

Iğdır İlinin Yerel Üzümü Kırmızı Kışmışı (*Vitis vinifera* L.) Çeşidinden Polifenol Oksidazın Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu*

Elif Duygu KAYA¹, Ayşe TÜRKHAN², Sadiye PERAL EYDURAN³, Melekşen AKIN⁴

ÖZET: Yerel üzüm çeşidi Kırmızı Kışmışı, Türkiye'nin Iğdır ilinin Necefali köyünden toplandı ve daha sonra laboratuvara taşındı ve -20 °C'de dondurularak saklandı. Kırmızı Kışmışı'den polifenol oksidaz aseton çöktürmesi yöntemi kullanılarak 5.45 kat kısmi olarak saflaştırıldı ve karakterize edildi. 50 gr Kırmızı kışmış üzümü hücre zarlarını parçalamak için porselen havanda dövüldü. Dondurulmuş Kırmızı kışmışı üzümü %1 polietilen glikol (PEG) içeren 100 mL 50 mM sodyum asetat tamponuyla (pH 5.0) homojenize edildi. Daha sonra homojenat, 4 katlı tulbentten süzüldü ve elde edilen süzüntü 4°C'de 30 dakika 10 000 rpm'de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatant, buz banyosunda süpernatanın hacmine kadar soğuk aseton eklendi ve karışım proteinlerin çökeltilmesi için gece boyunca 4°C'de inkübe edildi. 4°C'de 30 dakika 10 000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, çökelti 20 mL 50 mM sodyum asetat tamponu (pH 5.0) içinde yeniden çözündürüldü. Protein konsantrasyonu Lowry yöntemine göre belirlendi. Ham enzim özütü ve aseton çöktürmesi sonrası protein konsantrasyonları sırasıyla 7.04 ve 3.83 mg/mL olarak belirlendi. Katekol substratı kullanılarak, optimum pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6.0 ve 20°C bulundu. Buna ek olarak, K_m ve V_{maks} değerleri gibi bazı biyokimyasal özellikler araştırıldı. PFO enzimi için askorbik asit, sitrik asit, sodyum metabisülfite ve benzoik asit ile inhibisyon çalışmaları yapılmış, her bir inhibitör için IC_{50} hesaplanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, bu enzimin gıda endüstrisi için yararlı olabileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Kırmızı kışmışı, kısmi saflaştırma, karakterizasyon, polifenol oksidaz, inhibisyon

The Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase in Native Grape Kırmızı Kismisi Cultivar (*Vitis vinifera* L.) Grown in Iğdır Province

ABSTRACT: The native grape Kırmızı Kismisi cultivar was gathered from the Necefali village of Iğdır province in Turkey, and then carried into the laboratory and stored in deep-frozen at -20°C. Polyphenol oxidase (PPO) was partial purified 5.45 times using the cold acetone precipitation from Kırmızı Kismisi Grape and was characterized. 50 gr of Kırmızı Kismisi Grape were placed in a porcelain mortar and pestled in order to decompose cell membranes. The frozen Kırmızı Kismisi Grapes were homogenised by using a porcelain mortar in 100 mL of 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 1% (w/v) polyethylene glycol (PEG). Then homogenate was percolated through 4-fold muslin and the resulting filtrate was centrifuged for 30 minutes at 10,000 rpm at 4°C. The supernatant obtained after centrifugation was mixed with cold acetone as much as the volume of the supernatant in the ice bath and the mixture was incubated overnight at 4°C for precipitation of proteins. After centrifugation at 10,000 rpm for 30 min at 4°C, the precipitate was redissolved in 20 mL 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0). Protein concentration was determined according to the Lowry method. Protein concentrations of crude extract and acetone precipitation were determined as 7.04 and 3.83 mg/mL, respectively. Optimum pH and temperature values were found to be 6.0 and 20°C, respectively, using catechol as a substrate. In addition, some biochemical properties such as K_m and V_{max} values were investigated. PPO activity was inhibited from ascorbic acid, citric acid, sodium metabisulfite and benzoic acid and the IC_{50} for each inhibitor was calculated. The data obtained from this study showed that this enzyme could be useful for food industrial purposes.

Keywords: Characterization, Kırmızı Kismisi, polyphenol oxidase, partial purification, inhibition.

¹ Elif Duygu KAYA (0000-0001-9052-5924), Iğdır Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Iğdır, Türkiye

² Ayşe TÜRKHAN (0000-0002-2195-9435), Iğdır Üniversitesi, Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, Iğdır, Türkiye

³ Sadiye PERAL EYDURAN (0000-0003-0884-0234), Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Iğdır, Türkiye

⁴ Melekşen AKIN (0000-0002-9513-8365), Iğdır Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Peyzaj Mimarlığı Bölümü, Iğdır, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Ayşe TÜRKHAN, ayse.turkhan@igdir.edu.tr

* Bu çalışma, 9-11 Ekim, 2017 tarihinde düzenlenen II. Uluslararası Iğdır Sempozyumunda sözlü sunum olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Polifenol oksidazlar (PFO), E.C.(1.14.18.1), meyve ve sebzelerdeki fenolik bileşikler oksijenle yükseltgeyerek enzimatik esmerleşmeye sebep olan aktif merkezinde bakır bulunduran oksidoredüktaz sınıfı bir metaloenzimdir. Hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve mantarlara kadar çok geniş bir yelpazede bulunurlar (Yoruk ve Marshall, 2003; Kolcuoğlu, 2012). 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 kahverengi-siyah renkteki polimer yapıda melanin pigmentlerine dönüşürler (Mason, 1948; Prota, 1988).

Enzimatik esmerleşme reaksiyonları sebze, meyve ve tahıllarda doğal olarak bulunan genellikle polifenol oksidaz enziminin neden olduğu bir oksidasyon reaksiyonudur. (Mathewson, 2000; Mcweeny, 1974). Enzimatik esmerleşme reaksiyonları gıdaların renk, lezzet ve besin kalitesini düşürerek gıdanın ekonomik değerini azaltmaktadır. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarının yan etkilerini ortadan kaldırmak ve istenen esmerleşmeleri optimize edebilmek için 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 (Labuza ve ark., 1992).

Ülkemizde birçok yerde yetiştiriciliği yapılan üzüm beslenmemizde önemli bir yere sahiptir. Taze, kurutulularak, meyve suyu, pekmez, sirke, reçel, şarap vb. birçok ürüne işlenerek kullanılır. Üzüm: İçerdiği vitamin, protein, karbonhidrat ve minerallerin yanı sıra sağlık açısından son derece önemli olan; Antosiyaninler, kateşinler, flavonoller, quersetin ve resveretrol bileşikler sayesinde Anti kanserojen, anti diyabet, bağışıklık ve sinir sistemini kuvvetlendirici, yaşlanmayı

geciktirici özelliği vardır (Çelik, 2014; Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal, Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, 2015).

Iğdırdırda necefali ve kadıkışlak köylerinde yetiştiriciliği yapılan tarihi bir üzüm çeşidi olan Kırmızı Kışmışi üzümü pembe-kırmızı rengi ve eşsiz lezzeti ile yöre halkı tarafından severek tüketilmektedir. Bu üzümün pazarlanması için taşıma, depolama ve saklama koşullarının belirlenebilmesi rol alan enzimatik esmerleşmeden sorumlu polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonu ve inhibisyon çalışmalarının belirlenmesi önemlidir. Yapılan bu çalışmada, Kırmızı kışmışi üzüm çeşidinden polifenol oksidaz enzimi soğuk aseton çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılarak, optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametreleri ve inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri araştırıldı.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Polifenol Oksidaz enzim kaynağı olarak Kırmızı Kışmışi üzüm çeşidi kullanılmıştır. Iğdır ilinin yerel çeşidi olan Kırmızı Kışmışi üzümü Ağustos 2016 tarihinde toplanmış ve analizleri yapılmaya kadar -20°C saklanmıştır. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar sigma ve merck firmalarından temin edilmiştir. Aktivite ölçümlerinde UV-VIS Spektrofotometre cihazı (Agilent cary 60) kullanılmıştır.

Ham Enzim Özütünün Hazırlanması

Mevsiminde toplanan Kırmızı Kışmışi üzüm çeşidi kullanılmaya kadar -20°C'de derin dondurucuda bekletilmiştir. Dondurulmuş üzüm bir havanda iyice ezilerek parçalanmıştır. Ardından %1 PEG içeren 50 mM pH 5.0 asetat tamponundan 1:2 oranında ilave edilerek karıştırılmıştır (Aydemir, 2004). 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.

Kısmi Saflaştırma

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

kısım atılıp, elde edilen çökelekler çözünebildiği en az hacimde 50 mM pH 5.0 asetat tamponuyla çözülmüştür (Özen ve ark., 2004).

Protein Tayini

Protein tayini Lowry metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Lowry ve ark., 1951). Protein Standardı olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılmıştır. 650 nm'de absorbanlar okunmuş ve kalibrasyon grafiği çizilerek protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

Polifenol Oksidaz Enziminin Aktivite Tayini

Polifenol Oksidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Enzim aktivitesi katekol için 500 nm absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlenmiştir (Espin ve ark., 1995). Reaksiyon karışımı, 100 mM substrat çözeltisi ile eşit hacimde 10 mM MBTH çözeltisi ve 20 µl DMF (orijinal şişeden kullanıldı) içeren reaksiyon karışımı sodyum asetat tampon (50 mM pH 5.0) 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 absorbandaki artış izlenmiş ve aktivite hesabı yapılmıştır.

Bir ünite PFO aktivitesi; 1 ml reaksiyon karışımında bir dakikadaki 0.001 absorban artışına neden olan enzim miktarı olarak, PFO'nun spesifik aktivitesi ise; 1 mg protein başına aktivite (ünite) olarak tanımlanmıştır (Galeazzi ve Sgarbieri, 1981).

pH Etkisi

PFO aktivitesi üzerine pH'nın etkisini incelemek amacıyla Mcilvaine tamponu (pH 3.0-7.0) ve Tris-HCl (pH 8.0) (Öz ve ark., 2013) tampon sistemleri ve substrat olarak katekol kullanılarak aktivite tayinleri yapılmıştır (Colak ve ark., 2005). %Bağıl aktivite-pH grafiği çizilmiştir. Böylece enzimin en etkin çalıştığı pH değeri belirlenmiştir.

Sıcaklık Etkisi

PFO'nun optimum sıcaklığının belirlenmesi için, 5-80°C sıcaklık aralığında 10°C'lik artışlarla aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Tampon ve substrat çözeltisinden oluşan karışım, 5-10°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 (Dincer ve ark., 2002). %Bağıl aktivite-sıcaklık grafiği çizilerek optimum sıcaklık belirlenmiştir.

Enzim Kinetiği

PFO aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisini incelemek üzere, nihai konsantrasyonu 0.5-10 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 (Lineweaver ve Burk, 1934).

İnhibitör Etkisi

PFO aktivitesi üzerine inhibitör etkisi, PFO'nun bilinen inhibitörlerinden askorbik asit (0.02-0.06 mM), sodyum metabisülfid (0.1-0.5 mM), sitrik asit (30-70 mM) ve benzoik asit (2.0-10.0 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 (Colak ve ark., 2005).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kısmi Saflaştırma

Çalışmamızda kullandığımız Kırmızı Kışmı üzüm çeşidinden 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 59.33 verimle 5.45 kat kısmi olarak saflaştırıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 1). Aseton çöktürmesi sonrası polifenol oksidaz *Lactarius eucalypti*'dan 3.01 kat (Kuyumcu, 2014) ve *Macrolepiota gracilentia*'dan 5.7 kat (Kolcuoğlu, 2012), amonyum sülfat çöktürmesi sonrası ise polifenol oksidaz Nevşehir patatesi'nden (*Solanum Tuberosum* L) 21.594 kat (Tozak, 2013), *Lactarius salmonicolor*'dan 3.96 kat (Dedeoğlu, 2009) kısmi olarak saflaştırılmıştır.

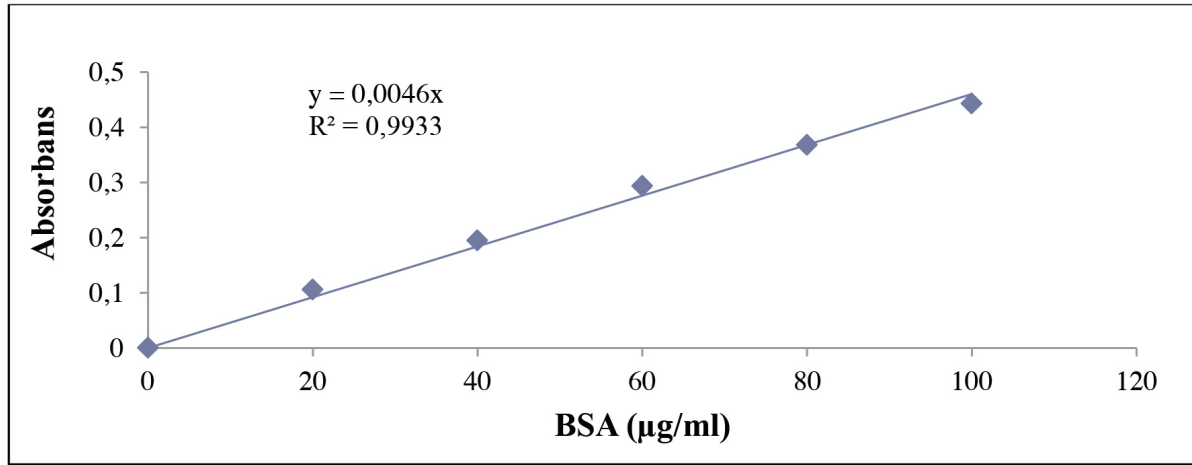
Çizelge 1. Kırmızı Kışmışi üzüm çeşidinden PFO'nun kısmi saflaştırma profili

Saflaştırma Basamağı	Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Aktivite (U/mL. dak)	Toplam Aktivite	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham Özüt	100	7.04	704	774	77400	110	100	1
Soğuk Aseton Çöktürmesi	20	3.83	76.6	2296	45920	599	59.33	5.45

Protein Tayini

Çalışmamızda kullandığımız Kırmızı Kışmışi üzüm çeşidinden hazırlanan ham enzim özütünde ve

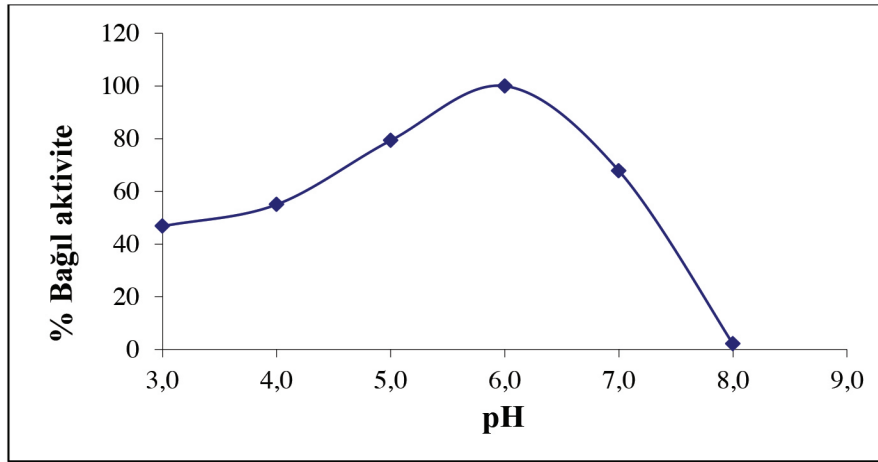
aseton çöktürmesi sonrası kısmi saflaştırılmış enzim özütünde protein tayini Lowry metodu ile belirlenmiştir (Şekil 1).

**Şekil 1.** Protein standart grafiği

pH Etkisi

PFO aktivitesi üzerine pH etkisini belirlemek amacıyla pH (3.0-8.0) arasında farklı tamponların kullanılmasıyla ayrı ayrı aktivite tayinleri yapılmış ve %bağıl aktivite-pH grafiği çizilmiştir. PFO'nun, katekol substratı varlığında, pH 6.0 değerinde en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Gerçekleştirilen karakterizasyon işlemlerinde pH 6.0 olan Mcilvaine tamponu kullanılmıştır (Şekil 2). Bazı literatür

çalışmalarında farklı kaynaklardan elde edilen PFO'nun katekol substratı varlığında, *Lactarius salmonicolor*'ın optimum pH 7.5 (Dedeoğlu, 2009), İzmir üzümü (*Vitis vinifera* L.)'nin optimum pH 7.2 (Önez, 2006), Nevşehir patatesi'nin (*Solanum tuberosum* L.) optimum pH 7.0 (Tozak, 2013), *Physalis peruviana* L.'nin optimum pH 5.5 (Bravo ve Osorio, 2016), patates (*Solanum tuberosum*)'in optimum pH 6.0 (Khan ve ark., 2006) olarak bulunmuştur.

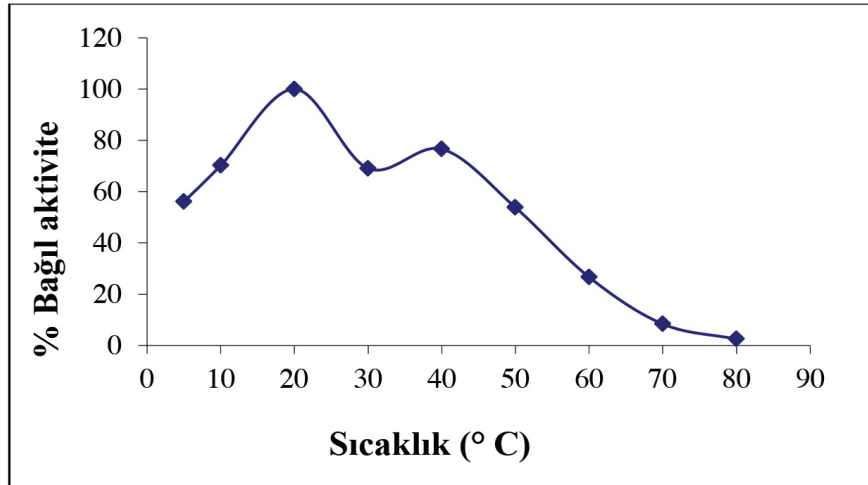


Şekil 2. Kırmızı Kışmışi üzüm PFO'nun aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Sıcaklık Etkisi

PFO'nun optimum sıcaklık değerini belirlemek için 5-80°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 20°C olarak belirlenmiştir. Bazı

literatür çalışmalarında farklı kaynaklardan elde edilen PFO'nun katekol substratı varlığında optimum sıcaklık değerleri, Nevşehir patatesi'nin (*Solanum tuberosum* L.) 20°C (Tozak, 2013), *Ocimum basilicum* L.'nin 40°C (Turan, 2005), armut (*pyrus elaeagrifolia*) 35°C (Ülker-Yerlitürk ve ark., 2008), *Lactarius piperatus* L.'un 20°C (Öz ve ark., 2013) olarak bulunmuştur.

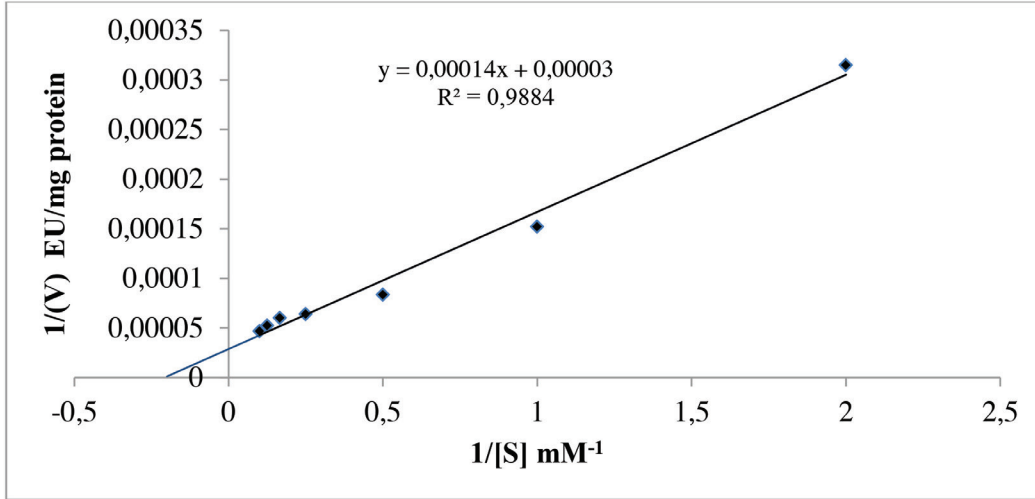


Şekil 3. Kırmızı Kışmışi üzüm PFO'nun aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Enzim Kinetiği

PFO'ya ait bazı kinetik verileri belirlemek için, son konsantrasyonu 0.5-10 mM arasında 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 33333.33 EU/mg protein ve 4.8 mM olarak belirlenmiştir (Şekil 4). *Lactarius piperatus* (L.)'nın V_{maks} ve K_m 25 U/mg protein ve 1 mM (Öz ve ark., 2013), *Boletus erythropus*'un V_{maks} ve K_m 1430 U/mg protein ve 2.8 mM (Özel ve ark., 2010) olarak bulunmuştur.

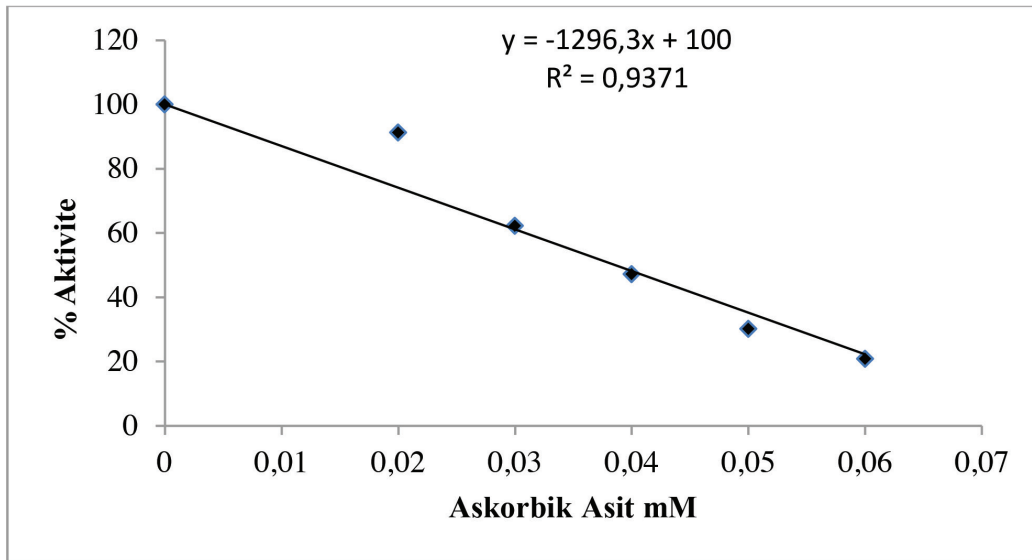


Şekil 4. Katekol varlığında polifenol oksidaz aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

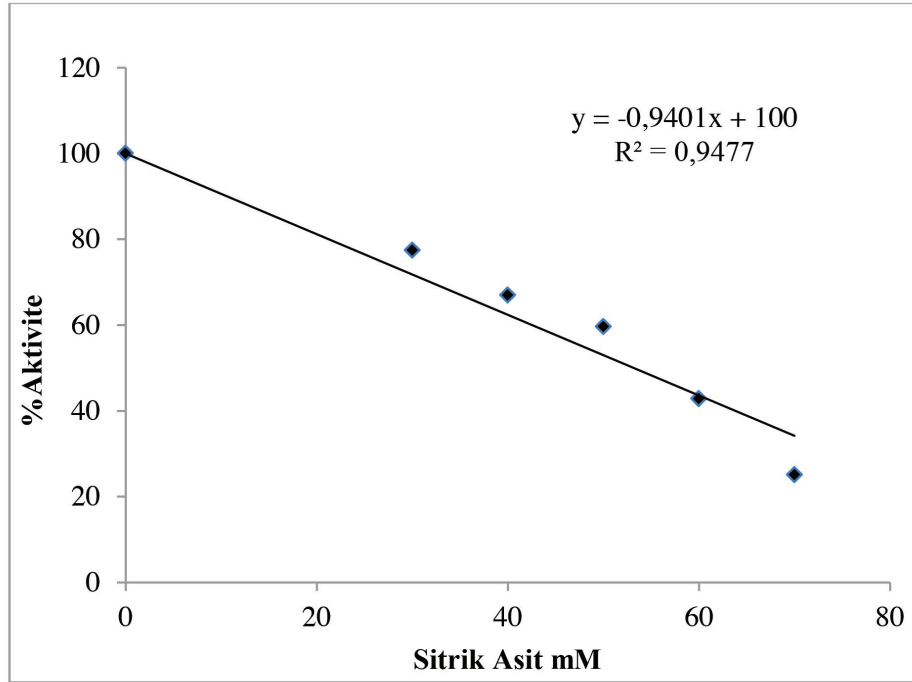
İnhibitör Etkisi

Bu çalışmada PFO'nun yaygın inhibitörleri kullanılmıştır. Her bir inhibitörün konsantrasyonuna karşılık enzimin %aktivite 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, Şekil 8). Bulunan IC_{50} değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Buna göre askorbik asit, sitrik asit, sodyum metabisülfid

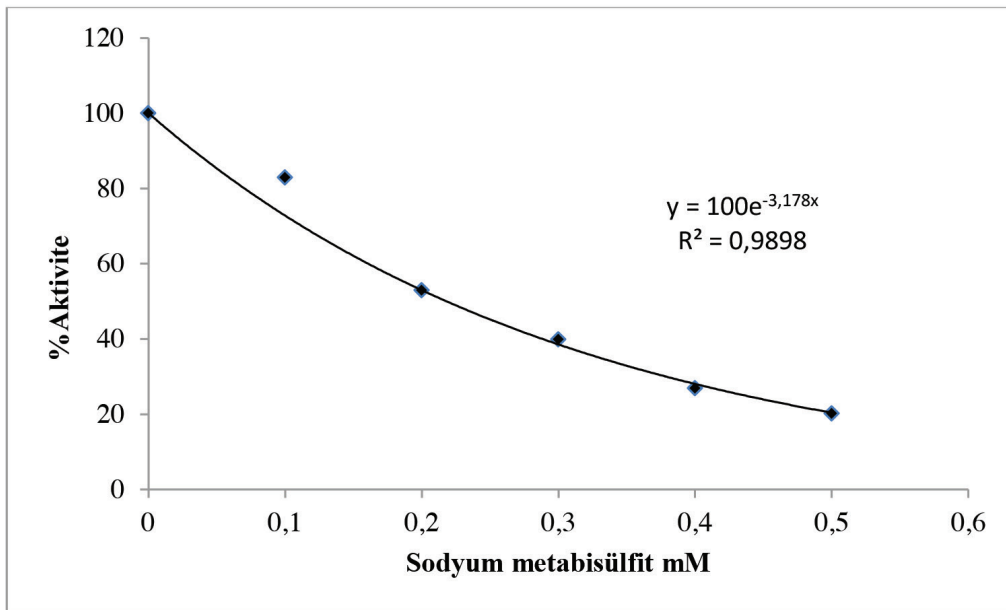
ve benzoik asit içinde en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu tespit edilmiştir. *Lactarius piperatus* (L.) PFO'sunun katekol substratı varlığında askorbik asit, sodyum metabisülfid ve benzoik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla, 0,019 mM, 0,035 mM ve 5,20 mM olarak bulunmuş ve çalışılan inhibitörler içinde en etkili inhibitörün askorbik asit olduğu belirlenmiştir (Öz ve ark., 2013).



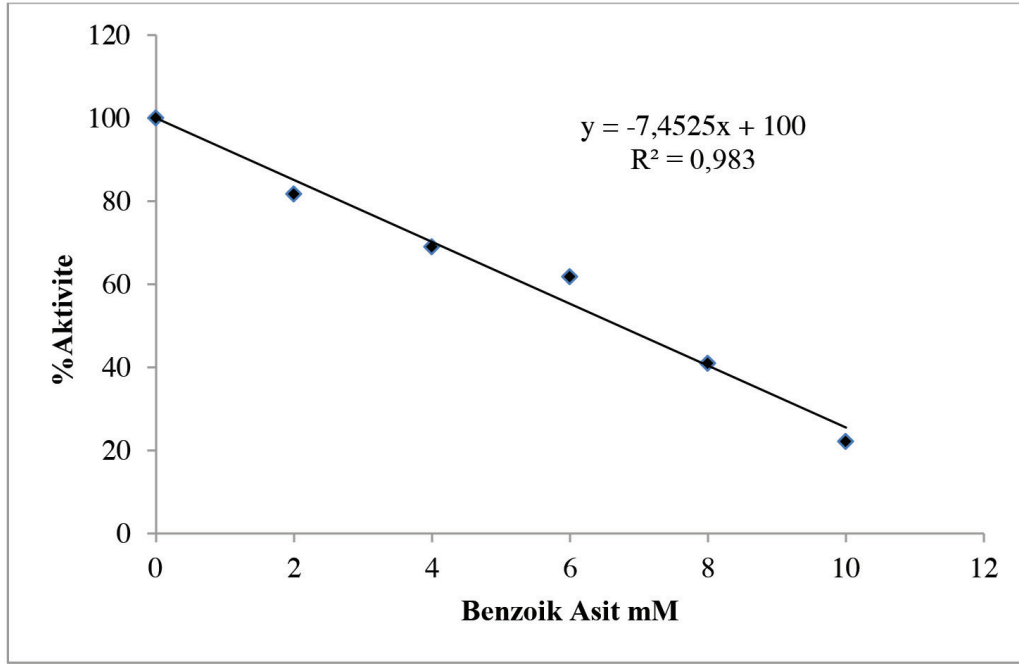
Şekil 5. Kırmızı Kışmışi üzüm PFO'sunun askorbik asit ile inhibisyonu



Şekil 6. Kırmızı Kışmışi üzüm PFO'sunun sitrik asit ile inhibisyonu



Şekil 7. Kırmızı Kışmışi üzüm PFO'sunun sodyum metabisülfid ile inhibisyonu



Şekil 8. Kırmızı Kışmışi üzüm PFO'sunun benzoik asit ile inhibisyonu

Çizelge 2. Kırmızı Kışmışi üzüm PFO'sunun aktivitesi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi

Katekol	
İnhibitör	IC_{50} mM
Askorbik asit	0.038
Sitrik asit	53.18
Sodyum metabisülfid	0.22
Benzoik asit	6.7

SONUÇ

Mevcut durumda tüketim şekli sofralık, kurutmalık ve şaraplık-şıralık olarak ayrılan üzüm için alternatif tüketim yolları geliştirilmeye başlanmıştır. Üzüm suyu özellikle kırmızı, mor, siyah renkli üzümlerden elde edilen üzüm suları hem dünyada hem de Türkiye'de gerek insan sağlığı gerekse beslenme açısından önemlidir. Meyve ve sebzelerde meydana gelen PFO enzimi katalizi enzimatik kararma reaksiyonları, ürünün tat, görünüm ve besin değerini düşürdüğü bilinmektedir. Gıda teknolojistleri PFO enzimiyle ilgili olan enzimatik kararma olayı üzerinde yoğunlaşmışlardır. İstenmeyen bu tür kararma reaksiyonları enzim inaktive edilerek önlenmeye çalışılmaktadır. Yapılan bu çalışmada

Kırmızı Kışmışi üzüm'ünden PFO aseton çöktürmesiyle kısmen saflaştırılmış enzimin optimum çalışma şartları belirlenmiş ve inhibisyon çalışması yapılarak enzim aktivitesini azaltan bazı yaygın inhibitörlerin IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Türkiyede sadece Iğdır ili'nde yetiştiriciliği yapılan ve yerel pazarda satılabilen Kırmızı Kışmışi'nden polifenol oksidaz enzimi ilk kez çalışılmıştır. Kırmızı Kışmışi üzüm çeşidinde, enzimatik kararmadan sorumlu polifenol oksidaz enziminin karakterizasyonunu ve inhibisyonunu içeren bu çalışma, üzümün depolanması sırasında dikkat edilmesi gereken parametreler için ön fikir sunmaktadır ve üzümün diğer illere taşınması, depolanması ve pazara sunulması açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Aydemir T, 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chemistry*, 87;59–67.
- Bravo K, Osorio E, 2016. Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chemistry*, 197:185–190.
- Colak A, Özen A, Dincer B, Güner S, Ayaz AF, 2005. Diphenolases from Two Cultivars of Cherry Laurel (*Laurocerasus Officinalis* Roem.) Fruits at Early Stage of Maturation. *Food Chemistry*, 90;801-807.
- Çelik H, 2014. Üzümün besin değeri. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*.
- Dedeoğlu N, 2009. Yenilebilir Mantar Türlerinden Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Dincer B, Colak A, Aydın N, Kadioglu A, Güner S, 2002. Characterization of Polyphenoloxidase from Medlar Fruits (*Mespilus Germanica* L. *Rosaceae*). *Food Chemistry*, 77;1-7.
- Espin JC, Morales M, Varon R, Tudela J, Garcia-Canovas F, 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 43;2807-2812.
- Galeazzi MAM, Sgarbieri VCJ, 1981. Substrate Specificity and Inhibition of Polyphenoloxidase from a Dwarf Variety of Banana (*Musa cavendishii*, L.). *Journal Of Food Science*, 46;1404-1406.
- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal, Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, 2015.
- Khan AA, Akhtar S, Husain Q, 2006. 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.
- Kolcuoğlu Y, 2012. Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochemistry*, 47;2449–2454.
- 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, Yüksek Lisans Tezi.
- Labuza TP, Lillemo JH, Taoukis PS, 1992. Inhibition of polyphenol oxidase by proteolytic enzymes. *Fruit Processing*, 2;9-13.
- Lineweaver H, Burk D, 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constant. *Journal of American Chemical Society*, 56;658-661.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193;265-275.
- Mason HS, 1948. Chemistry of melanin Mechanism of oxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 72;83–99.
- Mathewson PR, 2000. *Enzymes*. Eagen Press Handbook Series, 37-38.
- Mcweeny DJ, 1974. The chemistry of non-enzymatic browning in foods and its control by sulphites. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25;735.
- Önez Z, 2006. Üzümünden (*Vitis Vinifera* L.) İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Özelliklerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Öz F, Colak A, Özel A, Sağlam-Ertunga N, Sesli E, 2013. Purification and Characterization of A Mushroom Polyphenol Oxidase and Its Activity in Organic Solvents. *Journal of Food Biochemistry*, 37:36–44.
- Özel A, Colak A, Arslan O, Yildirim M, 2010. Purification and characterisation of a polyphenol oxidase from *Boletus erythropus* and investigation of its catalytic efficiency in selected organic solvents. *Food Chemistry*, 119;1044–1049.
- Özen A, Colak A, Dincer B, Güner S, 2004. A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., *Ebenaceae*). *Food Chemistry*, 85;431–437.
- Prota G, 1988. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Medicinal Research Review*, 8;525–556.
- Tozak KÖ, 2013. Nevşehir Patatesinden (*Solanum tuberosum* L.) Polifenoloksidaz Enziminin Afinité Kromatografisi İle Saflaştırılarak Kinetik Ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi, Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Turan P, 2005. *Ocimum basilicum* L.'den Elde Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Saflaştırılması, Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin İncelenmesi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Ülker-Yerlitürk F, Arslan O, Sınan S, Gencer N, Özensoy Ö, 2008. Characterization Of Polyphenoloxidase from Wild Pear (*Pyrus elaeagnifolia*). *Journal of Food Biochemistry*, 32:368–383.
- Yoruk R, Marshall MR, 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenoloxidase:a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27;361–422.