

FARKLI PANCAR ÇEŞİTLERİNDEKİ POLİFENOLOKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF POLYPHENOLOXIDAZE ENZYME ACTIVITY IN DIFFERENT BEET CULTIVARS

Nezire SAYGILI¹, Ferit LEBLEBİCİ², Hamit KÖKSEL¹

¹Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

²Türkiye Şeker Fabrikaları Anonim Şirketi, Şeker Enstitüsü, ANKARA

ÖZET: Bu çalışmada Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş., Şeker Enstitüsü (Ankara) deneme tarlalarında yetiştirilen Evita, T.Ş. Poly, Gisela, Adonis ve Agra adlı şeker pancarı çeşitlerindeki polifenoloksidad (PPO) aktivitesi incelenmiştir. PPO enzim aktivitesi substrat olarak kateşolün kullanıldığı dolaylı bir yöntemle ölçülmüştür. Absorbans-zaman grafiğinin eğimi toplam enzim aktivitesi olarak değerlendirilmiştir. Bazı şeker pancarı çeşitlerinde (Evita, T.Ş. Poly) ortalama PPO aktivitesinin yüksek olduğu ve aynı çeşit örneklerdeki enzim aktivitesi değerlerinin çok geniş sınırlar arasında değiştiği belirlenmiştir. Fakat Adonis çeşidi için ortalama PPO aktivitesi ve standart sapma değerleri oldukça düşük bulunmuştur. Tam doğal şeker (Whole Sugar) üretiminde pancardaki polifenoloksidadlar ürün rengini olumsuz etkilemekte ve bu nedenle üretimin ilk aşamasında PPO buharla inaktive edilmektedir. Bu tür düşük PPO aktivitesine sahip çeşitlerin kullanımı ile prosese ve ürün kalitesinde iyileştirme sağlanabilecektir.

ABSTRACT: In this study sugar beet varieties (Evita, T.Ş. Poly, Gisela, Adonis and Agra) grown in the trial fields of the Sugar Research Institute (Turkish Sugar Factories Corporation, Ankara) were tested for polyphenoloxidase (PPO) activity. The PPO enzyme activity was measured by an indirect method by using catechol as substrate. Slope of the absorbance-time graph was taken as the total enzyme activity. Some of the sugar beet varieties (Evita, T.Ş. Poly) had considerably higher average PPO activity and the variation of enzyme activity among the samples of the same cultivar was wide. However Adonis variety had lower values both in terms of average PPO activity and standard deviation. In Whole Sugar production polyphenoloxidases in beet deteriorate color of the product. Therefore, PPO is inactivated with steam at the first stage of production. Such varieties with lower PPO activity can be used advantageously in the Whole Sugar production in order to improve the color of the final product.

GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin doğal gıda maddelerine tekrar yönelmesi ve rafine gıdalar ile doğal olmayan katkı maddelerine karşı tepkilerinin artması sonucu gıda üreticileri de bu tür ürünlerin üretimine yönelmişlerdir. Rafine bir ürün olan şeker de bu eğilimden etkilenmeye başlamıştır. Avusturya Şeker Enstitüsü, şeker pancarından, rafine edilmemiş, pancardan gelen amino asit, vitamin ve tuzları doğal dengesiyle içeren, şeker gibi pratik ve çok yönlü kullanılabilir, çok pahalı olmayan, iyi görünüm ve tatta bir ürünü geliştirmek için 1986 yılında araştırmalara başlamıştır. Bu çalışmalar sonucu geliştirilen ve *Tam Doğal Şeker* (Whole Sugar, Vollzucker) olarak adlandırabileceğimiz bir ürün ticari olarak 1990 yılında üretilmeye başlanmıştır. Pazar payı hızla artan bu ürünün üretim aşamaları belirtilmekte ancak üretim parametreleri açıklanmamaktadır (POLLACH, 1992). Pancardan çeşitli ürünlerin üretilmesi sırasında elde edilen şerbet havayla temas eder etmez koyu gri bir renk alır. Kristal şeker üretiminde bu renk maddeleri arıtma ve rafinasyon aşamalarında giderilirken, tam doğal şeker üretiminde bu yöntemlerin uygulanması mümkün değildir. Çünkü bu işlemler sırasında şerbet bileşimindeki istenilen vitamin, mineral vb. maddeler de kaybolmaktadır.

Kristal şeker üretiminde elde edilen ham şerbetteki renk koyulaşmasının nedenlerinden en önemlisi şeker pancarının yapısında bulunan polifenoloksidad (PPO) enzim(ler)idir (MATHEW AND PARPIA, 1971; MADSEN ve ark., 1979; POLLACH, 1992). Esmerleşme reaksiyonlarının mekanizması modern analitik metotların ve enzimolojik tekniklerin geliştirilmesinden çok önce biliniyordu. Enzimatik esmerleşme reaksiyonlarına neden olan tirozinaz ilk olarak 1895 yılında Bertrand tarafından mantar hücre ve ekstraktlarında belirlenmiştir (GROSS ve COOMBS, 1978).

Literatürde o-difenol oksidaz, tirosinaz, fenol oksidaz, yaygın olarak da fenolaz gibi çok farklı şekillerde adlandırılan enzimin Enzim Komisyonu tarafından kabul edilen sistematik ismi de önce o-difenol: oksijen oksidoredüktaz ve Enzim Komisyonu numarası EC 1.10.3.1 olmuş daha sonra bu enzimin rol oynadığı reaksiyonlara göre monofenol monooksijenaz EC 1.14.18.1, difenoloksidaz EC 1.10.3.2. ve lakkaz EC 1.10.3.1 olarak değiştirilmiştir (MAYER, 1987).

Meyve ve sebzelerde mekanik yaralanma sonucu oluşan esmerleşme olayları genelde bitkinin yapısında bulunan polifenollerin enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonu sonucu esmer renkli bileşiklere dönüşmesiyle ortaya çıkar. Enzimatik esmerleşmeye neden olan polifenoloksidazlar ve substratları buldukları bitki türüne göre farklılıklar göstermektedir. Aynı bitkide çeşit, iklim, gübreleme vb. şartların değişimiyle de PPO enzim aktivitesi büyük değişiklikler göstermektedir (BONNER, 1957; HEIMER ve MAYER, 1966; MATHEW ve PARPIA, 1971, KELEŞ, 1987a).

Bitki içinde, polifenoloksidaz enzimi ve substratı farklı dokularda farklı miktarlarda ve bitki hücrelerinin farklı bölümlerinde bulunmaktadır. Şeker pancarında PPO enzimi pancarın yapraklarında, yaprak kök birleşme bölgesi ve kökün dış kabuğunda yoğun şekilde bulunurken kökün iç kısmında oldukça az bulunmaktadır. Polifenoloksidaz enzimi pancar kök hücrelerinde partiküler formda kloroplast veya mitokondriye yapışık olarak bulunur. Pancar yapraklarında ise hem partiküler formda hem de hücre sıvısı içinde çözülmüş olarak bulunmaktadır. Substrat olarak şeker pancarında tirosin ve 3,4-Dihidroksifenilalanin (DOPA) yanında az miktarda kateşol bulunmaktadır. Bakır, PPO enzimi için kofaktör olarak rol oynamaktadır (MATHEW ve PARPIA, 1971; GROSS ve COOMBS., 1987; MADSEN ve ark., 1979; MAYER ve HAREL, 1979).

Polifenoloksidazların etkili olduğu esmerleşme reaksiyonlarının engellenmesi ya da kontrol altında tutulması, reaksiyonun temel öğeleri olan enzim ve substrat ikilisinden en az birinin kontrolü ile mümkündür (ESKIN ve, 1971; MAYER, 1964; MATHEW VE PARPIA, 1971; AVIESSE ve VAROQUAUX, 1977; MOWLAH ve ark., 1981; SETHI, 1986; KELEŞ, 1987a.; CANO ve ark., 1989; LOURENCO ve ark., 1990; ZAMEL ve ark., 1990). Bitkinin genetik yapısının ıslah edilmesi veya yetiştirilmesi sırasında gübreleme, sulama vb. agronomik parametrelerin kontrol edilmesi ile enzim ve/veya substrat içeriğinin azaltılması bu amaçla uygulanabilecek yöntemlerden biri olarak ele alınabilir. PPO aktivitesi düşük çeşitlerin bulunması, pancarın renk bakımından arzu edilir nitelikte ürünlere dönüştürülmesine olumlu katkılarda bulunacaktır. Tam doğal şeker üretimi sırasında, ilk aşamada polifenoloksidazların inaktivasyonu amacıyla pancar kıyımlarına ısıtma işlemi uygulanırsa da düşük ve stabil olan hammadde kullanımının avantaj sağlayacağı açıktır. Bu çalışmada şeker pancarının işlenmesi sırasında ham şerbette gri siyah renk oluşumuna neden olan PPO enziminin farklı pancar çeşitlerindeki ve aynı çeşite ait örneklerdeki değişiminin incelenmesi amaçlanmaktadır.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Denemelerde Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş., Şeker Enstitüsü (Ankara) deneme tarlalarında yetiştirilen pancarlar kullanılmıştır. Aynı günde sökülen pancarlar içinden yaklaşık aynı büyüklükte olanlar seçilmiş ve temizlendikten sonra naylon torbalara konularak $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki soğuk odada korunmuşlardır. Materyal olarak kullanılan pancar çeşitleri şunlardır: Evita, T.Ş. Poly, Adonis, Gisela ve Agra.

Metod

Şeker pancarı kıyımlarından polifenoloksidazın ekstraksiyonu işlemi $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki soğuk odada gerçekleştirilmiştir. Soğuk odada bekletilen pancarlardan kesilen 50 g pancar kıyımı blenderde (Starmix) üzerine 80 mL tampon çözelti ve 1 g Polivinil polipirrolidon (PVPP) (Sigma) eklendikten sonra 12000 devir/dakika hızda 2 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım filtre edilmiş ve süzüntü tüplere konarak santrifüjde (Heraeus) 5000 devir/dakika hızda 1 saat santrifüj edilmiş ve supernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Tampon çözelti olarak 0.2 M Na_2HPO_4 ve 0.1 M sitrik asidin karışımından oluşan pH 7.0 McIlvaine tamponu kullanılmıştır (KNAPP, 1965; SKOOG ve WEST, 1976; RAUDSARI ve ark., 1981; LEE ve ark., 1983; GÜRAKAN, 1988; KLAP ve ark., 1989; CANO ve ark., 1989). Kullanılan tampon ve PVPP miktarları bir dizi ön deneme sonucu saptanmıştır. Tamponun az kullanılması homojenizasyonun iyi yapılamamasına, fazla kullanılması ise enzim konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır. PVPP fenolik absorbant bir madde olup fazla kullanılması durumunda polifenoloksidaz üzerinde inhibitör etkisi yaratmaktadır (MATHEW ve PARIPIA, 1971; GROSS ve COOMBS, 1978; MAYER ve HAREL, 1979). Bu çalışmada enzim karakterizasyonu amaçlanmayıp polifenoloksidazdan kaynaklanan teknolojik problemlerin çözümü hedeflendiğinden enzim saflaştırılmasına gidilmemiştir.

Şeker pancarı kıyımlarındaki polifenoloksidaz aktivitesi SUSSMAN (1961), KNAPP (1965) ve GÜREL (1991)'in kullandıkları, polifenoloksidaz enzim aktivitesinin dolaylı olarak saptandığı yöntemlerin modifikasyonu ile ölçülmüştür. Bu yöntemde enzim-substrat sistemine indirgen madde olarak potasyum ferrosiyanid ($\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$) ilave edilmektedir. Potasyum ferrosiyanid'in potasyum ferrisiyanid ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$)'e yükseltgenmesiyle oluşan absorbans artışı 420 nm'de ölçülmektedir. Ferrosiyanid'in enzimatik reaksiyon hızı üzerine hiçbir etkisi bulunmamaktadır (LEBLEBİCİ, 1995).

Reaksiyon karışımı 5.0 mL, pH 7.0 McIlvaine tamponu (günlük olarak hazırlanıp buzdolabında bekletilen); 0,8 mL, 0.2 M $\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$; 1.0 mL taze olarak hazırlanan 0.01 M kateşol (Sigma) ve 0.2 mL ekstraktan oluşmaktadır. Tampon, $\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$ ve kateşol karışımı 50 mL'lik bir beherde oda sıcaklığına getirildikten sonra ekstrakt eklenmiş ve karıştırılıp 1.0 cm'lik küvete doldurulduktan sonra Shimadzu UV-2101 spektrofotometre ile 420 nm'de absorbans değerleri zamana karşı kaydedilmiştir. Bu işlemler yaklaşık 5 saniyede tamamlanmaktadır. Absorbans değerleri 15 saniyede bir kaydedilmiştir. Yapılan ön denemelerde, absorbansın ilk 5 dakika doğrusal arttığı gözlenmiş ve aktivite saptanmasında ilk 2 dakikadaki ölçümler temel alınmıştır. Bu çalışmada enzim saflaştırması yapılmamış ve saflaştırılmamış olan enzim ekstraktında belirlenen aktivite toplam enzim aktivitesi olarak ifade edilmiştir. Toplam enzim aktivitesi olarak absorbans zaman grafiğinin ilk 2 dakikalık lineer bölümünün eğimi ($A_{420} \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$) alınmıştır.

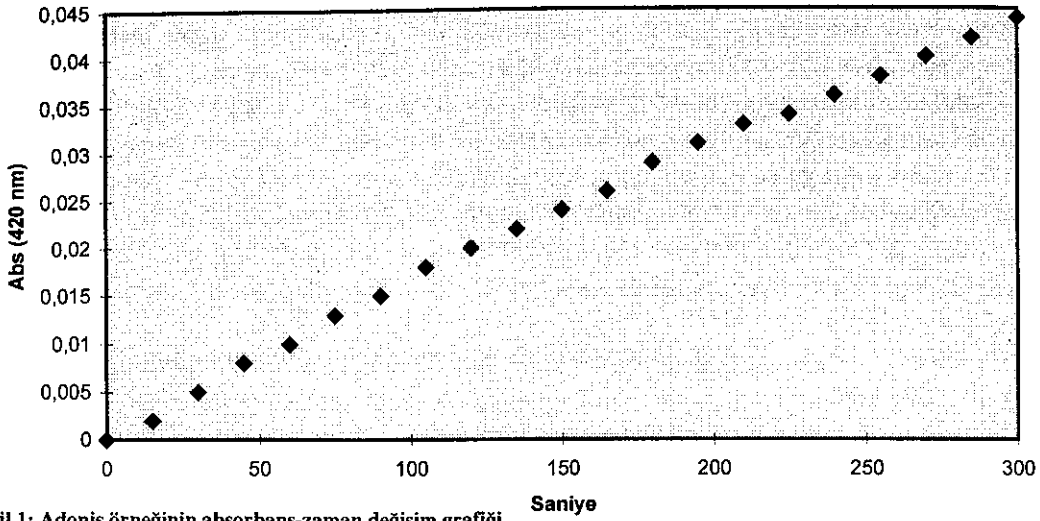
ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Substrat (kateşol), tampon çözelti ve indirgen madde ($\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$)'den oluşan karışıma enzim ekstraktının eklenmesiyle başlatılan reaksiyonda absorbans değerlerinin zamana karşı değişimi tüm çeşitler için kaydedilmiş ve sonuçlar örnek olarak Adonis çeşidi için Çizelge 1'de verilmiştir. Reaksiyon başladıktan sonra lineer olarak artan absorbans değerleri daha sonra lineerlikten sapma göstermektedir (Şekil 1). Bu değerlerin lineer olarak değiştiği bölgenin ilk 2 dakikalık bölümünün eğiminin bulunmasıyla PPO enzim aktivitesi elde edilmiştir.

Çizelge 1. Tüm Adonis örnekleri için absorbans değerlerinin zamana karşı değişimi.

Saniye	Absorbans					
	Örnek 1	Örnek 2	Örnek 3	Örnek 4	Örnek 5	Örnek 6
0	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
15	0.002	0.002	0.002	0.004	0.003	0.002
30	0.003	0.005	0.005	0.006	0.004	0.004
45	0.005	0.008	0.008	0.006	0.006	0.005
60	0.007	0.010	0.010	0.008	0.007	0.007
75	0.009	0.013	0.012	0.010	0.009	0.009
90	0.011	0.015	0.015	0.011	0.011	0.010
105	0.012	0.018	0.017	0.014	0.013	0.011
120	0.014	0.020	0.019	0.015	0.014	0.013

Evita, T.Ş.Poly, Gisela, Adonis ve Agra çeşitlerinin farklı örnekleri için belirlenen PPO enzim aktivitelerinin minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Tablo incelendiğinde bu çeşitlerin bazılarında örneğin Evita, T.Ş. Poly) PPO aktivitesi değerlerinin çok geniş sınırlar arasında değiştiği ve ortalama enzim aktivitesi değerlerinin diğer çeşitlere göre oldukça yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 1: Adonis örneğinin absorbans-zaman değişim grafiği.

Çizelge 2. Farklı pancar çeşitlerindeki PPO enzim aktivitesi.

Çeşit	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
Evita	1.82	4.56	2.72	1.252
T.Ş.Poly	1.97	3.79	2.91	0.893
Gisela	1.61	2.42	2.00	0.394
Adonis	1.06	1.70	1.30	0.279
Agra	1.06	2.26	1.84	0.423

Adonis çeşidine ait tüm örneklerin ortalama PPO aktivite değerleri ise genellikle Evita ve T.Ş. Poly gibi çeşitlere göre daha düşüktür. Ayrıca standart sapma değerleri bu çeşite ait örneklerde ortalama PPO aktivitesinin daha dar sınırlar arasında değiştiğini göstermektedir. Sonuç olarak bazı pancar çeşitlerinde PPO aktivitesi değerleri diğer çeşitlere

göre daha düşük olup genellikle bu çeşite ait farklı örnekler arasındaki varyasyon da daha azdır. Bu özellikteki örneklerin seçimi (ve uygun koşullarda yetiştirilmesi) şeker pancarı fabrikasyonu sırasında ortaya çıkan ve şerbet arıtım aşamalarında kimyasal yollarla giderilen olumsuz renk öğelerinin kontrolüne olanak verecektir. Tam doğal şeker üretimi sırasında ham şerbette meydana gelen istenmeyen renk maddelerinin giderilmesi için arıtma ve rafinasyon işlemleri uygulanamamakta, renk oluşumu ısı ile işlem uygulamasıyla engellenmeye çalışılmaktadır. Ancak ısı ile işlem sırasında pancarın kıyılmasından inaktivasyon için gerekli sıcaklığa erişinceye kadar geçen süre içinde istenmeyen renk maddeleri oluşabilmektedir. Ayrıca çok yüksek sıcaklıklar pancarın preslenebilirlik özelliğini de olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu nedenle tam doğal şeker üretiminde PPO aktivitesi düşük olan ve kampanya sırasında dalgalanma göstermeyen hammadde kullanımı avantaj sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmanın çok sayıda şeker pancarı çeşidi ile, birçok üretim yerinde ve değişik üretim koşullarında genişletilerek yapılmasında yararlar vardır. Bölece düşük PPO aktiviteli pancar hammadde üretimi için uygun çeşit, üretim yeri ve agronomik uygulamaların belirlenmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- AVIESSE, C., VAROQUAUX, P., 1977. Microwave Blanching of Peaches, *Journal of Microwave Power*, 12, No.1, 73-77.
- BONNER, Jr. W.D., 1957, Soluble oxidase and their functions, *Annual Review Plant Physiology*, 8, 423-452.
- CANO P., ANTONIA, M., FUSTER, C., 1989. Effects of some thermal treatments on polyphenoloxidase and peroxidase activities of banana, *Journal of Science Food Agriculture*, 51, 223-231.
- ESKIN, N.A.M., 1971, *Biochemistry of Foods*, Academic Press New York and London, 240p.
- GROSS, D., COOMBS, J., 1987, Enzymic colour formation in beet and cane juices, *International Sugar Journal*, 78, 69-73, 106-109.
- GÜRAKAN, T., 1988, Patlıcanlarda esmerleşme reaksiyonları ve işleme sırasında bu reaksiyonların önlenmesi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, 132p. (unpublished).
- GÜREL, E., 1991, Callus development and organogenesis in cultural leaf explants of sugar beet (*Beta Vulgaris L.*), Doktora Tezi, Leeds University, England, 167p. (unpublished).

- HEIMER, Y., MAYER, A.M., 1966, Distribution, development and nature of catechol oxidase in sugar beet, *Israel Journal of Botany*, 15, 1-11.
- KELEŞ, F., 1987a., Amasya ve Golden elmalarının polifenoloksidazları üzerine araştırmalar, II. Substrat spesifikliği, *Dođa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 11, 1, 1-6.
- KLAPP, J.A., RICHARD, F., NICOLAS, J., 1989, Polyphenoloksidase from apple, partial purification and some properties, *Phytochemistry*, Vol. 28, No.11, 2903-2911.
- KNAPP, F.W. 1965, Some characteristics of eggplant and avacado polyphenolases, *Journal of Food Science*, 30, 930-936.
- LEE, C.Y., SMITH, N.L., PENNESI, A.P., 1983, Polyphenoloksidase from De Chaunac grapes, *Journal of Science Food Agriculture*, 34, 987-991.
- LOURENCO E.J., LEAO, J.S., NEVES, V.A., 1990, Heat inactivation and kinetic of polyphenoloksidase from palmito, *Journal of Science Food Agriculture*, 52, 249-259.
- MADSEN, R.F., NIELSEN, K.W., OLSEN, W.B., NIELSEN, T.E., 1979. Formation of color compounds in production of sugar from sugar beet, *Sugar Technology Reviews*, 6, 49-115.
- MATHEW, A.G., PARPIA, H.A., 1971, Food browning as a polyphenol reaction, *Advances in Food Research*, 19, 75-145.
- MAYER, A.M., 1964, Factors controlling activity of phenolase in chloroplasts from sugar beets, *Israel Journal of Botany*, 13, 74-81.
- MAYER, A.M., HAREL, E., 1979, Polyphenoloksidases in plants, *Phytochemistry*, Vol.18, 193-215.
- MOWLAH, G., TAKANO, K., ASARI, T., KAMOI, I., OBORA, T., 1981, Inactivation behaviour of enzymes and the changing pattern of some physicochemical properties during steam blanching of banana slices before further processing, *Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi*, 28, No.12, 620-626.
- POLLACH, G., 1992, "whole sugar.": Technological aspects, *Zuckerindustrie*, 117, 9, 711-714.
- ROUDSARI, M.H., SIGNORET, A. CROUZET, J., 1981. Eggplant polyphenoloksidase: Purification, characterization and properties, *Food Chemistry*, 7, 227-235.
- SETHI, V., 1986, Effect of blanching on drying of amla, *Indian Food Packer*, 40, 7-10.
- SKOOG, A.D., WEST, D.M., 1976, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Holt, Rinehart and Winston Inc., New York, Third Edition, 804p.
- SUSSMAN, A.S., 1961, A comparison of the properties of two form of tyrosinase from *neurospora crassa*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95, 407-415.
- ZEMEL, G.P., SIMS, C.A., MARSHAL, M.R., BALABAN, M., 1990, Low pH inactivation of polyphenoloksidase in apple juice, *Journal of Food Science*, 55, No.2, 562-563.