

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKLA KABUĞUNDAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU
VE BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

AYŞENUR YEDİEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

EDİRNE-2018

AYŞENUR YEDİEL'in hazırladığı "BAKLA KABUĞUNDAN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU VE BAZI BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):

Doç. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Teymine ŞABUDAK

Prof. Dr. Hülya YAĞAR

İmza



Tez Savunma Tarihi:

23 / 10 / 2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Doç. Dr. Şebnem SELEN İŞBİLİR

Tez Danışmanı



Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mümin KURTCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

23 / 10 / 2018

Ayşemir YEDİEL

Yüksek Lisans Tezi

Bakla Kabuğundan Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu ve Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Polifenol oksidaz (PFO, EC 1.10.3.1) enzimi bazı meyve ve sebzelerde renk ve tat açısından istenmeyen değişimlere ve besin değeri kayıplarına neden olduğu için, PFO enziminin özelliklerini belirleyebilmek amacıyla çeşitli kaynaklardan izolasyonu ve karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmada, Edirne bölgesinde yetiştirilen baklanın kabuklarından izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin optimum pH ve pH kararlılığı, optimum sıcaklık ve termal stabilitesi, K_m ve V_{max} kinetik parametreleri, substrat seçiciliği, enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin ve inhibitörlerin etkisi gibi özellikleri araştırılmıştır. Substrat olarak kateşol kullanılmış ve enzimin K_m değeri 5.53 mM, V_{max} değeri 4424 U/mL dk olarak belirlenmiştir. PFO aktivitesi için optimum pH değeri 5 olarak bulunmuş ve optimum pH'ında 30 dk ve 1 saat inkübasyon sonrasında aktivitesini % 60'a yakın koruduğu görülmüştür. Enzimin optimum sıcaklığı 10 °C olarak tayin edilmiştir. 10-70 °C sıcaklık aralığında termal kararlılık profili incelendiğinde, 1 saat inkübasyon sonrasında 10-40 °C aralığında % 50'nin üzerinde aktivite gösterdiği görülmüştür. Çalışılan metaller enzim aktivitesi üzerine değişen oranlarda etki ederken; denenen inhibitörlerden askorbik asit ve sodyumbisülfid güçlü inhibisyon etkisi göstermiştir.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : 65

Anahtar Kelimeler : Polifenol oksidaz, bakla kabuğu, amonyum sülfat çöktürmesi, optimum pH, optimum sıcaklık, inhibisyon.

Master Thesis

Isolation of Polyphenol Oxidase Enzyme From Broad Bean Pod and Determination of Its Some Biochemical Properties

Trakya University, Institute of Natural Sciences

Chemistry of Department

ABSTRACT

Since polyphenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1) enzyme causes undesirable changes and nutritional value loss in some fruits and vegetables. PPO isolation and characterization studies are performed from various sources in order to determine the properties of the enzyme. In this study, PPO enzyme was isolated and partially purified from broad bean which planted in Edirne. Its optimum pH and pH stability, optimum temperature and thermal stability, K_m and V_{max} kinetic parameters, substrate selectivity, properties of some metals and inhibitors on enzyme activity were investigated. Catechol was used as the substrate and the K_m and V_{max} values of the enzyme were determined to be 5.53 mM and 4424 U / mL min, respectively. The optimum pH value for PPO activity was found to be 5 and it saved about 60 % of its activity at its optimum pH after 30 min and 1 hour incubation periods. The optimum temperature of the enzyme was determined as 10 °C. When the thermal stability profile was examined in the 10-70 °C temperature range, it exhibited more than 50 % of its activity in the range of 10-40 °C after 1 hour of incubation. The studied metals showed variable effect on the enzyme activity; ascorbic acid and sodium sulphide showed strong inhibitory effect.

Year : 2018

Number of Pages : 65

Keywords : Polyphenol oxidase, broad bean pod, ammonium sulfate precipitation, optimum pH, optimum temperature, inhibition.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca tüm desteğini esirgmeden benimle paylaşan danışmanım Şebnem SELEN İŞBİLİR ve Prof. Dr. Hülya YAĞAR hocama çok teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında soğutmalı santrifüjü kullanmama olanak veren Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ABD ve bu konuda yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Gamze ALTINTAŐ KAZAR'a teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, her adımda yanımda olan, gösterdikleri sabır ve destekleri için sevgili aileme; sevgi ve desteğiyle yanımda olan eşim'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	İV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	İX
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.....	3
KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Enzimler ve Polifenol Oksidazlar	3
2.2. PFO'nun Canlılardaki Dağılımı ve Fonksiyonu	8
2.3. Gıda Endüstrisinde PFO'nun Önemi	10
2.4. PPO'nun Substratları	11
2.5. PFO'nun İnhibitörleri.....	12
2.6. Polifenol Oksidaz Enzimi İle İlgili Yapılan Çalışmalar	14
2.7. Bakla Bitkisi.....	20
2.8. Tezde Kullanılan Yöntemlere Genel Bakış.....	24
2.8.1. Amonyum Sülfat Tuzu Çöktürmesi	24
2.8.2. Diyaliz	24
2.8.3. Bradford Yöntemi İle Protein Tayini	25
BÖLÜM 3.....	26
MATERYAL VE METODLAR	26
3.1. MATERYALLER.....	26
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	26
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	26
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	27
3.2. METOTLAR	27
3.2.1. Bakla Kabuğundan Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu	27

3.2.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	28
3.2.3. Enzimatik Aktivite Tayini	29
3.2.4. Protein Tayini	30
3.2.5. Bakla Kabuğu PPO Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	30
3.2.5.1. Optimum pH belirlenmesi	30
3.2.5.2. Optimum sıcaklık belirlenmesi	31
3.2.5.3. pH kararlılığı çalışması	31
3.2.5.4. Termal kararlılık çalışması	31
3.2.5.5. Substrat spesifikliği çalışması	32
3.2.5.6. K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi	32
3.2.5.7. PFO enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi	32
3.2.5.8. PFO enzimi üzerine bazı kimyasalların etkisi	32
3.2.5.9. Enzimin depo kararlılığı	33
BÖLÜM 4	34
DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR	34
4.1. Bakla Kabuğundan PFO İzolasyonu	34
4.2. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması	35
4.3. Optimum pH Belirlenmesi	35
4.4. Optimum Sıcaklık Belirlenmesi	36
4.5. pH Kararlılığı Çalışması	37
4.6. Termal Kararlılık Çalışması	38
4.7. Substrat Spesifikliği Çalışması	38
4.8. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi	40
4.9. PFO Enzimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi	42
4.9. PFO Enzimi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi	43
4.10. Enzimin Depo Kararlılığı	44
BÖLÜM 5	46
TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	64
TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER	65

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AA	Askorbik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
G6PD	Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
L-DOPA	L-3,4-dihidroksi fenilalanin
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PFO	Polifenol oksidaz
KCN	Potasyum siyanür
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforezi



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
	no
Çizelge 2.1. Enzimlerin Uluslararası Sınıflandırılması.....	3
Çizelge 2.2. 100 gram baklanın besin içeriği.....	22
Çizelge 4.1. Çeşitli basamaklarda bakla kabuğu PFO'ın protein miktarı ve enzim aktiviteleri.....	34
Çizelge 4.2. Bakla kabuğu PFO enziminin substrat spesifitesi.....	39
Çizelge 4.3. Bakla kabuğu PFO enziminin farklı substratları için kinetik parametreleri.....	41
Çizelge 4.4. Bakla kabuğu PFO enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi.....	43
Çizelge 5.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen PFO enziminin farklı substratları için optimum pH ve optimum sıcaklıkları.....	49
Çizelge 5.2. Çeşitli kaynaklardan elde edilen PFO enziminin farklı substratları için kinetik parametreleri.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil 2.1. Polifenol oksidazın krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri.....	5
Şekil 2.2. Lakkazların katalizlediği reaksiyon.....	5
Şekil 2.3. Kataliz sırasında PFO merkezindeki met, deoksi ve oksidasyon formlarının döngüsü.....	7
Şekil 2.4. PFO enziminin kataliz mekanizması.....	8
Şekil 2.5. Melanin oluşumuna uzanan PFO yolu.....	9
Şekil 2.6. PFO enziminin bazı doğal substratları.....	12
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bakla kabukları.....	28
Şekil 4.1. Bradford yöntemine ait protein standart grafiği.....	35
Şekil 4.2. Bakla PFO'nun sitrat ve fosfat tamponlarındaki optimum pH değerleri.....	36
Şekil 4.3. Bakla kabuğu PFO'nun optimum sıcaklık değeri.....	36
Şekil 4.4. Bakla kabuğu PFO enzimi için pH kararlılık grafiği.....	37
Şekil 4.5. Bakla kabuğu PFO enzimi için termal kararlılık grafiği.....	38
Şekil 4.6. Bakla kabuğu PFO enziminin pirogallol substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri.....	39
Şekil 4.7. Bakla kabuğu PFO enziminin 4-metil kateşol substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri.....	40
Şekil 4.8. Bakla kabuğu PFO enziminin kateşol substratı için Linewear-Burk Grafiği.....	40
Şekil 4.9. Bakla kabuğu PFO enziminin pirogallol substratı için Linewear-Burk grafiği.....	41
Şekil 4.10. Bakla kabuğu PFO enziminin 4-metil kateşol substratı için Linewear-Burk grafiği.....	41
Şekil 4.11. Bakla kabuğu PFO enzimi üzerine kateşol substratı varlığında metal iyonlarının etkisi.....	42
Şekil 4.12. Bakla kabuğu PFO enzimi üzerine kateşol substratı varlığında inhibitörlerin etkisi.....	44
Şekil 4.13. Bakla kabuğu PFO enzim aktivitesi için +4 °C'de depo kararlılık grafiği.....	45

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Polifenol oksidazlar (PFO) pekçok bitkide yaygın olarak bulunan, bakır içeren oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir. Çeşitli fenolik bileşikleri substrat olarak kullanırlar. Bitkiler aleminden başka deniz hayvanları, böcekler, bakteriler ve bazı mantarlar da PFO enzimini içermektedir. Polifenol oksidazlar, substrat spesifitesi ve yapılarına göre kateşol oksidaz (EC 1.10.3.1), tirozinaz (EC 1.14.18.1) ve lakkaz (EC 1.10.3.2) olarak üç gruba ayrılabilirler.

PFO; fenollerini oksijen varlığında renkli kinon bileşiklerine yükseltmektedir. Bitkilerdeki PFO, bitkilerin savunma mekanizmasında önemli rol oynar. PFO'nun katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan kinon bileşikleri, bitkilerde patojen ve zararlı böceklere karşı bir savunma sistemi oluşturarak savunmaya katkıda bulunur. Ancak oluşan kinonlar bazı meyve ve sebzelerde istenmeyen renk değişimlerine de yol açar. PFO'nun neden olduğu bu esmerleşme olayı, gıdaların sadece rengini bozmakla kalmayıp, ürünün tadında bozulmaya ve besin değerinde azalmaya neden olur. Ayrıca pek çok meyve ve sebzenin hasat sırasında zarar görmesi, işleme sırasında kesilmesi, kabuğunun soyulması veya parçalanması gibi işlemler de enzimatik esmerleşmeye neden olur. Meyve ve sebzelerdeki bu kararma olayı ekonomik kayıplara yol açtığı gibi, müşteriler tarafından arzu edilmeyen bir durum oluşturur. Bu yüzden PFO aktivitesi sonucu oluşan istenmeyen kararmaların yavaşlatılması veya durdurulması amacı ile PFO enzimiyle ilgili pekçok çalışma yapılmış, çeşitli meyve ve sebzelerdeki enzimin biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Enzimatik aktivite mekanizmasının anlaşılması ve dolayısıyla meyve ve sebzelerdeki karar mekanizmasının daha iyi anlaşılması için, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin bilinmesi gerekmektedir. Bu nedenle enzimin optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi, substratlarının ve inhibitörlerinin çalışılması gerekir. Enzimin karakterizasyon çalışmalarının yapılması, kararmanın oluşumunun engellenmesini, dolayısıyla ekonomik kayıpların azalmasını sağlayabilir.

Gıda alanındaki karar sorununu çözmek üzere çeşitli bitkisel kaynaklardan PFO izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapılarak enzim tanınırken, bu çalışmalar enzim için yeni uygulama alanları da doğurmaktadır. Son yıllarda bitki kaynaklı polifenol oksidazlar kullanılarak biyosensör dizaynı, çevre kirliliği parametrelerinin değerlendirilmesi ve atık suların arıtılması gibi endüstriyel alanlarda uygulamaya yönelik çalışmalar başlamıştır.

Yapılan literatür taramasında mantar, marul, brokoli, patates, enginar, patlıcan, ayva, erik gibi birçok bitkisel kaynaktan PFO enzimi saflaştırılıp, karakterizasyon çalışmaları yapılmasına rağmen, bakla kabuğun PFO'ı üzerine bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca farklı bitkisel kaynaklardan saflaştırılan enzimlerin biyokimyasal özelliklerinde farklılıklar da olabilir. Bu tez çalışmasının amacı bakla kabuğundan PFO enzimini izole ederek kısmen saflaştırdıktan sonra, enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, K_m ve V_{max} parametrelerini belirlemek; pH ve sıcaklık kararlılığı, substrat seçiciliği, enzimin depolama kararlılığı, aktivitesi üzerine bazı metallerin ve inhibitörlerin etkisi gibi bazı biyokimyasal özelliklerini incelemektir.

BÖLÜM 2

KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Enzimler ve Polifenol Oksidazlar

Enzimler, yaşamın merkezinde yer alan protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Canlı hücrelerinde çeşitli kimyasal reaksiyonları katalizleyen 40.000 kadar farklı enzim olmasına rağmen katalizledikleri reaksiyon tiplerine göre altı ana grupta toplanırlar (Çizelge 2.1). Biyolojik katalizle ilgili ilk çalışmalar 1700'lerin sonlarında etin mide salgılarıyla sindirilmesiyle başlamış, Pasteur, Buncher ve ilk kez “enzim” terimini kullanan Kühne gibi önemli isimlerin çalışmalarıyla devam etmiştir. 1926 yılında James Sumner'in üreaz enzimini saflaştırması ve kristallendirmesi enzimoloji alanındaki ilk başarıdır. Günümüzde çok sayıda enzim saflaştırılarak üç boyutlu yapıları ve mekanizmaları belirlenmiştir.

Çizelge 2.1. Enzimlerin uluslararası sınıflandırılması (Nelson & Cox, 2013, s. 185)

No	Sınıf	Katalizlenen tepkime tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektronların transferi (hidrit iyonları ve H atomları)
2	Tranferazlar	Grup-transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeler (İşlevsel grupların suya transferi)
4	Liyazlar	Çift bağlara grupların ilavesi ve grupların yer değiştirmesiyle çift bağların oluşması
5	İzomerazlar	İzomerik formları oluşturmak üzere moleküller içinde grupların transferi
6	Ligazlar	ATP'nin ayrılmasıyla eşleşmiş kondensasyon tepkimeleriyle C-C, C-S, C-O ve C-N bağlarının oluşması

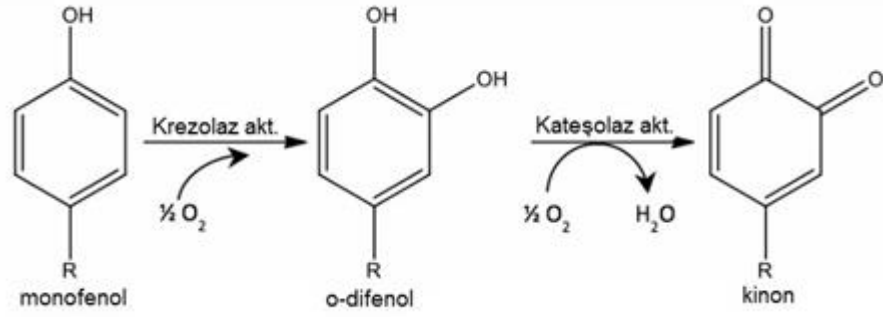
Polifenol oksidazlar (PFO) oksijen varlığında fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyen oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdir, aktivite gösterebilmeleri için prostetik grup olarak bakır gerekir. PFO grubuna ait 3 enzim sınıfı bulunmaktadır: kateşol oksidaz (EC 1.10.3.1; 1,2-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz), lakkaz (EC 1.10.3.2; *p*-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) ve tirozinaz (EC 1.14.18.1; monofenol monooksijenaz, krezolaz) (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology-IUBMB; Panadare ve Rathod, 2018).

Bitkiler, memeliler, böcekler, bakteri ve mantarlarda bulunan tirozinaz (EC 1.14.18.1; krezolaz, fenol oksidaz, tirozin-dopa oksidaz) hem monofenol oksidaz hem de difenol oksidaz aktivitesi gösteren bir oksidoredüktazdır (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology-IUBMB). Enzim bitkilerde substrat olarak krezolu kullanabildiği için krezolaz olarak da isimlendirilmektedir. Yaygın olarak kullanılan polifenol oksidaz (PFO) isimlendirmesi ise bitkilerde fenolik bileşiklerin bol bulunmasından dolayıdır (Corzo-Martinez vd., 2012). PFO oksijene bağımlı iki farklı temel reaksiyonu ardarda katalizler (Şekil 2.2):

1. Monofenollerin orto pozisyonunda hidroksilasyonu (monofenol oksidaz veya krezolaz aktivitesi)
2. *o*-difenollerin *o*-kinonlara yükseltgenmesi (difenol oksidaz, kateşol oksidaz veya kateşolaz aktivitesi)

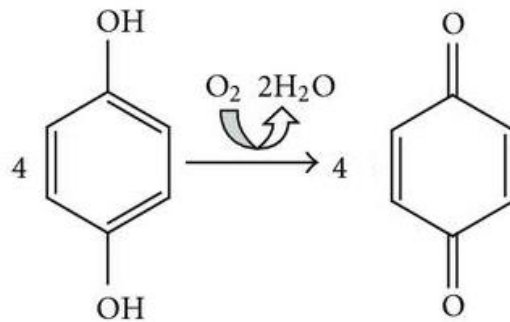
Enzimin ikinci reaksiyonu kateşol oksidaz (EC 1.10.3.1) enziminin katalizlediği reaksiyon ile aynıdır.

Birçok enzimatik preparatta PFO'nun krezolaz aktivitesi çok düşüktür veya yok denecek kadar azdır. Bitkilerde krezolaz aktivitesinin doğal olarak olup olmadığından veya ekstraksiyon sırasında ekstrakte edilip edilmediğinin anlaşılması zordur. Krezolaz aktivitesi genellikle saflaştırma sırasında da kaybedilebilir (Corzo-Martinez vd., 2012). Bitkilerde her iki aktivite de olduğunda, bitkisel kaynağa bağlı olmakla birlikte krezolaz aktivitesinin kateşolaz aktivitesine oranı 1:10 ila 1:40 arasındadır (Yörük & Marshall, 2003).



Şekil 2. 1. Polifenol oksidazın krezolaz ve kateşolaz aktiviteleri

Lakkazlar (E.C.1.10.3.2) difenolik bileşikleri oksijen varlığında kinonlara yükseltgeyen, bakır kofaktörlü oksidoredüktazlardır. Bitkilerden daha çok mantarlarda bulunmaktadır. Lakkaz enzimi substrat molekülünden bir elektron koparıp moleküler oksijene aktararak su açığa çıkarır, bunu yapısında bulunan 4 adet Cu^{2+} atomu sayesinde gerçekleştirir (Şekil 2.1). Oksijen varlığında difenolik bileşiklerin kinonlara yükseltgenmesi enzimlerin difenol oksidaz aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Lakkazın yanında kateşol oksidaz (EC 1.10.3.1) enzimi de difenolaz aktivitesi göstermektedir. Ancak kateşol oksidaz (kateşolaz) ve lakkazın substrat ve inhibitör spesifiteleri farklıdır; kateşolaz o-dihidroksi fenolleri yükseltgerken, lakkaz p-dihidroksi fenolleri yükseltger. Ayrıca polifenoller ve metoksi substütiye fenolleri içeren fenolik substratlar, aminofenoller ve fenilendiaminler de lakkaz için substrattır. Katyonik bir deterjan olan setil trimetil amonyum bromür lakkazlar için spesifik bir inhibitördür (Corzo-Martinez, Corzo, Villamiel, & Castillo, 2012; Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology-IUBMB)



Şekil 2.2. Lakkazların katalizlediği reaksiyon

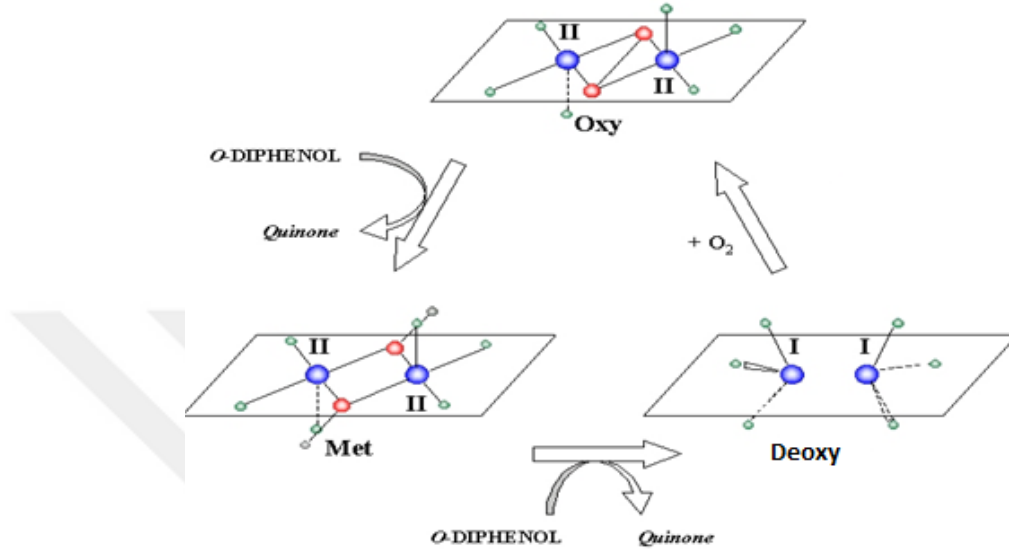
Polifenol oksidaz ile ilgili ilk rapor 1896 yılında Bertrand tarafından bildirilmiş olup, 1938'de Keilin ve Mann tarafından çok miktarda enzim izolasyonu için bir prosedür ve Kubowitz tarafından PFO'nun bakır içermesi gibi önemli özellikleri açıklanmıştır. Daha sonraları (1956'da) Mason PFO'nun olası fonksiyonları ve yapısını tartışmış ve devamındaki çalışmalarla PFO hakkında birçok bilgi birikimi sağlanmıştır (Mayer, 2006). Bugün pek çok meyve ve sebze de polifenol oksidaz enziminin varlığı belirlenmiş ve karakterize edilmiştir.

PFO bitkiler aleminde yaygın olarak bulunur ve birçok meyve ve sebzenin toplanması ve depolanması süresince meydana gelen kararmaların başlıca sebebidir. PFO bitkilerin kök, yaprak, çiçek ve vasküler dokularını da kapsayan çeşitli kısımlarında bulunur (Constabel & Barbehenn, 2008). Kloroplastlarda, mitokondride ve özellikle tilakoidlerde membranlara sıkıca bağlı olarak bulunmaktadır (Yörük & Marshall, 2003; Corzo-Martinez vd., 2012). Bitkisel dokularda ve mantarlarda PFO'lar latent (inaktif) veya aktif formlarında bulunur. Latent enzim zamanla dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya etilen gibi birtakım metabolitlerce aktif hale dönüşmektedir (Yemenicioğlu, Özkan & Cemeroglu, 1997). Bitkilerde enzim savunma mekanizmasında majör rol oynar. PFO'nun katalizlediği reaksiyonlar sonucu oluşan kinon bileşiklerinin bitkilerde patojen ve zararlı böceklerle karşı bir savunma sistemi oluşturduğu bilinmektedir (Constabel & Barbehenn, 2008).

PFO çekirdekte kodlanan (nükleer kodlu) bir proteindir ve stoplazmik ribozomlarda sentezlenir. Plastide gidene kadar inaktiftir ve tilakoid membrana integre olana kadarki sürede şaperonlar tarafından stabilize edilir. Bu prekürsör protein N-ucundaki bir sinyal peptid dizilimi ile kloropasta yönlendirilir, bu sinyal dizisi tilakoid membrana birleşme sırasında stromal spesifik bir peptidaz tarafından kesilir ve oluşan olgun protein (PFO) tilakoid membrana sıkıca bağlıdır. Bu proses baklayı da içeren kayısı, elma, üzüm, patates, domates, ıspanak gibi çeşitli bitkilerde bu şekilde meydana gelir (Yörük & Marshall, 2003).

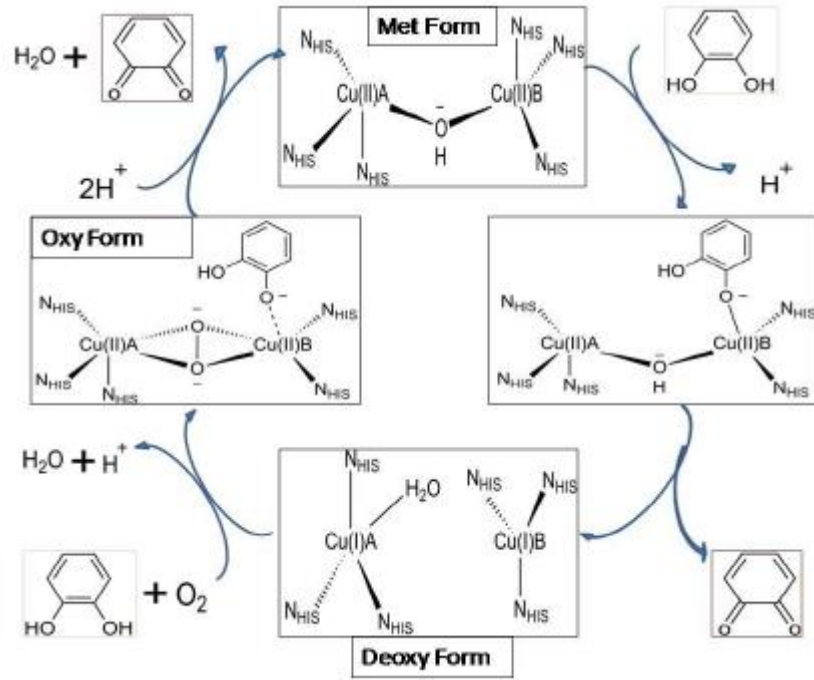
PFO'nun aminoasit dizilimi oldukça değişken olmasına karşın, aktif merkezdeki bakır bağlama bölgeleri yüksek derecede korunmuştur. PFO, Tip 3 bakır proteini olarak bilinmektedir. Aktif merkezinde dinükleer bakır kompleksi içerir ve herbir bakır iyonu üç histidin kalıntısına bağlıdır (Mayer, 2006). Bakır atomları Cu(A) ve Cu(B) olarak

isimlendirilir ve reaksiyon sırasında enzimin aktif merkezi Met, Deoksi ve Oksi halleri olarak isimlendirilen bir döngü içindedir (Şekil 2.3). Her bir döngüde iki molekül kateşol kinona yükseltgenirken, bir moleküler oksijen suya indirgenir (Mishra, Gautam & Sharma, 2012).



Şekil 2.3. Kataliz sırasında PFO merkezindeki met, deoksi ve oksi formlarının döngüsü (Eicken'den uyarlayan Mishra vd., 2012)

Enzimin deoksi (indirgenmiş hali) halinde, oksijen (O_2) enzimin merkezindeki CuA 'ya bağlı olan çözücü molekülü (H_2O) ile yer değiştirerek bakır metal merkezine bağlanır. UV/VIS spektroskopi çalışmaları önce oksijenin peroksit formunda bağlandığını, kateşol substratının daha sonra bağlandığını göstermiştir. Kateşol molekülünün iki hidroksil grubundan biri proton kaybeder ve CuB (Oksi formu)'ye bağlanır. Substrattan iki elektronun perokside transferini peroksid grubunun protonlanması izler ve O-O bağı kırılır. Glutamat 236 kalıntısının ve substratın ikinci koordine olmayan hidroksil grubunun bir proton vermesiyle su çıkışı ve o-kinon ürünü oluşur. Köprü yapan grubun protonlanması, aktif merkezi hidroksid köprülü dikuprik duruma (Met formu) getirir. Diğer bir kateşol molekülü kosubstrat olarak rol oynar ve hidroksid köprülü dikuprik ($Cu II$) halinin dikupröz ($Cu I$) haline geri dönmesini sağlar (Şekil 2.4) (Mishra vd., 2012).



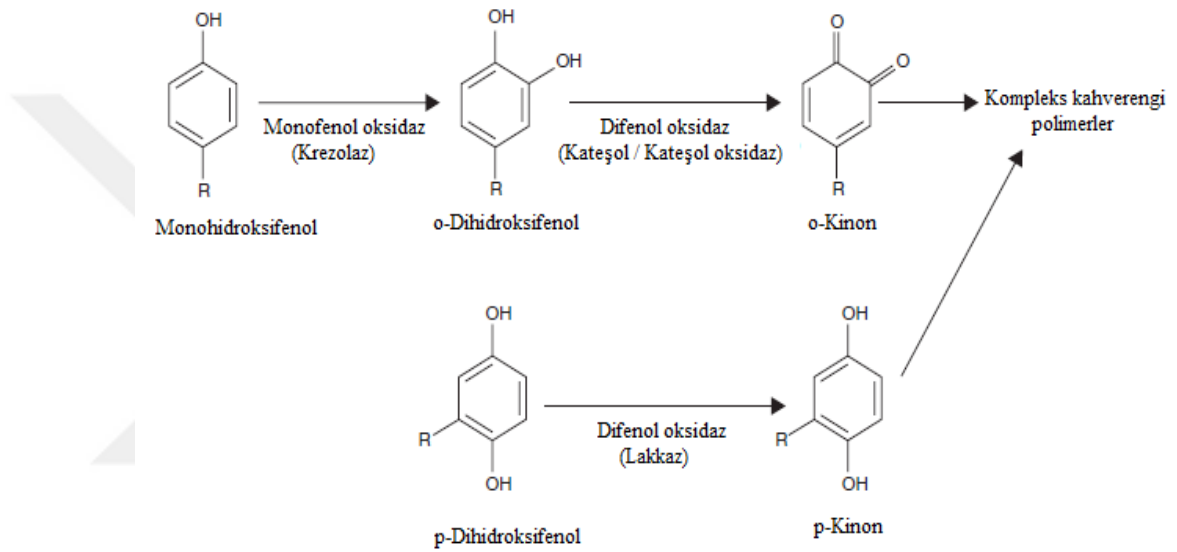
Şekil 2.4. PFO enziminin kataliz mekanizması (Eicken'den uyarlayan Mishra vd., 2012)

Meyve, sebzeler ve bunlardan çeşitli ürünler üretilirken işlemler sırasında esmerleşme denilen bir renk koyulaşması olduğu gözlenmektedir. Bitkilerde meydana gelen esmerleşme olayının en önemli sebeplerinden biri PFO enzimidir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan polifenol oksidaz enziminin sebep olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. PFO aktivitesiyle fenolik bileşikler o-kinonlara yükseltgenir. Daha sonra gerçekleşen ve enzimatik olmayan bir dizi reaksiyon ile, kinon türevi bileşikler daha büyük moleküllü yapılara polimerize olurlar ve siyah renkli melanin pigmentlerini oluştururlar. Melaninler, bakteriden insana kadar farklı organizmalarda bulunan polimerik pigmentlerdir.

2.2. PFO'nun Canlılardaki Dağılımı ve Fonksiyonu

PFO bitkiler, hayvanlar, mantarlar ve bakterilerde bulunan bir enzimdir. Özellikle mantarlar ve bakterilerde enzimin biyolojik fonksiyonu ile ilgili hala bilinmeyen konular bulunmaktadır (Mayer, 2006). PFO aktivitesine karides, istakoz gibi deniz ürünlerinde de rastlanmıştır. Ekonomik değeri olan bu deniz ürünlerinde melanosiz olarak bilinen PFO kaynaklı enzimatik kararma ciddi sorun yaratmaktadır ve

gıda endüstrisinde deniz ürünlerindeki PFO'nun inhibisyonuyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Yörük & Marshall, 2003). Eklembacaklılar ve böceklerde bulunan PFO'nun yara iyileşmesi, kabuğun sertleşmesi, savunma reaksiyonlarını içeren çeşitli fizyolojik olaylarda rolü olduğu bildirilmektedir (Yörük & Marshall, 2003). Melanin memelilerde derinin bazal tabakasında bulunan melanosit hücrelerinde sentezlenen polimerik renk pigmentidir. Memelilerde, başlıca PFO tarafından sentezlenen melaninler saç pigmenti olarak rol oynar ve UV ışınları absorblayarak deriyi solar radyasyona karşı korur (Kim & Uyama, 2005).



Şekil 2.5. Melanin oluşumuna uzanan PFO yolu (Corzo-Martinez vd., 2012)

Mantarlarda PFO'nun melanin oluşumunda aktif olduğu bilinmektedir. Patogenezde fungal melaninin rolü Jacobson tarafından incelenmiş ve melaninin koruyucu rolünün yanında, bazı parazitik mantarların konak hücreye (bitki hücresine) tutunup penetre olmasında melaninin gerekli olduğu bildirilmiştir (Jacobson, 2000).

PFO bitkiler aleminde oldukça geniş dağılım gösterir ve pek çok meyve ve sebze PFO aktivitesi tayin edilmiştir. Polifenol oksidazların bitkilerde en önemli fonksiyonu hastalıklara karşı korumada ve bitkiyle beslenen böceklerle karşı savunmada rol oynamasıdır. PFO'nun otçul böceklerle karşı etkisi için üç farklı mekanizma önerilmiştir (Constabel & Barbehenn, 2008): 1) PFO'nun ürettiği kinon türevleri esansiyel aminoasitleri alkilleyerek, bitkinin protein ve besin değerini azaltır, 2) Kinonların redoks döngüsü hayvanın barsak lümeninde oksidatif stres oluşturabilir, 3) Kinonlar gibi fenolik oksidasyon ürünleri ve kinon redoks döngüsünde üretilen reaktif

oksijen türleri absorblanır ve otçullar üzerinde toksik etki gösterir. Bitkilerin korunma mekanizmasında PFO'nun rolüyle ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu alanda genel olarak yaralanma, otçul ve patojen saldırısı sırasında veya bitki bir strese maruz kaldığında PFO kodlayan spesifik genlerin ekspresyonuyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Mayer, 2006).

Ayrıca polifenol oksidazlar, bitkilerde meydana gelen mikrobiyal veya virüs kaynaklı enfeksiyonlarda koruyucu olarak rol oynamaktadır. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan kinonların daha sonra oluşturdukları koyu renkli, çözünmeyen polimerleşme ürünleri, dokularda enfeksiyonlara karşı bariyer olarak rol oynamaktadır. Bazı araştırmacılara göre bu, polifenol oksidaz enziminin asıl fonksiyonudur.

2.3. Gıda Endüstrisinde PFO'nun Önemi

PFO meyve ve sebzelerde kararmaya yol açarak bu ürünlerin besin ve pazar değerini düşürdüğü için gıda sektöründe önemli bir enzimdir. Bu yüzden çeşitli bitkisel kaynaklardan PFO enziminin izolasyonu, saflaştırılması, enzimin biyokimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar sürmektedir. Gıda endüstrisinde genellikle bu alandaki çalışmalar enzimin aktivitesini azaltmaya yöneliktir.

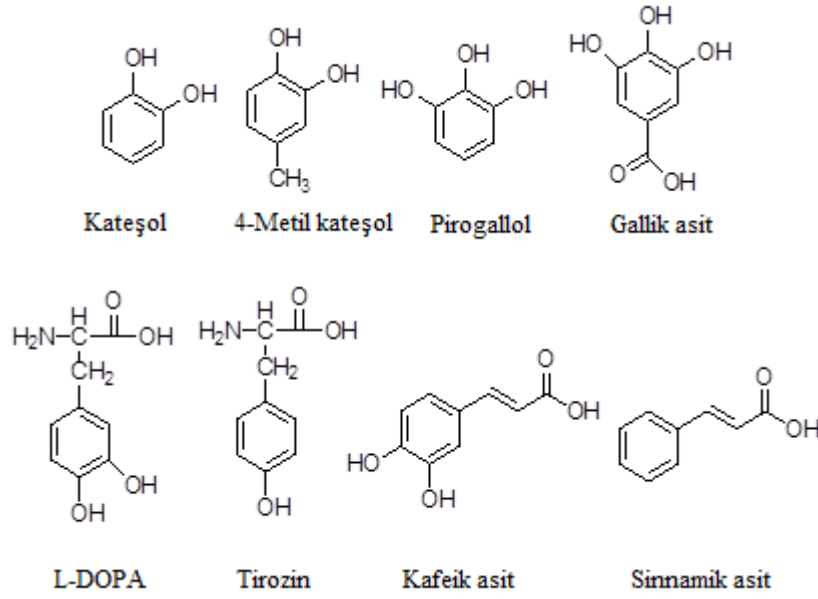
Bütünlüğü bozulmamış, sağlıklı meyve ve sebze dokularında PFO enzimi ve substratı olan fenolik bileşikler bitki hücresinin farklı kısımlarında bulunurlar; PFO kloroplastlarda tilakoid membrana bağlı halde bulunurken, fenolik bileşiklerin çoğu vakuollerde bulunmaktadır. Birçok meyve ve sebzelerde zedelenme olmadığı sürece enzimatik kararma meydana gelmemektedir. Ancak hasat zamanı, kasalama, taşıma, depolama gibi işlemler sırasında oluşan mekanik etkilerle meydana gelen zedelenmeler sonucu veya bu meyve ve sebzelerin herhangi bir ürüne dönüştürülmesi için uygulanan kesme, doğrama, parçalama, rendeleme ve ezme gibi işlemler sırasında bitki dokusunun bütünlüğü bozulur. Böylece enzim ve substratı bir araya gelerek oksijen varlığında yükseltgenme reaksiyonu gerçekleşir, ürünün renginde kararma ve bozulmalar meydana gelir.

Enzimatik kararırna muz, elma, Őeftali, armut gibi meyvelerde, patates, kereviz, patlıcan ve yemeklik mantar gibi sebzelerde daha çok görülür. Domateste, limon ve portakal gibi turunçgillerde hem asitlikleri nedeniyle hem de yeterince fenolik madde ve PFO enzimi içermedikleri için kararırna oluŐmamaktadır. Bunun yanında bazı tahılların unlarındaki yüksek PFO aktivitesinden dolayı, ekmek ve makarna ürünlerinin kararırna gösterdiği ve oluşan kinonların proteinlerle birleŐerek gıdaların sindirimini zorlaŐtırdıĐı da bildirilmiştir (Vamos-Vigyazo, 1981).

Gıdaların işlenmesi sırasında PFO enzimi sebep olduğu kararmalar ile sorun oluŐtururken, diğer yandan PFO aktivitesi bazı ürünlerin duyusal özellikleri üzerinde olumlu katkılar da sağlar. Örneğin siyah çay, kahve, kakao, kuru üzüm, incir, hurma, zeytin gibi ürünlerde enzimatik kararırna istenen bir olaydır. Taze ay yaprağı yüksek oranda PFO içerir ve oksijen varlığında kateŐinlerin oksidasyonunu katalizler. Oluşan kinon türevleri aya tadını ve aromasını veren teafavinlerin n maddesidir (Yabancı, 2008). Siyah zeytinde de fenolik bileşiklerin enzimatik olarak yükseltgenmesi istenilen bir deĐiŐimdir (Taş, 2009). Benzer Şekilde kuru üzüm, incir ve hurmaların beğenilen renkleri, enzimatik esmerleşme sonucudur. Kakao ve kahvenin renk ve aroması ile siyah zeytinin renk ve lezzetinde de enzimatik kararırmanın rolü vardır.

2.4. PFO'nın Substratları

Meyve ve sebzeler flavonoid tipi bileşikler, sinamik asit türevleri ve basit fenoller gibi çeşitli fenolik bileşikleri içerirler ve bu fenolik bileşiklerin bir kısmı polifenol oksidaz enziminin substratıdır. Bu bileşikler, vakuollerde yoğun olmak üzere bitkilerin hemen hemen her bölgesinde bulunur. PFO'nın substratları katekol, 4-metil katekol, pirogallol, gallik asit, L-DOPA, tirozin, kafeik asit ve sinamik asit esterleri (klorojenik asit ve kafeik asit)dir. Enzimatik oksidasyon çalıŐmalarında genellikle model substrat olarak katekol (o-dihidroksi fenol) kullanılmaktadır. Dopa ve tirozin de hemen hemen bütün bitki dokularında bulunan aminoasitler oldukları için PFO enziminin yaygın olarak kullanılan substratlarıdır (Yörük & Marshall, 2003; Queiroz, Lopes, Fialho & Valente-Mesquita, 2008). Bir kaynaktan elde edilen PFO enzimi için en iyi substrat, aynı kaynaktan bulunan substratıdır.



Şekil 2.6. PFO enziminin bazı doğal substratları

2.5. PFO'nın İnhibitörleri

Sebze ve meyvelerin taze olarak pazara sunulması, satılması ve servis yapılması sırasında meydana gelen enzimatik kararmalar hem müşteriler tarafından istenmeyen bir durumdur, hem de gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu yüzden enzimatik kararmaların kontrolü gıda işleme endüstrisinde oldukça önemli bir yer tutmakta ve araştırmacılar tarafından da ilgi görmektedir. Günümüzde gıda sektöründe PFO kaynaklı enzimatik kararmaları önlemek için çeşitli PFO inhibitörleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan inhibitörler ürünlerin tadına, kokusuna ve kalitesine etki etmeyen, toksik olmayan ve ekonomik olarak uygun maddeler olmalıdır.

PFO aktivitesini engellemek üzere kullanılan inhibitörler etki tarzlarına göre 6 grupta toplanabilir (McEvily, Iyengar & Otwell, 1992):

- 1) İndirgeyici ajanlar (askorbik asit ve analogları, sülfidler)
- 2) Şelat yapıcı ajanlar (EDTA, sodyum dietil ditiyo karbamat-DIECA, sodyum azid)
- 3) Kompleks yapıcı ajanlar (siklodekstrinler, kitosan)
- 4) Asitlik düzenleyiciler (Askorbik asit, sitrik asit, malik asit, fosforik asit)
- 5) Enzim inhibitörleri (substrat analogları, halojenürler)

6) Diğer enzimlerle muamele (proteazlar, o-metiltransferaz)

Gıda endüstrisinde indirgeyici ajanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar o-kinonların birikimini önleyerek melanin oluşumunu inhibe eder veya kararlı renksiz ürünler oluşturabilir. Enzimatik kararma inhibitörlerinden en çok kullanılanları kükürt dioksit veya sülfidlerdir, özellikle sodyum sülfid, sodyum bisülfid ve sodyum metabisülfiddir. Sülfidler çok kullanılan PFO inhibitörü olmalarına rağmen, bitki ve meyvelerde yumuşama yaptığı ve tadı etkilediği bilinmektedir. Askorbik asit ve onun izomeri olan erithorbik asit, sülfide alternatif olarak kullanılan indirgeyici ajanlardır ve meyve suyu, püreleri, dondurulmuş dilimli meyveler, kutulanmış meyve ve sebzelerin üretiminde esmerleşme önleyici ajan olarak kullanılmaktadırlar. Askorbik asit oluşturduğu asidik çevre ile enzimin katalitik aktivitesi üzerine etki etmektedir. Sitrik asit de şelatlama özelliğiyle PFO inhibitörü olarak rol oynamaktadır (Yörük & Marshall, 2003).

PFO üzerinde etkili bir diğer inhibitör sisteindir. Sisteinin, enzimin difenolaz aktivitesiyle oluşan o-kinonlarla tiyol konjugatları oluşturmak suretiyle etki ettiği düşünülmektedir. PFO prostetik grup olarak bakır içeren bir metaloenzim olduğu için siyanür, karbon monoksit, sodyum dietil ditiyo karbamat (DIECA), merkaptotiyazol, dimerkaptopropanol, azid veya potasyum metil ksantat gibi metal şelatlayıcı reaktiflerle inhibe olmaktadır.

Doğal kaynaklarda da PFO enziminin inhibisyonuna yol açan polifenoller ve aldehid türevi bileşikler bulunmaktadır. Bazı potansiyel PFO inhibitörleri bitkilerde bulunan kampferol, kuersetin, luteolin gibi flavonoidlerdir (Kim & Uyama, 2005). Flavonoidlerin inhibisyon özelliği aktif bölgedeki bakırla şelat yapabilme özelliğinden ileri gelmektedir. Trans sinamaldehit, anisaldehit ve kuminaldehit gibi çeşitli aldehid türevleri ile ilgili çalışmalar yapılmış ve bunların inhibitör etkilerinin enzimin primer amino gruplarıyla Schiff bazı oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kim & Uyama, 2005; Parvez, Kang, Chung & Bae, 2007).

PFO'ın başka birçok inhibitörü bilinmektedir. Hidrojen peroksit, hidroksilamin, tiyoller, aromatik karboksilik asitler gibi kimyasallar, lignanlar ve bazı alkaloidler gibi doğal bileşikler de bunlar arasındadır (Khan, 2007). Tez çalışmasında PFO inhibitörü

olarak askorbik asit, benzoik Asit, EDTA, KCN, sodyum azid, sodyum metabisülfid, sodyum sülfid ve L-sistein kullanılmıştır.

2.6. Polifenol Oksidaz Enzimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

PFO gıdalarda yol açtığı enzimatik kararmalar görüntü, tat ve koku değişimleri gibi önemli kalite kayıplarına neden olmakta ve arzu edilmeyen bir durum oluşturmaktadır. Meyve ve sebzelerin taşınması, depolanması ve işlenmesi sırasında meydana gelen bu olumsuzlukları en aza indirmek ve böylece kaliteli ürünlerin üretilmesi için çeşitli bitkisel kaynaklardan PFO'ın izole edilip, saflaştırılması ve enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu yüzden gıda sektöründe önemli bir yeri olan PFO enzimi üzerine çok sayıda araştırma yapılmış, çeşitli meyve ve sebzelerdeki enzimin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bakla kabuğu PFO'ı üzerine yapılmış pek fazla çalışma bulunmamaktadır. 1992 yılında Robinson ve Dry bakla yaprağından saflaştırdıkları PFO'ın molekül ağırlığını 60 kDa olarak tayin etmişler ve bu PFO'ın proteolitik parçalanmaya karşı hassas olduğunu belirlemişlerdir. Yine 1992 yılında Ganesa, Fox ve Flurkey PFO'ın heterojenitesine ilişkin yaptıkları çalışmada, bakla yaprağından PFO saflaştırmışlar ve enzimin pH=4-6 aralığında farklı izoelektrik noktalara sahip olan değişik yükte izoformları olduğunu bildirmişlerdir.

Bakla PFO enzimiyle ilgili saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarından başka, diğer alanlarda da araştırmalar mevcuttur. Enzim regülasyonunda ışığın rolünü inceleyen Hutcheson, Buchanan ve Montalbini (1980) bakla yaprağından membrana bağlı PFO içeren kloroplastları saflaştırmış ve polifenollerin kloroplast membranlarındaki ışığa bağımlı oksidasyonunun, membrana bağlı PFO'dan bağımsız olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer araştırmada bakla yaprağından latent PFO enzimi izole edilmiş ve 4-metil kateşol substratı kullanılarak kateşolaz aktivitesi çalışılmıştır. Çalışmada enzimin kateşolaz aktivitesi göstermesinin güçlü şekilde pH'ya bağımlı olduğu ve değişen pH değerlerinde aktivite gösterebilmesi için bir lag süreci olduğu ve bu nedenle bakla kabuğu PFO'sunun histeretik özellikte bir enzim olduğu bildirilmiştir (Jimenez & Garcia-Carmona, 1995). Başka bir çalışmada ise Flurkey (1989) bakla

yaprağından PFO enzimini saflaştırarak 61.5, 60, 44.5 ve 45 kDa moleküler kütleli dört polipeptid tayin etmiştir. Amino terminal dizilimi ile bu dört polipeptidin dokuzuncu aminoasit kalıntısına kadar aynı dizilimde olduğunu belirlemiştir.

Baklanın yanında fasulye, mercimek, bezelye, soya ve çeşitli fasulye türlerinin de içinde bulunduğu Fabaceae (Leguminosae) ailesi bitkilerine ait PFO izolasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar şunlardır:

Shin, Froderman ve Flurkey (1997)'in yaptığı çalışmada; maş fasüyesi (*Vigna radiata*) yaprak, kök, dal ve karanlıkta yetişen fidelerinin ham ekstraktlarında SDS-PAGE ile 65×10^3 , 59×10^3 , 52×10^3 , 47×10^3 , 31×10^3 ve 21×10^3 Da molekül ağırlıklı alt birimlere sahip PFO izoformları belirlenmiştir. Yapraktan saflaştırılan enzim 6.0 değerinde bir pH optimumuna ve 5.1 izoelektrik noktasına sahiptir. Çeşitli o-difenollerini yükseltgeyen enzimin L-DOPA için K_m değeri 24 mM'dır. Enzim salisil hidroksamik asit ve 2,3-naftalenediol ile güçlü; kojik asit, metimazol ve tropolon ile değişen oranlarda inhibe olmuştur.

Paul ve Gowda (2000) sümbül fasüyesi (*Dolichos lablab*)'nden PFO enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-Sephacel kromatografi, fenil agaroz kromatografi ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografilerini içeren dört adımlı bir prosedür ile saflaştırmışlardır. Bu işlemler sonrası 34 kat saflaştırılmış olan enzimin molekül ağırlığının 120 kDa olduğu ve 30 kDa'luk identik dört altbirimden oluştuğu bildirilmiştir. Optimum pH değeri kateşol ve 4-metil kateşol substratları için 4.0, DOPA substratı için 5.0; Michaelis sabiti K_m kateşol, 4-metil kateşol, pirogallol ve DOPA substratları için sırasıyla 10.5, 4.0, 12.5 ve 1.18 mM'dür. Tropolon, askorbik asit, potasyum metabisülfid ve sisteinin enzim üzerindeki inhibitör etkileri çalışılmıştır.

Guo, Ma, Shi ve Xue (2009) yeşil fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ve yeşil fasulye kabuğundan fosfat tamponu (pH=6.8, % 10 PVPP içeren) ile elde ettikleri ham enzim ekstraktlarına % 60'luk $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ve diyaliz uygulamış; diyaliz işlemi sonrası elde edilen yeşil fasulye diyalizatını DEAE-selüloz kolon kromatografisi ve yeşil fasulye kabuğu diyalizatını da Sephadex G-100 kolon kromatografisine tabii tutarak fraksiyonlamışlardır. PFO aktivitesine sahip fraksiyonlardan yeşil fasulye örneğinde PFOIIa ve PFOIIb, yeşil fasulye kabuğu örneğinde de PFOIa ve PFOIb

olmak üzere ikişer izoform elde edilmiş ve SDS-PAGE ile molekül ağırlıkları 57.5-39.0 kDa, optimum pH değerleri 6.8-7.2 aralığında bildirilmiştir. Enzimler çalışılan substratlar arasında pirogallolden sonra en yüksek katalitik aktiviteyi kateşol, 4-metil kateşol ve L-DOPA'ya karşı göstermişlerdir. L-askorbik asit, sodyum metabisülfid ve L-sistein enzimin güçlü; NaCl, tiyoüre ve sitrik asit zayıf inhibitörleridir. PFOI MnSO₄ ve CaCl₂ tarafından aktive edilmiştir.

Nagai ve Suzuki (2003) soya fasulyesi (*Glycine max* L.) filizi ekstraktına (NH₄)₂SO₄ çöktürmesi (% 40-80 arası), DEAE-Toyopearl 650M, CM-Toyopearl 650M, SuperQ-Toyopearl 650S ve QAE-Toyopearl 550C kolon kromatografileri uygulayarak PFO saflaştırmışlardır. Enzimin molekül ağırlığı 54 kDa, optimum pH=9.0 ve optimum sıcaklık değeri 40 °C'dir. 30 °C'de termal inaktivasyon meydana gelmiştir. Enzim kateşol, pirogallol ve dopamine karşı aktivite gösterirken; askorbik asit, L-sistein, 2-merkaptotanol ve glutatyon tarafından yüksek oranlarda inhibe edilmiştir. Depolama kararlılığı açısından değerlendirildiğinde ise enzim 4 °C'de 7 gün boyunca aktivite göstermiştir.

Günlük diyetle tükettiğimiz patates, kereviz, patlıcan, mantar ve enginar gibi yiyeceklerin işlenmesi, hazırlanması ve sunumu sırasında PFO enzimi kararmalara sebep olduğu için bu tür sebzelerden izole edilen PFO ve özellikle enzimin inhibisyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır:

İki patates (*Solanum tuberosum* L.) kültüründe depolama sırasında, çeşitli PFO ekspresyon örnekleri gözlenmiş ve bunların birinin izoformu izole edilip saflaştırılmıştır (Marri, Frazzoli, Hochkoeppler & Poggi, 2003). SDS-PAGE (69 kDa) ve jel filtrasyon kromatografisiyle (340 kDa) yapılan moleküler kütle tayini sonucu bu izoform bir multimer olarak değerlendirilmiş ve izoelektrik noktası 6.5 olarak hesaplanmıştır.

Patates ile ilgili yapılan bir başka çalışmada Mercimek vd. (2015) patatesten (*Solanum tuberosum*) saflaştırdıkları PFO enziminin kateşol substratı varlığında bazı özelliklerini belirlemişlerdir. İnhibisyon çalışmasında ise enzim aktivitesi üzerine limon, kırmızı pancar ve kırmızı biber gibi doğal ürünlerin etkisini incelemişlerdir.

Yağar (2004) kerevizden (*Apium graveolens* L.) elde ettiği polifenol oksidazını $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ çöktürmesi (% 20-80 arası) ve diyaliz işlemi ile kısmi saflaştırdıktan sonra, kateşol, pirogallol ve L-DOPA substratlarına karşı enzimin biyokimyasal özelliklerini belirlemiştir; enzim tirozin, rezorsinol ve p-krezol substratlarına karşı aktivite göstermemiştir. Ayrıca yapılan inhibisyon çalışmasında L-sistein, askorbik asit, glisin ve rezorsinolün etkili inhibitörler olduğunu tayin edilmiştir.

Aydemir ve Akkanlı'nın (2006) da kereviz (*Apium graveolens* L.) PFO'su ile ilgili yaptıkları çalışmada, % 40'luk tuz çöktürmesi ve diyaliz işlemi ile enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve kateşol substratına karşı optimum pH=7.0, optimum sıcaklığı 30 °C, K_m ve V_{max} değerlerini sırasıyla 29 mM ve 5560 U mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Çeşitli inhibitörler ile yaptıkları inhibisyon çalışmasında en etkili inhibitörün β -merkaptotanol olduğunu bulmuşlar ve kobalt, civa, baryum, kalay gibi diğer bileşiklerin tuzlarının da enzimi inhibe ettiğini gözlemişlerdir. Kerevizden kısmi saflaştırılan PFO enziminin elektroforez jelinde altı adet izoenzimi gözlemlenmiştir.

Aydemir (2004) yaptığı diğer bir çalışmada enginardan (*Cynara scolymus* L.) PFO enzimini kısmi saflaştırarak, enzim aktivitesi üzerine pH ve sıcaklığın etkisini incelemiştir. Enzim kateşol, 4-metil kateşol, pirogallol, DL-DOPA, L-DOPA ve gallik aside karşı aktivite gösterirken, L-tirozini yükseltmemiştir. Çeşitli bileşikler ile yapılan inhibisyon çalışmasında ditiotreitol, sodyum metabisülfid ve askorbik asit etkili inhibitörler olarak belirlenmiştir. Uygulanan PAGE sonrası enginar polifenol oksidazının üç izoformu olduğu görülmüştür.

Mishra vd., (2012) zengin bir PFO kaynağı olan patlıcandan (*Solanum melongena*) enzimi izole ederek, çeşitli kromatografik tekniklerle saflaştırmışlardır. Enzim 112 kDa'luk bir homodimer olup, substrat spesifikliğı 4-metil kateşol > tert bütül kateşol > dihidro kafeik asit > pirokateşol sıralamasındadır. Çalışılan çeşitli inhibitörler arasında, en güçlü inhibisyon oranını sistein hidroklorür göstermiştir.

Patlıcandaki (*Solanum melongena* var. depressum) PFO enzimiyle ilgili bir diğer çalışmada (Ng & Wong, 2015) enzim, tuz çöktürmesi ve jel filtrasyon kromatografisi kombinasyonu ile kısmi olarak saflaştırılmış, enzimin optimum pH, optimum sıcaklık,

substrat spesifitesi, termal kararlılığı ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Sodyum bisülfid ve askorbik asit inhibitör olarak denenmiştir.

Gawlik-Dziki, Szymanowska ve Baraniak (2007) yaptıkları çalışmada; brokoliden (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) elde edilen PFO % 80'lik amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında iyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri ile saflaştırılmıştır. Elde edilen enzimin optimum pH değeri 5.72 olarak ve moleküler ağırlığı 51.3 – 57 kDa aralığında belirlenmiştir. Brokoli PFO'sunun vanilin, ferulik asit, klorogenik asit, kafeik asit, kateşol ve 4-metil kateşol substratlarına karşı spesifikliğı ve askorbik asit, sitrik asit, EDTA ve sodyum sülfat gibi inhibitörlere karşı cevabı da çalışılmıştır. Benzer grup daha sonra maruldan benzer teknikleri kullanarak elde ettikleri PFO enzimi için de optimum pH, substrat spesifikliğı, inhibitör etkisi ve termal kararlılık çalışmalarını yapmıştır (Gawlik-Dziki, Zlotek & Swieca, 2008).

Pazı yaprağı (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) ile yapılan bir çalışmada (Gao, Han & Xiao, 2009) % 40-80 amonyum sülfat çöktürmesi ardından jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografilerini kullanarak PFO enzimini saflaştırmıştır. Enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve moleküler ağırlığını sırasıyla 7.5, 45 °C ve 41 kDa olarak belirlenmiştir. K⁺, Na⁺, SDS ve lauroil sarkosin tarafından enzimin aktive edildiğı; askorbik asit, sistein, merkaptöetanol, tiyoüre, sodyum metabisülfid, sodyum sülfidin yanında Ca⁺² ve Cu⁺² yi içeren divalent iyonlar tarafından inhibe edildiğı bildirilmiştir.

Öz, Çolak, Özel, Ertunga ve Sesli (2013) mantardan (*Lactarius piperatus* L.) PFO enzimini affinite kromatografisiyle saflaştırdıktan sonra substrat spesifitesini, enzim aktivitesi üzerinde pH'ın ve sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Çalışmada çeşitli inhibitörler ve metal iyonlarının enzim aktivitesine olan etkileri denenmiş; ayrıca mantar PFO'nun bazı organik çözücülerde aktivite gösterip göstermediğı de araştırılmıştır.

Diğer bitkilerden izole edilen PFO enzimleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve hala çeşitli bitkisel kaynaklardan PFO enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları yapılmaya devam edilmektedir. Meyvelerdeki PFO enzimiyle ilgili olarak literatürde yer alan çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir:

Orenes-Pinero, Garcia-Carmona ve Sanchez-Ferrer (2006) ayva (*Cydonia oblonga*) meyvesinden Triton X-114 ve PEG 8000 kullanarak faz partiyonu ve sonrasında % 35-70'lik amonyum sülfat çöktürmesiyle latent PFO'yu kısmi olarak saflaştırmışlardır. TBC (4-tert bütül kateşol) substratı varlığında enzim aktivitesi üzerinde SDS'nin etkisini incelemişler; reaksiyon ortamında SDS varlığında ve yokluğunda optimum pH ve inhibitör çalışması yapmışlardır. SDS varlığında optimum pH=5 olarak belirlenirken, SDS yokluğunda enzim asidik pH'da (pH=4) maksimum aktivite göstermiştir. Her iki durumda enzimin K_m değeri aynı kalırken, V_{max} değeri SDS varlığında 15 kat artmıştır, ayrıca askorbik asit ve L-sistein de her iki durumda enzimi yüksek oranlarda inhibe etmiştir.

Diğer bir çalışmada beyaz kiraz meyvesinden (Starks gold) polifenol oksidaz enzimi ekstrakte edilmiş ve enzim amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. PFO aktivitesi gösteren iki izoenzim (A ve B) elde edilmiş ve bunların optimum pH ve optimum sıcaklıkları belirlenerek, enzim aktivitesi üzerinde L-sistein ile sodyum disülfidin inhibitör etkileri tayin edilmiştir (Ünal, Gökkaya & Şener, 2011).

Navarro, Tarrega, Sentandreu ve Sentandreu (2014) Trabzon hurması PFO enzimi ile çalışmışlardır. Meyveden elde ettikleri ham ekstraktta kateşol substratını kullanarak farklı sıcaklık ve pH değerlerinde enzim aktivitelerini belirlemişler, daha sonrasında ısıyla çöktürerek PFO dışındaki proteinleri uzaklaştırmış, tuz çöktürmesi ve diyaliz işlemleriyle enzimi kısmen saflaştırmış ve jel elektroforezi uygulamışlardır. Elektroforez sonucu oksidaz aktivitesi gösteren dört bant gözlemişler ve farklı PFO izoformlarının olduğunu belirtmişlerdir.

Başka bir PFO çalışmasında, Yomra elmasından elde edilen ham ekstraktta PFO aktivite tayini yapılmış ve beş farklı substratın varlığında enzimin optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreleri (K_m ve V_{max}) belirlenmiştir. İnhibitör olarak sodyum metabisülfid, askorbik asit, sodyum azid ve benzoik asit ile çalışılmış, sodyum metabisülfid ve askorbik asit en iyi sonucu göstermiştir (Can vd., 2014).

Siddiq ve Dolan (2017) yaban mersininden (*Vaccinium corymbosum* L.) izole ettikleri PFO enziminin; optimum pH, optimum sıcaklık, substrat sfesifitesi, kinetik

parametreleri ve ısıl kararlılık gibi bazı biyokimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Askorbik asit, sodyum dietilditiyokarbamik asit, L-sistein ve sodyum metabisülfite bileşiklerini etkili PFO inhibitörleri olarak belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca -20, 4, ve 22 °C’de depolama kararlılığı da çalışılmıştır.

Ionita vd. (2017) erikten (*Prunus domestica*) amonyum sülfat çöktürmesi, hidrofobik etkileşim kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırdıkları PFO enzimini karakterize etmişler. Erik PFO’sunun moleküler ağırlığı 65 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzim kateşol, kateşin, 4-metil kateşol, klorojenik asit substratlarına karşı aktif iken, kafeik asid, ferulik asid, p-kumarik asit, p-krezol ve L-tirozine karşı aktivite göstermemiştir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı, pH ve termal kararlılığı, aktivitesi üzerine çeşitli inhibitörlerin etkisi çalışılmıştır. Ayrıca çalışmada enzim inaktivasyonunu sağlamak üzere yeni ve alternatif bir teknoloji olan yüksek basınç uygulaması da (300-1000 MPa) denenmiştir.

2.7. Bakla Bitkisi

Bakla (*Vicia faba*) Fabaceae (Legüminoseae) ailesinden bir yıllık bir bitkidir, ılıman iklimleri sever. Bakla yetiştiriciliğinin M.Ö. 6.800’den 6.500 yılları arasında başladığı düşünülmektedir. Günümüzde Kuzey Afrika ve Güneybatı Asya başta olmak üzere, dünyanın her yerinde bakla yetiştirilmektedir (<https://www.saglikfit.com>). Bakla bitkisi yaklaşık 10-25 cm uzunluğunda, açık yeşil renktedir. Bitkinin çiçekleri 1-2 cm uzunluğunda, siyah noktalı beyazdır ve meyve olarak bakla verir. Baklalar yeşil renkte, 4-15 cm uzunluğunda, dar veya geniş, bitkinin gövde üzerindeki yaprak altlarında asılı olarak bulunur.

Ülkemizde çoğunlukla Ege, Marmara ve Akdeniz Bölgesi’nde yetiştirilir. Türkiye’de 2002 yılı verilerine göre bakla yetiştiriciliği yapılan illerde bakla ekim alanı ve bakla üretiminde ön sırada olan il 6.988 ha ve 11.594 ton ile Balıkesir’dir, onu Muğla (3.524 ha ve 6.918 ton) ve Çanakkale (3.335 ha ve 5.523 ton) illeri izlemektedir. Ülkemizde kişi başına yıllık bakla tüketimi 2002 yılında 0.42 kg olarak belirlenmiştir

(Çiftçi, 2004). 2009-2016 yılları arasındaki Türkiye’de yaş sebze üretiminde bakla üretiminin 44.389 tondan 35.081 tona düştüğü görülmektedir (BÜGEM, 2017).

İnsan beslenmesinde önemli yeri olan bakla, bitkisel protein zenginliğinden dolayı değişik şekillerde tüketilmektedir. Taze bakla sebzesi olarak, taze iç bakla şeklinde veya enginar ile karıştırılarak çeşitli yemekleri yapılabilir. Taze sebze olarak tüketilmesinin yanında artan miktarı kuru tane olarak da değerlendirilir. Kuru taneleri ezilerek fava denen meze hazırlanabilir veya kuru fasulye gibi pişirilebilir. % 20-36 protein içeriği ile kuru bakla insan beslenmesinde olduğu kadar hayvan beslenmesinde de büyük önemi olan bir sebzedir (<http://www.tarimmarketi.com>).

Bakla yüksek protein içeriğinden dolayı hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır. Tek yıllık bitki olan yem baklası (*Vicia faba* var minör) taneleri % 24.5 ham protein oranı ile karma yemler için uygun bir protein kaynağıdır (Okuyucu, Tokaç & Okuyucu, 1990).

Soya, mercimek, bakla, bezelye ve yoncayı içeren baklagiller yaklaşık 20.000 türden oluşan geniş bir ailedir. Baklagillerin büyük bir kısmının nodül oluşturan bakterilerle (*Rizobium*) simbiyoz oluşturduğu gösterilmiştir. Bu nedenle azot fiksasyonu yüksek olan baklagiller “yeşil gübre” olarak tarımda önemli yer tutar (Heldt & Piechulla, 2015, s. 308). Bakla bitkisinin brokoli yetiştirmede yeşil gübre olarak kullanılmasıyla ilgili yapılan çalışmada, brokolinin verimini ve bazı özelliklerini arttırdığı görülmüştür (Yılmaz & Şahin, 2014).

Protein, karbonhidrat ve lif açısından zengin bir besin olan bakla potasyum, fosfor ve magnezyum mineralleri açısından da oldukça zengindir. A, C ve K vitaminlerinin yanında niasin, tiamin (B1), riboflavin (B2) ve piridoksin (B6) vitaminlerini de bol miktarda bulundurur (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. 100 gram baklanın besin içeriği (Basic Report 16052, 2017)

Temel bileşenler		Vitaminler	
Enerji	341 Kcal	Folat	423 µg
Karbonhidrat	58.59 g	Niasin	2.832 mg
Protein	26.12 g	Pantotenik asit	0.976 mg
Yağ	1.53 g	Piridoksin	0.366 mg
Diyet lifi	25 g	Riboflavin	0.333 mg
Mineraller		Tiamin	0.555 mg
Kalsiyum	103 mg	A vitamini	53 IU
Bakır	0.824 µg	C vitamini	1.4 mg
Demir	6.70 mg	K vitamini	9 µg
Magnezyum	192 mg	Elektrolitler	
Mangan	1.626 mg	Sodyum	13 mg
Fosfor	421 mg	Potasyum	1062 mg
Selenyum	8.2 µg	Fitonutrient	
Çinko	3.14 mg	β-Karoten	32 µg

Bakla bitkisi karbonhidrat, lif, protein, vitamin ve minerallerden oluşan besinsel içermesinin yanında polifenolik bileşikler ve saponinler, fitik asit, alkaloidler, tanenler ve lektinler gibi anti-nutritional bileşenleri de içerir (Kantar, 1994; Turco, Ferretti & Bacchetti, 2016). Bakla (*Vicia faba*) ve diğer bazı Fabaceae türleri teknolojide L-DOPA (L-3,4-dihidroksi fenilalanin) eldesinde kullanılmaktadır (Goyoaga vd., 2008; Zeybek & Zeybek, 2002, s. 217). Bu özelliğinden dolayı bakla Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır (Topal & Bozoğlu, 2016).

Baklanın Faydaları: Özellikle Ege ve Akdeniz mutfağının önemli sebzelerinden olan bakla, sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Böbreklere oldukça yararlıdır; böbrek kumlarının ve taşlarının dökülmesine yardımcı olur, idrar yollarını temizler. Böbrek iltihaplarının giderilmesinde de etkilidir. Vitamin ve mineralleri sayesinde bağışıklık sistemini güçlendirerek hastalıklara yakalanma riskini azaltır. Göğüs hastalıkları ve öksürüğe iyi gelir. Parkinson hastalığına karşı koruyucudur. Baklanın haşlanmak sureti ile hazırlanan

lapası cilt hastalıklarının tedavisinde etkili olabilmektedir. Kötü kolesterolü dengeleyerek kalp sağlığının korunmasına yardımcı olur. Yüksek lif içeriği sayesinde bağırsak hareketlerinin artmasını sağlar, hazımsızlık, kabızlık gibi sorunları giderebilir (<https://tr.mydearbody.com/sifali-bitkiler/baklanin-faydalari.html>, <http://www.faydalarizararlari.com/baklanin-faydalari/>, <http://www.medikaltedavi.com/baklanin-faydalari-ve-zararlari/>).

Favizm: Bakla, genetik olarak glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği olan kişilerde hemolitik anemiye yol açan tek bitkidir. Bakla bitkisinin neden olduğu bu tür akut hemolitik anemi “Favizm” olarak adlandırılır. Favizm adı bakladan yapılan meze olan Fava’dan gelmektedir. Baklanın dondurulmuş veya kurutulmuş şekilde tüketilmesi veya bakla bitkisinin polenlerinin solunması bile bazı kişilerde hemolize yol açabilmektedir. Favizm genellikle Akdeniz ülkelerinde ve ilkbaharda meydana gelmektedir. Bakla yendikten sonraki 24 saat içinde akut hemolitik anemi geliştiği bilinmektedir (Şaşmaz, 2009).

G6PD pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olup, intrasellüler indirgeyici güç olan NADPH’nın başlıca kaynağıdır. G6PD, eritrosit hücrelerinde yer alan ve kırmızı kan hücrelerini oksidasyondan koruyan önemli bir enzimdir. Eksikliğinde yeterli miktarda NADPH üretilemez, eritrositleri oksidatif strese koruyan glutatyonun okside formu indirgenemez ve sonuçta H₂O₂ birikimi ile eritrositler lizise uğrar (Nelson & Cox, 2013, s.559).

Baklanın hemolitik etkisinden, visin ve konvisin olarak adlandırılan iki glukozidik pirimidin türevi ve bunların aglikonları olan divisin ve izouramil bileşikleri sorumlu tutulmaktadır. Bu maddeler otooksidasyona giderek reaktif oksijen radikalleri oluşturur. Oluşan radikaller redükte glutatyonu oksitler ve G6PD eksikliği görülen bireylerde hemolize neden olur (Doğan, İkbal & Pirim, 2007; Şaşmaz, 2009).

2.8. Tezde Kullanılan Yöntemlere Genel Bakış

2.8.1. Amonyum Sülfat Tuzu Çöktürmesi

Proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılması işlemleri esnasında homojenat ortamında proteinlerin çöktürülmesi; ortamın pH ve iyonik kuvvetinin değişimi, organik çözücü veya polimer ilavesi gibi yöntemlerle sağlanır.

Nötral tuzların ilavesiyle proteinlerin çöktürülerek fraksiyonlanması yaygın kullanılan bir yöntemdir. Proteinler yüzeylerinde hidrofilik bölgelerin yanında hidrofobik bölgelere de sahiptir. Sulu ortamda aşırı miktarda tuz ilavesi yüzey gerilimini artırır ve protein yüzeyindeki hidrofobik bölgelerin birbirleriyle etkileşimleri artarak agregatlaşma meydana gelir. Bir araya gelen büyük hidrofobik bölgelerin daha küçük veya daha az miktarda hidrofobik bölgeleri içerenlerden önce çökmesi, protein fraksiyonlanmasına imkan tanır. Tuz ilavesiyle protein çöktürmelerinde en çok amonyum sülfat tuzu kullanılır. Amonyum sülfat; doymuluk konsantrasyonunun yüksek olması (20 °C 4 M), 0-30 °C aralığında çözünürlüğünün çok az değişmesi, doymun çözeltisinin yoğunluğunun aynı çözeltideki protein agregatlarının yoğunluğundan düşük olması sebebiyle santrifüjle ayrılabilmesi ve proteini stabilize etmesi gibi bazı avantajlara sahiptir (Telefoncu, Salnikow, Zihnioğlu & Kılıç, 2000).

2.8.2. Diyaliz

Protein izolasyon ve saflaştırma prosesinde ortama eklenen çöktürücülerin uzaklaştırılması ve ekstraktın deriştirilmesi için uygulanan çeşitli yöntemler mevcuttur. Diyaliz işlemi de amonyum sülfat tuz çöktürmesinden sonra uygulanan yöntemlerden biridir. Diyaliz işlemi, genellikle tuzlar gibi küçük moleküllü bileşenlerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Seçici geçirgen bir membran ile ayrılmış iki faz arasındaki konsantrasyon yani kimyasal potansiyel farkına dayalı difüzyonla gerçekleşen diyaliz, membranın iki yüzeyi arasındaki bu potansiyel fark eşitleninceye kadar devam eder. Aktivite kayıplarını azaltmak için işlem +4 °C'de gerçekleştirilir (Telefoncu, Salnikow, Zihnioğlu & Kılıç, 2000, s. 87).

2.8.3. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Protein izolasyonu ve saflaştırılması çok adımlı bir süreçtir ve her adımda toplam protein miktarının belirlenmesi gerekir. Ancak bu sayede protein izolasyonu ve saflaştırmasının gidişatı izlenerek, çalışmanın devamı hakkında yorum yapılabilir. Protein konsantrasyonunun belirlenmesi için günümüze kadar birçok yöntem geliştirilmiştir, bunlardan UV ve görünür bölge spektroskopisindeki ölçümler en yaygın kullanılanlarıdır. Bradford yöntemi de görünür bölgede çalışılan yöntemlerden biridir.

Proteinlerin asidik ve bazik grupları organik boyalarla etkileşerek renkli bileşikler oluşturur. Özellikle aromatik boyar maddeler proteinlere kuvvetli bağlanırlar. Boya bağlama esaslı yöntemlerin en yaygını Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyar maddesinin kullanıldığı yöntemdir. Boya kuvvetli asitte çözüldüğü için protonlu hali kırmızı-kahverengi arası bir renge sahiptir, ortamda protein varlığı durumunda proteinin bazik ve aromatik amino asitlerine bağlanarak mavi renkli hale dönüşür. Oluşan mavi renk 595 nm'de maksimum absorbanans verir. Boyanın proteine bağlanması yaklaşık 2 dakikada tamamlanır ve 1 saat boyunca renk kararlılığını korur. Yöntemin duyarlılığı 25-200 µg protein/ml civarındadır. Diğer protein tayini yöntemlerinin aksine Bradford yöntemi ortamdaki çeşitli kimyasallardan kaynaklanan girişimden daha az etkilenmektedir (Telefoncu & Kılıç, 2009, s.78).

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METODLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich), Na_2HPO_4 (Riedel-de Haen), Triton X-100 (Sigma), polivinil pirolidon (Sigma), amonyum sülfat (Sigma), Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich), sığır serum albümini BSA (Sigma-Aldrich), o-fosforik asit (Atabay), asetik asit (Riedel-de Haen), etanol (Riedel-de Haen), sitrik asit (Merck), kateşol (Aldrich), pirogallol (Sigma), L-DOPA (Sigma), gallik asit (Sigma), klorojenik asit (Sigma), 4-metil kateşol (Sigma), rezorsin (Merck), hidrokinon (Sigma-Aldrich), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) FeCl_2 (Riedel-de Haen), CaCl_2 (Merck), MnCl_2 (Aldrich), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel-de Haen), $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck) L-askorbik asit (Merck), EDTA-Na tuzu (Sigma), potasyum siyanür, sodyum azid (Merck), sodyum bisülfid (Sigma), L-sistein (Sigma), sodyum klorür (Riedel-de Haen), sodyum hidroksit (Merck), dializ membranı (Sigma).

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Tampon hazırlamak için gerekli çözeltiler;

- 0.1 M Disodyum fosfat çözeltisi
- 0.1 M Potasyum dihidrojen fosfat çözeltisi
- 0.1 M CH_3COOH çözeltisi

- 0.1 M NaOH çözeltisi

Protein tayini için gerekli çözeltiler;

- % 0.1'lik sığır serum albümini (w/v)
- Bradford reaktifi: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 mL etanol ve 50 mL o-fosforik asitle 10 dakika karıştırıldı, distile suyla 500 mL'ye tamamlandı. Whatman no: 1 kağıdından süzülerek koyu renkli cam şişede buzdolabında saklandı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- pH Metre (Jenco 6173)
- Terazi (Precisa XB 220A)
- Waring Blender (Homojenizer)
- Soğutmalı santrifüj (Heraeus Biofuge Stratos)
- Su banyosu (Clifton)
- Çalkalamalı su banyosu (Wisebath Daihan)
- Orbital çalkalayıcı (Wishshake Daihan SHO-1D)
- Ultrasonik su banyosu (Wisclean Daihan)
- Derin dondurucu (-80 °C) (WiseCryo Daihan)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific)
- Isıtıcı ve manyetik karıştırıcı (IKA RH basic-2)
- Mikro pipetler (Eppendorf)
- Vorteks (Whırlı mixer)

3.2. Metotlar

3.2.1. Bakla Kabuğundan Polifenol Oksidaz Enziminin İzolasyonu

Bu çalışmada enzim kaynağı olarak, Edirne-Karaağaç Mahallesi'nde yetiştirilen baklalar halk pazarından satın alındı. Tez çalışmasında kullanılmak üzere, baklalar yıkanarak kurulandıktan sonra içleri çıkarılarak kabukları alındı. 300 g taze bakla

kabuğu 600 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH 6.0) içinde 0.63 g polivinil piroolidon (PVP) ve 2.8 mL Triton X-100 eklenerek oda sıcaklığında Waring Blender kullanılarak 1 dakika boyunca homojenize edildi. İşlem sonunda elde edilen homojenat bekletilmeden tülbent bez ve cam pamuğundan süzöldü. Süzöntü bitki kalıntılarını uzaklaştırmak üzere +4 °C’de 10000 rpm’de 20 dk santriföjlendi. Elde edilen sıvı kısım “ham ekstrakt” olarak adlandırıldı. Protein tayini ve enzim aktivite tayini yapıldıktan sonra tuz çöktürmesi aşamasına geçildi.



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan bakla kabukları

3.2.2. Polifenol Oksidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Bakla kabuklarından elde edilen ham ekstraktı deriştirmek ve kısmi saflaştırma için tuz çöktürmesi ve diyaliz işlemleri uygulandı. İşlem başlangıcında proteinleri çöktürmede kullanılacak uygun amonyum sülfat miktarını (%) belirlemek üzere; ham ekstrakta farklı tuz konsantrasyonlarında (% 30, % 30-65, % 65-80) amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı. Denenen bu miktarlardaki tuz çöktürmeleri sonrası polifenol oksidaz enzimi için maksimum tuz oranı % 30 - 65 olarak belirlendi.

İzolasyon sonrası elde edilen ham ekstrakta (660 mL) 116.2 g amonyum sülfat eklenerek % 30’luk doygunluğa getirildi ve karıştırılarak bir süre soğukta bekletildi. Daha sonra 10000 rpm’de +4 °C’de, 45 dakika santriföjlendi. Elde edilen çökelek 0.1 M fosfat tamponuna (pH=6.0) alındı, enzimatik aktivite ve protein tayinleri yapıldı. Kalan

süpernatanta (680 mL) 159.8 gr amonyum sülfat eklenerek % 65 doygunluğa getirildi ve tekrar santrifüjlendi. Santrifüj sonrası çökelti alındı ve istenmeyen proteinlerin mevcut olduğu süpernatant atıldı. Çökelti az miktar tamponda çözülerek enzimatik aktivite ve protein tayinleri yapıldı.

Amonyum sülfat ile çöktürülen fraksiyonlarda yapılan aktivite tayini sonucu %30'luk tuz çöktürmesi uygulanan kısımda düşük aktivite belirlendi. % 30-65'lik tuz çöktürmesi uygulanan kısımda daha yüksek aktivite gözlemlendi için bu fraksiyona diyaliz işlemi uygulandı. Çöktürülen enzim çözeltisi, 0.1 M fosfat tamponuna (pH=6.0) karşı diyalizlendi. Bu işlem, manyetik karıştırıcı üzerinde +4 °C'de 24 saat boyunca tamponun 3 kez değiştirilmesi ile gerçekleştirildi. Diyaliz işlemi sonrası elde edilen diyalizat "kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı" olarak kabul edildi. Deneyler süresince diyalizat koyu renkli bir şişede buzdolabında saklandı.

3.2.3. Enzimatik Aktivite Tayini

% 30-65'lik amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz sonrası elde edilen polifenol oksidaz enziminin (kateşolaz) aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. 0.1 mL enzim çözeltisi, 0.02 M 2.90 mL kateşol çözeltisi (0.1 M pH=6.0 fosfat tamponunda hazırlanmış) ile karıştırılarak absorbanstaki artışlar 420 nm'de zamana karşı takip edildi. Şahit küveti 3 mL 0.02 M substrat çözeltisi ile hazırlandı. Ayrıca diyalizat renkli olduğundan her bir tüp için 0.1 mL enzim çözeltisi ve 2.90 mL fosfat tamponundan oluşan numune körü de hazırlandı.

1 Ünite Polifenol Oksidaz Aktivitesi, bir dakikada örneğin absorbansında meydana gelen 0.001 birimlik artış olarak tanımlandı (Park ve Luh., 1985). Enzimin hacimsel aktivite ve spesifik aktivite değerleri aşağıdaki formüllerle belirlendi:

$$\text{Hacimsel aktivite (U/mL)} = \text{Ünite} / \text{Enzim Hacmi (mL)}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg)} = \text{Hacimsel Aktivite} / \text{mL'deki mg protein miktarı}$$

3.2.4. Protein Tayini

Çalışma süresince elde edilen ham ekstrakt, % 30 ve % 30-65'lik tuz çöktürmesi sonrası çöken protein, % 30 ve % 30-65'lik çöktürme sonrası elde edilen süpernatant ve dializat örneklerinde protein tayini Bradford Yöntemine göre yapıldı (Bradford, 1976).

Standart protein olarak sığır serum albüminin (BSA) % 0.1'lik çözeltisi kullanıldı ve farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltileri hazırlanarak standart protein grafiği çizildi. Standart grafik için standart protein çözeltisinden 10, 20, 40, 60, 80, 100'er µL alınarak her birinin hacmi destile su ile 100 µL'ye tamamlandı. Her bir tüpe 5 mL Bradford reaktifi eklenerek vortekslendi ve 5 dk bekletildikten sonra 595 nm'de absorbans değerleri okundu. Şahit olarak 100 µL tampon ve 5 mL Bradford reaktifi karışımı kullanıldı. Artan konsantrasyonlarda hazırlanan sığır serum albümini örneklerinin absorbansları ile konsantrasyonları arasında doğrusal standart protein grafiği oluşturuldu.

Örneklerden (ham ekstrakt, % 30 ve % 30-65'lik tuz çöktürmesi sonrası çöken proteinler, % 30 ve % 30-65'lik süpernatantlar ve diyalizat) 50 µL alınarak hacimleri tamponla 100 µL'ye tamamlandı. 5 mL Bradford reaktifi eklenerek vortekslendikten sonra 5 dk bekletildi. Absorbans değerleri 595 nm'de okundu. Örneklerin protein içerikleri standart protein grafiğinden elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplandı.

3.2.5. Bakla Kabuğu PPO Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakla kabuğundan elde edilen polifenol oksidaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH, optimum sıcaklık, K_m ve V_{max} kinetik parametreleri belirlendi. Enzimin termal kararlılığı, pH kararlılığı, substrat spesifikliğı, enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının ve bazı inhibitörlerin etkisi incelendi. Ayrıca enzimin depolama sırasındaki kararlılığı da araştırıldı.

3.2.5.1. Optimum pH belirlenmesi

Enzimin aktivitesi üzerinde pH etkisini incelemek amacıyla 0.1 M fosfat tamponu (pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 8.0) ve 0.1 M sitrat tamponu (pH 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0) sistemlerinde 0.02 M kateşol substratı kullanılarak aktivite tayinleri

yapıldı. Daha sonraki deneyler enzim aktivitesinin en yüksek olduğu tampon ve pH'ta yapıldı. Belirlenen absorbanslardan yararlanılarak PFO aktiviteleri Bölüm 3.2.3'de belirtildiği gibi hesaplandı.

3.2.5.2. Optimum sıcaklık belirlenmesi

Enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 10 °C'lik artışlarla 10-60 °C aralığında enzim aktiviteleri ölçüldü. Çalışma 10 ve 20 °C'ler için buz banyosunda, 30-60 °C'ler için digital göstergeli su banyosunda yapıldı. 0.02 M kateşol substratı ve sitrat tamponu (pH 5.0) kullanıldı. Tampon ve substrat çözeltileri belirtilen sıcaklıklara ulaşmaya kadar uygun ortamda inkübe edildi. Enzim çözeltisi eklenir eklenmez hızlıca aktivite tayini yapıldı. Belirlenen absorbanslardan yararlanılarak PFO enzim aktiviteleri Bölüm 3.2.3'de belirtildiği gibi hesaplandı.

3.2.5.3. pH kararlılığı çalışması

Bakla kabuğundan elde edilen PFO enziminin pH kararlılığını incelemek için 6 farklı pH değerinde (pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 de 0.1 M sitrat tamponu, pH 8.0 de fosfat tamponu) tampon çözeltiler hazırlandı. Çalışılacak tamponun 1.9 mL'si ile 0.1 mL enzim karışımı 30 dakika ve 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası aktivite tayinleri yapıldı. Kalan yüzde polifenol oksidaz aktivitelerini hesaplamak için; inkübasyona tabi tutulmadan optimum koşullarda enzim aktivitesi tayin edildi. Bu değer %100 aktivite olarak kabul edildi ve inkübe edilen enzimlerin yüzde kalan aktiviteleri bu değerden yararlanılarak hesaplandı.

3.2.5.4. Termal kararlılık çalışması

Bakla kabuğundan elde edilen PFO enziminin termal kararlılığını belirlemek için 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda, enzim çözeltisi 15, 30, 45 ve 60 dakika boyunca bekletildikten sonra tüpler 2 dakika buz banyosunda soğutuldu ve 0.1 M sitrat tamponunda (pH=5.0) hazırlanan 0.02 M kateşol substratı ile PFO aktivite tayini yapıldı. % polifenol oksidaz aktivitelerini belirlemek için sıcaklıkta bekletilmeden, optimum koşullarda enzim aktivitesi tayin edildi. İnkübe edilen örneklerin yüzde kalan aktiviteleri buna göre bağıl olarak hesaplandı.

3.2.5.5. Substrat spesifikliği alışması

Kateşol dışındaki diğer fenolik bileşikler üzerinde bakla kabuğu PFO aktivitesini incelemek üzere 0.1 M sitrat tamponunda (0.02 M, pH=5.0) pirogallol, L-DOPA, gallik asit, klorojenik asit, 4-metil kateşol, rezorsin ve hidrokinon zelteleri hazırlandı. Hazırlanan her bir substrat ile PFO enzim aktiviteleri tayin edildi. Kateşol substratının PFO aktivitesine göre, denenen her bir substratın bağıl aktiviteleri (%) hesaplandı. Yüksek aktivite gösteren substratların optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri ayrıca belirlendi.

3.2.5.6. K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Bakla kabuğu polifenol oksidazının K_m ve V_{max} değerlerini belirlemek amacıyla, 0.005, 0.0075, 0.010, 0.0015, 0.020, 0.025, 0.050 M'lık olmak üzere 7 farklı konsantrasyonda kateşol ve 0.010, 0.0015, 0.020, 0.025, 0.030 M'lık olmak üzere beş farklı konsantrasyonda pirogallol ve 4-metil kateşol zelteleri hazırlandı. PFO aktivite ölümleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek her bir substrat için K_m ve V_{max} sabitleri belirlendi.

3.2.5.7. PFO enzimi üzerine metal iyonlarının etkisi

Bakla kabuğu PFO zerine bazı metal iyonlarının etkisini incelemek için Cu^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} iyonlarının klorür tuzlarının 1 mM ve 10 mM'lık zelteleri 0.1 M sitrat tamponunda (pH=5.0) hazırlandı. Reaksiyon ortamına her bir metal zeltisinden 0.1 mL eklenerek aktivite tayinleri yapıldı. Optimum koşullarda yapılan aktivite ölümüne göre bağıl aktiviteleri (%) hesaplandı.

3.2.5.8. PFO enzimi üzerine bazı kimyasalların etkisi

Bakla kabuğu PFO enzimi üzerine inhibitör etkisini incelemek amacıyla askorbik asit, EDTA-Na tuzu, potasyum siyanür, sodyum azid, sodyum bisülfit ve L-sistein kullanıldı. Bu maddelerin 0.3 mM ve 0.6 mM deşişimlerde zelteleri 0.1 M sitrat tamponunda (pH=5.0) hazırlandı. Reaksiyon ortamına her bir inhibitör zeltisinden 100 μ L ve 200 μ L eklenerek aktivite tayinleri yapıldı. Optimum koşullarda yapılan PFO aktivite ölümüne göre bağıl aktiviteleri (%) hesaplandı.

PPO'nun en yaygın inhibitörü olan L-sistein için 0.005-0.02 M konsantrasyon aralığında enzim aktivitesi tayini yapıldı. İnhibisyon konsantrasyonuna karşı aktivite grafiği çizildi ve L-sistein için IC₅₀ değeri hesaplandı.

3.2.5.9. Enzimin depo kararlılığı

Bakla kabuğu PFO enziminin depo kararlılığını belirlemek amacıyla diyalizat +4 °C'de bir ay boyunca bekletildi ve belirli aralıklarla aktivite tayini yapıldı.



BÖLÜM 4

DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR

4.1. Bakla Kabuğundan PFO İzolasyonu

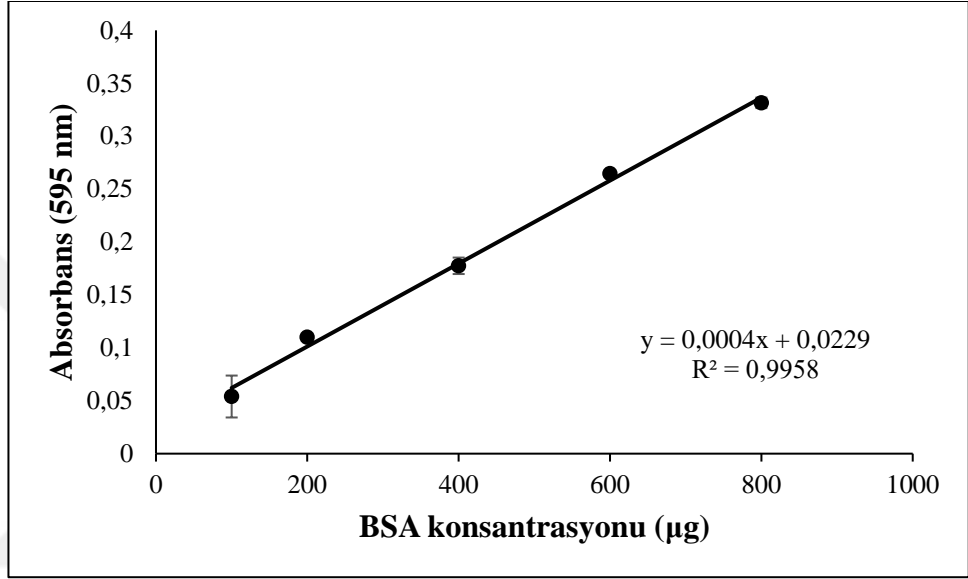
Edirne’de yerel pazardan satın alınan baklaların taneleri çıkarıldıktan sonra taze olarak Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde protein izolasyonu yapıldı ve elde edilen çözelti “ham ekstrakt” olarak isimlendirildi. Elde edilen ham ekstrakta Bölüm 3.2.2’de belirtildiği gibi çeşitli amonyum sülfat konsantrasyonları eklenerek tuz çöktürmesi ve sonrasında diyaliz işlemi uygulandı. Diyalizden sonra elde edilen çözelti “diyalizat” olarak adlandırıldı ve kısmi saflaştırılmış enzim kaynağı olarak kullanıldı. İzolasyon ve kısmi saflaştırma sırasında elde edilen bu fraksiyonlara ait protein ve aktivite değerleri Çizelge 4.1’de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Çeşitli basamaklarda bakla kabuğu PFO’ın protein miktarı ve enzim aktiviteleri

Kısmi Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Protein Miktarı mg/mL	Toplam Protein (mg)	Hacimsel Aktivite (U/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg prt)	Toplam Spesifik Aktivite	Saflaştırma Oranı
Ham Ekstrakt	660	11.8	7788	37	3.14	2072.4	1
% 30 çöken protein	-	3.75	-	20	5.33	-	-
% 65 çöken protein	-	10.05	-	78	7.76	-	-
Diyalizat	51	20.4	1040	2568	125.8	6415.8	3.1

4.2. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması

Kantitatif protein tayini 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan standart protein çözeltisi olan BSA çözeltisinden 10, 20, 40, 60 ve 80 µL örnekler alınarak hacimler saf su ile 100 µL'ye tamamlandı. Her örneğe 5'er mL Bradford reaktifi eklenerek 5 dakika bekletildi ve 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. BSA konsantrasyonu- Absorbans grafiği çizildi (Şekil 4.1).

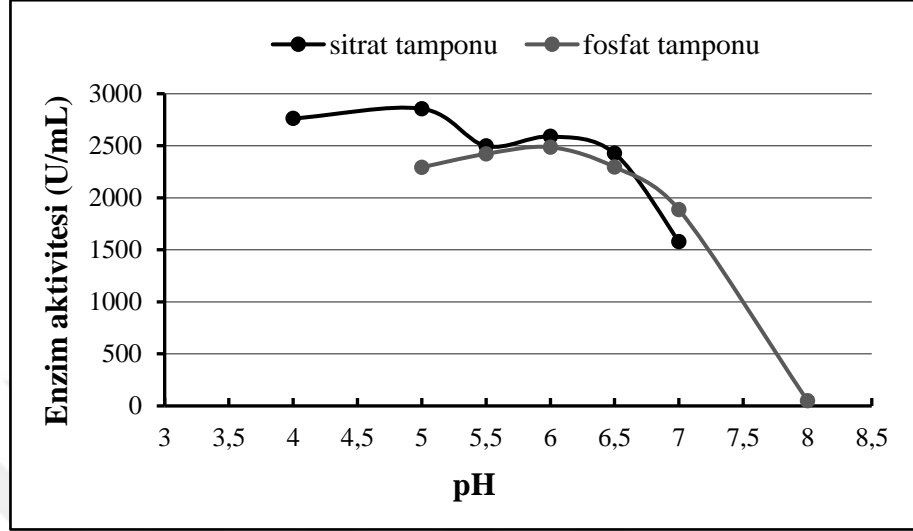


Şekil 4.1. Bradford yöntemine ait protein standart grafiği

4.3. Optimum pH Belirlenmesi

Bakla kabuğu polifenol oksidaz enziminin optimum pH'ını belirlemek için çalışma aralığı pH =5.8-8.0 olan KH₂PO₄/Na₂HPO₄'dan oluşan fosfat tamponu, çalışma aralığı pH =2.6-7.6 olan Sitrik asit/ Na₂HPO₄'dan oluşan sitrat tamponu kullanıldı. Bu amaçla enzimin çalışabileceği en uygun tampon pH'ını belirlemek için pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 8.0 değerlerinde 0.1 M fosfat tamponu ile ve pH 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 ve 7.0 değerlerinde sitrat tamponu ile hazırlanan kateşol substratı varlığında aktivite tayinleri yapıldı. Enzimin optimum pH değerleri fosfat tamponu için pH 6.0 ve sitrat tamponu için 5.0 olarak belirlendi (Şekil 4.2). Sitrat tamponunda yapılan deneylerden elde edilen PFO aktiviteleri, fosfat tamponunda yapılan deneylerden elde edilen PFO aktivite sonuçlarına göre daha yüksek olduğu için ve belirlenen optimum pH sitrat tamponunun

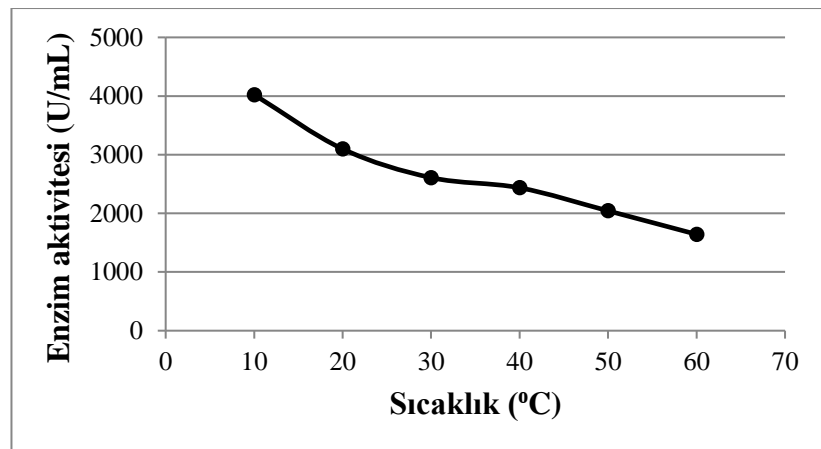
çalışma aralığına daha uygun olduğu için, daha sonraki çalışmalarda 0.1 M pH 5.0 sitrat tamponunun kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.2. Bakla PFO'nun sitrat ve fosfat tamponlarındaki optimum pH değerleri

4.4. Optimum Sıcaklık Belirlenmesi

Optimum sıcaklık çalışması Bölüm 3.2.5.2'de belirtildiği gibi 10 °C'lik artışlarla 10-60 °C aralığında yapıldı. Elde edilen aktivite sonuçlarına göre en yüksek aktivite 10 °C'de belirlenmesine rağmen, sıcaklığı sabit tutmada yaşanan zorluktan dolayı daha sonraki çalışmalar 20 °C'de sürdürüldü. Bakla PFO enziminin optimum sıcaklık tayinine ait değerlerin grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir.

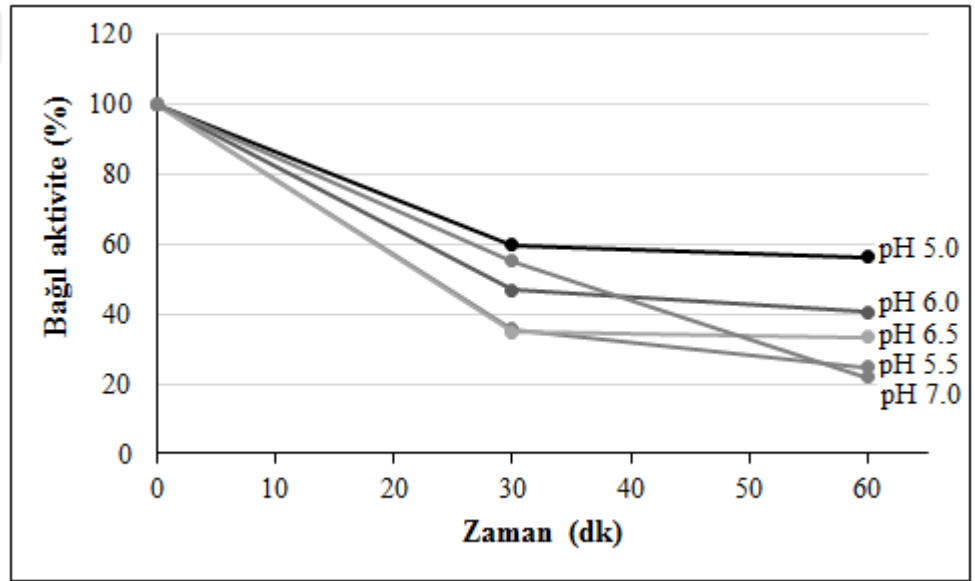


Şekil 4.3. Bakla kabuğu PFO'nun optimum sıcaklık değeri

4.5. pH Kararlılığı Çalışması

Enzimin pH kararlılığını incelemek için pH'ı 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 8.0'de tampon çözeltiler hazırlandı. Bakla kabuğundan kısmi saflaştırılan PFO enzimi çalışılacak tampon ile 30 ve 60 dakika süresinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası aktivite tayinleri yapıldı. Optimum koşullarda enzim aktivitesi tayin edilerek bu değer %100 aktif kabul edildi ve inkübe edilen enzimlerin yüzde kalan aktiviteleri bu değerden yararlanılarak bağıl aktivite cinsinden hesaplandı.

Şekil 4.4'te PFO enziminin incelenen pH değerlerinde 30 ve 60 dakika inkübasyonlar sonrası kalan bağıl aktiviteleri görülmektedir. pH 5.0'te aktivitenin yarıdan fazlasının korunduğu ve pH 6.0'da aktivitenin yaklaşık yarısının korunduğu gözlemlendi. pH 5.5 ve 6.5'te aktivitenin yarıdan fazla azaldığı ve en fazla düşüşün 60 dakika inkübasyon sonrası pH 7.0 tamponunda olduğu belirlendi. pH 8.0 fosfat tamponunda 30 dakika ve 60 dakika inkübasyon sonrasında aktivite gözlemlenmedi.

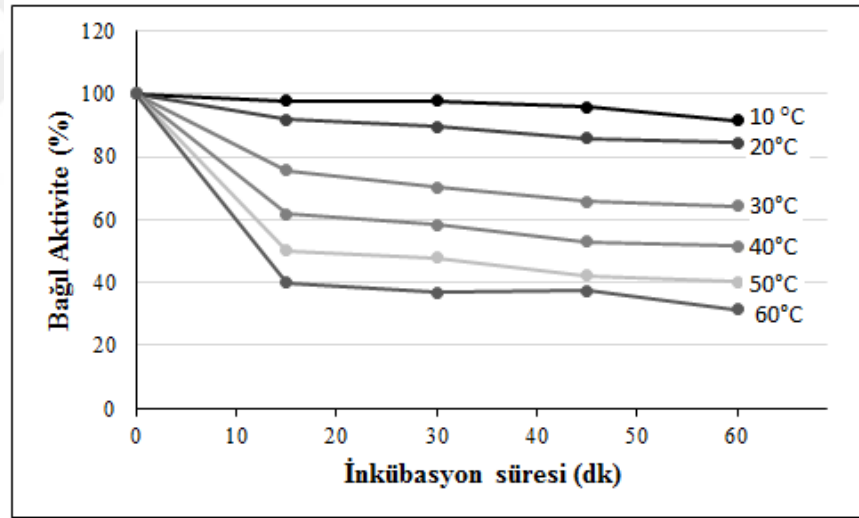


Şekil 4.4. Bakla kabuğu PFO enzimi için pH kararlılık grafiği

4.6. Termal Kararlılık Çalışması

Bakla kabuğundan kısmen saflaştırılmış PFO enzimine ait ısıl kararlılığının incelenmesi için 15, 30, 45 ve 60 dakikalık zamanlar için 10-60 °C'lik sıcaklık aralıklarında uygun ortamda inkübe edildikten sonra aktivite tayinleri yapıldı. Yüzde aktiviteleri ısıl işlem görmemiş PFO enziminin aktivite değeri ile karşılaştırılarak hesaplandı. Elde edilen değerler kullanılarak grafik çizildi (Şekil 4.5).

Şekil 4.5'te PFO enziminin farklı sıcaklıklardaki 15., 30., 45. ve 60. dakikalar sonrasında kalan aktiviteleri görülmektedir. Belirtilen inkübasyon sürelerinde aktivite, enzimin optimum sıcaklığı olarak belirlenen 10 °C'de % 90 oranında, deneysel çalışmaların yapıldığı 20 °C'de ise % 85 oranında korunmuştur. Enzim aktivitesi ilk 30 dakikalık zaman içinde 30 °C'de % 70 ve 40 °C'de % 58 korunurken, 50-60 °C'lerde ilk 15 dakikada enzim aktivitesi yarı yarıya azalmıştır.



Şekil 4.5. Bakla kabuğu PFO enzimi için termal kararlılık grafiği

4.7. Substrat Spesifikliği Çalışması

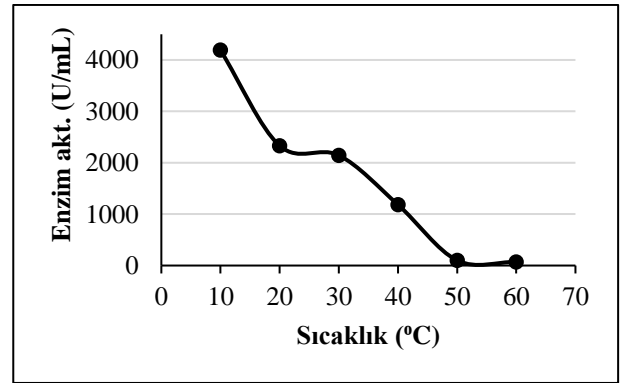
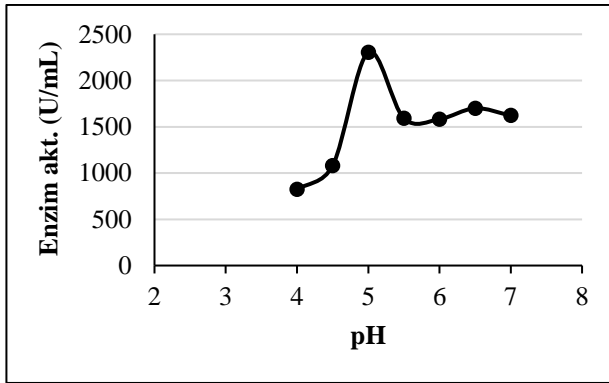
Bakla kabuğundan kısmi olarak saflaştırılan PFO enziminin aktivitesi en yaygın substratı olan kateşol haricinde difenolik ve trifenolik yapıdaki farklı fenolik substratlar ile de (4-metil kateşol, klorojenik asit, L-DOPA, rezorsin, hidrokinon, gallik asit ve pirogallol) çalışıldı. Elde edilen aktivite sonuçları Çizelge 4.2'de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Bakla kabuğu PFO enziminin substrat spesifitesi

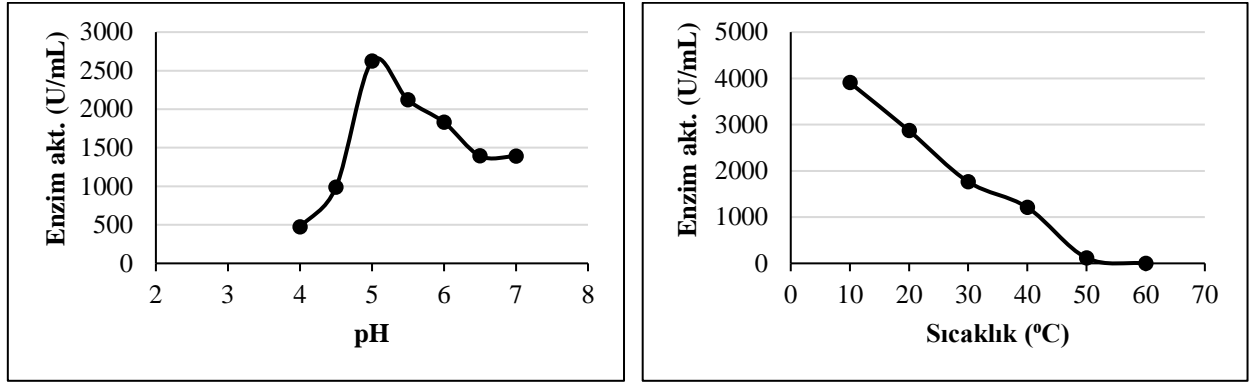
Substrat	Konfigürasyon	Bağlı Aktivite %
Kateşol	Orto-dihidroksi	100
4-metil kateşol	Orto-dihidroksi	77.2±0.6
Klorojenik Asit	Orto-dihidroksi	20.9±2.8
L-DOPA	Orto-dihidroksi	33.5±1.97
Rezorsin	Meta-dihidroksi	24.8±0.84
Hidrokinon	Para-dihidroksi	38.9±0.14
Gallik asit	Trihidroksi	14.4±1.69
Pirogallol	Trihidroksi	81.8±3.25

Edirne’de yetişen bakla kabuğundan elde edilen PFO enzimi, çalışılan substratlar arasında en yüksek aktiviteyi $3370 \pm 135,4$ U/mL ile kateşol substratına karşı göstermiştir. Diğer substratların aktiviteleri kateşole göre bağlı aktivite olarak hesaplanmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Enzimin kateşolden sonra en iyi aktivite gösterdiği substratlar pirogallol ve 4-metil kateşoldür. Bu substratlar için optimum pH ve optimum sıcaklık çalışması yapılmıştır. Her iki substrat için de, kateşol substratında belirlendiği gibi enzimin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH 5,0, optimum sıcaklık $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak belirlenmiştir.



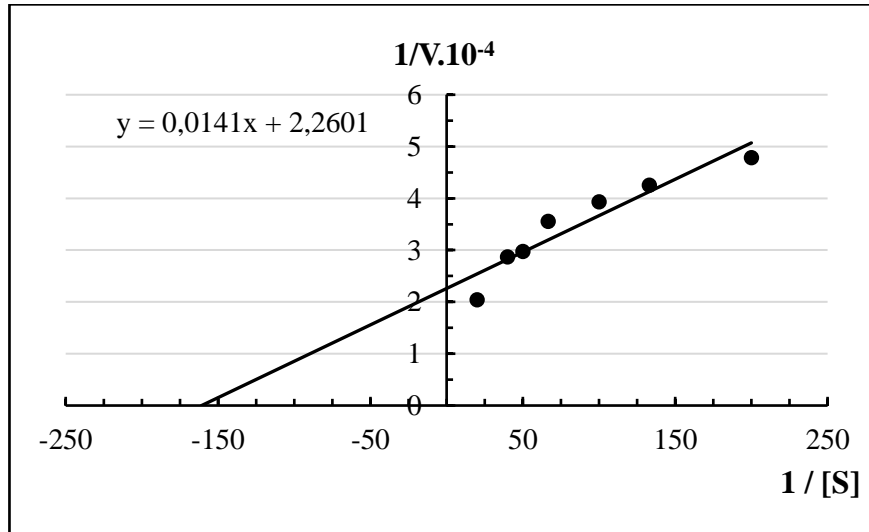
Şekil 4.6. Bakla kabuğu PFO enzimin pirogallol substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri



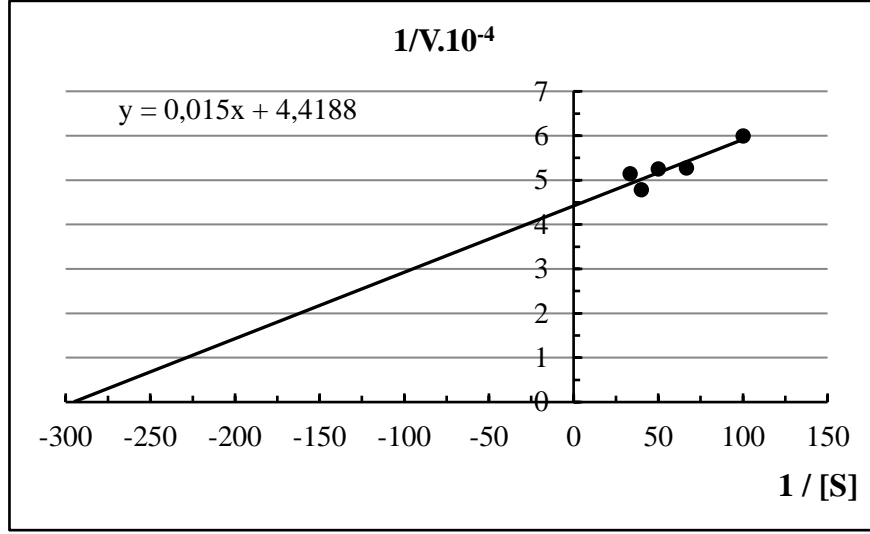
Şekil 4.7. Bakla kabuğu PFO enziminin 4-metil kateşol substratı için optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri

4.8. K_m ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

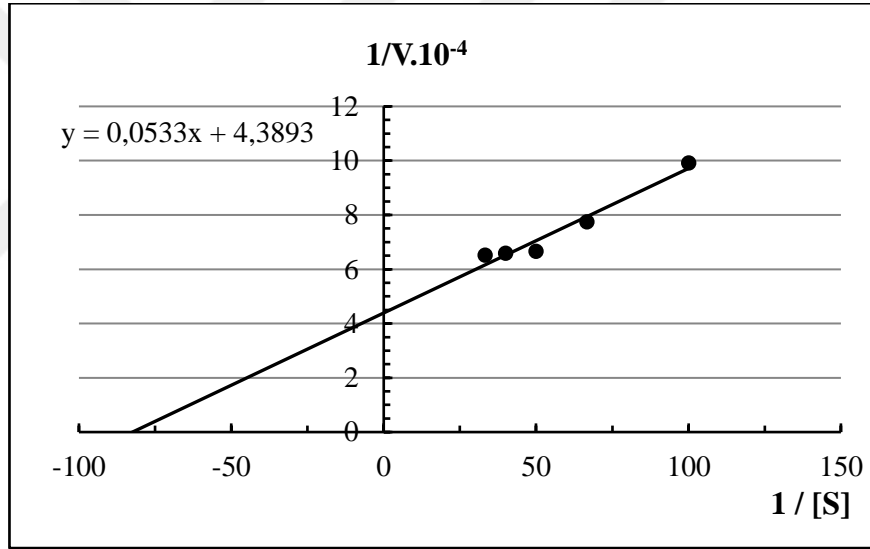
Bakla kabuğu PFO enziminin en yüksek aktivite gösterdiği kateşol, pirogallol ve 4-metil kateşol substratlarının K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda substrat çözeltileri hazırlandı. Enzim aktiviteleri ölçüldü ve aktivite değerleri U/mL olarak ifade edildi. $1/V$ ve $1/S$ değerleri hesaplanarak her bir substrat için Linewear-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.8, 4.9, 4.10). K_m ve V_{max} değerleri bu grafikler yardımıyla belirlendi. Ayrıca katalitik etkinlik değerleri (V_{max}/K_m) hesaplandı (Çizelge 4.3).



Şekil 4.8. Bakla kabuğu PFO enziminin kateşol substratı için Linewear-Burk grafiği



Şekil 4.9. Bakla kabuğu PFO enziminin pirogallol substratı için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.10. Bakla kabuğu PFO enziminin 4-metil kateşol substratı için Lineweaver-Burk grafiği

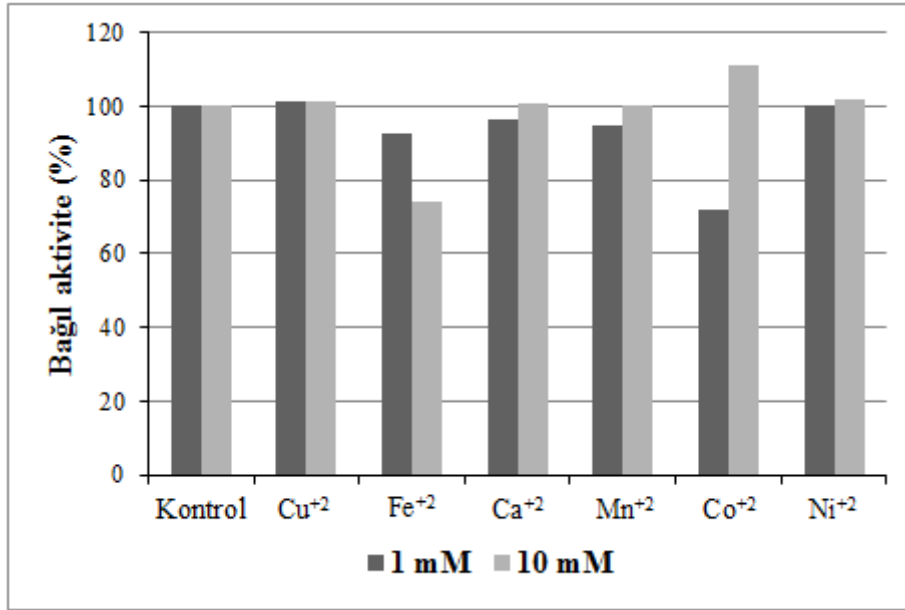
Çizelge 4.3. Bakla kabuğu PFO enziminin farklı substratları için kinetik parametreleri

Substrat	K_m (mM)	V_{max} (U/mL dk)	V_{max}/K_m
Kateşol	5.53	4424.58	800.10
Pirogallol	3.05	2263.06	741.98
4-metil kateşol	8.62	2278.27	264.30

Bakla PFO'nun üç substratı için K_m değerleri karşılaştırıldığında, enzim ilgisinin en yüksek olduğu substratlar kateşol ve pirogalloldür. Bu iki substrat için V_{max}/K_m oranının yüksek olması da bakla kabuğu PFO enzimi için en uygun olan substratların kateşol ve pirogallol olduğunun göstergesidir.

4.9. PFO Enzimi Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Bakla kabuğu PFO aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisini incelemek için $CuCl_2$, $FeCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiCl_2$ tuzlarının iki farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon ortamına 1 mM ve 10 mM'lık her bir metal çözeltisinden eklenerek aktivite tayinleri yapıldı. Kontrol olarak optimum koşullarda, metal iyonu içermeyen örneklerle aktivite tayini yapıldı ve buna göre hesaplanan bağlı aktiviteler Çizelge 4.4'te verildi.



Şekil 4.11. Bakla kabuğu PFO enzimi üzerine kateşol substratı varlığında metal iyonlarının etkisi

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.11'de PFO aktivitesinin 1 mM ile 10 mM'lık bakır ve nikel iyonları varlığında ve 10 mM'lık kalsiyum ve mangan iyonları varlığında değişmediği; 1 mM'lık demir, kalsiyum ve mangan iyonları varlığında bir miktar azaldığı görülmektedir. 10 mM'lık kobalt iyonu varlığında aktivitede % 10 civarında

artış gözlenmiştir. Ancak 1 mM kobalt iyonu ve 10 mM demir iyonu varlığında enzim aktivitesinin %75'in altına düştüğü gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. Bakla kabuğu PFO enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

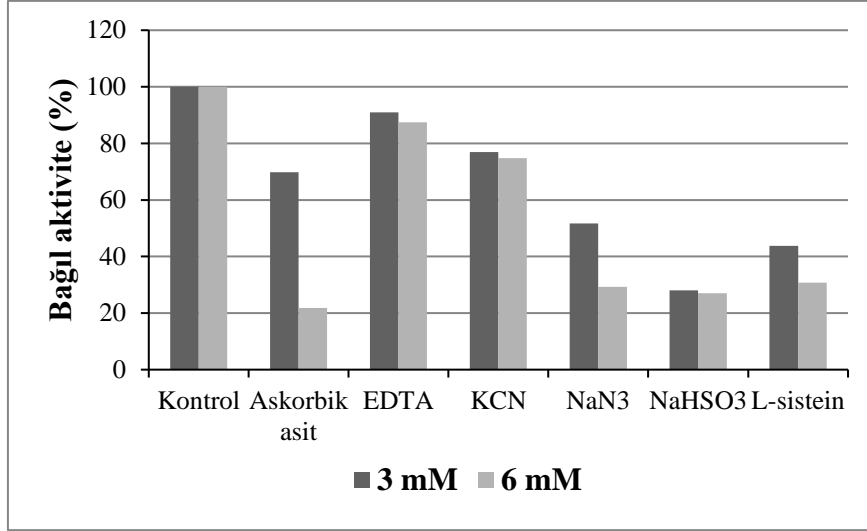
Metal iyonu (1 mM)	% Aktivite	Metal iyonu (10 mM)	Aktivite (%)
Cu ²⁺	101.2	Cu ²⁺	101.4
Fe ²⁺	92.4	Fe ²⁺	74.1
Ca ²⁺	96.2	Ca ²⁺	100.9
Mn ²⁺	94.9	Mn ²⁺	100.4
Co ²⁺	72.1	Co ²⁺	110.9
Ni ²⁺	100.5	Ni ²⁺	102

Çalışılan metallerin 1 mM ve 10 mM konsantrasyonlarındaki aktiviteleri kıyaslandığında (Çizelge 4.4) PFO aktivitesinin bakır iyonları varlığında değişmediği; kalsiyum, mangan ve nikel iyonları varlığında bir miktar arttığı; 10 mM'lık kobalt iyonu varlığında ise % 52 civarında arttığı görülmektedir. Ancak 10 mM demir iyonu varlığında aktivitenin % 19 oranında düştüğü gözlenmiştir.

4.9. PFO Enzimi Üzerine Bazı Kimyasalların Etkisi

Bakla kabuğu PFO enzimi üzerine bazı kimyasal maddelerin etkisini incelemek için çalışmada askorbik asit, EDTA, potasyum siyanür (KCN), sodyum azid (NaN₃), sodyum bisüfit (NaHSO₃) ve L-sistein çözeltileri kullanıldı. Reaksiyon ortamına her bir inhibitörün 3 mM ve 6 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri eklenerek aktivite tayinleri yapıldı. Optimum koşullarda yapılan aktivite ölçümüne göre bağıl aktiviteleri hesaplandı (Şekil 4.12).

Aktivitenin % 50'sinin korunduğu inhibitör konsantrasyonu olarak tanımlanan IC₅₀ değeri PFO'nun en yaygın inhibitörü olan L-sistein için bu değer 50 mM olarak hesaplandı.

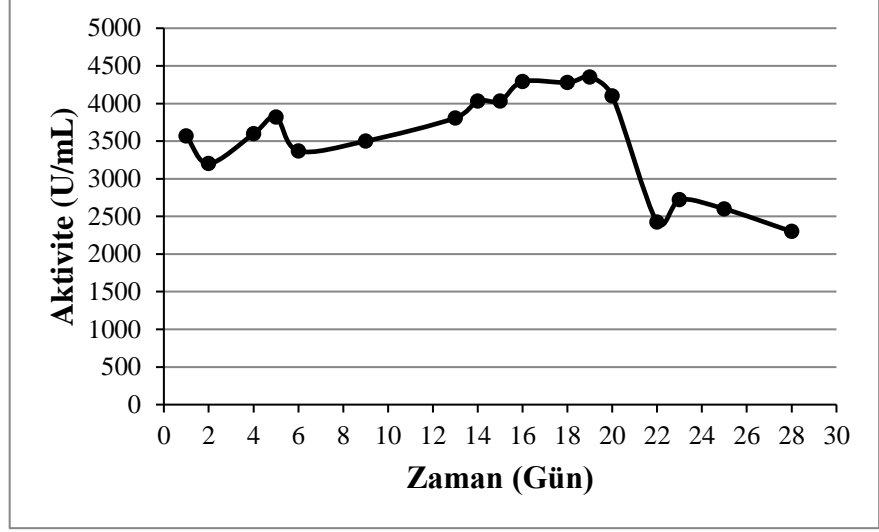


Şekil 4.12. Bakla kabuğu PFO enzimi üzerine kateşol substratı varlığında inhibitörlerin etkisi

Denenen tüm inhibitörlerde % 100 inhibisyon görülmemiş, en yüksek inhibisyon oranlarını 3 mM ve 6 mM konsantrasyonlarda sodyum bisülfid (sırasıyla % 72 ve % 73) ve L-sistein (sırasıyla % 56 ve % 69); 6 mM konsantrasyonda askorbik asit (% 78.2) ve sodyum azid (% 71) vermiştir. Bakla PFO enzimi üzerine çalışılan 6 mM konsantrasyondaki kimyasalların inhibisyon etkisi genel olarak sodyum bisülfid > askorbik asit > L-sistein > sodyum azid > potasyum siyanür > EDTA sıralaması şeklinde verilebilir.

4.10. Enzimin Depo Kararlılığı

Enziminin depo kararlılığını belirlemek amacıyla diyalizat çözeltisi +4 °C'de muhafaza edildi ve yaklaşık bir ay boyunca belli aralıklarla PFO aktivite tayini kateşol ile yapıldı. Enzim çözeltisinin 20 gün boyunca aktivitesini koruduğu ve bakla kabuğu PFO enzim aktivitesinde 20. günden sonra azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Bakla kabuğu PFO enzim aktivitesi için +4 °C’de depo kararlılık grafiği

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Polifenol oksidaz bitkilerde yaygın olarak bulunan bir enzimdir ve meyve ve sebzelerin hazırlanması sırasında katalitik etkisi sonucu esmerleşmelere neden olur. Yeşil çay üretiminde polifenol oksidaz gibi yükseltgenme enzimleri yüksek sıcaklık veya buharla şok soldurmayla inaktif hale getirilirken; siyah çay üretiminde PFO oksidasyonu önem kazanmaktadır (Tosun ve Karadeniz, 2005). Benzer şekilde hurma, kuru kayısı ve üzüm gibi ürünlerde de enzimatik oksidasyon arzu edilen bir durumdur. Bazı durumlarda ise enzimatik esmerleşme ürünün görüntüsünü ve tadını değiştirmenin yanında besin değeri üzerine olumsuz etki etmektedir. Meyve ve sebzelerin ticari üretiminde PFO kaynaklı enzimatik esmerleşmenin neden olduğu bu besinsel ve ekonomik kayıplardan dolayı, PFO'nun katalitik ve biyokimyasal özelliklerini araştırmaya yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Yapılan literatür taramasında daha önce bakla kabuğu PFO enziminin izolasyonu ve biyokimyasal özellikleriyle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bunun yanı sıra Özcan ve Sağıroğlu (2014) bakla kabuğu homojenatını camsı karbon elektrot yüzeyine immobilize ederek fenolik bileşiklerin tayini için amperometrik ölçüm temelli bir biyosensör dizayn etmişlerdir. Çalışmada, çeşitli fenolik bileşikleri (kateşol, p-krezol, kafeik asit, hidrokinon, pirogallol, sinamik asit gibi) bakla kabuğu dokusunda bulunan PFO enzimi tarafından yükseltgenerek tayin edilmiş ve biyosensör çalışma koşullarının optimizasyonu da belirlenmiştir. Kateşol substratı için en iyi ölçüm aralığı pH=7 ve 37.5 °C'de ölçülmüştür. Taze bakla kabuğu homojenatının gösterdiği bu PFO aktivitesi ve daha önce PFO enzimi çalışılmamış olduğu için; bu tez kapsamında PFO kaynağı olarak bakla kabuğu seçilmiş ve PFO

enziminin izolasyonu, biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda enzimin bazı biyokimyasal özellikleri (optimum pH ve optimum sıcaklığı, pH kararlılığı, termal stabilitesi, kinetik parametreleri, çeşitli substratlara karşı olan ilgisi, enzimin aktivitesi üzerine iki değerlikli katyonların ve inhibitör olabilecek bazı kimyasalların etkisi) incelenmiştir.

Çalışmada taze bakla kabukları, 0.1 M fosfat tamponunda (pH 6.0) polivinil piroolidon (PVP) ve Triton X-100 varlığında homojenize edildi ve ham ekstrakt hazırlandı. Ekstraksiyonda deterjan olarak Triton X-100 ilavesi; membran proteinleri veya membrana bağlı proteinlerin çözünürleştirilmesi açısından önemlidir. Ayrıca PVP de izolasyon esnasında açığa çıkan polifenoller ile kompleks yaparak ham ekstraktın kararmasını engellemektedir (Paul ve Gowda, 2000). Elde edilen ham ekstrakttaki PFO aktivitesi gösteren fraksiyon katı amonyum sülfat ile % 30-65 doygunlukta çöktürüldü ve 4 °C’de diyalizlenerek kısmen saf enzim elde edildi. Proteinlerin çöktürülmesinde en çok kullanılan amonyum sülfat tuzunun miktarı proteinlerin molekül ağırlığına bağlıdır (Panadare & Rathod, 2018). PFO izolasyonu için pekçok araştırmacı genellikle % 30-85 (w/v) amonyum sülfat konsantrasyonunda çalışmışlardır (Ionita vd., 2017; Gao, Han & Xiao, 2009; Guo, Ma, Shi & Xue, 2009; Orenes-Pinero, Garcia-Carmona & Sanchez-Ferrer, 2006). Çalışmamızda da % 30-65 tuz konsantrasyonunda çöken proteinler en yüksek PFO aktivitesini göstermiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi sonrası PFO enzimi aktivitesi, ham enzim ekstraktına göre 3.1 kat saflaştırılmıştır. Baklagiller ailesiyle ilgili olarak çalışılan PFO kaynakları arasında Guo vd. (2009) de PFO enzimini % 60 tuz çöktürmesi ve diyaliz sonrası yeşil fasulye kabuğundan 3.5 kat, tanelerinden 3.7 kat; Paul ve Gowda (2000) % 40-80 aralığında tuz çöktürmesi ve diyaliz sonrası sümbül fasulyesinden 5.7 kat saflaştırdıkları görülmektedir. Diğer kaynaklarla yapılan çalışmalarda da benzer oranlar görülmektedir. % 50 oranında tuz çöktürmesi ve diyaliz sonrasında PFO patlıcandan 1.77 kat (Ng & Wong, 2015); % 80 oranında tuz çöktürmesi ve diyaliz uygulaması sonrasında brokoliden 3.8 kat (Gawlik-Dziki, Szymanowska & Baraniak, 2007); pazı yaprağından 2 kat (Gao, Han & Xiao, 2009); üzümünden 2.23 kat (Önez, 2006) ve % 90’lık tuz çöktürmesi ve diyaliz işlemi sonrasında beyaz kirazdan 3.3 kat (Ünal, Gökkaya & Şener, 2011) oranda saflaştırıldığı bildirilmektedir.

pH, enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Bakla kabuğu PFO enzimi için kateşol substratıyla yapılan çalışmada pH profili iki farklı tampon sisteminde, 4-8 aralığında çalışıldı ve optimum pH fosfat tamponu ile optimum pH=6.0 ve sitrat tamponu ile optimum pH=5.0 olarak belirlendi. Pirogallol, 4-metil kateşol ve hidrokinon substratlarının optimum pH'ları da 5.0 olarak bulundu. PFO enziminin optimum pH'sı bitki kaynağına bağlı olarak değişmekle birlikte, genellikle 4.0-8.0 aralığında olduğu görülmektedir. Substrat olarak kateşol kullanılarak sümbül fasulyesi PFO'ı için optimum pH=4.0 (Paul & Gowda, 2000), maş fasulyesi PFO için optimum pH=6.0 (Shin, Froderman & Flurkey, 1997), yeşil fasulye kabuğu PFO'ı için optimum pH=6.8-7.0 (Guo, Ma, Shi & Xue, 2009) ve soya fasulyesi PFO'ı için optimum pH=9.0 (Nagai & Suzuki, 2003) olarak bildirilmiştir. Çizelge 5.1'de diğer bazı sebze ve meyvelerin farklı substratları için optimum pH değerleri görülmektedir.

Enzimin pH kararlılığını incelemek üzere enzim altı farklı pH ortamında (pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 ve 8.0) 30 ve 60 dakika inkübe edildikten sonra kateşol substratı varlığında PFO aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve kalan aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplandı (Şekil 4.4). pH=8.0 tamponunda inkübe edilen enzim aktivite göstermezken, 60 dakikalık inkübasyon süresi sonunda en fazla aktivite kaybı pH=7.0 ve en yüksek aktivite ise enzimin optimum pH olan pH=5.0 tamponunda tayin edildi. Marula PFO için de yapılan pH kararlılığı çalışmasında, 30 dakika inkübasyon sonrası pH=6 ve optimum pH'sı olan pH=7 tamponunda çok stabil olduğu; asidik pH'larda aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Mdluli, 2005). Mantardan izole edilen PFO için 20 °C'de 24 ve 72 saatlik inkübasyon uygulaması ile yapılan pH kararlılık çalışmasında; enzimin 4-metil kateşol ve L-DOPA substratları için sırasıyla pH 5.0 ve 7.0'de yüksek pH kararlılığına sahip olduğu bildirilmiştir (Kuyumcu, 2014). Pazı yaprağı PFO enzimi 35 °C'de 1 saat inkübe edildiğinde bazik bölgede, özellikle pH=7.0-8.0 stabil olduğu rapor edilmiştir (Gao, Han & Xiao, 2009). Çeşitli kaynaklardan izole edilen PFO enzimleri için farklı pH'ya sahip tamponlarda inkübasyon sonrası aktiviteleri ölçüldüğünde, hepsinin optimum pH'larındaki tamponlarda en yüksek aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir.

Çizelge 5.1. Çeşitli kaynaklardan elde edilen PFO enziminin farklı substratları için optimum pH ve optimum sıcaklıkları

Enzim kaynağı	Substrat	pH	T (°C)	Kaynak
Bakla kabuğu	Kateşol, 4-metil kateşol Pirogallol	5	10	(Bu çalışma)
Kereviz	Kateşol L-DOPA Pirogallol	7 7 7.5	40 45 25	Yağar, 2004
Enginar	Kateşol, 4-metil kateşol Pirogallol	6 6.5	25 25	Aydemir, 2004
Kereviz	Kateşol	7	30	Aydemir, 2006
Brokoli	Kateşol, 4-metil kateşol	5.7	-	Gawlik-Dziki, Szymanowska & Baraniak, 2007
Pazı yaprağı	L-DOPA	7.5	45	Gao, Han & Xiao, 2009
Mantar	Kateşol	7	20	Öz vd., 2013
Mantar	4-metil kateşol L-DOPA	5 7	20 20	Kuyumcu, 2014
Mantar	Kateşol	6	10	Tsivinska vd., 2015
Patlıcan	Kateşol 4-metil kateşol	6 5	30 40	Ng & Wong, 2015
Kaldirik bitkisi	Kateşol 4-metil kateşol Pirogallol	7.5 5 7.5	10 5 30	Alıcı & Arabacı, 2016
Çay	4-metil kateşol	6	30	Yabancı, 2008
Domat zeytini	4-metil kateşol	4.5	30	Taş, 2009
Dut	4-metil kateşol Kateşol Pirogallol	5 7 7.5	20 45 20	Arslan, Erzen, Sinan & Özensoy, 2004
Üzüm	Kateşol	7.2	25	Önez, 2006
Beyaz kiraz	Kateşol (A izoenzimi) Kateşol (B izoenzimi)	4.5 4.9	20 30	Ünal, Gökkaya & Şener, 2011
Yomra elması	Kateşol L-titozin	5 5	40 20	Can vd., 2014
Erik	Kateşol	6	25	Ionita vd., 2017
Yaban mersini	Kateşol	6.1-6.3	35	Siddiq & Dolan, 2017

Çalışma sıcaklığında enzimlerin katalitik aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden biridir ve PFO aktivitesi üzerinde de oldukça etkilidir. Bitkisel kaynağa bağlı olarak, sıcaklıktaki farklılıklar PFO enziminin aktivitesi için gerekli olan oksijenin çözünürlüğünü değiştirerek veya enzimin konformasyonunda değişikliklere neden olarak aktiviteye etki edebilir. Bakla PFO enzimi aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 10-60 °C aralığında enzimatik aktivite tayinleri yapıldı. Kateşol, pirogallol ve 4-metil kateşol substratları ile yapılan çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesi 10 °C'de ölçüldü, ancak bu sıcaklığı stabil sağlamının güçlüğü nedeniyle çalışmalar ikinci en yüksek aktivitenin gözleendiğı 20 °C'de yürütüldü. Substrat olarak kateşol kullanılarak yeşil fasulye kabuğı PFO'ı için 20-30 °C'de (Guo, Ma, Shi & Xue, 2009) ve soya fasulyesi PFO'ı için 40 °C'de (Nagai & Suzuki, 2003) maksimum aktivite gözleendi. Literatürde enzimin optimum sıcaklık değerleri genellikle 10-50 °C aralığında değiştii görülmektedir. Bazı sebze ve meyvelerin farklı substratları için optimum sıcaklık değerleri Çizelge 5.1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, bakla polifenol oksidaz enziminin de optimum sıcaklığı diğer polifenol oksidazlarla benzer olduğı görülmektedir.

Gıda endüstrisinde meyve ve sebzeler ile ilgili ürünler hazırlanırken enzim aktivitesinin önlenmesi için, ısıl uygulamalar kullanılmaktadır. Bu amaçla ısıl işlemden/ısıtmada aktivasyonun olmadığı sıcaklıklar seçilmelidir. Bu sıcaklık aralığının belirlenebilmesi için PFO enzimi termal kararlılık yönündende incelenmelidir. Tez kapsamında bu amaçla (kateşol substratı için) kısmen saflaştırılmış enzim çözeltisi 10-60 °C sıcaklıklarında 15 dakikalık aralıklarla toplam bir saat inkübe edilerek enzimin ısıl kararlılığı incelendi. Bakla PFO enziminin bir saatin sonunda 10 ve 20 °C'lerde aktivitesinin % 85'ini koruduğı belirlendi. Kuyumcu'nun çalışmasında (2014) mantar PFO için belirttiğı gibi, bakla PFO enzimi de optimum sıcaklıklarında yapılan (10 ve 20 °C'lerde) inkübasyonlar sonrasında aktivitesini büyük oranda korumuştur. Bakla PFO 30 dakikalık inkübasyon sonrası 30 ve 40 °C'de % 58 ve üzerinde, 50 °C'de % 48 oranında aktivitesini koruduğı (Şekil 4.5) için nispeten termostabil olduğı söylenebilir. Bu durum ayva (Yağar, 2004), dut (Arslan vd., 2004) ve kaldirik bitkisinden (Alıcı, 2012) izole edilen PFO çalışması sonuçlarıyla benzer özellik göstermektedir.

Fenolik bileşikler polifenol oksidazların öncelikli substratıdır. Kateşol en genel substrat olarak bilinmesine rağmen doğal fenollerin türü ve konsantrasyonu bitkinin çeşidine göre değiştiği için, enzim aktivitesi de değişebilmektedir. Bu yüzden farklı fenolik bileşikler (kateşol, 4-metil kateşol, klorojenik asit, L-DOPA, rezorsin, hidrokinon, gallik asit ve pirogallol) kullanılarak bakla kabuğu PFO'nun substrat seçiciliği incelenmiştir. Çalışmada kullanılan substratlara karşı aktiviteler, polifenol oksidazın en yaygın olarak kullanılan substratı kateşol baz alınarak % bağıl aktivite cinsinden hesaplanmıştır. Bakla PFO enzimi kateşol (% 100), pirogallol (% 81.8) ve 4-metil kateşole (% 77.2) karşı yüksek, çalışılan diğer substratlara karşı en düşük gallik asit olmak üzere, değişen difenolaz aktiviteleri gözlenmiştir. Baklagiller ailesinden olan maş fasülyesi PFO enzimi substrat olarak kateşol için % 100, 4-metil kateşol için % 208 ve klorojenik asit için % 140 oranında bağıl aktivite hesaplanmıştır (Shin, Froderman & Flurkey, 1997). Sümbül fasülyesi (*Dolichos lablab*) PFO'ı da bakla PFO'ı ile aynı substratlara (kateşol % 100, 4-metil kateşole % 140, pirogallol % 24) etki ederken; tirozin, gallik asit, kateşin, klorojenik asit ve p-krezole karşı aktivite göstermemiştir (Paul & Gowda, 2000). Soya filizinden saflaştırılan PFO kateşol (% 100) ve pirogallole (% 79) karşı yüksek; dopamin (% 29), klorojenik asit (% 7) ve L-DOPA'ya (% 3) karşı düşük aktivite göstermiştir (Nagai & Suzuki, 2003). Paul ve Gowda (2000) tarafından sümbül fasülyesi PFO çalışmasında kateşol, 4-metil kateşol gibi küçük o-fenoller için küçük ve yüksek afiniteli bir substrat bağlama yeri olduğu ve kafeik asit, klorojenik asit, kateşin gibi büyük o-difenollere afinitesi olmadığı önerilmiştir. Yeşil fasülye kabuğu kaynaklı PFO için Guo vd. (2009) de mono-, di- ve trifenolleri kullanarak yaptıkları substrat spesifitesi denemesinde katalitik etkinliği pirogallol, kateşol, 4-metil kateşol ve L-DOPA sıralamasında olduğunu bildirmişlerdir.

Çeşitli bitkisel PFO'lara bakıldığında ise; muşmula PFO'ı en yüksek aktiviteyi 4-metil kateşol varlığında gösterirken, L-DOPA, tirozin ve 3-(4-hidroksifenil) propiyonik asit substratlarını da yükseltmiştir (Demir, 2006). Başka bir PFO enzimi çalışmasında, çay bitkisi kaynaklı PFO'nun kateşol, 4-metil kateşol ve pirogallol substratlarına aktivite gösterdiği; kafeik asit ve gallik asit substratlarına karşı aktivite göstermediğini bildirilmiştir (Yabacı, 2008). Alıcı ve Arabacı (2016) yedi farklı substrat ile yaptıkları çalışmada kaldirik bitkisi PFO enziminin, metil kateşol, 4-kateşol,

pirogallol ve kafeik asite karşı aktivite gösterirken; guaikol, L-tirozin ve gallik asit substratlarına karşı aktivite göstermediğini bildirmişlerdir.

Bakla polifenol oksidazının kateşolden sonra yüksek aktiviteyle yükselttiği 4-metil kateşol ve pirogallol için optimum pH ve optimum sıcaklık çalışması yapılmış ve her iki substrat için de optimum aktivite şartları pH=5.0 ve 10 °C olarak tayin edilmiştir. Kateşol, 4-metil kateşol ve pirogallolün Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerlerini belirleyebilmek için pH=5.0 ve 20 °C'de çeşitli konsantrasyonlarda substrat çözeltileri hazırlanarak PFO enzim aktiviteleri ölçüldü. Lineweaver-Burk grafikleri oluşturularak her bir substrat için K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı. K_m ve V_{max} değerleri kıyaslandığında bakla PFO için kateşol ve pirogallolün iyi birer substrat olduğu görüldü. Bazı baklagil türleri ve diğer bitkisel kaynakların K_m ve V_{max} değerleri Çizelge 5.2'de derlenmiştir.

Çizelge 5.2. Çeşitli kaynaklardan elde edilen PFO enziminin farklı substratları için kinetik parametreleri

Enzim kaynağı	Substrat	K_m (mM)	V_{max}	Kaynak
Bakla kabuğu	Kateşol Pirogallol 4-metil kateşol	5.53 3.05 8.62	4424 U/mL dk 2263 U/mL dk 2278 U/mL dk	(Bu çalışma)
Maş fasülyesi	L-DOPA 4-metil kateşol	24 4	0.13 U/dk 0.11 U/dk	Shin, Froderman & Flurkey, 1997
Sümbül fasülyesi	Kateşol Pirogallol 4-metil kateşol L-DOPA	10.5 12.5 4.0 1.18		Paul & Gowda, 2000
Soya filizi	Kateşol Pirogallol	71 84	20.9 OD/dk 31.4 OD/dk	Nagai & Suzuki, 2003
Yeşil fasülye kabuğu	Kateşol 4-metil kateşol L-DOPA Pirogallol	37.7 39 50.6 15.1	4260 U/mL dk 4015 U/mL dk 3720 U/mL dk 9140 U/mL dk	Guo vd., 2009
Kereviz	Kateşol L-DOPA Pirogallol	8.3 6.2 4.5	400 U/mL 222.2 U/mL 666.6 U/mL	Yağar, 2004
Enginar	Kateşol 4-metil kateşol	10.2 12.4	19662 U/mL 12500 U/mL	Aydemir, 2004

	Pirogallol	14.3	8065 U/mL	
Kereviz	Kateşol	29	5560 U/dk/mL	Aydemir, 2006
Brokoli	Kateşol	12.34	2000 U/dk/mL	Gawlik-Dziki, Szymanowska & Baraniak, 2007
	4-metil kateşol	21	28 U/dk/mL	
Pazı yaprağı	L-DOPA	3.17	1667 U/dk/mL	Gao, Han & Xiao, 2009
Patlıcan	Kateşol	10.79	526.3 EU/mL	Ng & Wong, 2015
	4-metil kateşol	5.0	2000 EU/mL	
Erik	Kateşol	26.3	1193 OD/dk	Ionita vd., 2017
	4-metil kateşol	15.5	792.7 OD/dk	
	L-DOPA	77.5	322.8 OD/dk	

Çalışmamızda enzimin en uygun substratları için tayin edilen kinetik parametreleri literatürdeki veriler ile uygun aralıktadır. Ayrıca Çizelge 5.2'den görüldüğü gibi çeşitli bitkilerden izole edilen PFO enzimi için en yüksek kinetik değerler genellikle kateşol ve 4-metil kateşol substratları için tayin edilmiştir.

Enzimlerin bazıları aktivite gösterebilmek için metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Polifenol oksidazlar da kofaktör olarak bakır içeren enzimlerdir. Reaksiyon ortamına Cu^{+2} iyonlarını da içeren Fe^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} ve Ni^{+2} tuzlarının çözeltilerinden 1 mM ve 10 mM'lık iki farklı konsantrasyonda hazırlanan metal tuz çözeltileri eklenerek PFO aktivite tayini yapıldı. Yapılan çalışmada genel olarak PFO aktivitesinin bakır, kalsiyum, mangan ve nikel iyonları varlığında küçük miktarlarda ve 10 mM kobalt iyonu varlığında daha fazla arttığı; ancak 1 mM kobalt ve 10 mM demir iyonu varlığında ise sırasıyla % 72.1 ve % 74.1'e düştüğü görülmüştür. 1 mM konsantrasyondaki Cu^{2+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , K^{+} , Ca^{2+} iyonları, farklı olum aşamalarındaki muşmula meyvesi PFO enzimi üzerine değişen şekilde etki ettiği literatürde bildirilmektedir (Demir, 2006). Kaldirik bitkisi ile yapılan çalışmada 14 metal iyonu 1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda hazırlanarak PFO aktivite tayinleri yapılmış, bazı metallerin PFO enzim aktivitesini artırırken (Fe^{+3} , Mg^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , K^{+} , Cu^{2+}) bazılarının da aktiviteyi düşürdüğü (Hg^{+2} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Na^{+}) bildirilmiştir (Alıcı, 2012). Mantar PFO aktivitesi üzerine Na^{+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} iyonlarının etkisi incelendiğinde 1 mM ve 10 mM son konsantrasyonlarda PFO aktivitesini en çok inhibe eden metal iyonunun Hg^{2+} olduğu; Na^{+} ve Al^{3+} iyonlarının ise aktivitede artışa sebep olduğu gözlenmiştir (Kuyucu, 2014). Gao, Han ve Xiao (2009)

pazı yaprağından izole ettikleri PFO için 1 mM ve 10 mM K⁺ ve Na⁺'nın enzim aktivitesi üzerinde pozitif etki gösterirken; Mg²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺ ve Zn²⁺ iyonlarının negatif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Metallerin, enzimin katalitik aktivitesi üzerine olan etkilerindeki bu farklılıklar metal çözeltilerinin farklılığından, metal çeşitliliğinden ve metallerin farklı değerliklerde (monovalent, divalent, trivalent) olmalarından dolayı olabilir ve bu da kıyaslama yapmayı zorlaştırmaktadır.

Enzimatik esmerleşme nedeniyle meyve ve sebze ürünlerinde kayıplar meydana gelmektedir. Ürünün raf ömrünü uzatmak ve kalitesini korumak amacıyla PFO enziminin aktivitesinin kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu sebeple PFO aktivitesini önlemek için çeşitli inhibitörler kullanılmaktadır. Çalışmamızda da bu amaçla bakla kabuğu PFO enzimini inhibisyonunu araştırmak üzere iki farklı konsantrasyonda (3 mM ve 6 mM) hazırlanan askorbik asit (AA), EDTA, potasyum siyanür (KCN), sodyum azid (NaN₃), sodyum bisülfid (NaHSO₃) ve L-sistein çözeltileri kullanıldı ve en yüksek inhibisyon oranları sodyum bisülfid, sodyum azid ve askorbik asitle yapılan denemelerden elde edildi. Literatüre bakıldığında maş fasulyesi yaprak PFO enziminin de salisil hidroksamik asit tarafından % 100, naftalendiol (% 70) ve kojik asit (% 60) tarafından da yüksek oranlarda inhibe edildiği bildirilmiştir (Shin, Froderman & Flurkey, 1997). Sümbül fasulyesinden izole edilen PFO enziminin de AA, sodyum metabisülfid ve L-sistein tarafından inhibe edildiği görülmektedir (Paul & Gowda, 2000). Benzer şekilde yeşil fasulye kabuğu PFO enzimi için de AA, sodyum metabisülfid ve L-sisteinin çok güçlü; tiyoüre ve sitrik asitin çok zayıf inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Guo vd., 2009). 0.1 mM ve 3 mM konsantrasyonlarındaki AA, L-sistein, 2-merkaptan etanol ve glutatyon çözeltilerinin soya filizi PFO enzimini % 95-100 oranlarında inhibe ettiği rapor edilmiştir (Nagai & Suzuki, 2003). Askorbik asit, sodyum meta bisülfid ve L-sisteinin çeşitli bitkisel kaynaklı PFO enzimleri üzerinde, etkili birer inhibitör olduğu daha önce yapılan pek çok çalışmada da bildirilmiştir (Demir, 2006; Yabancı, 2008; Gao, Han & Xiao, 2009; Ünal, 2011; Alıcı, 2012; Kuyumcu, 2014; Siddiq & Dolan, 2017).

Pek çok çalışmada askorbik asit, sodyum meta bisülfid (sodyum disülfid) ve L-sisteinin etkili inhibitörler olarak tespit edilmeleri onların bazı özellikleriyle ilgili olabilir. Askorbik asidin güçlü inhibitör etkisi, hem aktif merkezdeki bakır ile şelat

yapması hem de Cu^{+2} 'nin Cu^{+} 'ya indirgenmesini öngören iki mekanizmayla açıklanmıştır (Gomez-Lopez'den aktaran Gawlik-Dziki, Szymanowska & Baraniak, 2007). Sodyum disülfid indirgeyici bir madde olduğu için gıda sanayinde sıkça kullanılmaktadır. Bu tür indirgeyici ajanlar o-kinonların birikimini önleyerek stabil renksiz ürünler oluştururlar (Yabacı, 2008). L-sistein üzerindeki $-SH$ grubundan dolayı güçlü bir nükleofildir ve o-kinonlar ile renksiz katılma ürünleri oluşturabilir. Güçlü bir şelat yapıcı olan EDTA'nın bakır kofaktörlü PFO üzerinde etkili bir inhibitör olması beklenirken, çalışmamızda EDTA varlığında enzim % 80'in üzerinde aktivite gösterdiği görülmüştür. Gao, Han & Xiao (2009) da 1 mM ve 10 mM EDTA ekleyerek yaptıkları inhibisyon çalışmasında pazı yaprağı PFO'su için % 80'in üzerinde aktivite gözlediklerini bildirmişlerdir.

Askorbik asit ve L-sistein; erikten izole edilen PFO enzimini % 100 ve % 99 oranlarında inhibe ederek, çalışılanlar arasında en etkili inhibitörler olmuşlardır. PFO ile inhibitörleri arasındaki bağlanma ilişkisini incelemek için yapılan moleküler docking çalışması AA ve L-sisteinin enzimin farklı yerlerine bağlandığını işaret etmiştir. Ayrıca hesaplanan bağlanma enerjilerinden PFO'nun AA ve L-sisteine olan afinitesinin kateşole olan afinitesinden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Ionita vd., 2017). Bu durum, diğer pekçok çalışmada PFO'nun AA ve L-sistein tarafından yüksek derecede inhibe edilmesini açıklayabilir.

Enziminin depolama kararlılığını incelemek için enzim çözeltisi $+4$ °C'de muhafaza edilmiş ve kateşol substratı kullanılarak belirli aralıklarla aktivite tayini yapılmıştır. Bakla kabuğu PFO enzim aktivitesinde 20. günden sonra düşüş olduğu gözlenmiştir. Soya filizi PFO enziminin 4 °C'de depolandığında aktivitesinin 8 günden sonra azaldığı bildirilmiştir (Nagai & Suzuki, 2003). Üzümünden izole edilen PFO enzimi ise 4 °C depolandığında bir ayın sonunda aktivitesini % 60 ve 20 °C'de depolandığında % 90 oranında kaybetmiştir (Önez, 2006). Kaldirik bitkisi ve yaban mersini kaynaklı PFO ile yapılan çalışmalarda, farklı depolama sıcaklıklarının etkisini incelenmek üzere enzim çözeltileri derin dondurucuda (-20 °C), buzdolabında (4 °C) ve oda koşullarında bekletilmiştir. Kaldirik bitkisi PFO'ı -20 °C'de depolandığında 7 hafta sonunda PFO aktivitesinde % 40 ve 4 °C'de depolandığında 20 gün sonunda aktivitesinde % 97 düşme meydana gelirken, oda sıcaklığında (25 °C) 19 gün sonunda PFO aktivitesini

kaybettiği belirlenmiştir (Alıcı, 2012). Yabanmersini PFO'nun 3 hafta sonrasında -20 °C'de PFO aktivitesinin % 80'ini, 4 °C'de % 10'unu koruduğu, oda sıcaklığında (22 °C) ise PFO aktivitesini tamamen kaybettiği görülmüştür (Siddiq & Dolan, 2017).

Sonuç olarak; baklanın kabuğundan polifenol oksidaz izolasyonu ve bazı biyokimyasal parametrelerinin belirlenmesi ilk kez bu çalışılma ile yapılmıştır. Tez kapsamında bakla kabuğundan polifenol oksidaz (PFO) enzimi izole edilerek kısmen saflaştırılmış ve enzimin optimum pH ve sıcaklığı, pH ve sıcaklık kararlılığı, substrat seçiciliği, kinetik parametreleri, enzimin aktivitesi üzerine bazı metallerin ve inhibitörlerin etkisi ve 4 °C'deki dayanıklılığı gibi biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Bakla ülkemizde hem taze olarak, hem de taneleri kuru olarak tüketilen bir sebzedir. Taze bakla dalından koparıldığında bekleme sırasında PFO aktivitesinden dolayı üzerinde kararmalar olmaktadır. Bakla sebzesi çok fazla ticari önem taşımamasına rağmen, tez kapsamında yürütülen termal inaktivasyon ve inhibitör çalışmalarının bakla sebzesinin derin dondurucuda saklanması esnasında PFO kaynaklı kararmaların engellenmesi konusunda gıda sektörüne katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca çeşitli bitkisel kaynaklardan kısmen saflaştırılan PFO enzimleri kullanılarak, biyosensörler ve enzim immobilizasyonu çalışmaları da yapılmaktadır. Bu bağlamda gıdalardaki fenolik bileşiklerin tayini (Özcan & Sağiroğlu, 2014) ve taze meyve ve sebzelerdeki pestisid tayini (Lima vd., 2010) gibi biyosensör uygulamaları; boya gidermede kullanılmak üzere PFO immobilizasyonu (Arabacı & Usluoğlu, 2014) uygulamaları yapılmıştır. Bu nedenle bakla sebzesi ucuz, kolay bulunabilen ve yüksek PFO aktiviteli bir sebze olarak fenolik bileşik analizinde veya çevre kirliliğiyle ilgili alanlarda uygulama alanı bulabilir.

PFO enziminin bu tür potansiyel uygulama alanları ele alındığında; bakla PFO enziminin özelliklerinin ve karakteristiğinin daha iyi anlaşılması için daha ileri saflaştırma çalışmaları planlanabilir ve böylece saflaştırılmış bakla kabuğu PFO enzimi sanayide kullanım için daha tercih edilir hale gelebilir. Ayrıca bakla PFO için saflaştırma işlemi ve sonrasında yapılacak olan karakterizasyon çalışmaları ile enzimin davranışının tahmin edilmesinde bir yol gösterici olarak, endüstriyel alandaki

uygulamalarda enzimatik kararmaların önlenmesi için bilimsel kaynak teşkil edebileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

Alıcı, E.H., & Arabacı, G. (2016) Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 1051-1056.

Arabacı, G. & Usluoğlu, A. (2014) The enzymatic decolorization of textile dyes by the immobilized polyphenol oxidase from quince leaves. *The Scientific World Journal*, Volume 2014, Article ID 685975.

Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. & Özensoy, Ö. (2004) Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88, 479-484.

Aydemir, T. & Akkanlı, G. (2006). Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens* L.) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1090-1098.

Aydemir, T. (2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87, 59-67.

Basic Report 16052, *Broadbeans (fava beans)*. (July 2017). USDA-National Nutrient Database for Standard References.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Can, Z, Dinçer, B, Şahin, H, Baltaş, N, Yıldız, Y. & Kolaylı, S. (2014). Polyphenol oxidase activity and antioxidant properties of Yomra apple (*Malus communis* L.) from Turkey. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(6), 829-835,

Constabel, C.P & Barbehenn, R. (2008). Induced Plant Resistance to Herbivory. A. Schaller (Ed), *Defensive Roles of Polyphenol Oxidase in Plants* (s. 253-269). Springer Science+Business Media: Berlin.

Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M. & Castillo, M.D. (2012). Food Biochemistry and Food Processing. B.K. Simpson (Ed), *Browning Reactions* (s. 56-83). John Wiley & Sons.: UK

Çiftçi, C.Y. (2004). Dünyada ve Türkiye’de Yemeklik Tane Baklagiller Tarımı. *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası Teknik Yayınlar Dizisi, No:5*, Ankara.

- Demir, Ö. (2006) *Muşmula (Mespilus germanica L.) Meyvelerinin Olgunlaşması Sırasındaki Polifenol Oksidazın Karakterizasyonu*. (Yayımlanmış yüksek lisans tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Doğan, H., İkbāl, M. & Pirim, İ. (2007). G6PD enzim in hemolytic anemia. *The Eurasian Journal of Medicine*, 39, 214-218.
- Flurkey, W.H. (1989). Polypeptide composition and amino-terminal sequence of broad bean polyphenoloxidase. *Plant Physiology*, 91, 481-483.
- Ganesa, C., Fox, M.T. & Flurkey, W.H. (1992). Microheterogeneity in purified broad bean polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 98, 472-479.
- Gao, Z.J, Han, X.H. & Xiao, X.G. (2009). Purification and characterisation of polyphenol oxidase from red Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cicla*) leaves. *Food Chemistry*, 117, 342-348.
- Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U. & Baraniak, B. (2007). Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food Chemistry*, 105, 1047-1053.
- Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U. & Swieca, M. (2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.). *Food Chemistry*, 107, 129-135.
- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. (2017 Mart). *BÜGEM Faaliyetleri*, Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Goyoaga, C., Burbano, C., Cuadrado, C., Varela, A., Guillamón, E., Pedrosa, M.M. & Muzquiz, M. (2008). Content and distribution of vicine, convicine and L-DOPA during germination and seedling growth of two *Vicia faba* L. varieties. *European Food Research and Technology*, 227, 1537-1542.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J. & Xue, S. (2009). The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 117, 143-151.
- Heldt, H.D. & Piechulla, B. (2015). F.A. Ayaz & A. Sökmen (Çev.Editörü) *Bitki Biyokimyası*, Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık.
- <http://www.faydalarizararlari.com/baklanin-faydalari/> (Mayıs 2016)
- <http://www.medikaltedavi.com/baklanin-faydalari-ve-zararlari/> (Mayıs 2016)
- <http://www.tarimmarketi.com> (Mayıs 2016)
- <https://tr.mydearbody.com/sifali-bitkiler/baklanin-faydalari.html> (Mayıs 2016)
- <https://www.saglikfit.com> (Mayıs 2016)
- Hutcheson, S.W., Buchanan, B.B. & Moltalini, P. (1980). Polyphenol oxidation by *Vicia faba* chloroplast membranes. *Plant Physiology*, 66, 1150-1154.

- Ionita, E., Gurgu, L., Aprodu, I., Stanciuc, N., Dalmadi, I., Bahrim, G. & Rapeanu, G. (2017). Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). *Process Biochemistry*, 56, 177-185.
- Jacobson, E.S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 708-717.
- Jimenez, M. & Garcia-Carmona, F. (1995). pH-induced hysteresis of latent broad bean polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 40(2), 373-376.
- Kantar, F. (1994). Anti-nutritional factors (ANFs) in *Vicia faba*. *A.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(3), 454-460.
- Khan, M.T.H. (2007). Bioactive Heterocycles III. Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol 9. Khan M.T.H. (Ed), *Heterocyclic Compounds Against the Enzyme Tyrosinase Essential for Melanin Production: Biochemical Features of Inhibition*. Springer: Berlin.
- Kim, Y.J. & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellulal and Molecular Life Science*, 62, 1707-1723.
- Kuyumcu, İ. (2014) *Yabani ve Yenilebilir Bir Mantar Olan Lactarius Eucalypti O. K. Mill & R. N. Hilton'dan Polifenol Oksidazın Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*. Karadeniz Teknik Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Lima F., Lucca, B.G., Barbosa, A.M.J., Ferreira, V.S., Moccelini, S.K., Franzoi, A.C. & Vieira, I.C. (2010) Biosensor based on pequi polyphenol oxidase immobilized on chitosan crosslinked with cyanuric chloride for thiodicarb determination. *Enzyme and Microbial Technology* 47:153–158.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A. & Poggi, V. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, 63, 745-752.
- Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidase in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry*, 67, 2318-2331.
- McEvily, A.J, Iyengar, R. & Otwell, W.S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(3), 253-273.
- Mdluli, K.M. (2005) Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea subsp. Caffra*). *Food Chemistry* 92, 311-323.
- Mercimek, H.A., Güzeldağ, G., Uçan, F., Güler, K.C, Karaman, M. & Karayılan, R. (2015). Inhibition of polyphenol oxidase purified from potato (*Solanum tuberosum*). *Romanian Biotechnological Letters*, 20(6), 10961-10968.
- Mishra, B.B., Gautam, S. & Sharma, A. (2012). Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant (*Solanum melongena*). *Food Chemistry*, 134, 1855-1861.

Nagai, T. & Suzuki N. (2003). Polyphenol oxidase from bean sprouts (*Glycine max* L.). *Food Chemistry and Toxicology*, 68(1), 16-20.

Navarro, J.L., Tarrega, A., Sentandreu, M.A. & Sentandreu, E. (2014). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chemistry*, 157, 283-289.

Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2013). *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, M. Elçin (Çev. Editörü) Ankara: Palme.

Ng, A.W.R. & Wong, C.W. (2015). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from round brinjal (*S. melongena* var. depressum). *International Food Research Journal*, 22:(2), 826-831.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology-IUBMB (<http://www.sbc.s.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/>)

Okuyucu, F., Tokaç, A. & Okuyucu, B.R. (1990). Yem baklasında (*Vicia faba* var minör) ekim sıklığının verim üzerine etkileri üzerinde araştırmalar. *Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6(1), 17-23.

Orenes-Pinero, E., Garcia-Carmona, F. & Sanchez-Ferrer, A. (2006). Latent polyphenol oxidase from quince fruit pulp (*Cydonia oblonga*): Purification, activation and some properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2172-2178.

Önez, Z. (2006) *Üzümnden (Vitis Vinifera L.) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi*. Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Öz, F., Çolak, A., Özel, A., Sağlam Ertunga, N. & Sesli, Ertuğrul. (2013). Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 36-44.

Özcan, H. & Sağıroğlu, A. (2014) Fresh broad (*Vicia faba*) tissue homogenate based biosensor for determination of phenolic compounds. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 42:4, 256-261.

Panadare, D. & Rathod, V.K. (2018). Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 431-437.

Park, E. Y., & Luh, B. S. (1985). Polyphenol oxidase of kiwifruit. *Journal of Food Science*, 50, 678-684.

Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S. & Bae, H. (2007). Mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research*, 21, 805-816.

Paul, B. & Gowda, L.R. (2000). Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3839-3846.

- Queiroz, C., Lopes, M.L.M, Fialho, E. & Valente-Mesquita, V.L. (2008). Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24, 361-375.
- Robinson, S.P. & Dry, I.B. (1992). Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiology*, 99, 317-323.
- Shin, R., Froderman, T. & Flurkey, W.H. (1997). Isolation and characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 45(1), 15-21.
- Siddiq, M. & Dolan, K.D. (2017). Characterization of polyphenol oxidase from blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Food Chemistry*, 218, 216-220.
- Şaşmaz, İ. (2009). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi*, 44, 35-38.
- Taş, C. (2009). *Domat Zeytini Polifenol Oksidaz Enziminin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi*. (Yayımlanmış yüksek lisans tezi) Çukurova Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Telefoncu, A., Salnikow, J., Zihnioğlu, F. & Kılıç, A. (2000). *Biyokimyada Temel ve Modern Teknikler*, E.Ü. Fen Fakültesi Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Aydın.
- Telefoncu, A. & Kılıç, A. (2009). *Protein Analitiği*, İzmir: Ege Üniversitesi.
- Topal, N. & Bozoğlu, H. (2016). Determination of L-DOPA (L-3, 4-dihydroxyphenylalanine) content of some faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes. *Journal of Agricultural Science*, 22, 145-151.
- Tosun, İ. & Karadeniz, B. (2005) Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1):78-83.
- Turco, I., Ferretti, G. & Bacchetti, T. (2016). Review of the health benefits of Faba bean (*Vicia faba* L.) polyphenols. *Journal of Food and Nutrition Research*, 55(4), 283-293.
- Ünal, M.Ü., Gökkaya, Ö. & Şener, A. (2011). Characterization of polyphenol oxidase from white cherry fruit (Starks gold). *Gıda*, 36(5), 255-262.
- Vamos-Vigyazo, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(1), 49-127.
- Yabacı, S.N. (2008). *Çay bitkisi polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı özelliklerinin belirlenmesi*. Çukurova Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yağar, H. (2004). Some biochemical properties of polyphenol oxidase from celery. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 34(4), 387-397.
- Yemenicioğlu, A., Özkan, M. & Cemeroğlu, B., 1997. Inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form. *Journal of Food Science*, 62(3), 508-510.

Yılmaz, M. & Şahin, S. (2014). Yeşil gübrelemede kullanılan bakla (*Vicia faba* L.) bitkisinin brokoli verimi üzerine etkilerinin belirlenmesi. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University*, 31(1), 85-93.

Yörük, R & Marshall M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361-422.

Zeybek, U. & Zeybek, N. (2002). *Farmasötik Botanik*, İzmir: Ege Üniversitesi.



ÖZGEÇMİŞ

06.09.1991 yılında Erzincan'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İstanbul'da Söğütluçeşme İlköğretim Okulu'nda tamamladım. 2005 yılında Gazi Anadolu Lise'sine başladım ve 2009 yılında buradan mezun oldum. 2009 yılında Nevşehir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandım ve 2013 yılında mezun oldum. Aynı yıl Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalında yüksek lisansa başladım.

2015 tarihinden beri İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Onkoloji Bölümünde Klinik Araştırma Koordinatörü olarak çalışmaktayım.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

Selen İşbilir Ş., Gülo A., Edirne Baklasından İzole Edilen Polifenol Oksidazın Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi. 29. Ulusal Kimya Kongresi, ODTÜ-Ankara, 10-14 Eylül 2017. (Yaşam P-8 1267)