

	SAKARYA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DERGİSİ SAKARYA UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE		
	e-ISSN: 2147-835X Dergi sayfası: http://www.saujs.sakarya.edu.tr		
	Geliş/Received 21.08.2017 Kabul/Accepted 28.05.2018	Doi 10.16984/saufenbilder.334811	

Alıç (*crataegus monogyna*) meyvesinden polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu

Ayşe Türkhan^{*1}, Elif Duygu Kaya², İbrahim Yılmaz²

ÖZ

Bu çalışmada, Alıç (*crataegus monogyna*) meyvesinden polifenol oksidaz (PFO) enzimi, soğuk aseton çöktürmesi metodu kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzimin optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri sırasıyla 5,0 ve 30°C olarak belirlenmiştir. Katekol substratı için Lineweaver-Burk eğrisi ile maksimum reaksiyon hızı (V_{maks}) ve Michaelis-Menten sabiti (K_m) değerleri sırası ile 5507 U/mL.dak ve 12,72 mM olarak hesaplanmıştır. İnhibisyon çalışmaları polifenol oksidazın yaygın inhibitörleri olan askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit ile yapılmış ve IC_{50} değerleri sırasıyla 0,012 mM, 0,099 mM, 2,21 mM olarak tespit edilmiştir. Farklı fenolik substratlarla yapılan substrat spesifikliği çalışmasında enzimin katekol substratına duyarlılığının 4-metil katekol ve L-tirosin substratlarına göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *crataegus monogyna*, polifenol oksidaz, soğuk aseton çöktürmesi, karakterizasyon, inhibisyon

The partial purification and characterization of polyphenol oxidase from hawthorn (*crataegus monogyna*)

ABSTRACT

In this study, polyphenol oxidase from *crataegus monogyna* fruit was partially purified using cold acetone precipitation and characterized. The optimum pH and optimum temperature of the enzyme were found to be 5,0 and 30 °C, respectively, in the presence of catechol as a substrate. The maximum reaction rate (V_{max}) and the Michaelis-Menten constant (K_m) values for the catechol substrate were calculated to be 12,72 mM and 5507 U/mL.dak, respectively, using the Lineweaver-Burk plot. Inhibition studies were performed for ascorbic acid, sodium metabisulphite and benzoic acid, which are common inhibitors of the enzyme, and the IC_{50} values for each inhibitor were determined to be 0,012 mM, 0,099 mM, 2,21 mM, respectively. The PPO were tested on different phenolic substrates, including 4-methylcatechol, catechol, L-tyrosine. The highest activity was observed in the presence of catechol for enzyme.

Keywords: *crataegus monogyna*, polyphenol oxidase, cold acetone precipitation, characterization, inhibition

¹ 1 Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, İğdır Üniversitesi, İğdir, 76000, Türkiye

² Gıda Mühendisliği, İğdir Üniversitesi, İğdir, 76000, Türkiye

*Corresponding Author: ayse.turkhan@igdir.edu.tr

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Polifenol oksidaz (PFO), E.C.(1.14.18.1), oksidoredüktaz sınıfına ait bakır içeren bir metaloenzim olup hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve mantarlara kadar çok geniş bir yelpazede bulunurlar [1,2]. Polifenol oksidaz enzimi, moleküler oksijen ile hidroksilasyon reaksiyonu olarak adlandırılan; monofenollerin hidroksilasyonu ile *o*-dihidroksifenollere yükseltgenme (monofenolaz aktivitesi) ve oksidasyon reaksiyonu olarak adlandırılan *o*-dihidroksifenollerin, *o*-kinonlara yükseltgenmesi (difenolaz aktivitesi) olmak üzere iki tür reaksiyonu katalizler. Reaksiyon sonucunda oluşan *o*-kinon bileşikler reaktif ara ürünlerdir ve daha sonra hızlı bir şekilde enzimatik olmayan oksidasyon reaksiyonları ile kahverengisiyah renkteki polimer yapıda melanin pigmentlerine dönüşürler [3,4].

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan genellikle polifenol oksidaz enziminin neden olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. Normal şartlarda enzim hücre içerisinde oksijenle temas halinde bulunmaz. Ancak, meyve veya sebze kesildiği ya da zedelendiğinde enzim hücre dışına çıkar ve moleküler oksijen varlığında bazı fenolik bileşiklerle reaksiyona girerek renkli bileşikler oluşturur [5,6]. Enzimatik esmerleşme reaksiyonları gıdaların renk, lezzet ve besin kalitesini azaltarak gıdanın ekonomik değerini düşürmektedir.

Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının etkilerini ortadan kaldırmak ve istenen esmerleşmeleri optimize edebilmek için en etkili yöntem, bu reaksiyonları katalizleyen polifenol oksidaz enziminin karakterize edilmesidir. Bu nedenle, enzim aktivitesine etki eden parametrelerin iyi bilinmesi gerekir. Bu durum gıda endüstrisinde, meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında uygulanan prosesleri en aza indiren uygun teknolojilerle, kişi başına düşen tüketimdeki artış, birçok ülke için ekonomik faydalar sağlayacaktır [7].

Alıç (*crataegus monogyna*) ülkemizde bol miktarda yabani olarak yetişen halk arasında yemişen adıyla da bilinen, meyveleri yüksek flavonoid içeriği ile antioksidan özellik gösteren bir bitkidir. Günümüzde alıç meyveleri Çin ve İngiltere’de şekerleme, reçel, jöle, içecekler gibi pek çok gıda maddesinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılırken; ülkemizde fazla miktarda bulunmasına rağmen gıda sanayinde kullanımı yetersizdir. Alıç meyvelerinin içeriğinde bulunan

flavonoidlerin kalbin oksijen kullanımını arttırarak metabolizma enzimlerine yardım ettiği, damarları genişleterek kan basıncını düşürdüğü, iltihap giderici, antikanserojen ve antibakteriyel özellikleri olduğu, C vitamini içerdiği ve mineral içeriğini yüksek olduğu bilinmektedir [8,9,10]. Alıç meyvelerinin fenolik bileşikler açısından zengin olması ve insan beslenmesindeki değeri ayrıca gıda endüstrisinde reçel, marmelat, sirke ve pekmez yapımı gibi farklı alanlarda kullanımının arttırılması ve fonksiyonel gıda ürünü olarak kullanılabilirliği sebebiyle çalışmamızda alıç bitkisi seçilmiştir.

Alıç (*crataegus monogyna*) meyvelerinden soğuk aseton çöktürmesiyle kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin (PFO) substrat spesifikliği, optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametreleri ve inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD (MATERIAL AND METHOD)

2.1. Materyal (Material)

Polifenol oksidaz enzim kaynağı olarak Alıç (*crataegus monogyna*) meyvesi kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar sigma ve merck firmalarından temin edilmiştir. Aktivite ölçümlerinde UV-VİS Spektrofotometre cihazı (Agilent Cary 60) kullanılmıştır.

2.2. Ham Enzim Özütünün Hazırlanması (Preparation of Crude Enzyme Extract)

Mevsiminde toplanan Alıç (*crataegus monogyna*) kullanılmaya kadar -20°C’de derin dondurucuda bekletilmiştir. Dondurulmuş olan alıçların kabukları ve çekirdekleri çıkarılmış ve bir havanda iyice ezilerek parçalanmıştır. Ardından %1 PEG içeren 50 mM pH 7,0 fosfat tamponundan 1:2 oranında ilave edilerek karıştırılmıştır [11]. Dört katlı tülbentten süzülen ham enzim özütü, 4°C’de 10,000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ham enzim özütü olarak kullanılmıştır.

2.3. Kısmi Saflaştırma (Partial Purification)

Elde edilen süpernatanta, hacmi (1:1) kadar soğuk aseton, buz banyosunda, yavaş yavaş ilave edilmiştir. Bir gece 4°C’de bekletilen ham enzim özütü, 4°C’de 10,000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılıp, elde edilen çökelekler çözünebildiği en az hacimde 50 mM pH 7,0 fosfat tamponuyla çözülmüştür [2].

2.4. Protein Tayini (Protein Determination)

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirilmiştir [12]. Protein Standardı olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılmıştır. 650 nm'de absorbanslar okunmuş ve kalibrasyon grafiği çizilerek protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

2.5. Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivite Tayini (Activity Determination of Polyphenol Oxidase Enzyme)

Polifenol oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Enzim aktivitesi 4-metil katekol için 496 nm'de, katekol ve L-tirosin için 500 nm absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlenmiştir [13]. Reaksiyon karışımı, 100 mM substrat çözeltisi ile eşit hacimde 10 mM MBTH çözeltisi ve 20 µl DMF içeren reaksiyon karışımı tampon çözelti ile 950 µl'ye tamamlandıktan sonra karışıma 50 µl enzim özütü ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Enzim çözeltisinin konulmadığı reaksiyon da kör olarak kullanılmıştır. 1 dakika boyunca belirtilen dalga boyunda absorbansdaki artış izlenmiş ve aktivite hesabı yapılmıştır. Bir ünite PFO aktivitesi; 1 ml reaksiyon karışımında bir dakikadaki 0,001 absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak, PFO'nun spesifik aktivitesi ise; 1 mg protein başına aktivite (ünite) olarak tanımlanmıştır [14].

2.6. Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi (Determination of Substrate Specificity)

Aseton çöktürmesi sonrası polifenol oksidaz aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisini incelemek amacı ile 4-metil katekol, katekol, ve L-tirosin substratları (100 mM stok) kullanılarak aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Enzimin en iyi etkileştiği substrata ait aktivite değeri %100 kabul edilmiştir. Sonuçlar %bağlı aktivite olarak hesaplanmıştır. Böylece enzimin en etkin çalıştığı substrat belirlenmiştir [2].

2.7. pH Etkisi (Effect of pH)

PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla sitrat-fosfat tamponu (pH 2,0-7,0) ve Tris-HCl (pH 8,0-9,0) tampon sistemleri ve substrat olarak katekol kullanılarak aktivite tayinleri yapılmıştır [15]. %Bağlı aktivite-pH grafiği çizilmiştir. Böylece enzimin en etkin çalıştığı pH değeri belirlenmiştir.

2.8. Sıcaklık Etkisi (Effect of Temperature)

PFO'nun optimum sıcaklığının belirlenmesi için, 0-80°C sıcaklık aralığında 10°C'lik artışlarla aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Tampon ve substrat çözeltisinden oluşan karışım, 0-10°C aralığında soğutmalı inkübatörde, 20-80°C aralığında ise Thermoblok'ta 5 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımına MBTH, DMF ve saf enzim çözeltisi ilave edildikten sonra PFO aktivitesi, mümkün olduğunca hızlı bir şekilde ölçülmüştür [16]. %Bağlı aktivite-sıcaklık grafiği çizilerek optimum sıcaklık belirlenmiştir.

2.9. Enzim Kinetiği (Enzyme Kinetics)

PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek üzere, nihai konsantrasyonu 0,5-8,0 mM aralığında değişen katekol çözeltisi, uygun konsantrasyonda PFO ve aktivite tayininde kullanılan diğer çözeltiler kullanılarak optimum pH'da reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Optimum şartlar altında enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplanmış ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri belirlenmiştir [17].

2.10. İnhibitör Etkisi (Effect of Inhibitors)

PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi, PFO'nun bilinen inhibitörlerinden askorbik asit (0,004-0,02 mM), sodyum metabisüfit (0,03-0,15 mM) ve benzoik asit (1,5-2,8 mM) substrat olarak da katekol kullanılarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda, katekolün inhibisyon sonrasında kalan yüzde aktivitesine karşılık, inhibitör konsantrasyonundan çizilen grafikten, %50 aktivitenin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu, IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir [15].

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

3.1. Kısmi Saflaştırma (Partial Purification)

Çalışmamızda kullandığımız *crataegus monogyna* hazırlanan ham enzim özüt ve aseton çöktürmesi sonrası kısmi olarak saflaştırılan enzim özütlerinde 500 nm'de spektrofotometrik olarak enzim aktivite tayinleri ve Lowry yöntemiyle protein tayinleri yapılmıştır. Bu tayinler sonucunda polifenol oksidaz enzimi 139,5 verimle

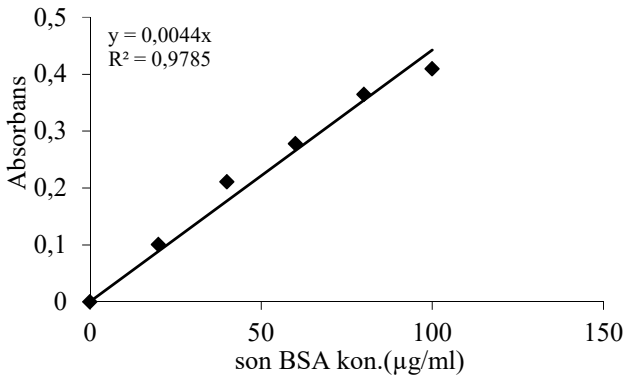
3,58 kat kısmi olarak saflaştırıldığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Aseton çöktürmesi sonrası polifenol oksidaz *lactarius eucalypti*'dan 3,01 kat [18] ve *macrolepiota gracilenta*'dan 5,7 kat kısmi olarak saflaştırılmıştır [2].

Tablo 1. Alıç'tan (*crataegus monogyna*) PFO'nun kısmi saflaştırma profili (Partial purification profile of PPO from hawthorn (*crataegus monogyna*))

Substrat	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL.dak)	Toplam Aktiviteler (U/mL.dak)	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spezifik Aktivite (U/mg Protein)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Özüt	50	860	43000	2,17	108,5	396,31	10,0	1
Soğuk Aseton Çöktürmesi	25	2400	60000	1,69	42,25	142,0,1	13,9,5	3,58

3.2. Protein Tayini (Protein Determination)

Çalışmamızda kullandığımız *crataegus monogyna* hazırlanan ham enzim özütünde ve aseton çöktürmesi sonrası kısmi saflaştırılmış enzim özütünde protein tayini Lowry metodu ile belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Protein standart grafiği (Protein standard chart)

3.3. Substrat Spesifikliği (Determination of Substrate Specificity)

PFO enziminin aktivitesi üzerine çeşitli substratların etkisi incelendiğinde; aktivitenin katekol varlığında en yüksek olduğu, 4-metil katekol varlığında ise katekole göre daha düşük bir aktivitenin olduğu tespit edilmiştir. Diğer

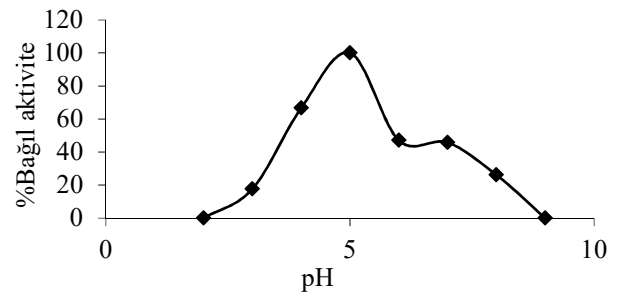
substratın varlığında ise PFO aktivitesi tespit edilememiştir (Tablo 2). Bu sonuçlar doğrultusunda gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında katekol substrat olarak kullanılmıştır. Benzer substrat spesifikliği, *L. piperatus*'tan saflaştırılan PFO için kullanılan tirozin, PHPPA, katekol, 4-metil katekol, *L-DOPA* ve DHPPA substratlarında çalışılmış, enzim en yüksek aktiviteyi katekol varlığında göstermiştir [19].

Tablo 2. Kısmi olarak saflaştırılan PFO'nun substrat spesifikliği (Substrate Specificity of partial purified PPO)

Substrat Adı	%Bağıl Aktivite
Katekol	100
4-Metil Katekol	60
L-Trosin	Aktivite Yok

3.4. pH Etkisi (Effect of pH)

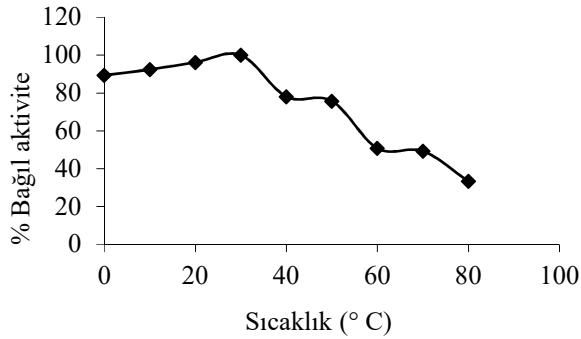
PFO aktivitesi üzerine pH etkisini belirlemek amacıyla pH (2,0-9,0) arasında farklı tamponların kullanılmasıyla ayrı ayrı aktivite tayinleri yapılmış ve %bağıl aktivite-pH grafiği çizilmiştir. PFO'nun, katekol substratı varlığında, pH 5,0 değerinde en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 2). Gerçekleştirilen karakterizasyon işlemlerinde pH 5,0 olan sitrat-fosfat tamponu kullanılmıştır. Bazı literatür çalışmalarında farklı kaynaklardan elde edilen PFO'nun katekol substratı varlığında, patates (*solanum tuberosum*)'ın optimum pH 6,0 [20], *physalis peruviana* L.'nin optimum pH 5,5 [21], buğday (*triticum aestivum* L.)'in optimum pH 4,5 [22], amasya elmasının optimum pH 7,0 [23], marul (*lactuca sativa* L.)'un optimum pH 8,0 [24] olarak bulunmuştur.



Şekil 2. Alıç (*crataegus monogyna*) PFO'nun aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (Effect of pH on activity of hawthorn (*crataegus monogyna*) PPO)

3.5. Sıcaklık Etkisi (Effect of Temperature)

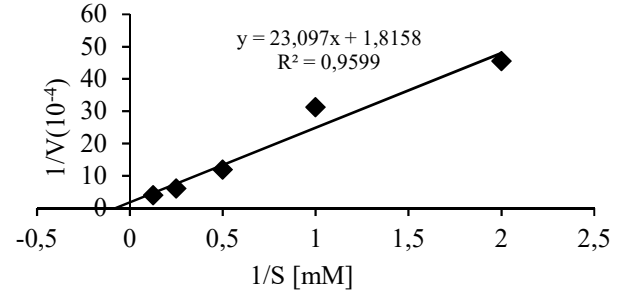
PFO'nun optimum sıcaklık değerini belirlemek için 0-80°C aralığında 10'ar derece aralıklarla aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, sıcaklık-%bağlı aktivite grafiğine çizilmiştir (Şekil 3). Bu grafiğe göre enzimin katekol substratı varlığında optimum sıcaklığı 30°C olarak belirlenmiştir (Şekil 3). Bazı literatür çalışmalarında farklı kaynaklardan elde edilen PFO'nun katekol substratı varlığında optimum sıcaklık değerleri, dereotu (*anethum graveolens*)'nun 10°C [25], marul (*lactuca sativa* L.)'un 40°C [24], armut (*pyrus elaeagrifolia*) 35°C [26], *lactarius piperatus* L.'un 20°C [19] olarak bulunmuştur.



Şekil 3. Alıç (*crataegus monogyna*) PFO'nun aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (Effect of temperature on activity of hawthorn (*crataegus monogyna*) PPO)

3.6. Enzim Kinetiği (Enzyme Kinetics)

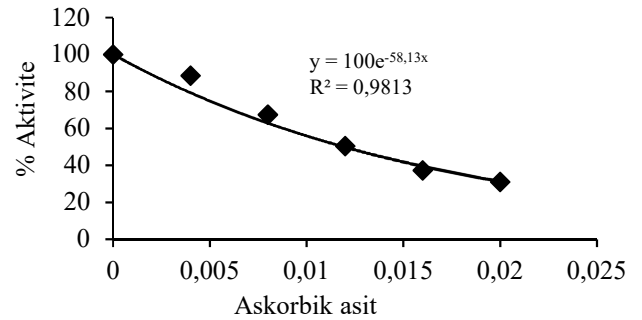
PFO'ya ait bazı kinetik verileri belirlemek için, son konsantrasyonu 0,5-8,0 mM olan katekol substratı varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, enzim aktivitesi tayin edilmiştir. Kinetik verilerin belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Enzimin katekol substratı varlığında V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 5507 U/mL.dak ve 12,72 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4). Enginar (*cynara scolymus* L.) PFO'sunun V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 7457 EU/min, 10,7 mM [27], *S. melongena* var. *depressum* PFO'sunun V_{maks} ve K_m değerleri sırası ile 526,32 EU/ml ve 10,79 mM [28] bulunmuştur.



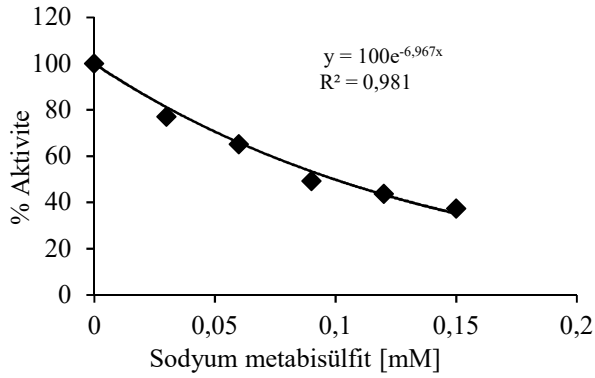
Şekil 4. Katekol varlığında polifenol oksidaz aktivitesi için Lineweaver-Burk grafiği (Lineweaver-Burk graph for polyphenol oxidase activity in the presence of catechol)

3.7. İnhibitör Etkisi (Effect of Inhibitors)

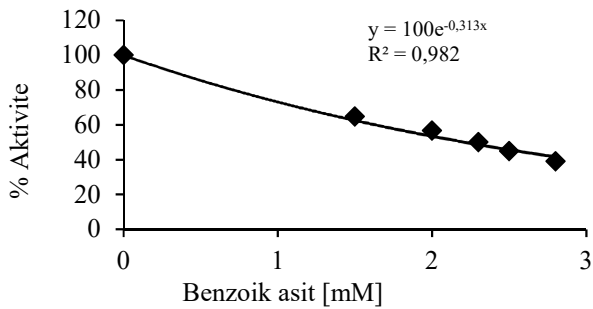
Bu çalışmada PFO'nun bilinen üç genel inhibitörü kullanılmıştır. Her bir inhibitörün konsantrasyonuna karşılık enzimin %kalan aktivitesi grafiğe geçirilerek elde edilen eğriden, enzimin %50 aktivitesinin korunduğu değere karşılık gelen inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7). Bulunan IC_{50} değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Buna göre askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit içinde en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu tespit edilmiştir. *Lactarius piperatus* (L.) PFO'sunun katekol substratı varlığında askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla, 0,02 mM, 0,03 mM ve 5,20 mM olarak bulunmuş ve çalışılan inhibitörler içinde en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu belirlenmiştir [19].



Şekil 5. Alıç (*crataegus monogyna*) PFO'nun askorbik asit ile inhibisyonu (Inhibition of PPO from hawthorn (*crataegus monogyna*) by ascorbic acid)



Şekil 6. Alıç (*crataegus monogyna*) PFO'nun sodyum metabisülfite ile inhibisyonu (inhibition of PPO from hawthorn (*crataegus monogyna*) by sodium metabisulfite)



Şekil 7. Alıç (*crataegus monogyna*) PFO'nun benzoik asit ile inhibisyonu (inhibition of PPO from hawthorn (*crataegus monogyna*) by benzoic acid)

Tablo 3. Alıç (*crataegus monogyna*) PFO'nun aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi (Effect of some inhibitors on the activity of PPO from hawthorn (*crataegus monogyna*)).

Katekol	
İnhibitör	IC ₅₀ (mM)
Askorbik Asit	0,012
Sodyum Metabisülfite	0,099
Benzoik Asit	2,21

Meyve ve sebzelerde meydana gelen PFO enzimi katalizi enzimatik kararar reaksiyonları, ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğü bilinmektedir. Gıda teknolojistleri PFO enzimiyle ilgili olan enzimatik kararar olayı üzerinde yoğunlaşmışlardır. İstenmeyen bu tür kararar reaksiyonları enzim inaktive edilerek önlenmeye çalışılmaktadır. Yapılan bu çalışmada Alıç (*crataegus monogyna*)'tan PFO soğuk aseton çöktürmesiyle kısmen saflaştırılmış enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 5,0 ve 30°C olarak, K_m ve V_{maks} değerleri 12,72 mM ve 5507 U/mL.dak olarak bulunmuştur. İnhibisyon

çalışmaları polifenol oksidazın yaygın inhibitörleri olan askorbik asit, sodyum metabisülfite ve benzoik asit ile yapılmış ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre en etkili intibitörün askorbik asit olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- [1] R. Yoruk and M. R. Marshall, "Physicochemical properties and function of plant polyphenoloxidase: a review," *Journal of Food Biochemistry*, 27, 361–422, 2003.
- [2] Y. Kolcuoğlu, "Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*macrolepiota gracilentia*)," *Process Biochemistry*, 47, 2449–2454, 2012.
- [3] H. S. Mason, "Chemistry of melanin Mechanism of oxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine by tyrosinase," *Journal of Biological Chemistry*, 72, 83–99, 1948.
- [4] G. Prota, "Progress in the chemistry of melanins and related metabolites," *Medicinal Research Review*, 8, 525–556, 1988.
- [5] P. R. Mathewson, "Enzymes," *Eagen Press Handbook Series*, 37-38, 2000.
- [6] D. J. Mcweeny, "The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 735, 1974.
- [7] T. P. Labuza, J. H. Lillemo, and P. S. Taoukis, "Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes," *Fruit Processing*, 2, 9-13, 1992.
- [8] A. Batu, A. Çağlar, Ö. Emrem, and B. Çeliker, "Alıç Pekmezi Üretimi," *Gıda Teknolojileri Dergisi*, 2, 45-51, 2007.
- [9] E. Middleton, "The flavonoids," *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5, 335-338, 1984.
- [10] N. C. Cook and S. Samman, "Flavonoids-chemistry, metabolism, cardio protective effects, and dietary sources," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7, 66–761, 1996.
- [11] T. Aydemir, "Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*cynara scolymus* L.) heads," *Food Chemistry*, 87, 59–67, 2004.
- [12] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1951.

- [13] J. C. Espin, M. Morales, R. Varon, J. Tudela, and F. Garcia-Canovas, "A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase," *Analytical Biochemistry*, 43, 2807-2812, 1995.
- [14] M. A. M. Galeazzi and V. C. J. Sgarbieri, "Substrate Specificity and İnhibition of Polyphenoloxidase from a Dwarf Variety of Banana (*musa cavendishii*, L.)," *Journal Of Food Science*, 46, 1404-1406, 1981.
- [15] A. Colak, A. Özen, B. Dincer, S. Güner, and A. F. Ayaz, "Diphenolases from Two Cultivars of Cherry Laurel (*laurocerasus officinalis* roem.) Fruits at Early Stage of Maturation," *Food Chemistry*, 90, 801-807, 2005.
- [16] B. Dincer, A. Colak, N. Aydın, A. Kadioglu, and S. Güner, "Characterization of Polyphenoloxidase from Medlar Fruits (*mespilus germanica* L. rosaceae)," *Food Chemistry*, 77, 1-7, 2002.
- [17] H. Lineweaver and D. Burk, "The Determination of Enzyme Dissociation Constant," *Journal of American Chemical Society*, 56, 658-661, 1934.
- [18] İ. Kuyumcu, "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, Yüksek Lisans Tezi, 2014.
- [19] F. Öz, A. Colak, A. Özel, N. Sağlam-Ertunga, and E. Sesli, "Purification and Characterization of A Mushroom Polyphenol Oxidase and İts Activity in Organic Solvents," *Journal of Food Biochemistry*, 37, 36-44, 2013.
- [20] A. A. Khan, S. Akhtar, and Q. Husain, "Direct immobilization of polyphenol oxidases on celite 545 from ammonium sulphate fractionated proteins of potato (*solanum tuberosum*)," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 40, 58-63, 2006.
- [21] K. Bravo and E. Osorio, "Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*physalis peruviana* L.) fruit," *Food Chemistry*, 197, 185-190, 2016.
- [22] M. Erat, Y. N. Şahin, G. Aksoy, and A. Demirkol, "Partial characterization of polyphenoloxidase from a hybridized wheat (*triticum aestivum* L.)," *European Food Research and Technology*, 231, 899-905, 2010.
- [23] M. Oktay, □ Küfrevioğlu, □ Kocaçalışkan, and H. Şakırolu, "Polyphenol oxidase from Amasya apple," *Journal of Food Science*, 60, 494-496, 1995.
- [24] S. Doğan and Ü. Salman, "Partial characterization of lettuce (*lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase," *European Food Research and Technology*, 226, 93-103, 2007.
- [25] H. Şakiroğlu, A. E. Öztürk, A. E. Pepe, and M. Erat, "Some kinetic properties of polyphenol oxidase obtained from dill (*anethum graveolens*)," *Journal of Enzyme İnhibition and Medicinal Chemistry*, 23, 380-385, 2008.
- [26] F. Ülker-Yerlitürk, O. Arslan, S. Sınan, N. Gencer and Ö. Özensoy, "Characterization Of Polyphenoloxidase From Wild Pear (*pyrus elaeagrifolia*)," *Journal of Food Biochemistry*, 32, 368-383, 2008.
- [27] S. Doğan, Y. Turan, H. Ertürk, and O. Arslan, "Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*cynara scolymus* L.)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 776-785, 2005.
- [28] A. W. R. Ng and C. W. Wong, "Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from round brinjal (*S. melongena* var. depressum)," *International Food Research Journal*, 22, 826-831, 2015.