

Atıf İçin: Öztürk, C. (2025). Şeker Pancarında Enzimatik Esmerleşmenin Önlenmesi İçin Yeni Bir Yaklaşım: Herbisit İnhibitörleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(2), 624-633.

To Cite: Öztürk, C. (2025). A New Approach to Prevent Enzymatic Browning in Sugar Beet: Herbicide Inhibitors. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 15(2), 624-633.

Şeker Pancarında Enzimatik Esmerleşmenin Önlenmesi İçin Yeni Bir Yaklaşım: Herbisit İnhibitörleri

Cansu ÖZTÜRK^{1*}

Öne Çıkanlar:

- Şekerpancarı bitkisinden PFO enzimi saflaştırıldı.
- enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile tek bant olarak yaklaşık 40 kDa olarak bulundu.
- pendimetalin, bentazon ve glifosat herbisitlerinin PFO enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı.

ÖZET:

Enzimatik esmerleşme, tüketici tercihlerini olumsuz etkileyebileceğinden, gıda endüstrisinde taze ürünlerin işlenmesi ve depolanmasında önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Ürünlerin raf ömrünü uzatmak amacıyla, polifenoloksidaz enzim aktivitesini inhibe eden çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler denenmiştir. Bu çalışmada, seçilmiş herbisitlerle polifenol oksidaz (PFO) aktivitesini sınırlayarak şeker pancarı (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) bitkisinde enzimatik esmerleşmenin önlenmesi amaçlanmıştır. Polifenol oksidaz enzimi, Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanılarak afinite kromatografisi ile 46,35 kat saflaştırıldı. Enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile tek bant olarak yaklaşık 40 kDa olarak bulundu. Daha sonra, pendimetalin, bentazon ve glifosatın saflaştırılmış PFO enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırıldı. IC₅₀ değerleri pendimetalin, bentazon ve glifosat herbisitleri için sırasıyla 0,157, 0,081 ve 0,230 µM olarak belirlendi. Kinetik analizler, bentazonun PFO üzerinde 0,092 µM'lik K_i değeriyle dikkate değer bir inhibitör olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler:

- Polifenol oksidaz,
- saflaştırma,
- inhibisyon,
- herbisit

A New Approach to Prevent Enzymatic Browning in Sugar Beet: Herbicide Inhibitors

Highlights:

- PPO enzyme was purified from sugar beet plant.
- The molecular weight of the enzyme was found to be about 40 kDa by SDS-PAGE as a single band.
- The inhibitory effects of pendimethalin, bentazone and glyphosate herbicides on purified PPO enzyme were investigated.

ABSTRACT:

Enzymatic browning represents a significant challenge in the processing and storage of fresh produce within the food industry, as it can adversely affect consumer preferences. Various physical and chemical methods have been explored to inhibit the activity of polyphenol oxidase in order to extend the shelf life of products. In this study, it was aimed to prevent enzymatic browning in sugar beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) by limiting the polyphenol oxidase (PPO) activity with selected herbicides. Polyphenol oxidase enzyme was purified 46.35-fold by affinity chromatography using Sepharose-4B-L-tyrosine-*p*-aminobenzoic acid affinity gel. The molecular weight of the enzyme was found to be about 40 kDa by SDS-PAGE as a single band. Then, the inhibition effects of pendimethalin, bentazone, and glyphosate on purified PFO enzyme were investigated. IC₅₀ values were determined as 0.157, 0.081, and 0.230 µM for pendimethalin, bentazone, and glyphosate herbicides, respectively. Kinetic assays indicated that bentazone was a remarkable inhibitor with the K_i value of 0.092 µM on PPO.

Keywords:

- Polyphenol oxidase,
- purification,
- inhibition,
- herbicide.

¹ Cansu ÖZTÜRK (Orcid ID: 0000-0002-0509-6537), Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzurum, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Cansu ÖZTÜRK, e-mail: cansu_36_25@hotmail.com.tr

GİRİŞ

Polifenol oksidaz (PFO), aktif bölgesinde bakır bulunduran metaloenzimler grubuna ait terminal oksidazdır ve sebze ile meyvelerin enzimatik olarak kahverengileşmesine neden olan endojen bir enzimdir (Tinello ve Lante, 2018). Enzim bitkilerin sadece belirli kısımlarında değil, aynı zamanda bitkinin çiçek, yaprak, damar dokusu ve kök gibi farklı organ ve dokularında yer almaktadır (Taranto ve ark., 2017).

Birçok araştırma, gıdaların depolanması ve işlenmesi süreçlerinde enzimatik esmerleşmenin istenmeyen bir olay olduğunu, bu reaksiyonun esas olarak polifenol oksidaz etkisiyle başlatıldığını göstermektedir (Muñoz-Pina ve ark., 2018). Bitki dokusu hasar gördüğünde, sitoplazmadan PFO enzimi salınır ve fenolik bileşiklerle temas eder. Ardından moleküler oksijen varlığında polifenoller kinonlara oksitleyerek, meyve ve sebzelerin kahverengileşmesine neden melanin üretmek üzere polimerize olur (Goncalves ve de Oliveira, 2016).

Enzimatik kararma, sadece organoleptik özellikleri etkilemekle kalmayıp aynı zamanda gıdanın besin değerini de olumsuz yönde etkileyip, doğrudan ürünlerin kalitesini ve pazarda kabul edilebilirliğini düşürmektedir (Cheng ve ark., 2020; Sae-leaw ve Benjakul, 2019). Bu bağlamda, melanin oluşumunu kontrol altına almak ve meyve ile sebzelerin raf ömrünü artırmak amacıyla PFO inhibitörleri üzerine çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu inhibitörler, kararma reaksiyonları için gereken öneme sahip ana bileşenlere dayanarak, enzimi, oksijeni veya substratı ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilmiştir (Nirmal ve ark., 2015).

İnsan sağlığını doğrudan ilgilendiren gıda güvenliği, küresel çapta artan öneme sahip olan bir konudur (Darko ve Akoto, 2008; Kaushik ve ark., 2009). Son zamanlarda gıdalarda tespit edilen pestisit varlığı ciddi endişelere yol açmıştır. Pestisitler (herbisit, insektisit, fungusit ve dezenfektan gibi) tarımsal uygulamalarda istenmeyen bitki ve organizmaların olumsuz etkilerini engellemek, ortadan kaldırmak ve kontrol etmek amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir (Çesko ve ark., 2023).

Tarımsal verimlilikteki etkileri ve insan sağlığını koruma yeteneklerine rağmen, aşırı ve hatalı kullanımları ile bunların kritik olmayan şekilde ortama salınması, geniş çaplı çevre kirliliğine neden olmaktadır (Lazarević-Pašti ve ark., 2013). Bazı pestisitler, polifenol oksidaz enziminin doğal substratlarıyla yapısal benzerlik göstermektedir. Bu durum bilim insanlarına, gıda örneklerindeki pestisit birikintilerini tespit etmek amacıyla immobilize edilmiş enzimleri kullanarak biyosensörler geliştirmek için ilham kaynağı olmuştur (Anh ve ark., 2002a, 2004b). Rung ve Schwack (2005) tarafından gerçekleştirilen bir araştırmada, organofosforlu bir insektisit olan parathion ile onun indirgeme ürünü olan aminoparathion'un, polifenol oksidaz enzimi için bir substrat olma potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmanın amacı, yaygın olarak kullanılan bazı herbisitlerin (Pendimethalin, Bentazone, Glifosat) şekerpancarı bitkisinden saflaştırılan PFO enziminin aktivitesi üzerindeki inhibitör etkilerini araştırmaktır.

MATERYAL VE METOT

Kimyasallar

Enzim kaynağı olarak kullanılan, şeker pancarı (*Beta vulgaris L. subsp. vulgaris*) bitkisi Erzurum ilinden temin edildi ve kullanılıncaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Tüm kimyasal maddeler, Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından analitik saflıkta temin edildi.

Ham enzim özütünün hazırlanması

Dondurucuda depolanmış şeker pancarı bitkisinden 10 gram alınarak rendelenmiş ve sıvı nitrojen altında parçalanarak hücre zarı ayrışması sağlanmıştır. Bitki numunesi % 0.5 PEG (polietilen glikol), 2 mM EDTA, 10 mM askorbik asit ve 1 mL Triton X-100 içeren 10 mL 0.05 M fosfat tamponunda (pH:7,4) iki dakika boyunca bir homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Ekstrakt, çift kat tülbenitten süzüldü ve 20000 xg'de 30 dakika 4°C'de santrifüjlendi. Süpernatantlar toplandı ve ham enzim özütü olarak kullanıldı.

Afinite kromatografisi

Polifenol oksidaz enziminin saflaştırılmasında, Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli, Arslan ve arkadaşlarının (2004) sentezlediği yöntemle göre hazırlandı (Arslan ve ark., 2024). Afinite kolonu 0.05 M fosfat tamponu (pH:6.0) ile önceden dengelendi ve safsızlıkları gidermek için aynı tamponla yıkandı. Afinite kolonunda tutulan enzimin elüsyonu 1 M KCl içeren fosfat tamponuyla (pH:8.0) gerçekleştirildi. Afinite kolonundan elde edilen eluat fraksiyonlarında, Bradford yöntemi ile protein tayini ve spektrofotometrik bir yöntemle enzim aktivite testi yapıldı.

Protein tayini

Bradford yöntemi ile numunelerdeki kantitatif protein analizi yapıldı ve sığır serum albümini (1 mg/mL) çözeltisi standart protein olarak kullanıldı (Bradford, 1976).

PFO aktivitesinin belirlenmesi

Polifenol oksidaz enzimi aktivitesi, fenolik bir substrat olan katekolün enzimatik oksidasyonu sonucu oluşan renkli ürünün 420 nm'deki absorbans artışına dayanmaktadır (Flurkey, 1986). Bir PFO birimi, belirtilen koşullarda, reaksiyon karışımında 0.001 birimlik bir absorbansiyon artışı oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Öztürk ve ark., 2020).

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi

Saflaştırma işleminin ardından elde edilen enzim, SDS-PAGE tekniği kullanılarak elektroforetik olarak analiz edildi (Laemmli, 1970). Proteinlerin görselleştirilmesi için gümüş boyama yöntemi tercih edildi ve elde edilen jel görüntüsü fotoğraflandı (Gerni ve Özdemir, 2024).

PFO'nun inhibisyonu

Çalışmada, katekol substratı kullanılarak bazı herbisitlerin (pendimethalin, bentazone, glifosat) şekerpancarı PFO enzimi üzerindeki inhibitör etkileri araştırıldı. IC₅₀ değeri, beş farklı herbisit konsantrasyonunda sabit katekol konsantrasyonu ile belirlendi. K_i sabiti ise üç farklı herbisit ve beş farklı substrat konsantrasyonunda belirlendi. K_i değerleri ve inhibisyon tipleri Lineweaver-Burk grafiklerinden (1/V-1/[S]) hesaplandı (Lineweaver ve Burk, 1934).

BULGULAR VE TARTIŞMA

PFO birçok bitki kaynağından saflaştırılmış olmasına rağmen, şekerpancarından saflaştırılmasını açıklayan az sayıda araştırma vardır.

Şeker pancarı (*Beta vulgaris L. subsp. vulgaris*), şeker üretiminde kullanılan belirli bir dönemde toplanması gereken bir bitkidir. Hızlı bozulduğu için, hasat sonrası hemen işlenmesi gerekmektedir. Pancarın hasat, işleme veya uzun süreli depolama süreçlerinde meydana gelen polifenol oksidaz enziminin neden olduğu enzimatik karararma ve esmerleşme reaksiyonları, bitkinin doğal pigmentlerini ve besin değerini olumsuz etkileyerek ürünün görünüm, aroma, tat ve besin profilini önemli ölçüde düşürmektedir. Bu durum, hem üreticiler hem de tüketiciler için olumsuz sonuçlar doğurmaktadır (Jaśkiewicz ve ark., 2024).

Enzimler, doğal katalizör özellikleri, biyolojik parçalanabilirlikleri, çevre dostu özellikleri ve doğalarıyla birlikte substrat spesifikliğı sayesinde büyük öneme sahiptirler. PFO enzimi bakterilerden mantarlara, hayvanlardan bitkilere kadar geniş bir yelpazede rapor edilmiştir. Polifenol oksidazlar, substratları katalize etme yetenekleri ve biyolojik işlevlerine göre üç ana gruba ayrılırlar: lakkazlar (EC 1.10.3.2), tirozinazlar (EC 1.14.18.1) ve katekol oksidazlar (EC 1.10.3.1) (Mishra ve Gautam, 2016). Bitki polifenol oksidazları organizmalarda abiyotik (yaralanma gibi) ve biyotik stres (mikrobiyal enfeksiyon gibi) faktörlerine karşı savunma mekanizmalarında önemli bir rol oynar ve genellikle melanin gibi koyu pigment oluşumu ile ilişkilidir. PFO enzimlerinin büyük bir kısmı, fotosentetik hücrelerin kloroplastlarında ve depolama hücrelerinin lökoplasterlarında lokalize olmaktadır (Zhang, 2023). Birçok meyve ve sebzenin renk, tat ve ticari değeri polifenol oksidaz enzimi nedeniyle önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu bağlamda, gıdaların kalitesini korumak amacıyla çalışmaların çoğu PFO aktivitesini inhibe etmeye yönelik geliştirilmiştir (Panadare ve Rathod, 2018).

Meyve ve sebzelerin hasat edilmesi, depolanması ve taşınması süreçlerinde zarar veren böcekleri, yabancı otları, patojen organizmaları vb. kontrol etmek, olası zararlarını önlemek, tarımsal ürün kalitesini ve verimliliğı arttırmak amacıyla pestisitler kullanılmaktadır. Dünya genelinde artan nüfusla birlikte gıda talebinin artması, tarım sektöründe verimliliğı arttırmak amacıyla pestisit kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Fitofarmasötikler olarak da adlandırılan pestisitler, düşük konsantrasyonlarda bile enzimlerin aktivitelerini değıştirir ve bu maddelerin doğaya ve insan sağlığına olan olumsuz etkileri göz ardı edilemez (Akdoğan ve Divrikli, 2012).

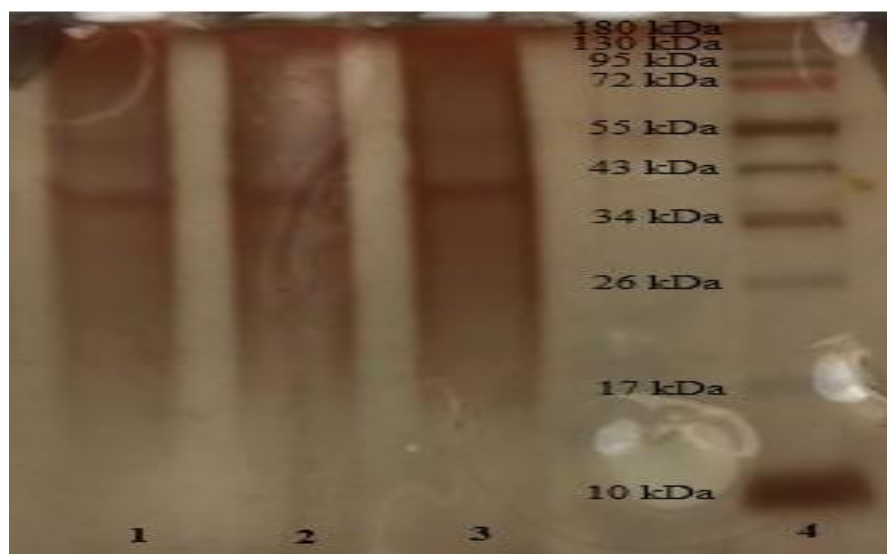
Bu çalışmada, PFO enziminin saflaştırılması için, Arslan ve arkadaşlarının geliştirdiğı yöntemle sentezlenen Sepharose-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite jeli kullanıldı (Arslan ve ark., 2024). Enzim, Sepharose 4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kromatografi tekniğı ile tek adımda şekerpancarı bitkisinden saflaştırıldı. Kantitatif protein tayini olarak Bradford yöntemi kullanıldı ve standart grafik oluşturularak enzim çözeltisinin protein miktarı belirlendi. PFO'nun saflaştırma profili Çizelge 1'de sunulmaktadır. Homojenattaki enzimin özgül aktivitesi 7430.34 EÜ/mg protein iken, afinite ile saflaştırılmış PFO'nun özgül aktivitesi 344444.44 EÜ/mg proteindir. Bu sonuçlara göre, enzim % 21,52 geri kazanımla 46,35 kat saflaştırılmıştır.

Önceki çalışmalarda, aynı afinite jeli kullanılarak avokadodan (*Persea americana*) %3.39 verimle 147.73 kat (Moeini Alishah ve ark., 2023), mürdüm eriğinden (*Prunus insititia*) % 15.04 verimle 93.88 kat (Yıldız ve ark., 2022), Posof Badele elmasından (*Malus domestica* L.) %22.62 verimle 61.073 kat (Çiğdem ve Güller, 2022), çay yaprağından (*Camellia sinensis*) %2.67 verimle 19.77 kat (Öztürk ve ark., 2020), Sarali eriğinden (*Prunus domestica*) %2.52 verimle 22.54 kat (Kaya, 2024), Kırmızı Kismis üzümünden (*Vitis vinifera* L.) %1.76 verimle 61.23 kat (Kaya ve Bağci, 2021), patatesten %35.24 verimle 21.16 kat (Öztürk ve ark., 2022) saflaştırılmıştır. Başka bir çalışmada, patates, mantar ve patlıcan PFO enzimleri, ligand olarak *p*-aminobenzoik asit afinite jeli ile sırasıyla 9.02, 16.57 ve 28.13 kat olarak bulunmuştur. Ayrıca ligand olarak 4-amino-2-metilbenzoik asit afinite jeli kullanılarak ise sırasıyla 41.17, 64.47 ve 56.78 kat saflaştırılmıştır (Öztürk ve Küfrevioğlu, 2024).

Çizelge 1. Şekerpancarı PFO Enziminin Saflaştırma Sonuçları

Saflaştırma adımları	Toplam Hacim(mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Toplam Aktivite(EÜ)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (EÜ/mg prot.)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	6	7200	43200	0.969	5.814	7430.34	100	1
Sepharose 4B-L-tirozin-p-amino Benzoik Asit Afinite Kromatografisi	1.5	6200	9300	0.018	0.027	344444.44	21.52	46.35

Polifenol oksidazın saflığı SDS PAGE gerçekleştirilerek belirlendi. Protein bantları gümüş boyama kullanılarak görselleştirildi. SDS-PAGE'den elde edilen elektroferogramda tek bir bant bulunması, PFO'nun saflaştırıldığını göstermektedir. Şeker pancarı bitkisinden saflaştırılan PFO'nun moleküler kütlesi yaklaşık 40 kDa olarak bulunmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. Şeker Pancarı PFO Enzimi SDS-PAGE Fotoğrafi

*1,2,3: Afinite kromatografilerinden sonra elde edilen enzim numuneleri 4: Standart Protein

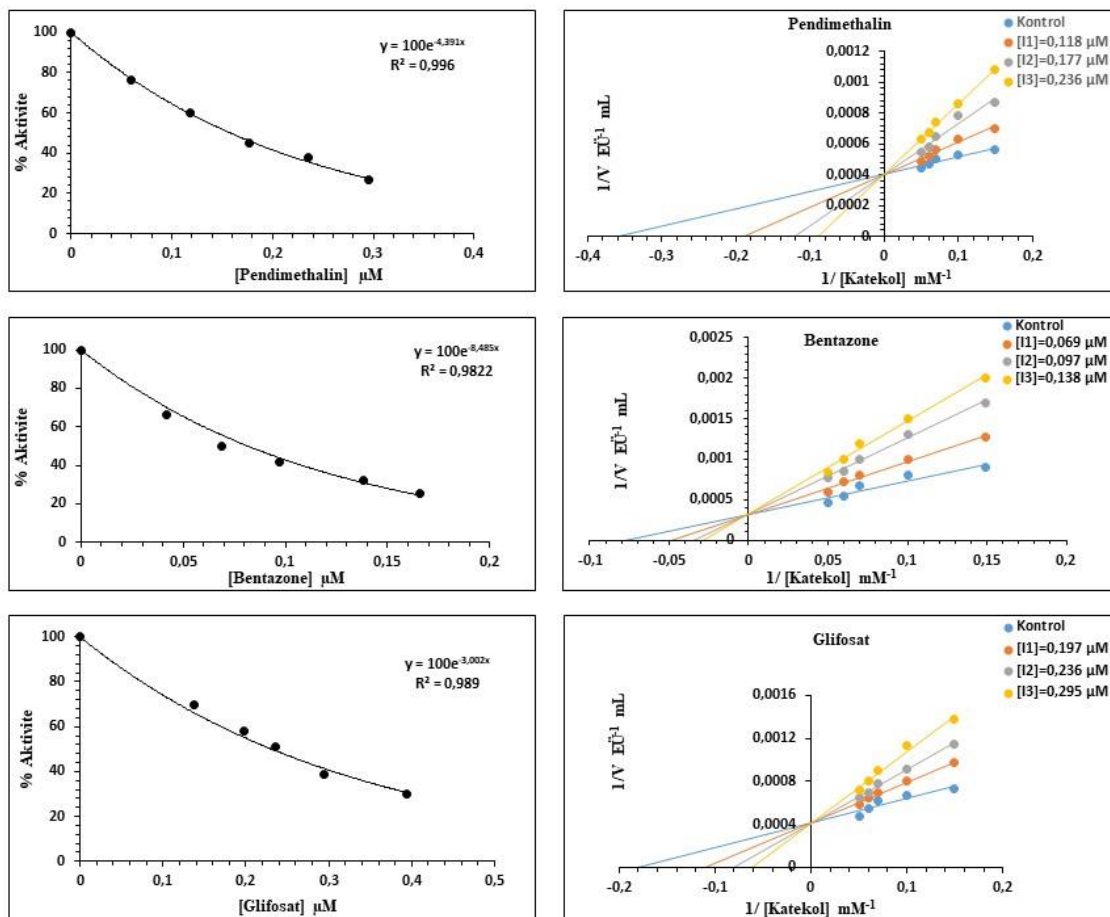
PFO'nun moleküler ağırlığının çeşitli türler arasında değişiklik gösterdiği daha önce belirtilmiştir (Öztürk ve ark., 2020). Yapılan çalışmalarda pancar köklerinden (*Beta vulgaris* L.) PFO enzimi 36 kDa (Gandía-Herrero ve ark., 2004), *L. piperatus* mantarından yaklaşık 40 kDa (Öz ve ark., 2011), Çin maydanozundan 46 kDa (Lin ve ark., 2016), ayçiçeği çekirdeğinden 42 kDa (Raymond ve ark., 1993), muzdan 41 kDa (Yang ve ark., 2000), lahanadan 39 kDa (Fujita ve ark., 1995), Fil ayağı patatesinden (*Amorphophallus paeoniifolius*) 40 kDa (Singh ve Wadhwa, 2017) olarak bulunmuştur. Xushu 22 tatlı patates kabuğundan izole edilen polifenol oksidaz enzimi, SDS-PAGE analizi ile yaklaşık 43.3, 45 ve 51.2 kDa molekül ağırlıklarına sahip üç farklı polipeptit bandı gösterdi. Doğal PAGE katekol substratı ile yapılan boyama sonucunda, enzimin üç izoformu olduğu tespit edildi (Li, 2020).

Bu çalışmada, gıda endüstrisinde kararmayı engellemek için inhibitör olarak kullanılan en yaygın üç herbisit (pendimethalin, bentazone ve glifosat) PFO inhibitörleri olarak değerlendirilmiştir. Herbisitlerin saf enzim üzerindeki inhibe edici etkileri, IC_{50} ve K_i sabitleri yardımıyla hesaplanarak ortaya konmuştur. İnhibisyon sırası bentazone > pendimethalin > glifosat şeklinde sıralanmıştır. Pendimethalin, bentazone ve glifosatın IC_{50} değerleri sırasıyla 0.157, 0.081 ve 0.230 μ M olarak bulunmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 2. Herbisitlerin Şekerpancarı PFO Enzimine Karşı İnhibisyon Parametreleri

İnhibitör	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)	İnhibisyon Tipi
Pendimethalin	0.157	0.098 ± 0.028	Yarışmalı
Bentazone	0.081	0.092 ± 0.024	Yarışmalı
Glifosat	0.230	0.219 ± 0.075	Yarışmalı

Bu inhibitörlerin K_i sabitlerinin tespiti için katekol substratı kullanıldı. Lineweaver-Burk grafikleri ile bu herbisitlerin K_i sabitleri ve inhibisyon tipleri saptandı. (Şekil 2). Bentazone (0.092 μM), en düşük K_i değerine sahip olarak en güçlü inhibitör olduğu belirlendi. Pendimethalin (0.098 μM) ve glifosat (0.219 μM) ise sırasıyla daha az etkili inhibitörler olarak tespit edildi. Her üç herbisit PFO enzimi için rekabetçi inhibisyon mekanizması sergiledi. Bu bileşikler, substratla aynı bağlanma bölgesi için yarışarak enzimin katalitik aktivitesini baskıladılar.

**Şekil 2.** Şekerpancarı PFO Enzimi Üzerinde İnhibitör Etki Gösteren Herbisitlerin IC₅₀ ve K_i Değerlerini İçeren İnhibisyon Parametreleri

Önceki bir araştırmadan olarak kullanılan bir dizi pestisit, saflaştırılmış ayva (*Cydonia oblonga*) polifenol oksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri incelenmiştir. Sonuçlara göre benomil, karbaril, deltametrin ve paratyon metil'in enzim aktivitesini rekabetçi olarak inhibe ettiği ve K_i değerleri sırasıyla 8.3, 5.7, 12 ve 4 μM'lık olarak belirlenmiştir (Fattouch ve ark., 2010). Başka bir

çalışmada, pestisit uygulanmış ve pestisitsiz Jonagold elmalarından elde edilen PFO enziminin aktivitesine etki eden çeşitli pestisitlerin etkileri karşılaştırmalı bir şekilde incelenmiştir. Çalışma, pestisit kullanımının elmada bulunan PFO enziminin aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir. Pestisitsiz elmalarda elde edilen PFO enziminin aktivitesi, pestisit uygulanmış elmalardakine göre daha yüksek bulunmuştur (Çesko ve ark., 2023). Shi ve ark. (2017), kavaklarda yaprakla beslenen zararlı böceği etkili bir şekilde yöneten ancak konak kavak ağacı üzerinde zararlı bir etkisi olmayan böcek öldürücülerin veya allelokimyasalların tanımlanması ve geliştirilmesi için bir çalışma yapmışlardır. Bu amaçla, 21 seçilmiş insektisit kavak ağaçlarında PFO aktivitesi üzerindeki in vitro inhibitör etkileri incelenmiştir. Ayrıca, pestisitlerin bitkiler üzerinde çok sayıda enzim inhibisyon profili bulunmaktadır. Örneğin, Köksal ve ark. (2018), yaygın olarak kullanılan 2,4- D-asit dimetilamin, fenoksaprop-p-etil, glifosat izopropilamin, haloksifop-p-metil, sipermetrin, λ -sihalotrin ve diklorvos olmak üzere yedi pestisit, şalgam (*Brassica rapa* L.) ve kara turptan (*Raphanus sativus* L.) afinite kromatografisi kullanılarak saflaştırılan peroksidaz enzimi üzerindeki in vitro inhibisyon etkilerini belirlediler. Balcı ve ark. (2019), yaptıkları bir çalışmada yaban mersininden afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılan glutatyon s-transferaz (GST) enzimi üzerine diklorvos, asetamiprid, sihalotrin, haloksifop-p-Metil, 2,4 diklorofenoksi asetik asit, sipermetrin, imidakloprid, fenoksaprop-p-etil, glifosat izopropilamin tuzu gibi bazı pestisitlerin inhibitör etkilerini incelediler. Tüm pestisitlerin GST enzimini milimolar düzeyde inhibe ettiği belirlenmiş ve en iyi inhibitör etkiyi gösteren pestisit diklorvos olduğu bulunmuştur.

SONUÇ

Gıda endüstrisinde yaşanan kayıpları minimize etmek ve sürdürülebilirliği artırmak için, esmerleşmeye neden olan polifenol oksidaz enzimi üzerine kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu çalışma, dünya genelinde tarımda sıkça kullanılan bir dizi herbisit varlığında, şekerpancarından tek adımda saflaştırılan PFO enziminin davranışını göstermektedir. Şekerpancarı PFO enzimi ilk kez Sefaroz-4B-L-tirozin-*p*-aminobenzoik asit afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı, SDS-PAGE elektroforezi ile yaklaşık 40 kDa olarak tespit edildi ve literatürdeki benzer enzimler için bildirilen değerlerle uyumlu olduğu görüldü. Bazı herbisitlerin enzim aktivitesi üzerindeki inhibisyon etkisi de araştırıldı. Sonuçlar 0.092 μ M K_i değerine sahip bentazone'nin enzim aktivitesi üzerinde sınırlayıcı bir etkiye sahip olması nedeniyle enzimatik esmerleşmeyi önlemede dikkate değer bir potansiyele sahip olduğunu gösterdi. Çalışma sonuçları, herbisitlerin bitki korumada çift yönlü bir etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. Hem zararlı otları kontrol altına alırken hem de ürünlerin PFO enzimi aktivitesini inhibe ederek farklı bir mekanizma ile de fayda sağlamaktadır. PFO aktivitesini engellemenin, ürünlerin bozulma sürecini yavaşlatarak raf ömrünü önemli ölçüde uzattığını göstermiştir. Bu durum, hem üreticiler hem de tüketiciler için büyük bir avantaj sağlayacaktır.

Çıkar Çatışması

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

Akdoğan, A., Divrikli, Ü., & Latif, E. L. Ç. İ. (2012). Pestisitlerin önemi ve ekosisteme etkileri. *Akademik Gıda*, 10(1), 125-132.

- Anh, T. M., Dzyadevych, S. V., Soldatkin, A. P., Chien, N. D., Jaffrezic-Renault, N., & Chovelon, J. M. (2002). Development of tyrosinase biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for phenols determination in water solutions. *Talanta*, 56(4), 627-634.
- Anh, T. M., Dzyadevych, S. V., Van, M. C., Renault, N. J., Duc, C. N., & Chovelon, J. M. (2004). Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites. *Talanta*, 63(2), 365-370.
- Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S., & Ozensoy, O. (2004). Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food chemistry*, 88(3), 479-484.
- Balcı, N., Türkan, F., Şakiroğlu, H., Aygün, A., & Şen, F. (2019). Purification and characterization of glutathione S-transferase from blueberry fruits (*Vaccinium arctostaphylos* L.) and investigated of some pesticide inhibition effects on enzyme activity. *Heliyon*, 5(4).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cesko, C., Gashi, S., Arabaci, G., Palüzar, H., Durmishi, B., Bruci, E., ... & Özdemir, N. (2023). Investigation of the effects of pesticides on 'Jonagold' apple (*Malus x domestica*) polyphenol oxidase enzyme activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 47(1), 57-66.
- Cheng, D., Wang, G., Tang, J., Yao, C., Li, P., Song, Q., & Wang, C. (2020). Inhibitory effect of chlorogenic acid on polyphenol oxidase and browning of fresh-cut potatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 168, 111282.
- Çesko, C., Gashi, S., ARABACI, G., Palüzar, H., Durmishi, B., Bruci, E., ... & Özdemir, N. (2023). Investigation of the effects of pesticides on 'Jonagold' apple (*Malus x domestica*) polyphenol oxidase enzyme activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 47(1), 57-66.
- Çiğdem, A., & Güller, U. (2022). Purification and characterization of catechol oxidase from Posof Badele apple (*Malus domestica* L): in vitro and in silico studies. *International Journal of Food Engineering*, 18(7), 513-524.
- Darko, G., & Akoto, O. (2008). Dietary intake of organophosphorus pesticide residues through vegetables from Kumasi, Ghana. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3703-3706.
- Fattouch, S., Raboudi-Fattouch, F., Ponce, J. V. G., Forment, J. V., Lukovic, D., Marzouki, N., & Vidal, D. R. (2010). Concentration dependent effects of commonly used pesticides on activation versus inhibition of the quince (*Cydonia Oblonga*) polyphenol oxidase. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 957-963.
- Flurkey, W. H. (1986). Polyphenoloxidase in higher plants: immunological detection and analysis of in vitro translation products. *Plant physiology*, 81(2), 614-618.
- Fujita, S., Saari, N. B., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., & Tono, T. (1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5), 1138-1142.
- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., & Escribano, J. (2004). Purification and characterization of a latent polyphenol oxidase from beet root (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 609-615.
- Gerni, S., & Özdemir, H. (2024). Development of a new affinity chromatography method for purification of horseradish peroxidase enzyme. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 71(1), 202-212.
- Gonçalves, A. A., & de Oliveira, A. R. M. (2016). Melanosis in crustaceans: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 791-799.

- Jaśkiewicz, A., Kunicka-Styczyńska, A., Baryga, A., Gruska, R. M., Brzeziński, S., & Świącik, B. (2024). Evaluation of the Impact of an Enzymatic Preparation Catalyzing the Decomposition of Raffinose from Poor-Quality Beets during the White Sugar Production Process. *Molecules*, 29(15).
- Kaushik, G., Satya, S., & Naik, S. N. (2009). Food processing a tool to pesticide residue dissipation—A review. *Food research international*, 42(1), 26-40.
- Kaya, E. D. (2024). Biochemical properties of polyphenol oxidase purified from Sarali plum (*Prunus domestica*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-12.
- Kaya, E. D., & Bağcı, O. (2021). Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidase extracted from Kirmizi Kismis grape (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), e13627.
- Koksal, Z., Kalin, R., Gulcin, I., & Ozdemir, H. (2018). Inhibitory effects of selected pesticides on peroxidases purified by affinity chromatography. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 385-394.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Lazarević-Pašti, T., Momić, T., Radojević, M. M., & Vasić, V. (2013). Influence of organophosphorus pesticides on peroxidase and chlorination activity of human myeloperoxidase. *Pesticide biochemistry and physiology*, 107(1), 55-60.
- Li, F. (2020). Purification, kinetic parameters, and isoforms of polyphenol oxidase from “Xushu 22” sweet potato skin. *Journal of Food Biochemistry*, 44(11), e13452.
- Lin, H., Ng, A. W. R., & Wong, C. W. (2016). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from Chinese parsley (*Coriandrum sativum*). *Food Science and Biotechnology*, 25, 91-96.
- Lineweaver, H., & Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American chemical society*, 56(3), 658-666.
- Mishra, B. B., and S. Gautam. "Polyphenol oxidases: biochemical and molecular characterization, distribution, role and its control. *Enz Eng* 5: 141." (2016).
- Moeini Alishah, M., Yıldız, S., Bilen, Ç., & Karakuş, E. (2023). Purification and characterization of avocado (*Persea americana*) polyphenol oxidase by affinity chromatography. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 53(1), 40-53.
- Muñoz-Pina, S., Ros-Lis, J. V., Argüelles, Á., Coll, C., Martínez-Máñez, R., & Andrés, A. (2018). Full inhibition of enzymatic browning in the presence of thiol-functionalised silica nanomaterial. *Food Chemistry*, 241, 199-205.
- Nirmal, N. P., Benjakul, S., Ahmad, M., Arfat, Y. A., & Panichayupakaranant, P. (2015). Undesirable enzymatic browning in crustaceans: causative effects and its inhibition by phenolic compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(14), 1992-2003.
- ÖZ, F., Colak, A., Özel, A., Sağlam Ertunga, Nagihan, N., & Sesli, E. (2013). Purification and characterization of a mushroom polyphenol oxidase and its activity in organic solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 37(1), 36-44.
- Öztürk, C., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2024). Affinity gel synthesis from the p-aminobenzoic acid derivative 4-amino-2-methylbenzoic acid and purification of polyphenol oxidase from various plant sources. *Protein Expression and Purification*, 219, 106474.

- Öztürk, C., Aksoy, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2020). Purification of tea leaf (*Camellia sinensis*) polyphenol oxidase by using affinity chromatography and investigation of its kinetic properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 31-38.
- Öztürk, C., Bayrak, S., Demir, Y., Aksoy, M., Alım, Z., Özdemir, H., & İrfan Küfrevioğlu, Ö. (2022). Some indazoles as alternative inhibitors for potato polyphenol oxidase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(5), 2249-2256.
- Panadare, D.; Rathod, V.K. (2018). Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol*, 14, 431–437.
- Raymond, J., Rakariyatham, N., & Azanza, J. L. (1993). Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds.
- Rung B, Schwack W. (2005). Aminoparathion: a highly reactive metabolite of parathion. 1. Reactions with polyphenols and polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (23): 9140–9145. <https://doi.org/10.1021/jf051520m>
- Sae-leaw, T., & Benjakul, S. (2019). Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 85, 1-9.
- Shi, X., Tang, F., Zhou, X., & Bu, X. (2017). In vitro inhibition of polyphenol oxidase activity by insecticides and allelochemicals in *Clostera anastomosis* (Lepidoptera: Notodontidae) larvae and poplar trees. *Journal of Entomological Science*, 52(3), 239-247.
- Singh, A., & Wadhwa, N. (2017). Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*). *Journal of Food Science and Technology*, 54, 2085-2093.
- Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M. M., Pavan, S., & Montemurro, C. (2017). Polyphenol oxidases in crops: Biochemical, physiological and genetic aspects. *International journal of molecular sciences*, 18(2), 377.
- Tinello, F., & Lante, A. (2018). Recent advances in controlling polyphenol oxidase activity of fruit and vegetable products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 73-83.
- Yang, C. P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M. D., Nakamura, N., & Hayashi, N. (2000). Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 2732-2735.
- Yıldız, S., Bilen, Ç., & Karakuş, E. (2022). Purification of damson plum polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of metal effects on enzyme activity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(9), 1019-1034.
- Zhang, S. (2023). Recent advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules*, 28(5), 2158.