

Bazı makrohalkalı tiyocrown eterlerin polifenol oksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkilerinin araştırılması

Adem ERGÜN^{1,*}, Baki ÇİÇEK²

¹Balıkesir Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Çağış Yerleşkesi, Balıkesir.

²Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Çağış Yerleşkesi, Balıkesir.

Geliş Tarihi (Recived Data): 03.08.2017

Kabul Tarihi (Accepted Date): 27.10.2017

Özet

Polifenol oksidaz (PPO) enzimi, meyvelerde, sebzelerde ve bazı hayvansal dokularda bolca bulunabilen, aktif bölgesinde bakır olan bir metalo enzimdir. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarını katalizleyen bu enzimin, ticari değere sahip ürünlerde bolca bulunmasından dolayı inhibisyonu oldukça önem kazanmıştır. Bunun için literatürde birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, PPO enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz gibi ön saflaştırma işlemlerinden sonra, Sepharose 4B-l-tirozin -p-aminobenzoik asit afinite kromatografi jeli kullanılarak, *Musa sapientum* var. *Cavendishii* (Muz) meyvesinden saflaştırılmıştır. Enzimin saflık kontrolü de SDS – PAGE ile yapılmıştır. Daha sonra, bizim tarafımızdan esterleşme – halka kapama reaksiyonu sonucunda sentezlenen AE1, AE2 ve AE3 kodlu makrohalkalı tiyocrown eterlerin, saf olarak elde ettiğimiz polifenoloksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Tüm maddelerin PPO enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. Sonuçlara göre en etkili inhibitör AE3 olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tiyocrown eter, polifenol oksidaz (PPO), inhibisyon, Afinite kromatografisi.

Investigation of the inhibitory effects of some macrogenetic thiocrown ethers on polyphenol oxidase enzyme

Abstract

The polyphenol oxidase (PPO) enzyme is a metallo enzyme that is copper in its active site, which can be found abundantly in fruits, vegetables and some animal tissues.

* Adem ERGÜN, ademergun@balikesir.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0003-4647-6058>

Baki ÇİÇEK, bcicek@balikesir.edu.tr, <http://orcid.org/0000-0003-1257-1188>

Inhibition of this enzyme, which catalyzes the enzymatic browning reactions, is gaining in importance due to its abundance in commercial value products. There are many studies in the literature for this. In this study, PPO enzyme was purified using a Sepharose 4B-1-tyrosine-p-aminobenzoic acid affinity chromatography gel, after preliminary purification, such as ammonium sulfate precipitation and dialysis, from Musa sapientum var. Cavendishii (Banana). Purity control of the enzyme was also performed by SDS - PAGE. We then investigated the inhibitory effects of the macrophilic thiocrown ethers AE1, AE2 and AE3 synthesized as a result of the esterification-ring closure reaction on the pure polyphenoloxidase enzyme. All substances were found to inhibit PPO enzyme. According to the results, the most effective inhibitor was identified as AE3.

Keywords: Thiocrown ether, polyphenol oxidase (PPO), inhibition, affinity chromatography.

1. Giriş

PPO enzimi, aktif bölgesinde ko-faktör olarak bakır bulunan, oksidoredüktazlar içinde yer alan bir enzimdir. Oksijen ile temasında, monofenolik maddeleri, o-difenollere hidroksilasyonu ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu katalize eder. Bu reaksiyonlar sonucunda, siyah, kahverengi veya kırmızı pigmentlerli maddeler oluşturur [1, 2]. Enzim isimlerindeki karışıklığı önlemek için bitki polifenol oksidaz enzimlerinin adlandırılmasında değişiklikler olmuştur. Tirozinaz (monofenol mono oksijenaz) EC.1.14.18.1, katekol oksidaz (katekolaz, difenoloksidaz) EC.1.10.3.2, lakkaz ise EC.1.10.3.1 enzim kodlarıyla gösterilmişlerdir [3]. Bazı kaynaklarda Lakkaz enziminin de PPO enziminin bir sınıfı olduğu belirtilmiştir. Lakkaz, metoksi ile yer değiştirmiş polifenoller ve aromatik diaminler gibi bir çok bileşiğin oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen bir enzimdir. Ancak tirozinazın okside ettiği tirozini oksitleyemez [4].

PPO enzimi, bitkilerde, kabuklu deniz ürünlerinde ve bazı hayvansal organlarda olmak üzere doğada bolca bulunan bir enzimdir [5, 6]. Bitkinin türüne ve yetiştiriliş biçimine göre PPO içerikleri değişik olabilir. Meyve ve sebzelerin olgunluklarına göre de bu enzimin bitki hücrelerindeki yerleşimi farklılık gösterebilir. Meyve ve sebzelerde hatta kabuklu deniz ürünlerinde mekanik işlemlerden sonra “esmerleşme” denilen renk değişimleri olabilir. Bu renk değişimleri belirli bir noktadan sonra istenilen noktada durdurulamaz ve rengiyle birlikte tadını ve kalitesini de bozar. Bu istenmeyen reaksiyonların önüne geçebilmek için PPO enziminin inhibe edilerek aktivitesinin sınırlandırılması veya tamamen durdurulması gerekmektedir. İnhibisyonun istenilen şekilde gerçekleştirebilmek için PPO enziminin kinetik özelliklerinin bilinmesi gerekir [7-10]. Bu özellikleri belirleyebilmek için PPO enzimi, muz, mantar, muşmula, çay, ananas, enginar, napoleon üzümü, tütün, patlıcan, patetes, şeftali, vanilya tohumu, dut, yeşil fasulye, elma, armut, domates, kaju fıstığı, kiraz, brokoli, enginar, nane, göbek marul, kayısı, biberiye, limon otu, karides gibi çeşitli kaynaklardan saflaştırılmıştır [2,11, 5-10, 12-26]. Polifenol oksidaz enziminin molekül boyuttaki yapısı enzimin kaynağına göre değişiklik gösterebilir. Enzimin sayısı ise enzim kaynağına ve saflaştırmada uygulanan metodlara göre değişiklikler gösterebilir [27].

Tiyocrown eterlerin makrohalkalı formasyonunun karbonil grubu kapsadığı önceden biliniyordu [28-31]. Makrosilik eter-ester bileşiğinin [32], eter-ester içeren geniş

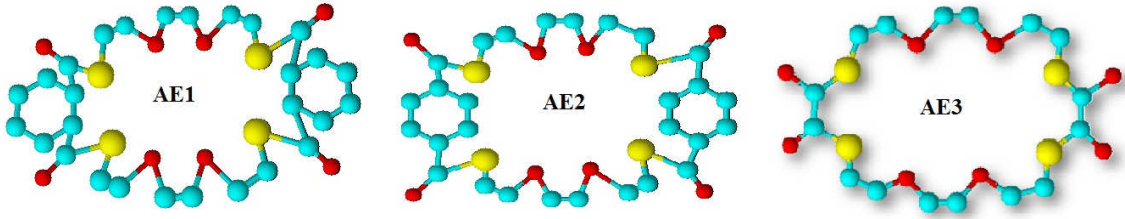
kapsamlı polieter-diester bileşiğinin [33-40], tiyoeter-ester [35, 37, 39, 41] ve eter-tiyolester [35, 37] bileşiğinin sentezi, Bradshaw, Izatt ve Christensen tarafından dibazik asit tuzu ve alfa, omega-dihalo bileşikler veya dibazik asit klorürleri ve alfa, omega-dihidroksi bileşiklerinden herhangi birine bağlanarak hazırlanmıştır. İki makrohalkalı polieter-monoester bileşikler, Matsushima [42] tarafından normal verimlilikle bulunmuştur. Edema ve çalışma arkadaşları [43] diketo-fonksiyonelleşmiş tiyocrown eterleri %38-57 verimle sentezlemiştir.

Bu çalışmada, daha önce Çiçek ve ark. tarafından sentezlenen 3 adet tiyo-crown eterin polifenol oksidaz enzimi üzerindeki inhibisyon etkileri araştırılıp $[IC_{50}]$ değerleri hesaplanmıştır [44].

2. Deneysel çalışmalar

2.1. *Inhibitör olarak kullanılan tiyo-crown eterler*

7,8,10,11,13,14,23,24,26,27,29,30-dodecahydrodibenzo[i,w][1,4,15,18,7,12,21,26] tetraoxatetra-thia cyclooctacosine-5,16,21,32-tetrone (**AE1**), 6,9,22,25-tetraoxa-3,12,19,28-tetra-thia tricyclo [29.2.2.14,17] heptatriaconta-1(33) ve 14,16,31,34,36-hexaene-2,13,18,29-tetrone (**AE2**), 1,4,13,16-tetraoxa-7,10,19,22-tetrathiacyclotetracosane-8,9,20,21-tetrone (**AE3**) inhibitör olarak kullanılan maddelerdir (Şekil 1) [44].



Şekil 1. Makro halkalı tiyocrown eterler.

2.2. *PPO enziminin saflaştırılması*

Daha önce grubumuz tarafından sentezlenen afinite jeli 1x15 cm'lik kolonlara paketlenerek 0,05 M fosfat tamponu (pH: 5) ile yıkanarak dengeleme sağlandı[11]. Dengelenip dengelenmediğini de pH kontrolü yaparak tespit edilir. Diyaliz işleminden sonra elde edilen enzim çözeltisi kolona tatbik edildi ve yine aynı tampon ile yıkandı. Böylece polifenol oksidazın büyük kısmı afinite jeline tutundu ve diğer safsızlıklar uzaklaşmış oldu. Daha sonra 0,05 M pH=7,00 Na_2HPO_4 /1 M NaCl tamponu ile elüsyon işlemi yapıldı ve 2'şer mL toplandı. Laemelli tarafından belirtilen yöntemle SDS-PAGE ile 10 ile 250 kDa molekül ağırlığına sahip proteinleri içeren marker kullanılarak enzimin saflık kontrolü yapıldı [45]. Daha sonra Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlendi [46].

2.3. *PPO enziminin aktivite tayini*

PPO enzim aktivitesi, Biotek UV-Visible Spektrofotometre ile 420 nm'de ölçüm yapılarak belirlendi [47]. 40 μ L enzim çözeltisi ile 960 μ L tampon + substrat (0,1 M katekol) karıştırıldıktan sonra köre karşı absorbansta meydana gelen değişme okundu. 1 Enzim Ünitesi (EU) reaksiyonun oluştuğu küvette 1 dakika sonunda meydana gelen

0,001'lik artış olarak tanımlandı. Aktivite birimi olarak "1 mL enzim çözeltisi başına 1 dakikada absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişim" kullanıldı.

2.4. İnhibitörler için $[IC_{50}]$ değerlerinin bulunması

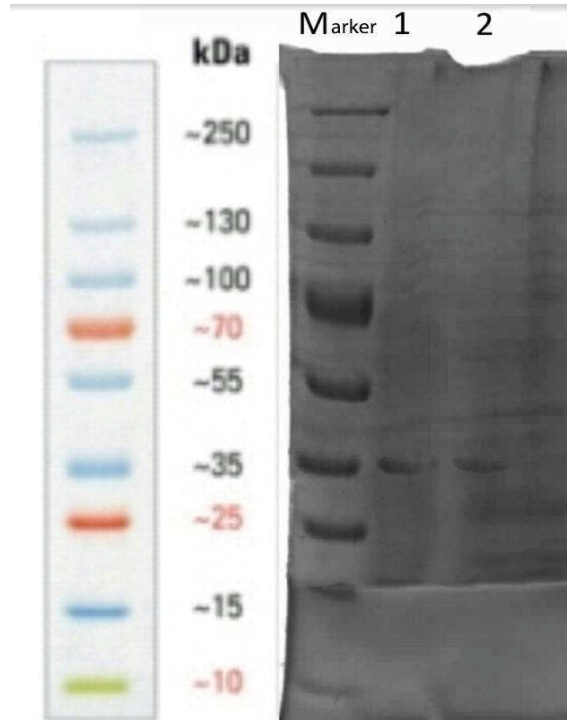
İnhibitörlerin IC_{50} değerlerini bulmak için, 0,01 M katekol substratıyla uygun şartlarda çalışmalar yapıldı. İnhibitörsüz ortamda bulunan enzim aktivitesi % 100 aktivite olarak kabul edildi Daha sonra farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktivite ölçümleri yapıldı ve elde edilen absorban değerlerinden % aktivite hesaplanarak, % Aktivite - $[I]$ grafikleri çizildi (Şekil 3).

3. Sonuçlar ve tartışma

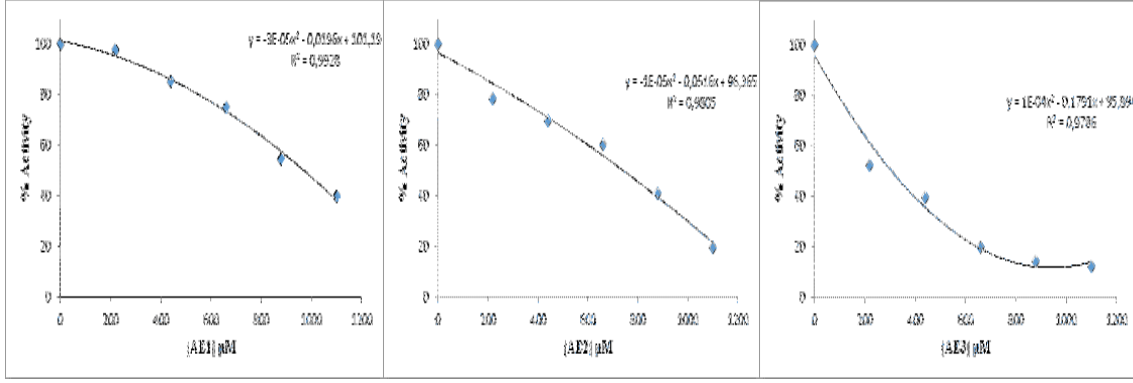
İnhibisyon çalışması için saflaştırılan PPO enziminin saflık kontrolü SDS-PAGE ile yapılmıştır (Şekil 2). Söz konusu çalışmada kullanılan tiyo-crown eterlerin $[IC_{50}]$ değerleri inhibisyon grafiklerinden hesaplanmıştır (Şekil 3). Elde edilen $[IC_{50}]$ değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Bu değerlere göre tiyo-crown eterlerin içerisinde en güçlü inhibitörün 1,4,13,16-tetraoxa-7,10,19,22-tetrathiacyclotetracosane-8,9,20,21-tetrone (**AE3**) olduğu gözlenmektedir.

Tablo 1. $[IC_{50}]$ değerleri.

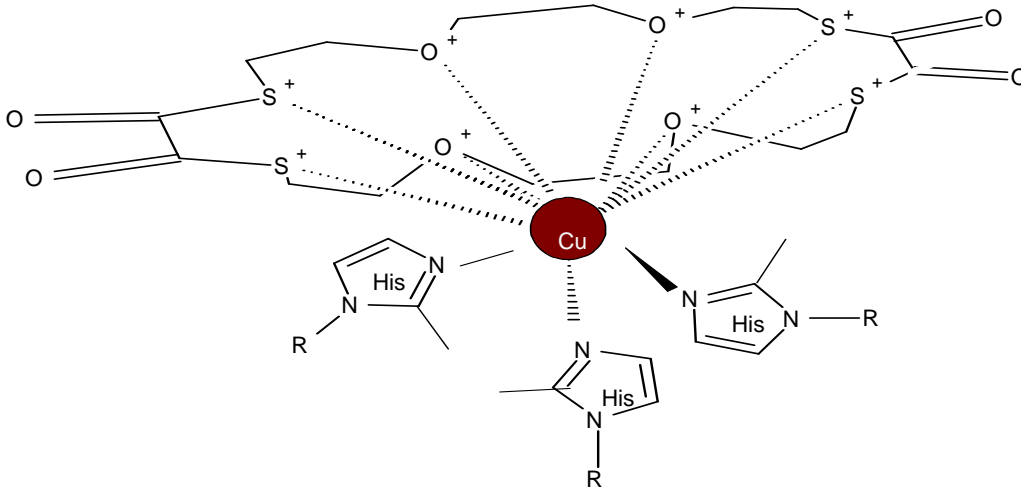
MADDELER	$[IC_{50}]$ (mM)
AE1	1,01
AE2	1,143
AE3	0,309



Şekil 2. Saf PPO enziminin SDS-PAGE görüntüsü

Şekil 3. IC₅₀ grafikleri.

PPO enzimi inhibitörü olarak birçok madde daha önce çalışılmıştır. Bu maddeler içinde en etkili inhibitörler ditiyoreitol ve metabisülfittir [48]. Enzimatik kahverengileşmeyi önlemedeki sülfürün etkisi, sülfürün o-kinonlar üzerindeki etkisi olabilir. Kinon-sülfid komplekslerinin oluşması, kinon polimerizasyonunu engeller [49]. PPO enziminin aktif bölgesinde kofaktör olarak bulunan bakır, tiyoüre gibi tiyol bileşiklerinin bu bakırı ortamdaki uzaklaştırdığı için enzim aktivitesinin etkilendiği saptanmıştır [50]. Chilaka ve ark. Tiyoürenin 0,15 mM olan Ki değeri ile güçlü bir inhibitör, inhibisyon türünün de yarışmasız olduğunu tespit etmiştir [51]. Çalışmamızda kullandığımız inhibitörler, Şekil 4.'deki gibi PPO enziminin aktif bölgesinde kofaktör olarak bulunan Cu²⁺ ile etkileşime girdiğinden enzimi inhibe etmiştir. Böylece, PPO enzimi üzerine inhibisyon etkisi tespit edilen tiyocrown eterlerin enzimatik kararmanın önlenmesinde aday bileşikler olduğu söylenebilir.



Şekil 4. İnhibitör (AE3) ile enzimin etkileşimi.

Kaynaklar

- [1] Mayer, A.M., and Harel, E., Polyphenol Oxidases in Plants, **Phytochemistry**, 18, 2, 193-215, (1979).
- [2] Friedman, M., Chemistry, Biochemistry, and dietary role of potato polyphenols, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 1 523-1540, (1997).

- [3] Sekme, S., Çeşitli Mantarlarda Polifenol Oksidaz İndüksiyonunun İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, (2011).
- [4] Gedikli, S., Çeşitli Makrofungus İzolatlarının Lakkaz Üretim Yetenekleri Açısından Değerlendirilmesi ve Dekolorizasyon Uygulamalarında Kullanılabilirliği, Yüksek Lisans Tezi, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, (2008).
- [5] Whitaker. J.R., **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, Marcel 201, New York, Dekker, 22-24, (1972).
- [6] Sarkar, J.M., Leonowicz, A. and Bollog. J.M., Immobilization of enzymes on clays and soils, **Soil Biology and Biochemistry**, 21 (2), 223-230, (1989).
- [7] Harel, E., Mayer, A.M. and Shain, Y., Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition, **Plant Physiology**, 17, 921, (1964).
- [8] Tolbert, N.E., Activation of polyphenol oxidase of kloroplasts, **Plant Pathology**, 51, 234, (1973).
- [9] Stephens, G.J. and Wood, R.K.S., Release of enzymes from cell walls by an endopectate-trans-eliminase, **Nature**, 251, 358, (1974).
- [10] Padron, M.P., Lorano, J.A. and Gonsales, A.G., Properties of *o*- diphenol oxidoreductase from *Musa cavendsha*, **Phytochemistry**, 14, 1959, (1975).
- [11] Arslan, O., Erzenin, M., Sinan, S. and Ozensoy, O., Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties, **Food Chemistry**, 88, 479-484, (2004).
- [12] Spille, G.A., **The Plant and Its Manufacture; Chemistry and Consumption of the Beverage**, 1-38, (1997).
- [13] Yue-Ming, J., Zauberman, G. and Fuchs, Y., Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp, **Postharvest Biology and Technology**, 10, 221-228, (1997).
- [14] Mazzafera, P. and Robinson, S.P., Characterization of polyphenol oxidase in coffee, **Phytochemistry**, 55, 285-296, (2000).
- [15] Shi, C., Dai, Y., Xu, X., Xie, Y. and Liu, Q., The purification of polyphenol oxidase from tobacco, **Protein Expression and Purification**, 24, 51-55, (2002).
- [16] Aydemir, T., Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynarascolymus* L.) heads, **Food Chemistry**, 87, 59-67, (2004).
- [17] Vaidya, B.K., Suthar, H.K., Kasture, S. and Nene, S., Purification of potatopolyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueoustwo-phasesystem, **Biochemical Engineering Journal**, 28, 161-166, (2006).
- [18] Waliszewski, K.N., Márquez, O. and Pardo, V.T., Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean, **Food Chemistry**, 117, 196-203, (2009).
- [19] Guo, L., Ma, Y., Shi, J. and Xue, S., The purification and characterisation of polyphenoloxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.), **Food Chemistry**, 117, 143-151, (2009).
- [20] Franck C., Lammertyn, J., Ho, Q.T., Verbohen, P., Verlinden, B. and Nicolai, B. M., Browning disorders in pear fruit, **Postharvest Biology and Technology**, 43, 1-13, (2007).
- [21] Alvarez-Parrilla, E., Rosa, L.A., Rodrigo-Garcia, J., Escobedo-Gonzalez, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., Vazquez-Flores, A. and Gonzalez-Aguilar, G.A., Dual effect of β -cyclodextrin (β -CD) on the inhibition of apple

- polyphenoloxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ), **Food Chemistry**, 101, 1346–1356, (2007).
- [22] Ünal, M.Ü. and Şener A., Two-year comparison of the biochemical properties of polyphenol oxidase from Turkish Alyanak apricot (*Prunus armenica* L.), **Food Chemistry**, 190, 741-747, (2016).
- [23] Arslan, O., Temur, A. and Tozlu, I., Polyphenol oxidase from Malatya apricot (*Prunus armeniaca* L.), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 1239–1241, (1998).
- [24] Doğan, S., Ayyıldız, Y., Doğan, M., Alan, Ü. and Diken, M.E., Characterisation of polyphenol oxidase from *Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis* (lemon balm), **Czech Journal of Food Science**, 31, 2, 156-165, (2013).
- [25] Doğan, S., Diken, M.E., Turhan, Y., Alan, Ü., Doğan, M. and Alkan, M., Characterisation and inhibition of *Rosmarinus officinalis* L. polyphenoloxidase., **Eur Food Res Technol**, 233, 293-301, (2011).
- [26] Doğan, S., Diken, M.E., Alan, Ü., Yılmaz, B., Alkan, M. and Doğan, M., Some kinetic and inhibition properties of deepwater pink shrimp from aegean sea: ph, temperature, kinetic., inhibition, **Advances in Food Sciences**, 38, 155, (2016).
- [27] Vamos-Vigyazo, L., Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables, **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 15, 49-127, (1981).
- [28] Frensch, V.K and Vogtle, F., Neuartige kronenether-lactone und -thiolactone. und ihre alkali- und erdalkaliion-komplexe, **Tetrahedron Letters**, 30, 2573, (1977).
- [29] Alberts, A.H. and Cram, D.F., Syntheses and binding characteristics of macrocyclic systems containing one to three β -diketone units, **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, 28, 958, (1976).
- [30] Pelissard, D. and Louis, R., Ligands macrocycliques pentadendates, **Tetrahedron Letters**., 45, 4589, (1972).
- [31] Chiu, J.J., Grewal, R.S., Hart, H. and Ward, D.L., Cyclic-ketones via the reaction of dithiols with 1,3-dichloroacetone - an unexpected base-catalyzed rearrangement of α,α' -dithia ketones, **Journal of Organic Chemistry**, 58, 1553, (1993).
- [32] Bradshaw, J.S., Maas, G.E., Izatt, R.M. and Christensen, J.J., Synthetic macrocyclic di- and tetraester compounds, **Chemical Reviews**, 79, 37, (1979).
- [33] Izatt, R.M., Lab, J.D., Maas, G.E., Asay, R.E., Bradshaw, J.S. and Christensen, J.J., Asymmetric hydrogenation of α,β -dehydroamino acid residue in cyclic dipeptides, **Journal of American Chemical Society**, 99, 2365, (1977).
- [34] Bradshaw, J.S., Hansen, L.D., Nielsen, S.F., Tompson, M.D., Reeder, R.N., Izatt, R.M. and Christensen, J.J., A new class of macrocyclic ether-ester ligands, **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, 21, 874-875, (1975).
- [35] Bradshaw, J.S., Bishop, C.T., Nielsen, S.F., Asay, R.E., Mashidas, D.R., Flanders, E.D., Hansen, L.D., Izatt, R.M. and Christensen, J.J., Preparation of macrocyclic ether-esters, thioether-esters, and ether-thioesters, **Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1**, 23, 2505-2508, (1976).
- [36] Asay, R.E., Bradshaw, J.S., Nielsen, S.F., Tompson, M.D., Snow, J.W., Mashidas, D.R.K., Izatt, R.M. and Christensen, J.J., The synthesis of novel macrocyclic multidentate compounds from dioxodioic acids, **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 14, 85, (1977).

- [37] Maas, G.M., Bradshaw, J.S., Izatt, R.M. and Christensen, J.J., Synthesis of a new series of macrocyclic polyether-diester ligands, **Journal of Organic Chemistry**, 42, 3937, (1977).
- [38] Tompson, M.D., Bradshaw, J.S., Nielsen, S.F., Bishop, C.T., Cox, F.T., Fore, P.E., Maas, G.E., Izatt, R.M. and Christensen, J.J., The synthesis of some substituted macrocyclic ether-ester compounds, **Tetrahedron**, 33, 3317, (1977).
- [39] Fore, P.E., Bradshaw, J.S. and Nielsen, S.F., The synthesis of macrocyclic ether esters, thioetheresters, and ether thioesters with the oxalyl moiety, **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 15, 269, (1978).
- [40] Bradshaw J.S. and Tompson, M.D., Synthesis of macrocyclic polyether-diester compounds with an aromatic subcyclic unit, **Journal of Organic Chemistry**, 43, 2456, (1978).
- [41] Izatt, R.M., Lamb, J.D., Asay, R.E., Maas, G.E., Bradshaw, J.S., Christensen, J.J. and Moore, S.S., Unusual stability characteristics in methanol of the complexes of a new pyridine-substituted cyclic polyether-ester compound with Na^+ , K^+ , Ag^+ and Ba^{2+} comparison with oxygen, sulfur, nitrogen analogues, **Journal of American Chemical Society**, 99, 6134, (1977).
- [42] Matsushima, K., Synthesis of novel macrocyclic ether-ester compounds via the intramolecular cyclization of oligoethylene glycol monocarboxymethyl ethers, **Tetrahedron Letters**, 20, 3445, (1979).
- [43] Edema, J.J., Buter, J., Kellogg, R.M., Spek, A.L. and Bolhuis, F.V., Intra- versus inter-molecular azine formation in thiocrown ether chemistry, **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 21, 1558, (1992).
- [44] Çiçek, B., Ergün, A. and Gençer, N., Synthesis and evaluation in vitro effects of some macrocyclic thiocrown ethers on erythrocyte carbonic anhydrase I and II, **Asian Journal of Chemistry**, 24, 7, 3729-3731, (2012).
- [45] Laemelli, D.K., Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage, **Nature**, 227-680, (1970).
- [46] Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, 72, 248, (1976).
- [47] Espin J.C., Morales M., Varon R., Tudela J. and Garcia-Canovas F., A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase, **Analytical Biochemistry**, 43, 2807–2812, (1995).
- [48] Sayaverde-Soto L.A. and Montgomery M.W., Inhibition of polyphenol oxidase by sulfite, **Journal of Food Science**, 51, 1531–1535, (1986).
- [49] Embs R.J. and Markakis P.T., Mechanism of sulphite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. **Journal of Food Science**, 30, 753–758, (1965).
- [50] Schimmer S. and Schimmer S., Source Book of Food Enzymology. **AVI Publishing, Westport**, 274, 267, (1981).
- [51] Chilaka F.C., Eze S., Anyadiegwu C. and Uvere P.O., Browning in processed yams: peroxidase or polyphenol oxidase, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82, 899–903, (2002).