitörlerin sırası ile askorbik asit ve sodyum sülfid olduğunu bildirmişlerdir.

Yeşil elma (ekşi elma) olarak bilinen granny smith (*Malus domestica* Borkh.) membrane PFO'su amonyum sülfat ile çöktürmesinin ardından iyon değişim kromatografisi yöntemi ile %1,8 verimle 20,53 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı 65 kDa olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklığını 35 °C optimum pH değerini ise 7,0 olarak bulunmuştur. Enzimin 4-metilkatekol, katekol, klorojenik asit ve pirogallol substratı için K_m değeri sırasıyla 7,31 mM; 11,92 mM; 32,14 mM ve 53 mM olarak hesaplanmıştır (Han vd., 2020).

Fil ayağı bitkisi (*Amorphophallus corm*) polifenol oksidazı aseton ile çöktürmenin ardından iyon değişim kromatografisi yöntemi kullanılarak %3,9 verimle 5,54 kat saflaştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE jelinde 40 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin katekol substratı varlığında optimum sıcaklık değeri 35 °C, optimum pH değeri 6,0 olarak bulunmuştur. Enzimin katekol den sonra en çok ilgi duyduğu substratların sırası ile klorojenik asit, gallik asit ve pirogallol olduğu rapor edilmiştir. Katekol substratı için enzimin K_m ve V_{maks} değeri 17,56 mM ve 0,023 U/mL/dak olarak hesaplanmıştır. Ayrıca askorbik asit, sodyum azid, sodyum klorür, kalsiyum klorür, çinko sülfat ve EDTA varlığında inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan termodinamik çalışmalar sonucunda enzimin katalizlediği reaksiyonun kendiliğinden gerçekleşmediği, reaksiyonun endotermik olduğu ve ΔG değerinin sıfırdan büyük olduğu rapor edilmiştir (Singh ve Wadhwa, 2017).

Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum* L.) polifenol oksidazı ekstrakte edilerek kısmen saflaştırılmıştır. Enzimin optimum pH değerinin 6,1 ile 6,3 aralığında ve sıcaklık değerinin ise 25 °C ile 60 °C aralığında olduğu bulunmuştur. Enzimin en çok aktivite gösterdiği substratların katekolü takiben 4-metilkatekol, L-DOPA, D-Dopa, dopamin, pirogallol ve resorsinol olduğu rapor edilmiştir. Katekol substratı için enzimin K_m ve V_{maks} değeri sırası ile 15 mM ve 2,57 ΔA_{420} nm/dak olarak hesaplanmıştır. Benzoik asit, siringik asit, vanilik asit, sodyum benzoat, *p*-hidroksi benzoik asit, sinamik asit, kumarik asit, ferulik asit, askorbik asit, L-sistein, sodyum dietilditiyokarbamik asit, sodyum metabisülfid ve tiyoüre bileşiklerinin 0,2 mM; 1,0 mM ve 2,0 Mm'lık son konsantrasyonlarında inibisyon çalışmaları yapılmıştır. Askorbik asit, L-sistein, sodyum dietilditiyokarbamik asit ve sodyum metabisülfid in 2,0 Mm'lık son konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin %99'unun inhibe olduğu bildirilmiştir. Farklı bileşik grupları ile yapılan inhibisyon çalışmalarının sonucunda,

benzoik asit ve sinnamik asit türevi inhibitörlerin daha zayıf inhibisyon gösterdiği rapor edilmiştir (Siddiq ve Dolan, 2017).



2. ARAŞTIRMA

2.1. Materyal

Bu çalışmada enzim kaynağı olarak 2021 yılının Mart ayında, Antalya' nın Gazipaşa İlçesi'nden toplanan Bakla (*Vicia faba* L.) kullanıldı.

2.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Bu tez çalışmasında Shimadzu-UV-1601UV model spektrofotometre, Termo Scientific-Heraeus Multifugure X3R marka soğutmalı santrifürj ve Bio-RAD- Mini Protean Tetra Cell model elektroforez cihazı kullanıldı. Kimyasallar Sigma, Fluka, Carlo Erba ve Merck firmalarından temin edildi.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Bazı Çözeltiler

Tez çalışması kapsamında pH'sı 4,0 ve 5,0 olan 50 mM asetat tamponu, pH'sı 6,0 ve 7,0 olan 50 mM MOPS tamponu, pH'sı 8,0 olan 50 mM Tris-HCl tampon ve pH'sı 10,0 olan 50 mM Glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Polifenol oksidaz enziminin varlığını gözlemleyebilmek için %10'luk doğal poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı (Sambrook vd.,1989). Enzimin substrata olan ilgisini belirlemek amacı ile 4-metilkatekol, katekol, hidrokateik asit, L-tirozin, *p*-kumarik asit, epikateşin, kateşin, gallik asit ve kuarsetinin 100 mM lık çözeltileri hazırlandı. İnhibisyon çalışmalarında kullanmak üzere 1000 µM askorbik asit, 1000 µM sodyummetabisülfid, 1000 mM benzoik asit ve 1000 mM sodyum azid çözeltileri hazırlandı. Ekstraksiyon çözeltisi: 0,84 g sodyum asetat (50 mM), % 6 (a/h) TX-114 deterjanı, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ ve 1 mM PMSF 80 mL saf suda çözülüp 1 M asetik asit ile pH'sı 5,0'a ayarlanıp hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1. Ham Ekstraktın Hazırlanması

Antalya İli'nin Gazipaşa İlçesinden toplanan Bakla (*Vicia faba* L.) deneysel çalışmalar başlayana kadar $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de derin dondurucuda saklandı (Şekil 7). Baklanın 30 g'ı beher içersinde sıvı azot ile ozmotik şoka tabii tutuldu. Daha sonra, $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki 100 mL ekstraksiyon çözeltisi ilave edildi ve blender ile iyice parçalandı. Elde edilen karışım 4 katlı beyaz tülbentten süzüldü ve $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15,000 devir/dk da 30 dakika santrifüj edildi. PFO içeren üstteki sıvı kısım (süpernatant) biraraya toplandı ve proteinler yavaş yavaş soğuk aseton ilavesi ile buz banyosunda çöktürüldü. Proteinlerin iyice olgunlaşması için aseton-protein karışımı bir gece $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Santrifüj yoluyla aseton uzaklaştırıldı. Elde edilen protein pelleti tamponda çözülerek karakterizasyon çalışmalarında enzim kaynağı olarak kullanıldı.



Şekil 7. Çalışmada Kullanılan Bakla (*Vicia faba* L.)

2.2.2. Protein Tayini

Protein tayini litaretüre göre yapıldı (Lowry vd., 1951) ve protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) kullanıldı. Spektrofotometrede 650 nm'de örnek ve standart absorbansları okundu. Standart kalibrasyon grafiği çizilerek örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplandı.

2.2.3. Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Substrat Boyaması

Doğal PAGE %5'lik yığıma jeli ve %10'uk ayırma jeli Tablo 3'te verilen jel yükleme yöntemine göre elektrofrez tankına yüklendi (Sambrook vd.,1989). Yığıma

jeline yerleştirilen tarak ile birlikte jelin donması beklendi ve protein yüklemek için kuyucuklar hazır hale geldi (Tablo 1).

Tablo 1. Doğal-PAGE de kullanılan bileşenler ve oranları.

	%5'lik Yığıma Jeli Bileşenleri (mL)	%10' luk Ayırma Jeli Bileşenleri (mL)
Saf su	2,7	3,1
% 30 Akrilamid/bisakrilamid	0,67	3,3
1.0 M Tris (pH 6,8)	0,5	---
1. M Tris (pH 8,8)	---	2,5
% 10 APS	0,04	0,1
TEMED	0,004	0,004

2.2.4. Polifenol Oksidaz Aktivitesinin Tayini

PFO aktivitesi, spektrofotometrik olarak 4-metilkatekol için 496 nm'de ve diğer bütün substratlar için 500 nm'de absorbansta meydana gelen artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin vd., 2001). Aktivite ölçümleri için 30 µL enzim + 100 µL substrat (100 mM) + 100 µL MBTH (10 mM) + 10 µL DMF + 760 µL tampon (50 mM) çözelti ilave edilerek reaksiyon karışımının nihai hacmi 1000 µL olacak şekilde hazırlandı. Enzim içermeyen reaksiyon karışımı ise kör olarak kullanıldı. Absorbansdaki artışlar 1 dakika boyunca kaydedildi (Espin vd., 1997).

2.2.5. Bakla PFO'sunun Substrat Özgünlüğünün Belirlenmesi

Bakla PFO'sunun en çok ilgi duyduğu substratları belirlemek için katekol, 4-metilkatekol, epikateşin, kateşin, hidrokafeik asit, *p*-kumarik asit, L-tirozin, PHPPA, gallik asit ve kuarsetinin 100 mM'lık çözeltileri kullanıldı. Herbir substrat varlığında PFO aktivitesi ölçüldü ve 1 dakikada absorbansta meydana gelen değişimler U/mL cinsinden hesaplandı.

2.2.6. Bakla PFO Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Bakla PFO'sunun en yüksek aktivite sergilediği substratlar olan hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratı varlığında pH'sı 4,0 ile 10,0 aralığında değişen tampon çözeltiler kullanılarak enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri

belirlendi. Bu substratlar için elde edilen pH değeri sonraki çalışmalarda kullanıldı (Çolak vd., 2005). Reaksiyon karışımı aktivite tayininde olduğu gibi hazırlandı.

2.2.7. Bakla PFO Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Bakla PFO'sunun en yüksek aktivite gösterdiği substratlar olan hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratı varlığında, 10 °C'lik artışlarla, 20 °C ile 70 °C aralığında enzimin optimum sıcaklık değerini belirlemek için aktivite tayinleri yapıldı. Bu substratlar için elde edilen optimum sıcaklık değeri sonraki çalışmalarda kullanıldı (Çolak vd., 2005). Aktivite ölçümlerinde her bir sıcaklık değeri için; 30 µL enzim + 100 µL substrat (100 mM) + 100 µL MBTH (10 mM) + 10 µL DMF + 760µL tampon (50 mM) çözeltisi ilave edildi (Espin vd., 1997; Dinçer vd., 2002, Çolak vd., 2007).

2.2.8. Farklı Substratlar İçin Bakla PFO Kinetiğinin İncelenmesi

Bakla PFO'sunun en çok sevdiği substratlar olan hidrokafeik asit (0,25 mM - 10,0 mM), 4-metilkatekol (6,0 mM -40,0 mM) ve katekolün (4,0 mM -30,0 mM) farklı konsantrasyonlarında optimum şartlar altında 500 nm'de aktivite tayinleri yapıldı. 1/[S] değerlerine karşılık elde edilen 1/V (U/mg protein) değerleri grafiğe geçirildi ve elde edilen denklem vasıtası ile maksimum reaksiyon hızı (V_{maks}) ve Michaelis sabiti (K_m) belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934).

2.2.9. Bakla PFO'sunun Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Enzim optimum sıcaklığı olan 30 °C'de, 10 gün boyunca inkübe edildi ve her gün aynı saatte hidrokafeik asit varlığında PFO aktivitesi ölçümü yapıldı. Kalan yüzde PFO aktivitesi başlağıçtaki inkübe edilmemiş enzimle yapılan ölçümle kıyaslanarak hesaplandı.

2.2.10. Bakla PFO'sunun pH Kararlılığının İncelenmesi

Bakla PFO'su pH'sı 4,0 olan 50 mM asetat tamponu, pH'sı 7,0 olan 50 mM MOPS tamponu ve pH'sı 8,0 olan 50 mM tris-HCl tamponu ile 1:1 oranında karıştırılarak +4 °C'de toplam 10 gün boyunca inkübe edildi. Belirli aralıklarla hidrokafeik asit varlığında optimum şartlarda aktivite ölçümleri yapıldı ve başlağıçtaki aktiviteye oranla kalan % aktivite değerleri hesaplandı.

2.2.11. Bakla PFO'sunun Bazı İnhibitörlere Karşı Davranışının İncelenmesi

Bakla PFO'su üzerine yapılan inhibisyon çalışmasında; benzoik asit 50 mM ile 6,25 mM aralığında, askorbik asit 3,125 μ M ile 25 μ M aralığında, sodyum metabisülfid 200 μ M ile 25 μ M aralığında ve sodyum azid 200 mM ile 25 mM aralığındaki konsantrasyonlar da çalışıldı. Herbir inhibitör konsantrasyonu için inhibitör içeren ve içermeyen deney tüplerinin absorbans değerleri kaydedildi ve IC_{50} değeri (varolan enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) hesaplandı.

2.2.12. Bazı Metal İyonlarının Bakla PFO'su Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Optimum şartlarda ve hidrokafeik asit substratı varlığında 100 mM'lık Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının klorür tuzlarının Bakla PFO'sunun aktivitesi 1 mM, 5 mM ve 10 mM'lık nihai iyon konsantrasyonunda ölçüldü ve % kalan aktiviteler hesaplandı.

2.3. Bulgular

2.3.1. Bakla PFO'sunun Doğal Poliakrilamid Jel Elektrofrez (Doğal PAGE)

Hazırlanan enzim özütünde, polifenol oksidazın varlığı doğal elektrofrez jelinin L-dopa substrat çözltisi ile boyanması sonucu ortaya konuldu. Elektrofrez kromatogramında az tek altbirimden oluşan iki tane izoenzim olduğu tespit edildi (Şekil 8).



Şekil 8. Doğal PAGE elektrofrez.

2.3.2. Bakla PFO'sunun Aktivitesinin ve Substrat Özgünlüğünün Tayini

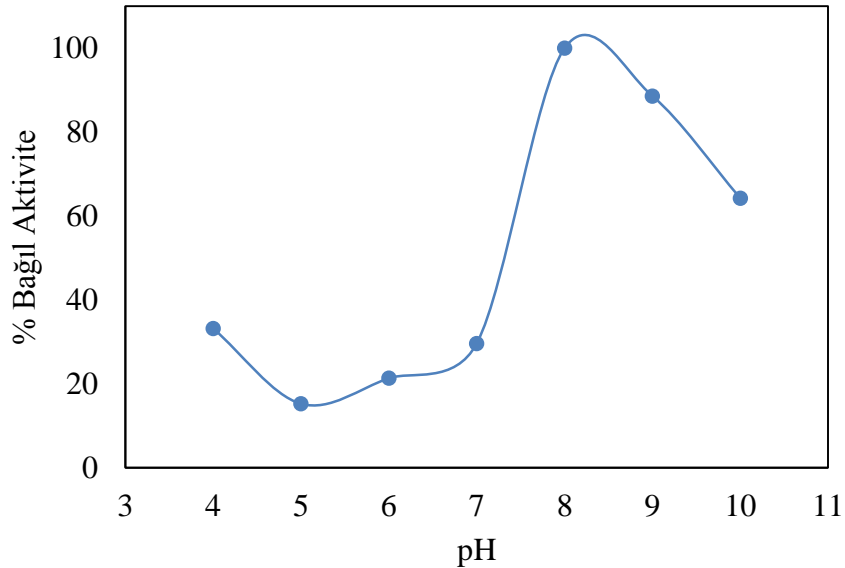
Bakla PFO'sunun en sevdiği substrat profilini belirlemek ve karakterize etmek amacıyla katekol, 4-metilkatekol, epikateşin, kateşin, hidrokafeik asit, *p*-kumarik asit, L-tirozin, PHPPA, gallik asit ve kuarsetin substratları varlığında yapılan aktivite ölçümlerinden kaydedilen absorban değerleri ünite (U/mL.dak) cinsinden hesaplandı (Tablo 2). 1 dakikada absorbansta 0,01 birimlik artışa neden olan enzim miktarı 1 U olarak tanımlandı (Batista vd., 2014; Baltaş., 2017; Baltaş vd., 2017)

Tablo 2. Bakla PFO' sunun farklı substratlar varlığında ölçülen aktivite değerleri (U/mL.dak).

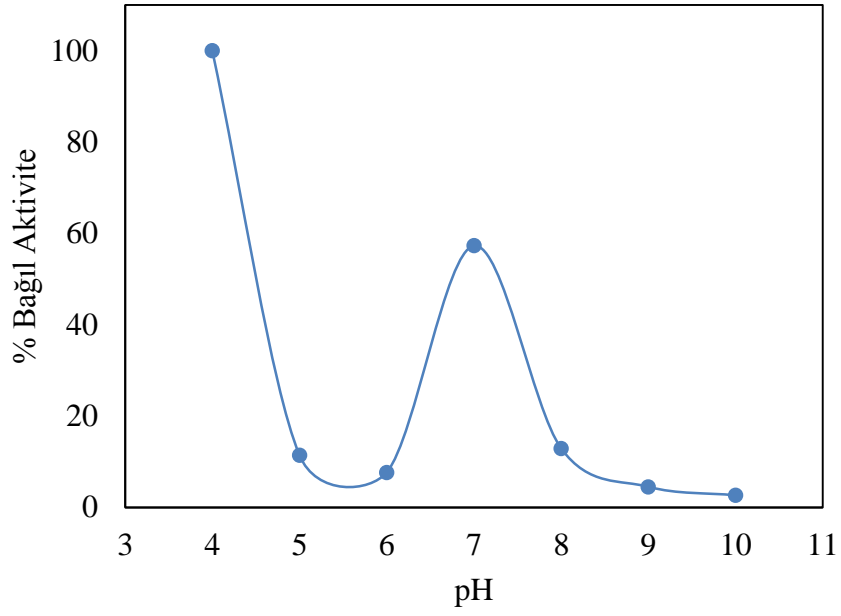
Substrat	Aktivite (U/mL.dak)
<i>p</i> -Kumarik asit	-
Hidrokafeik asit	1573
4-Metilkatekol	1143
Katekol	940
Kuarsetin	30
L-Tirozin	7
PHPPA	-
Gallik asit	-
Kateşin	-
Epikateşin	-

2.3.3. Bakla PFO'su Üzerine pH' ın Etkisi

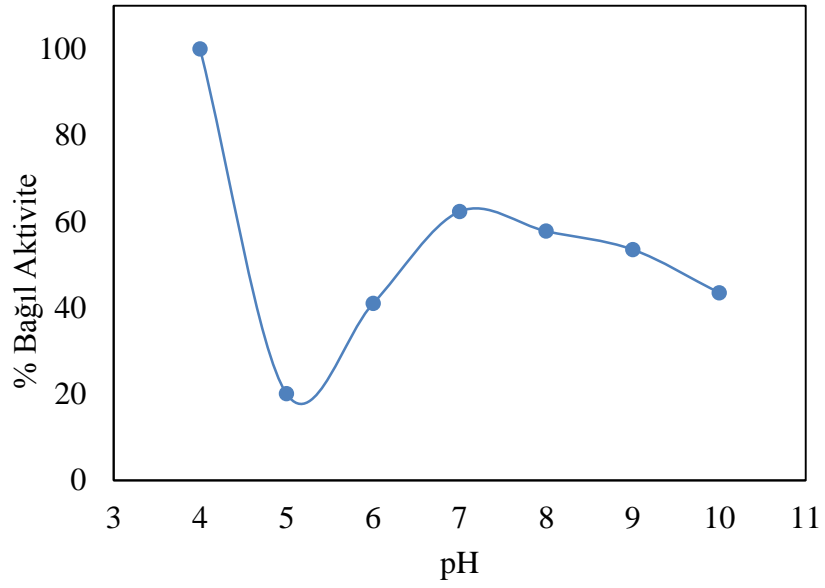
Bakla PFO'sunun hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları varlığında en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için pH'sı 4,0 ile pH 10,0 aralığında değişen tampon çözeltiler kullanıldı. Çizilen pH - % bağıl aktivite grafiklerine bakıldığında, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri hidrokafeik asit için 8,0; katekol ve 4-metilkatekol için 4,0 olarak belirlendi (Şekil 9-11).



Şekil 9. Bakla PFO'su üzerine hidrokafeik asit varlığında pH'ın etkisi.



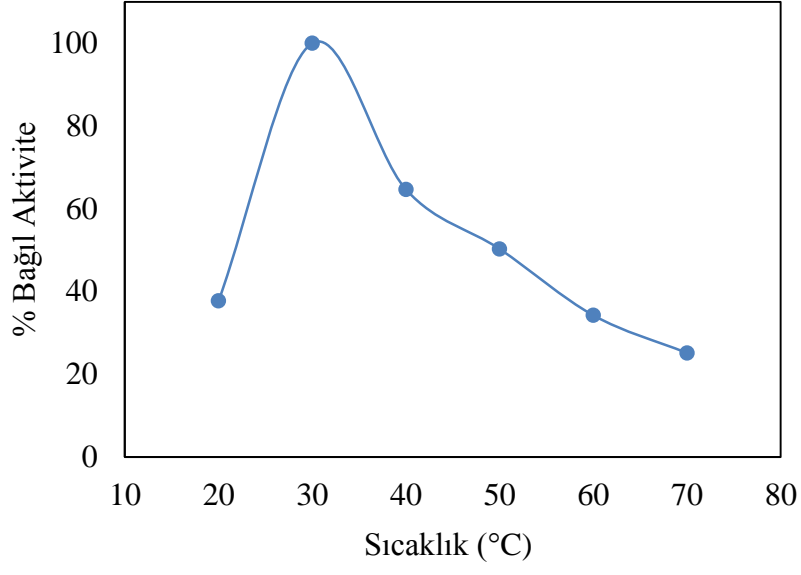
Şekil 10. Bakla PFO'su üzerine 4-Metilkatekol varlığında pH'ın etkisi.



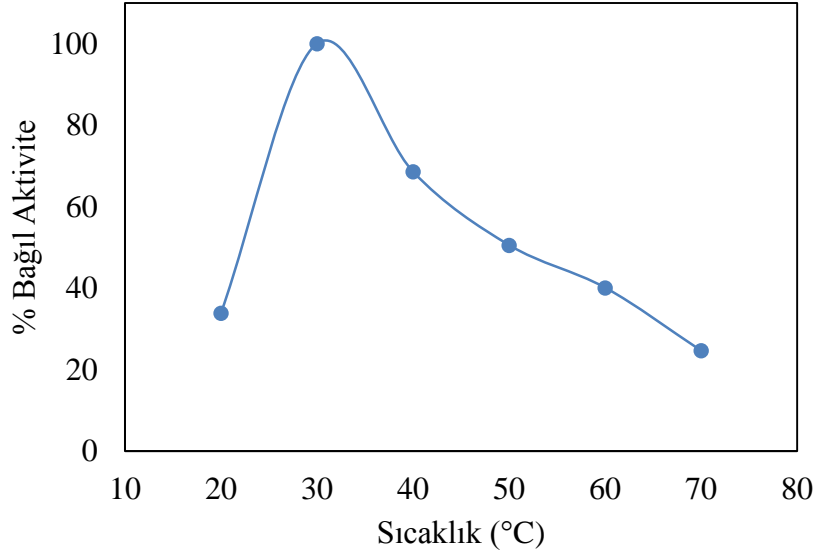
Şekil 11. Bakla PFO'su üzerine katekol varlığında pH'ın etkisi.

2.3.4. Bakla PFO'su Üzerine Sıcaklığın Etkisi

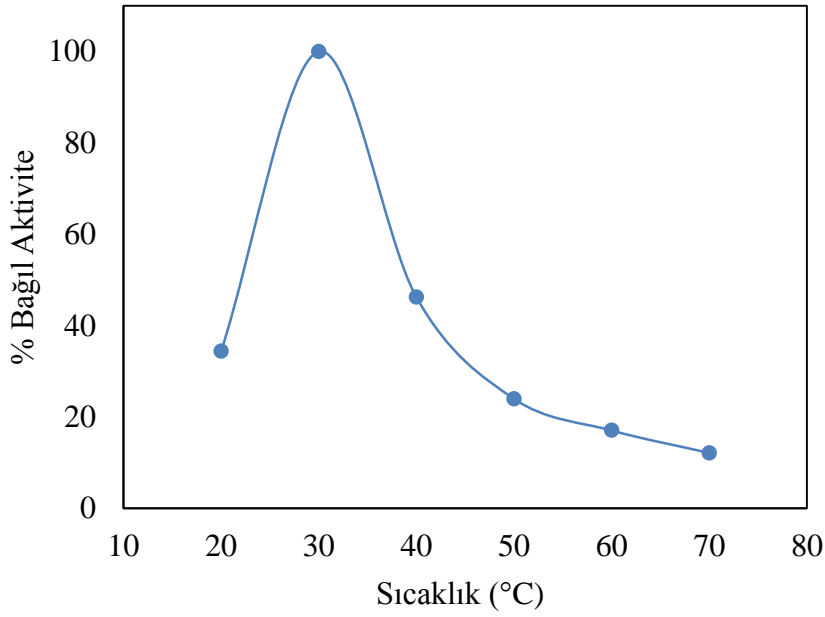
Bakla PFO'sunun hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları için, 20 °C ile 70 °C sıcaklık aralığında yapılan aktivite ölçümleri sonucunda, herbir substrat için optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak belirlendi (Şekil 12-14).



Şekil 12. Bakla PFO'su üzerine hidrokafeik asit varlığında sıcaklığın etkisi.



Şekil 13. Bakla PFO'su üzerine 4-metilkatekol varlığında sıcaklığın etkisi.



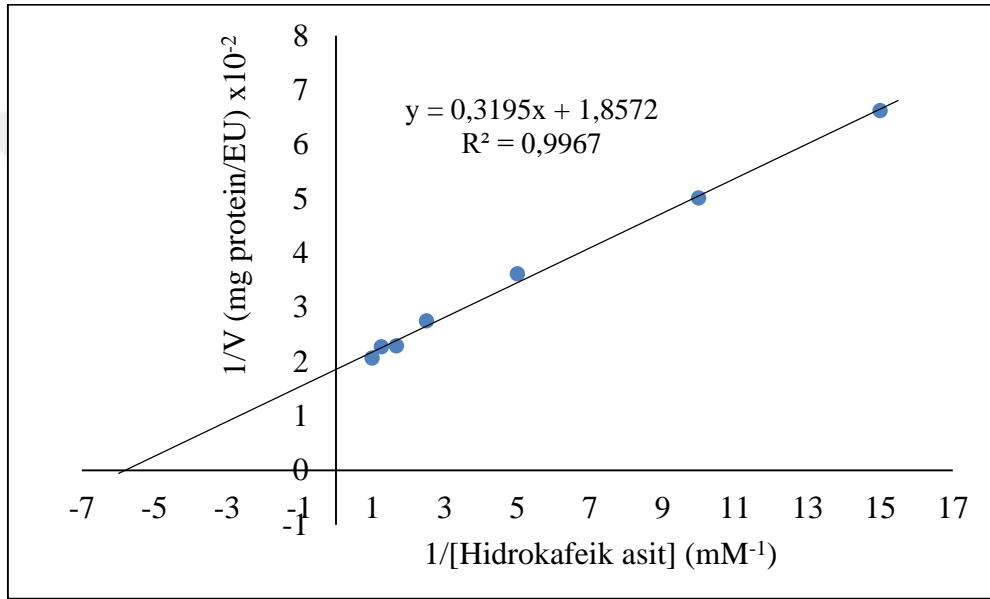
Şekil 14. Bakla PFO'su üzerine katekol varlığında sıcaklığın etkisi.

2.3.5. Bakla PFO'su Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

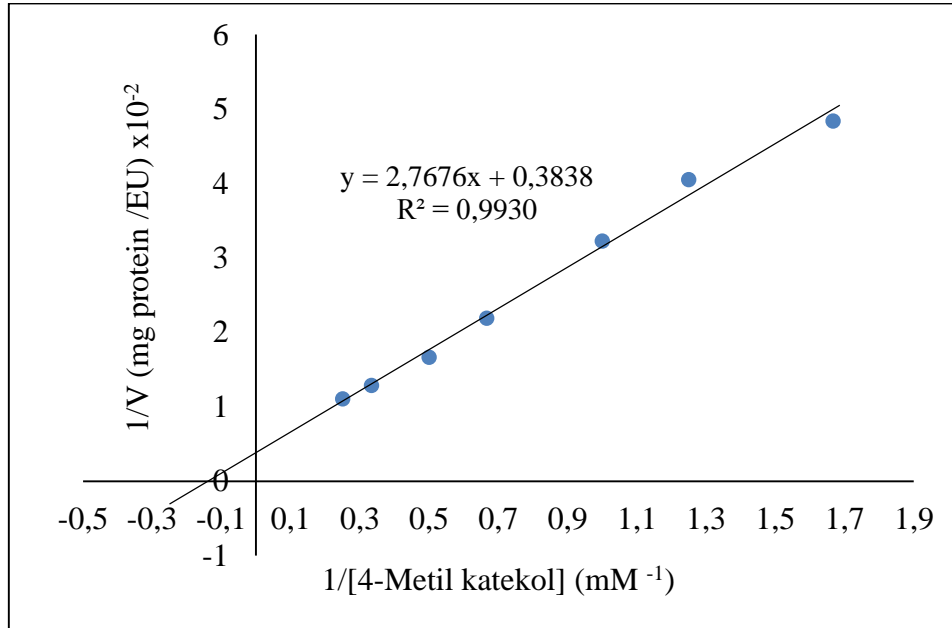
Bakla PFO'suna ait kinetik verilerin belirlenmesi amacı ile, hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratlarının değişen konsantrasyonlarında ve herbir substratın optimum reaksiyon şartlarında aktivite çalışmaları yapıldı. Michaelis-Menten kinetiğine uyan ölçüm sonuçları kullanılarak çizilen Lineaweaver-Burk grafiği yardımıyla her bir substrat için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{maks}) hesaplandı. K_m ve V_{maks} değerleri, hidrokafeik asit için 0,172 mM; 538,445 U/mg protein (Şekil 15), 4-metilkatekol için 7,133 mM; 260,552 U/mg protein (Şekil 15) ve katekol için 9,158 mM; 117,398 U/mg protein (Şekil 17) olarak hesaplandı. V_{maks}/K_m oranlarına bakıldığında enzimin substrat affinitesini çoktan aza doğru hidrokafeik asit > 4-metil katekol > katekol şeklinde sıralayabiliriz (Tablo 3).

Tablo 3. Bakla PFO'sunun farklı substratlar varlığında elde edilen optimum pH, optimum sıcaklık değerleri ve kinetik parametreleri.

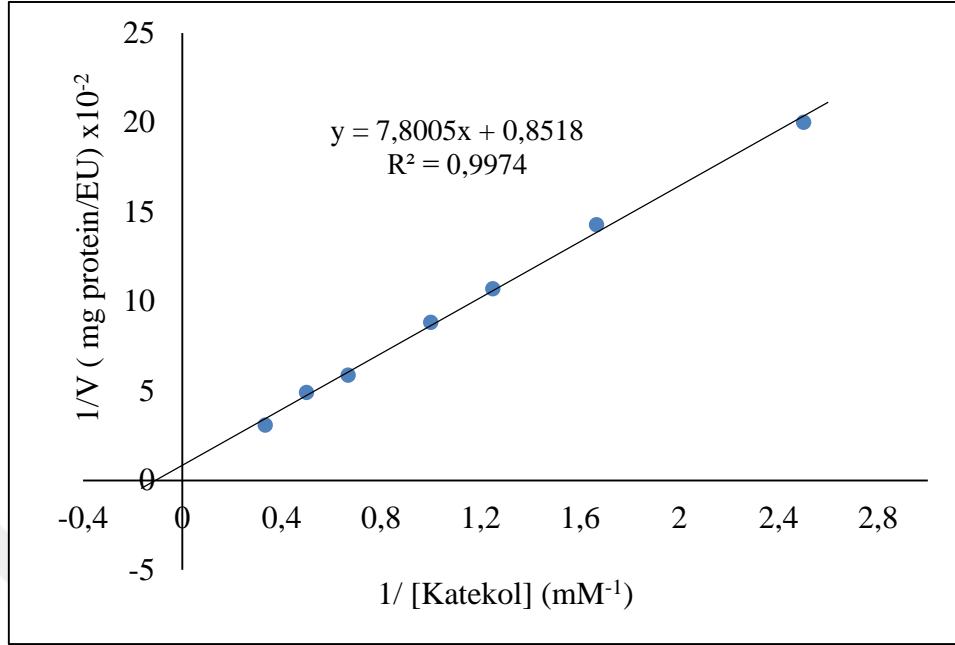
Substrat	pH	Sıcaklık (°C)	K_m (mM)	V_{maks} (U/mg protein)
Hidrokafeik asit	8,0	30	0,172	538,445
4-Metilkatekol	4,0	30	7,133	260,552
Katekol	4,0	30	9,158	117,398



Şekil 15. Hidrokafeik asit substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi



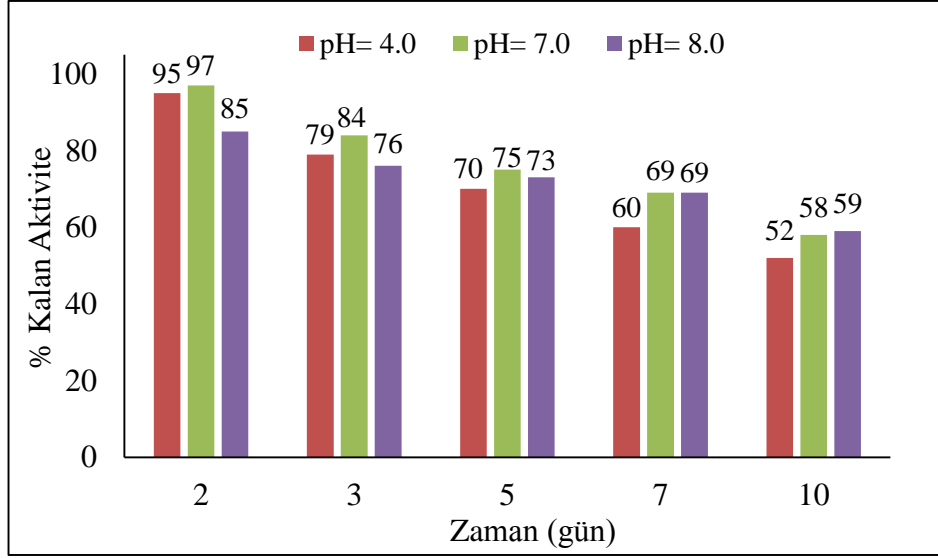
Şekil 16. 4-Metilkatekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.



Şekil 17. Katekol substratı varlığında Lineweaver-Burk eğrisi.

2.3.6. Bakla PFO'sunun pH Kararlılığının İncelenmesi

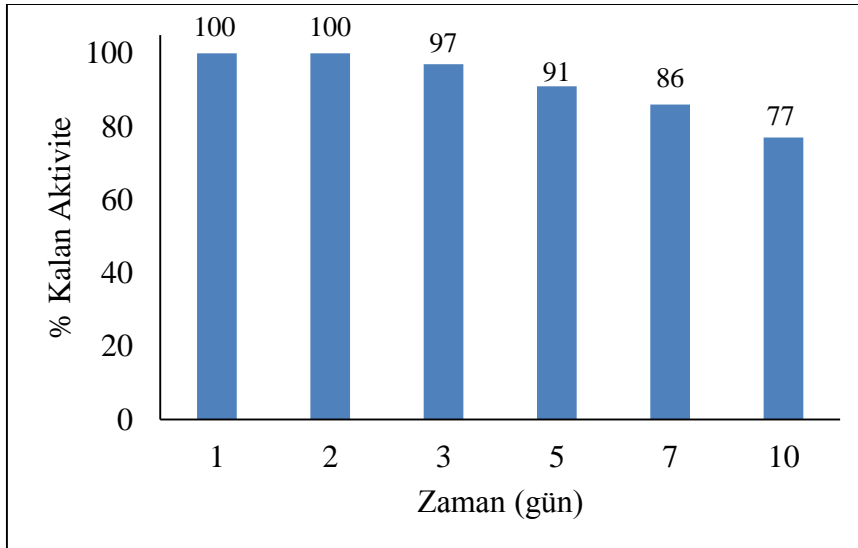
Enzimin pH kararlılık çalışmasında, +4 °C' de inkübe edilen enzim-tampon karışımlarında, optimum şartlar altında ve hidrokafeik asit substratı varlığında aktivite ölçümleri yapıldı. 2 gün sonunda pH 4,0'de enzim aktivitesinin % 95' ini, pH 7,0' de % 97' sini ve pH 8,0'de ise % 85'ini koruduğu gözlemlendi. 10. günün sonunda ise, pH 4,0' te enzim aktivitesinin % 52'sini, pH 7,0'da % 58'ini ve pH 8,0'de ise % 59'unu koruduğu kaydedildi (Şekil 18).



Şekil 18. Bakla PFO'sunun +4 °C' deki pH kararlılığının zamana göre değişimi.

2.3.7. Bakla PFO'sunun Isıl Kararlılığının İncelenmesi

Isıl kararlılık çalışmasında 30 °C'de 10gün boyunca inkübe edilen enzimin aktivite ölçümleri hergün aynı saatte hidrokafeik asit substratı varlığında ve optimum şartlarda yapıldı. Ölçüm sonuçları incelendiğinde 2.ci günün sonunda enzimin aktivitesinin tamamını, 5.ci gün bittiğinde % 86' sını ve 10 günün sonunda % 77' sini koruduğu gözlemlendi (Şekil 19).



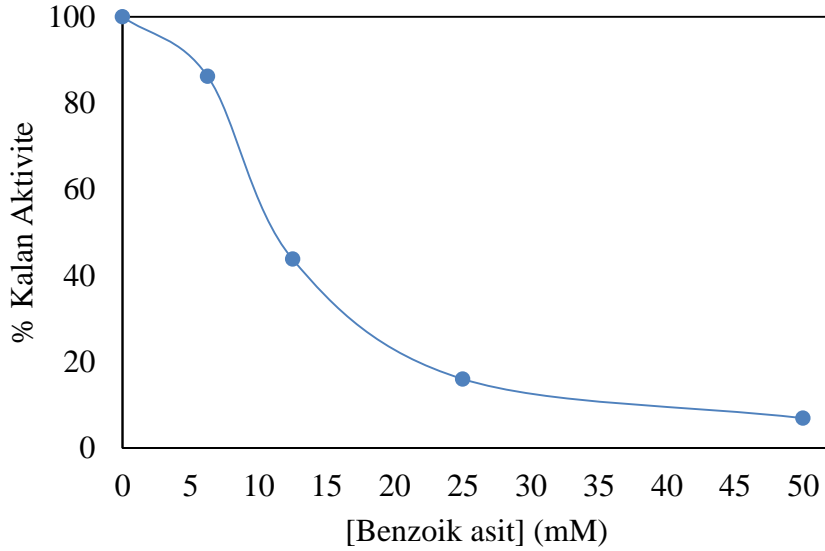
Şekil 19. Bakla PFO' sunun 30 °C'de ısıl kararlılığının zamana göre değişimi.

2.3.8. Bazı İnhibitörlerin Bakla PFO'su Üzerine Etkisi

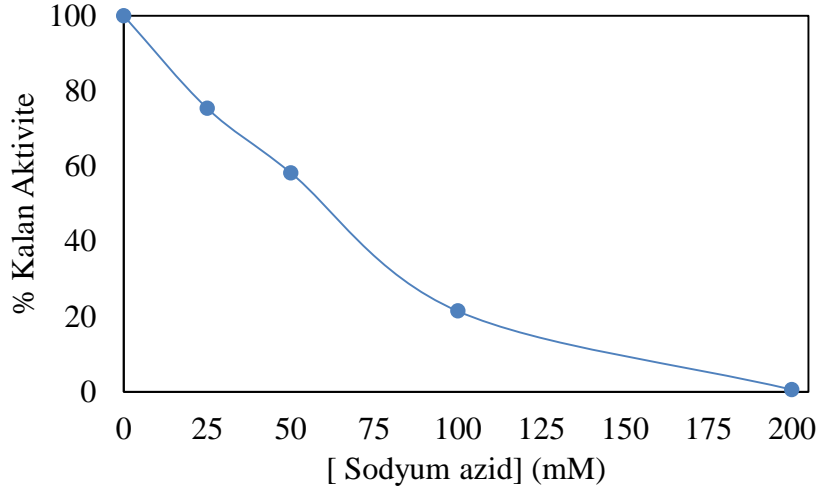
PFO'nun en yaygın inhibitörlerinden olan benzoik asit (50 mM -6,25 mM), askorbik asit (3,125 μ M -25 μ M), sodyum metabisülfid (200 μ M -25 μ M) ve sodyum azid (200 mM -25 mM) varlığında hidrokafeik asit substratı kullanılarak inhibisyon çalışmaları yapıldı ve IC_{50} değerleri hesaplandı (Şekil 20-23). IC_{50} değeri 8,25 μ M olan askorbik asit varlığında en kuvvetli inhibisyon gözlemlendi (Tablo 4).

Tablo 4. Bakla PFO aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi.

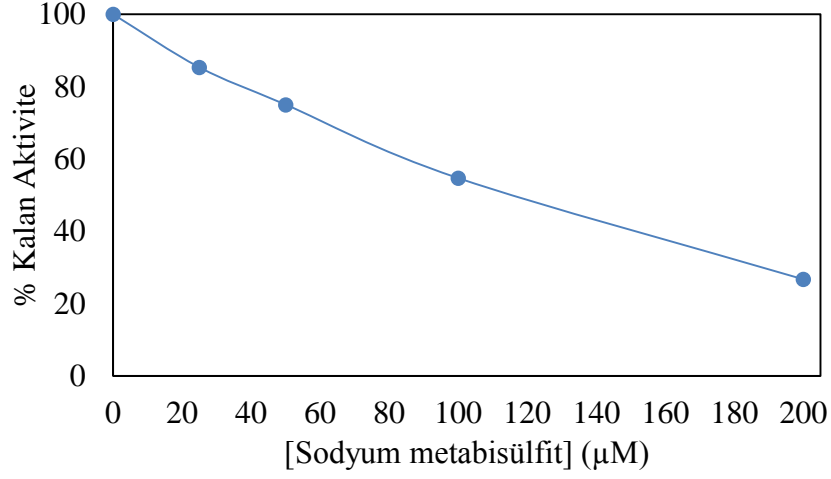
İnhibitör	IC_{50}
Sodyum metabisülfid	116,00 μ M
Askorbik asit	8,25 μ M
Sodyum azid	60,00 mM
Benzoik asit	11,00 mM



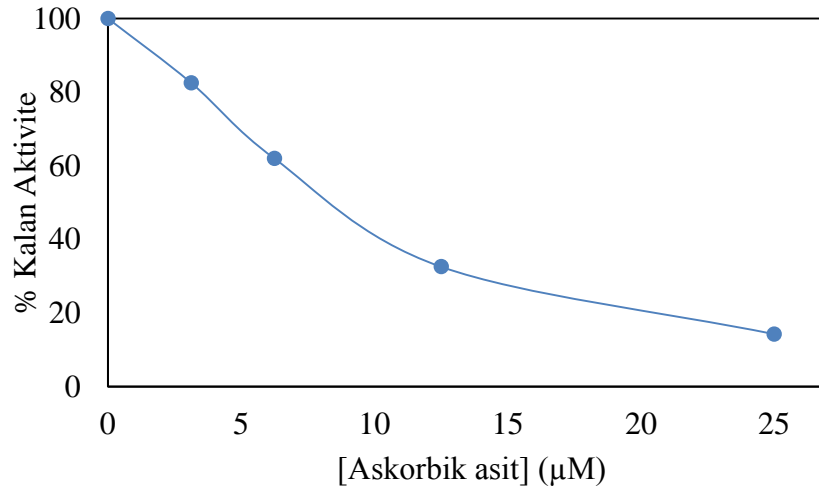
Şekil 20. PFO'nun benzoik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.



Şekil 21. PFO'nun sodyum azid inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.



Şekil 22. PFO'nun sodyum metabisülfıt inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.



Şekil 23. PFO'nun askorbik asit inhibisyonundan sonra % kalan aktivitesi.

2.3.9. Bazı Metal İyonlarının Bakla PFO'su Üzerine Etkisi

Bakla PFO aktivitesi üzerine hidrokafeik asit substratı varlığında bazı metal iyonlarının etkisini incelemek amacıyla, Na⁺, K⁺, Ba⁺², Mg⁺², Mn⁺², Hg⁺², Ni⁺², Cu⁺², Ca⁺² ve Fe⁺² iyonlarının 1 mM, 5 mM ve 10 mM'lık son konsantrasyonlar da çalışıldı. Hidrokafeik asit substratı varlığında, metal katyonlarının 1 mM'lık nihai konsantrasyonda enzimi inhibe etmedikleri gözlemlendi (Tablo 5). 5 mM'lık iyon konsantrasyonunda ise, Ni⁺² iyonu varlığında enzim aktivitesinin % 24,47'sinin inhibe olduğu gözlemlendi. 5 mM'lık son konsantrasyonda Fe⁺², Ba⁺² ve Ni⁺² iyonlarının enzim aktivitesini sırasıyla % 19,78; %38,48 ve % 65,11 inhibe ettikleri gözlemlendi (Tablo 5).

Tablo 5. Bazı metal iyonlarının PFO aktivitesi üzerine etkisi.

Metal iyonları	Bağıl Aktivite (%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
Kontrol	100	100	100
Na ⁺	134,17	90,647	91,01
K ⁺	135,61	100,71	91,73
Ca ⁺²	138,12	99,640	96,04
Ba ⁺²	137,76	111,15	38,48
Ni ⁺²	126,25	75,539	65,11
Cu ⁺²	106,11	93,525	86,33
Mg ⁺²	136,33	111,15	98,56
Fe ⁺²	99,280	86,330	19,78

3. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan tez çalışmasında, bakla polifenol oksidazı doğal poliakrikamid jel elektroforezinde görüntülendi. Substrat sipesifitesi, optimum sıcaklık, optimum pH, enzimin kinetik parametrelerinin belirlenmesi ve inhibisyon çalışmaları yapılarak kısmen saflaştırılan enzimin biyokimyasal özellikleri karakterize edildi. PFO bulunduğu canlıya ve canlının yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişik biyokimyasal özelliklere sahip olabilir ve bu özellikler enzimden enzime farklılık gösterebilir.

Enzimin doğal PAGE jelinde L-dopa ile boyandıktan sonra en az tek alt birimden oluşan iki tane izoenzimin varolduğu gözlemlendi (Şekil 10). Birden fazla izoenzime sahip olan PFO birçok çalışmada mevcuttur. Özellikle son altı yıl içerisinde yapılmış olan PFO enzimlerinin saflaştırma ve biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları incelendiğinde, *Pyrus Elaeagnifolia* yabani armutu PFO' sunun iki (Baltaş, 2017), yabani erik (*Prunus spinosa* L. Subsp. Daspylla) PFO' sunun altı (Baltaş vd., 2017), tarçın elması (*Annona muricata* L.) PFO' sunun iki (Palma-Orozco vd., 2019), hurma meyvesi PFO' sunun dört (Navarro vd., 2014) ve mango meyvesi (*Magnifera indica* cv. Manila) PFO' sunun üç tane izoenziminin (Cheema ve Sommerhater, 2015) olduğu rapor edilmiştir.

Bakla PFO' sunun en çok ilgi duyduğu substratları en çok aktivite gösterdiğinden en az aktivite gösterdiğine doğru sıralayacak olursak; hidrokafeik asit, 4-metilkatekol, katekol, kuarsetin ve L-tirozin şeklinde yazabiliriz (Tablo 2). En yüksek aktivite gösterdiği substrat çeşidine bakıldığında bakla PFO' sunun difenolaz aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Literatüre bakıldığında difenolaz aktivitesine sahip PFO içeren sebze ve meyve örneklerine oldukça sık rastlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda, yabani armut (*Pyrus Elaeagnifolia*) PFO' sunun 4-metilkatekol varlığında (Baltaş, 2016), yabani erik (*Prunus spinosa*) PFO' sunun 4-metilkatekol ve katekol varlığında (Baltaş vd., 2017), *Diospyros lotus* PFO' sunun 4-metilkatekol varlığında (Faiz ve Baltaş., 2017), çay yaprağı PFO' sunun katekol (Öztürk vd., 2020), tarçın elması (*Annona muricata*) PFO' sunun hidrokafeik (Palma-Orozco vd., 2019), sultaniye üzümü (*Vitis vinifera* L.) PFO' sunun 4-metilkatekol (Kaya ve Bağcı., 2021), afrika mangosu (*Irvinga gabonensis*) PFO' sunun tirozin (Adeseke vd., 2021), semizotu PFO' sunun katekol (Gül vd., 2017), maviyemiş (*Vaccinum corymbosum* L.) PFO' sunun katekol ve 4-metilkatekol (Siddiq ve Dolan, 2017) ve yeşil elma PFO' sunun 4-metilkatekol

substratı varlığında (Han vd., 2020) en çok aktivite gösterdikleri bildirilmiştir. Difenolaz aktivitesi gösteren Bakla PFO'su için elde edilen bu verilerin, hem enzimin küçük substrat bağlama bölgesine sahip olduğunu hemde 4-metil katekol, katekol ve kafeik asit gibi küçük moleküler ağırlıklı *o*-difenollerin etkili substratlar olduklarını gösteren sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir (Baltaş vd., 2017; Faiz ve Baltaş., 2017; Öztürk vd., 2020; Kaya ve Bağcı., 2021; Adeseko vd., 2021; Gül vd., 2017; Han vd., 2020).

Bakla PFO'su üzerine pH'ın etkisi incelendiğinde, enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri hidrokafeik asit için 8.0; katekol ve 4-metilkatekol için 4.0 olarak belirlendi (Şekil 9-11). Literatürde PFO enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 3,0 ile 9,0 aralığında değişmektedir. Yabani bir erik türü olan *Prunus spinosa* L. subsp. *dasphylla* PFO' sunun 4-metilkatekol, katekol, kafeik asit, kateşin ve epikateşin substratı varlığında enzimin optimum pH değeri sırası ile 7,0; 7,0; 4,0-6,0; 5,0 ve 5,0 olarak tespit edilmiştir (Baltaş vd., 2017). Yapılan çalışmalarda, *Pyrus elaeagnifolia* L. PFO'sunun 4- metilkatekol substratı için optimum pH değeri 7.0 (Baltaş, 2017), çay yaprağı PFO'sunun katekol substratı varlığında optimum pH değeri 9,0 (Öztürk vd., 2020), tarçın elması (*Annona muricata*) PFO'sunun katekol substratı varlığında optimum pH değeri 6,5 (Palma-Orozco vd., 2019) ve çin maydonozu PFO'sunun katekol ve 4-metilkatekol substratları varlığında enzimin optimum pH değeri ise sırası ile 7,0 ve 8,0 olarak bulunmuştur (Lin vd., 2016). Sultaniye üzümü (*Vitis vinifera* L.) PFO'sunun 4-metilkatekol substratı varlığında optimum pH değeri 5,0 (Kaya ve Bağcı., 2021), afrika mangosu (*Irvinga gabonensis*) PFO'sunun katekol substratı varlığında optimum pH'sı 7,0 (Adeseko vd., 2021) ve rezene çekirdeği PFO'sunun katekol substratı varlığında optimum pH değerinin 5,0 ile 7,0 aralığında değiştiği (Karakuş vd., 2021) rapor edilmiştir. Benaceur ve diğerleri (2020) çikolata mantarı (*Terfezia arenaria*) polifenol oksidazının 4-Metilkatekol, L-tirozin, pirogallol ve katekol substratları için optimum pH değerini sırası ile 4,0; 6,0; 6,5 ve 7,0 olarak bulmuşlardır. Peng ve diğerleri (2019), mor patates (*Dioscorea alata*) polifenoloksidazının katekol substratı varlığında optimum pH değerini 6,0 olarak hesaplamışlardır.

Hidrokafeik asit, 4-metilkatekol ve katekol substratları varlığında bakla PFO'sunun optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak belirlendi (Şekil 12-14). Yabani armut PFO'sunun 4-metilkatekol substratıyla 30 °C'de (Baltaş, 2017), fil ayağı bitkisi (*Amorphophallus corm*) PFO'sunun katekol substratıyla 35 °C'de (Singh ve Wadhwa, 2017), mor patates (*Dioscorea alata*) PFO'sunun katekol substratıyla 35 °C'de (Peng vd., 2019) ve semizotu (*Portulaca oleracea*) PFO'sunun katekol substratıyla 50 °C'de (Gül vd., 2017) en yüksek difenolaz aktivitesi gösterdikleri rapor edilmiştir. Saki ve diğerleri (2018) yabani mantar (*Lepiota procera*) PFO'sunun L-dopa varlığında optimum sıcaklık değerini 40 °C bulmuşlardır. Benaceur ve diğerleri (2020) 4-metilkatekol, L-tirozin, pirogallol ve katekol substratları varlığında çikolata mantarı (*Terfezia arenaria*) PFO'sunun optimum sıcaklığını sırası ile 30 °C, 35 °C, 40 °C ve 45 °C olarak rapor etmişlerdir. Sultaniye üzümü (*Vitis vinifera* L.) PFO'sunun 4-metilkatekol substratı varlığında optimum sıcaklığının 30 °C (Kaya ve Bağcı., 2021), afrika mangosu (*Irvingia gabonensis*) PFO'sunun katekol substratı için 50 °C (Adeseko vd., 2021) ve tarçın elması (*Annona muricata*) PFO'sunun katekol substratı için 25 °C (Palma-Orozco vd., 2019) olduğu bildirilmiştir.

Bakla PFO'sunun K_m (mM) ve V_{maks} (U/mg protein) değeri, hidrokafeik asit için 0,172 mM, 538,445 U/mg protein (Şekil 15), 4-metilkatekol için 7,133 mM, 260,552 U/mg protein (Şekil 16) ve katekol için 9,158 mM; 117,398 U/mg protein (Şekil 17) olarak hesaplandı. Her bir substratın kendi V_{maks} (U/mg protein) değeri K_m (mM) değerine oranlandığında, bakla PFO'sunun substrat ilgisini hidrokafeik asit > 4-metilkatekol > katekol şeklinde sıralayabiliriz (Tablo 3). *Prunus spinosa* L. PFO'sunun K_m ve V_{maks} değeri 4-metilkatekol substratı varlığında 0,97 mM; 4753 U/mg protein, katekol varlığında 2,35 mM; 3964 U/mg protein, kafeik asit varlığında 2,49 mM; 7628 U/mg protein, kateşin varlığında 4,26 mM; 1686 U/mg protein ve epikateşin varlığında ise 6,04 mM; 2093 U/mg protein olarak hesaplanmıştır (Baltaş vd., 2017). *Pyrus eleagnifolia* PFO'sunun 4-metilkatekol substratı varlığında K_m ve V_{maks} değeri sırasıyla, 3,57 mM ve 4781 U/mg protein olarak saptanmıştır (Baltaş., 2017). Yabani hurma (*Diospyros lotus* L.) PFO'sunun 4-metilkatekol substratı için K_m ve V_{maks} değeri sırası ile 3,8 mM ve 1250 U/mg protein olarak bildirilmiştir (Faiz ve Baltaş., 2017). Çay (*Camellia sinensis*) yaprağı PFO'sunun katekol ve 4-metilkatekol substratı için K_m değeri sırası ile 3,782 mM ve 3,881 mM olarak

bildirilmiştir. Aynı substratlar için V_{maks} değeri sırası ile 1,676 $\mu\text{mol/L}$ ve 1,912 $\mu\text{mol/L}$ olarak rapor edilmiştir (Öztürk vd., 2020). Tarçın elması (*Annona muricata* L.) PFO'sunun kafeik asit, 4-metil katekol, trihidroksifenol ve katekol substratları varlığında K_m değerini sırası ile 0,47 mM; 0,86 mM; 1,42 mM ve 3,16 mM olarak hesaplamışlardır. 4-metilkatekol, katekol, trihidroksifenol ve kafeik asit substratları için V_{maks}/K_m ($\text{U mM}^{-1} \text{dak}^{-1}$) değerini sırası ile 1067; 866; 631 ve 385 olarak bulmuşlardır (Palma-Orozco vd., 2019). Bununla birlikte sultaniye üzümü (*Vitis vinifera* L.) polifenol oksidazının 4-metilkatekol substratı için K_m ve V_{maks} değeri sırasıyla 4,8 mM ve 2000 EU/mL olarak hesaplanmıştır (Kaya ve Bağcı, 2021). Afrika mangosu (*Irvingia gabonensis*) kabuğu PFO'sunun katekol, L-dopa ve tirozin substratları varlığında K_m değeri sırası ile 14,34; 17,84 ve 20,32 mM, V_{maks} değeri ise sırası ile 0,46; 0,42 ve 0,39 U/dak olarak rapor edilmiştir (Adeseke vd., 2021). Yabancı mantar (*Lepiota procera*) PFO'sunun L-dopa, kafeik asit ve 4-metilkatekol substratları için K_m değeri sırası ile 0,12; 0,27 ve 0,46 mM olarak hesaplanmıştır (Saki vd., 2018). Erik (*Prunus domestica*) polifenol oksidazının klorojenik asit, kateşin, 4-metilkatekol, katekol ve L-dopa substratları için K_m değeri sırası ile 0,091 mM; 1,57 mM; 15,5 mM; 26,3 mM ve 77,5 mM olarak hesaplanmıştır (Lonita vd., 2017). Semizotu (*Portulaca oleracea*) PFO'sunun katekol, L-dopa ve 4-metilkatekol substratları için K_m ve V_{maks} değerleri sırası ile 4,40 mM/5503 Udak^{-1} ; 4,60 mM/1655 Udak^{-1} ve 6,75 mM/4504 Udak^{-1} olarak hesaplanmıştır (Gül vd., 2017). Yeşil elma (*Malus domestica* Borkh.) PFO'sunun 4-metilkatekol, katekol, klorojenik asit ve pirogallol substratı için K_m değeri sırasıyla 7,31 mM; 11,92 mM; 32,14 mM ve 53 mM olarak hesaplamışlardır (Han vd., 2020). Fil ayağı bitkisi (*Amorphophallus corm*) polifenol oksidazının katekol substratı varlığında K_m ve V_{maks} değeri 17,56 mM ve 0,023 U/mL/dak olarak bulunmuştur (Singh ve Wadhwa, 2017). Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum* L.) PFO'sunun katekol substratı için K_m ve V_{maks} değeri 15 mM ve 2,57 $\Delta\text{A420 nm/dak}$ olarak rapor edilmiştir (Siddiq ve Dolan, 2017).

Bakla PFO'sunun pH kararlılığını incelemek için enzimin optimum pH'sı olan 4,0 ve 8,0 ile fizyolojik pH'ya yakın pH 7,0'de hazırlanan enzim-tampon karışımları +4 °C' de inkübe edilerek 2, 3, 5, 7 ve 10. cu günün sonunda optimum şartlar altında aktivite ölçümleri yapıldı. 2. günün sonunda pH 4,0'te enzim aktivitesinin % 95' ini, pH 7,0' de % 97' sini ve pH 8,0'de ise % 85'ini koruduğu gözlemlendi. 5.ci günün sonunda

pH 4,0'de enzim aktivitesinin % 70' ini, pH 7,0' de % 75' ini ve pH 8,0'de ise % 73'ünü koruduğu gözlemlendi (Şekil 18). 10. cu gün bittiğinde ise, pH 4,0' te enzim aktivitesinin % 52'sini, pH 7,0'da % 58'ini ve pH 8,0'de ise % 59'unu koruduğu kaydedildi (Şekil 18). Hurma PFO' sunun pH 5,5' te 80 °C'de 70 dakika inkübasyonu sonucunda aktivitesinin %90'ını kaybettiği ve 60 °C'de 10 dakika inkübe edildiğinde enzim aktivitesinin %90'ını kaybettiği rapor edilmiştir (Navarro vd., 2014). *Prunus spinosa* L. subsp. *dasphylla* PFO' sunun pH kararlılık çalışmasında pH 5,0 ve 7,0 de yedi gün boyunca inkübe edildiğinde aktivitesini %80 ve %75 oranında koruduğu gözlemlenmiştir (Baltaş vd., 2017). Erik (*Prunus domestica*) polifenol oksidazının pH 6,0' da 25 °C ile 65 °C değişen sıcaklık aralığında aktivitesini çok iyi koruduğu ve oldukça kararlı olduğu gözlenmiştir (Lonita vd., 2017).

Bakla PFO'sunun ısıl kararlılık çalışmalarında enzim optimum sıcaklık değeri olan 30 °C' de 10 gün boyunca inkübe edildi ve 1, 2, 3, 5,7 ve 10.cu günün sonunda aynı saatte hidrokafeik asit substratı varlığında optimum şartlarda aktivite ölçümü yapıldı (Şekil 19). Ölçümler sonucunda 2.ci günün sonunda enzimin aktivitesinin tamamını koruduğu, 3.cü günün sonunda aktivitesinin %3' ünü kaybettiği, 5.ci günün sonunda aktivitesinin %9' unu kaybettiği ve 10.cu günün sonunda aktivitesinin %77' sini koruduğu gözlemlendi. Tarçın elması (*Annona muricata* L.) PFO' sunun ısıl kararlılık çalışmalarında enzimin 30 °C' de 30 dakika sonra aktivitesinin %20 azaldığını, 60 °C' de ise aktivitesinin neredeyse tamamının bittiğini belirtmişlerdir (Palma-Orozco vd., 2019). Erik (*Prunus domestica*) polifenol oksidazının pH 6,0' da 25 °C ile 65 °C değişen sıcaklık aralığında aktivitesini çok iyi koruduğu ve oldukça kararlı olduğu gözlenmiştir (Lonita vd., 2017). Altın çilek PFO' su 70 °C' de 30 dakika inkübe edildiğinde 4-metilkatekol varlığında orijinal aktivitesinin %30' unu, klorojenik asit substratı varlığında %20'sini koruduğu gözlenmiştir. Altın çilek PFO'sunun 80 °C' de 30 dakika inkübe edildiğinde orijinal aktivitesinin %90' ını kaybettiği bildirilmiştir (Bravo ve Osorio, 2016).

Enzimatik esmerleşmeyi önlemek amacıyla en sık başvurulan yol PFO inhibitörlerin kullanımınıdır. PFO inhibitörü olarak en çok kullanılan bileşikler arasında; askorbik asit, sodyum azid, tiyoüre, L-sistein, benzoik asit, sitrik asit, siringik asit, vanilik asit, sodyum benzoat, *p*-hidroksi benzoik asit, sinamik asit, kumarik asit, ferulik asit, sodyum dietilditiyokarbamik asit, sodyum metabisülfid ve tiyoüre

sayılabilir. Bu inhibitörlerden beklenen ve istenen en önemli özellik meyve yada sebzeleredeki esmerleşmeyi inhibe etmesi ya da durdurmasının yanı sıra insan sağlığına zarar vermemesidir.

Bilinen en yaygın PFO inhibitörlerinden olan askorbik asit, benzoik asit, sodyum metabisülfid ve sodyum azid için, hidrokafeik asit substratı varlığında enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplandı (Şekil 20-23). Askorbik asit, benzoik asit, sodyum azid ve sodyum metabisülfid için IC_{50} değeri sırası ile 8,25 μ M; 11,00 mM; 60,00 mM ve 116,00 μ M olarak bulundu (Şekil 20-23, Tablo 4). *Prunus spinosa* L. PFO'sunun sodyum metabisülfid, askorbik asit, sodyum azid, benzoik asit ve tiyoüre için, 4-metilkatekol substratı varlığında, IC_{50} değeri sırası ile 0,01 mM; 0,04 mM; 50,02 mM; 5,92 mM ve 3,95 mM olarak bulunmuştur (Baltaş vd., 2017). Yabani armut PFO'sunun 4-metilkatekol substratı varlığında, askorbik asit için IC_{50} değeri 0,036 mM olarak rapor edilmiştir (Baltaş, 2017). *Diospyros lotus* L. (yabani hurma) PFO'su üzerine en etkin inhibisyon gösteren askorbik asit için IC_{50} değeri 0,121 μ M olarak hesaplanmıştır (Faiz ve Baltaş, 2017). Çay yaprağı PFO'su için sodyum metabisülfid, sodyum sülfid, askorbik asit ve glutatyon inhibitörleri için IC_{50} değeri sırasıyla 21,65 μ M; 23,90 μ M; 69,31 μ M ve 99,08 μ M olarak rapor edilmiştir (Öztürk vd., 2020). Çin maydonozu PFO'su için sitrik asitin yarışmalı ve L-sisteinin yarışmasız inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Lin vd., 2016). Sultaniye üzümü (*Vitis vinifera* L.) PFO'sunun askorbik asit, sodyum bisülfid, sitrik asit ve benzoik asit inhibitörleri için IC_{50} değeri sırası ile 0,0086 mM; 0,286 mM; 27,3 mM ve 7,75 mM olarak hesaplanmıştır. Askorbik asit ve benzoik asit inhibitörlerinin yarışmalı, sodyum bisülfid ve sitrik asit inhibitörlerinin ise yarışmasız inhibisyon gösterdiği ifade edilmiştir (Kaya ve Bağcı, 2021). Semizotu (*Portulaca oleracea*) PFO'sunun askorbik asit, sitrik asit ve sodyum azid için K_i değeri sırası ile 0,36 mM; 4,47 mM ve 2,76 mM olarak hesaplanmıştır (Gül vd., 2017). Mor patates (*Dioscorea alata*) PFO'su için en etkili inhibitörlerin L-sistein den sonra sırası ile askorbik asit ve sodyum sülfid olduğu ifade edilmiştir (Peng vd., 2019). Rezene çekirdeği PFO'sunun sodyum metabisülfid, askorbik asit, benzoik asit, L-sistein, β -merkaptetanol, tiyoüre ve glutatyon inhibitörleri için katekol, 4-tertiyerbütill katekol, 4-metilkatekol ve pirogallol gibi difenolik substratlar varlığında K_i ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır (Karakuş vd., 2021). Yapılan PFO saflaştırma ve karakterizasyon

çalışmaları incelendiğinde, askorbik asit, sodyum metabisülfid, tiyoüre, benzoik asit, L-sistein ve glutatyon en etkili PFO inhibitörleri olarak rapor edilmiştir (Lin vd., 2016; Baltaş vd., 2017; Gül vd., 2017; Baltaş., 2017; Faiz ve Baltaş, 2017; Peng vd., 2018; Öztürk vd., 2020; Benaceur vd., 2020; Kaya ve Bağcı, 2021; Adeseko vd., 2021).

PFO aktivitesi üzerine Na^+ , K^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Cu , Ca^{2+} ve Fe^{2+} iyonlarının etkisini incelemek amacı ile 1 mM, 5 mM ve 10 mM son katyon konsantrasyonlarında hidrokafeik asit substratı varlığında aktivite ölçümleri yapıldı. Metal katyonlarının 1 mM'lık nihai konsantrasyonun da hidrokafeik asit substratı varlığında, Fe^{2+} katyonu hariç, diğer iyonların bakla PFO'sunu arttırdıkları gözlemlendi (Tablo 5). 5 mM'lık nihai iyon konsantrasyonunda, Ni^{2+} varlığında PFO aktivitesinin % 24,47'sini, Fe^{2+} varlığında % 13,67'sini, Na^+ varlığında % 9,36'sını ve Ca^{2+} varlığında yaklaşık %1'ini kaybettiği gözlemlendi. Fe^{2+} , Ba^{2+} ve Ni^{2+} iyonlarının 5 mM'lık son konsantrasyonlarının enzim aktivitesini sırasıyla % 19,78; % 38,48 ve % 65,11 inhibe ettiği kaydedildi (Tablo 5). *Diospyros lotus* L. (yabani hurma) PFO'sunun Fe^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} ve K^+ iyonlarının 1 mM'lık son konsantrasyonunda enzimin ciddi derecede inhibe olduğu rapor edilmiştir (Faiz ve Baltaş, 2017). Na^+ iyonunun Sultaniye üzümü (*Vitis vinifera* L.) PFO'su aktivitesi üzerine etkisine bakıldığında, 1 mM'lık son konsantrasyonda enzim aktivitesinin % 44,19'unu, 10 mM da ise aktivitesinin % 49,45'ini koruduğu bulunmuştur. K^+ , Mg^{2+} , Cu^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının her iki konsantrasyonda da enzim aktivitesini ciddi derecede azalttığı gözlemlenmiştir. Özellikle 10 mM Cu^{2+} varlığında enzim aktivitesinin % 99,16'sını kaybettiği bildirilmiştir (Kaya ve Bağcı, 2021). Rezene çekirdeği PFO'su üzerine Cu^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 0,1 mM ve 5 mM'lık son konsantrasyonunda inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Özellikle Fe^{2+} , Cd^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 5 mM'lık son konsantrasyonunda enzimin ciddi derecede inhibisyona uğradığı kaydedilmiştir (Karakuş vd., 2021). Çikolata mantarı (*Terfezia arenaria*) PFO'su üzerine Cu^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} ve Al^{3+} iyonlarının 2 mM ve 5 mM'lık son konsantrasyonunda, katekol ve L-tirozin substratları varlığında inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. 5 mM'lık Al^{3+} iyonlarının son konsantrasyonunda enzim aktivitesinin %78'inin inhibe olduğu saptanmıştır (Benaceur vd., 2020). Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum* L.) PFO'su üzerine inhibitör ve metal iyon etkisini incelemek amacı ile benzoik asit, siringik asit, vanilik asit, sodyum benzoat,

p-hidroksi benzoik asit, sinnamik asit, kumarik asit, ferulik asit, askorbik asit, L-sistein, sodyum dietilditiyokarbamik asit, sodyum metabisülfid ve tiyoüre inhibitörlerinin 0,2 mM; 1,0 mM ve 2,0 mM son konsantrasyonlarında inibisyon çalışmaları yapılmıştır (Siddiq ve Dolan, 2017).

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde, Bakla PFO'sunun biyokimyasal özelliklerinin, hesaplanan kinetik parametrelerinin, metal iyonlarına ve inhibitörlere karşı sergilediği davranışların diğer sebze ve meyvelerden karakterize edilen PFO enzimleri ile çokça benzerlikler ve bazı farklılıklar gösterdiği belirlendi.



KAYNAKÇA

- Adeseko, C. J., Sanni, D. M., Salawu, S. O., Kade, I. J., Bamidele, S. O., ve Lawal, O.T. (2021). Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase of African bush mango (*Irvingia gabonensis*) fruit peel. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102119.
- Baltas, N., (2017). Investigation of a wild pear species (*Pyrus elaeagnifolia* subsp. *Elaeagnifolia* Pallas) from Antalya, Turkey: polyphenol oxidase properties and anti-xanthine oxidase, anti-urease, and antioxidant activity. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 585-595.
- Baltas, N., Pakyildiz, S., Can, Z., Dincer, B., ve Kolayli, S., (2017). Biochemical properties of partially purified polyphenol oxidase and phenolic compounds of *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* as measured by HPLC-UV. *International journal of food properties*, 20(sup2), 1377-1391.
- Batista, K.A., Batista, G.L.A., Alves, G.L., ve Fernandes, K.F., (2014). Extraction, Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Solanum lycocarpum* Fruits. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, 211-217.
- Benaceur, F., Chaibi, R., Berrabah, F., Neifar, A., Leboukh, M., Benaceur, K., Nouioua, W., Rezzoug, A., Bouazzara, H., Gouzi, H., Cabana, H., ve Gargouri, A., (2020). Purification and characterization of latent polyphenol oxidase from truffles (*Terfezia arenaria*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 885-893.
- Bravo, K., ve Osorio, E., (2016). Characterization of Polyphenol Oxidase from Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.) Fruit. *Food Chemistry*, 197, 185-190.
- Brooks, S.J., Doyle, E.M., Hewage, C., Malthouse, J.P.G., Duetz, W., ve O'Conner, K.E., (2004). Biotransformation of halophenols using crude cell extracts of *Pseudomonas putida* F6. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 486-492.
- Cemeroğlu, B., Yemencioğlu, A., ve Özkan, M., (2001). Meyve ve sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolamaları, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No, 24, Ankara.
- Chaieb, N., González, J.L., López-Mesas, M., Bouslama, M., ve Valiente, M., (2011). Polyphenols Content and Antioxidant Capacity of Thirteen Faba Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes Cultivated in Tunisia. *Food Research International*, 44 (4): 970-977.
- Cheema, S., ve Sommerhalter, M., (2015). Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Aulofo Mango. *Food Chemistry*, 171, 382-387.
- Colak, A., Özen, A., Dincer, B., Güner, S., ve Ayaz, A.F., (2005). Diphenolases from Two Cultivars of Cherry Laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) Fruits at Early Stage of Maturation. *Food Chemistry*, 90, 801-807.

- Colak, A., Kolcuoglu, Y., Faiz, Ö., Özen, A., ve Dincer, B., (2007). Comparative Characterization of Diphenolases from two Mulberry Fruits (*Marula alba* L. and *Morus nigra* L.). *Asian Journal of Chemistry*, 19, 2961-2972.
- Creumiere, F., (2000). Inhibition of Enzymatic Browning in Food Products Using BioIngredients. A. Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements of the Degree of Master of Science. Department of Food Science and Agricultural Chemistry.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., ve Güner, S., (2002). Characterization of Polyphenol Oxidase from Medlar Fruits (*Mespilus germanica* L. Rosaceae). *Food Chemistry*, 77, 1-7.
- Espin, J.C., ve Wichers, H.J., (2001). Effect of Captopril on Mushroom Tyrosinase Activity *in vitro*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1554, 289-300.
- Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., ve Garcia-Canovas, F., (1997). Improvement of a Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities for Mushroom Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1084-1090.
- Faiz, O., ve Baltas, N. (2017). Polyphenol oxidase properties, anti-urease, and anti-acetylcholinesterase activity of *Diospyros lotus* L. (Plum Persimmon). *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1186-1196.
- Gül G.R., Güven, K., Matpan, B. F., Acer, O., Alkan, H., ve Dogru, M. (2017). Purification and characterization of polyphenol oxidase from purslane. *Food Science and Technology*, 37, 356-362.
- Han, Q., Liu, F., Hao, Y., ve Ni, Y., (2020). Characterization of membrane-bound polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus × domestica* Borkh.). *International Journal of Biological Macromolecules* 158, 977-984.
- Hussein, MA., (2012). Anti-Inflammatory Effect of Natural Heterocycle Glucoside Vicine Obtained from *Vicia faba* L. Its Aglucone (divicine) Their Effect on Some Oxidative Stress Biomarkers in Albino Rats. *Free Radicals and Antioxidants*, 2 (2), 44-54.
- İdikut, L., Çabar, YE., Zulkadir, G., Çölkesen, M., Çiftçi, S., ve Karabacak, T., (2018). Investigation of Distances Between Row on Two Faba Bean in Kahramanmaraş Conditions.1. International Gap Agriculture and Livestock Congress, 25-27 April 2018, Şanlıurfa.
- Karaköy, T., Demirbaş, A., Yörük, V., Toklu, F., Baloch, F.S., Durukan H, Öztürk M, Ton A, Anlarsal AE, ve Özkan H, (2015). Türkiye Orijinli Bakla (*Vicia faba* L.) Genotiplerinin Soğuğa Dayanıklılık Yönünden İncelenmesi Üzerine Bir Araştırma, 11. Tarla Bitkileri Kongresi 7-10 Eylül, Çanakkale, Cilt:1, 430-433.

- Karakus, Y. Y., Yildirim, B., ve Acemi, A. (2021). Characterization of polyphenol oxidase from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds as a promising source. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 261-271.
- Kaya, E. D., ve Bağci, O. (2021). Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase extracted from Kirmizi Kismis grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), 13627.
- Kutos, T., Golob, T., Kac, M., ve Plestenjak, A., (2003). Dietary Fibre Content of Dry and Processed Beans. *Food Chem*, 80, 231–235.
- Lima, AIG., Mota, J., Monteiro, SAVS., Ferreira, RMSB., (2016). Legume Seeds and Colorectal Cancer Revisited: Protease Inhibitors Reduce MMP-9 Activity and Colon Cancer Cell Migration. *Food Chemistry*, 197,30-38.
- Lin, H., Ng, A.W.R., ve Wong, C. W. (2016). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from Chinese parsley (*Coriandrum sativum*). *Food science and biotechnology*, 25(1), 91-96.
- Linewear, H., ve Burk, D., (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Liu, F., Zhao, J.H., Wen X., ve Ni., Y.Y., (2015). Purification and Structural Analysis of Membrane-bound Polyphenol Oxidase from Fuji Apple. *Food Chemistry*, 183, 72-77.
- Loniță, E., Gurgu, L., Aprodu, I., Stănciuc, N., Dalmadi, I., Bahrim, G., ve Râpeanu, G. (2017). Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). *Process Biochemistry*, 56, 177-185.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., ve Randall, R.J., (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luo, Y., ve Xie, W., (2012). Effect of Phytase Treatment on Iron Bioavailability in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Flour. *Food Chemistry*, 134 (3), 1251-1255.
- Marshall, M.R., Kim, J., ve Wei, C., (2000). Enzymatic Browning in fruits, Vegetables and Seafoods.
- Millar, KA., Gallagher, E., Burke, R., McCarthy, S., ve Barry-Ryan, C., (2019). Proximate Composition and Anti-Nutritional Factors of Fava-Bean (*Vicia faba*), Green-Pea and Yellow-Pea (*Pisum sativum*) Flour. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103233.
- Navarro, J.L., Tarrega, A., Sentandreu, M.A., ve Sentandreu, E., (2014). Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Persimmon. *Food Chemistry*, 157, 282-289.

- Önez, Z., (2006). “Üzümünden (*vitis vinifera* L.) izole edilen polifenol oksidaz enziminin özelliklerinin belirlenmesi”. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Öztürk, C., Aksoy, M., ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2020). Purification of tea leaf (*Camellia sinensis*) polyphenol oxidase by using affinity chromatography and investigation of its kinetic properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 31-38.
- Palma-Orozco, G., Marrufo-Hernández, N. A., Tobías, I., ve Nájera, H. (2019). Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase from soursop (*Annona muricata* L.) and its inactivation by microwave and ultrasound treatments. *Journal of food biochemistry*, 43(3),12770.
- Peng, X., Du, C., Yu, H., Zhao, X., Zhang, X., ve Wang, X. (2019) Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from water yam (*Dioscorea alata*), *CyTA - Journal of Food*, 17:1, 676-684.
- Prabhu, SD., ve Rajeswari, DV., (2018). Nutritional and Biological Properties of *Vicia faba* L.: A Perspective Review. *International Food Research Journal*, 25 (4): 1332-1340.
- Ray, H., ve Georges, F., (2010). A Genomic Approach to Nutritional, Pharmacological and Genetic Issues of Faba Bean (*Vicia faba*): Prospects for Genetic Modifications. *Genetically Modified Crops and Food*, 1 (2), 99-106.
- Saki, N., Akin, M., Alici, E. H., ve Arabaci, G. (2018). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from the wild edible mushroom *Lepiota procera* using three-phase partitioning. *International Journal of Food Engineering*, 14(9-10).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., ve Maniatis, T., (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Siddiq, M., ve Dolan, K.D., (2017). Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry* 218, 216–220.
- Siegbahn, P.E.M., (2003). The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 8, 567-576.
- Singh, A., ve Wadhwa, N., (2017). Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*). *J Food Sci Technol* 54(7), 2085–2093.
- Topal, N., ve Bozoğlu, H., (2016). Determination of L-dopa (l-3, 4-dihydroxyphenylalanine) Content of Some Faba Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 22, 145-151.

Whitaker, J.R., (1972). Principles of Enzymology for the Food Sciences, Fennema, O. R., Marcel Dekker, New York, Chapters 22-24.

Yang, R., Guo, Q., ve Gu, Z., (2013). GABA Shunt and Polyamine Degradation Pathway on γ -Aminobutyric Acid Accumulation in Germinating Fava Bean (*Vicia faba* L.) under Hypoxia. Food Chemistry, 136 (1), 152-159.

