

## Polifenol Oksidaz Enzimi ve Esmerleşme Reaksiyonlarının Gıda Endüstrisi Uygulamaları

Şule PEKYARDIMCI

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü — ANKARA

### ÖZET

Polifenoloksidaz (PPO) doğada yaygın olarak bulunan bir enzimdir. Sebze ve meyvelerde bulunmasının yanı sıra, bazı hayvan organlarında ve mikroorganizmalarda da bulunur. Meyvelerin, Sebzelerin ve kabuklu deniz hayvanlarının endüstriyel hazırlanmaları sırasında, PPO'nun katalitik etkisi sonucu enzimatik esmerleşme olur. Bu durum, ürünün sadece görünüş ve tadını bozmakla kalmayıp, onun besleyici değerini de düşürür. Bu derlemede, PPO'nun temel özellikleri, esmerleşme reaksiyonları ve bunları önlemek için alternatifler sunulmuştur.

### SUMMARY

#### POLYPHENOLOXIDASE AND BROWNING REACTIONS

Polyphenoloxidase (PPO) is widely distributed in nature. It has been detected in most fruits and vegetables. In addition to its general occurrence in plants, it may also be present in microorganisms and some animal organs. During the processing of the vegetables and some crustaceans polyphenol oxidase causes enzymatic browning. This phenomena is of vital importance to the manufacturer because it impairs the sensory properties and hence the marketability of the product, and also lowers its nutritive value. In this article, the main features of PPO, browning reactions and alternative methods for preventing enzymic browning are presented.

### GİRİŞ

Tüketicinin giderek daha bilinçlenmesi sonucu, tüketilen besinlerin hem çevre ve insan sağlığına, hem de damak zevkine uygun olması talep edilmektedir. Bu nedenle gıda endüstrisi alanında, üretim ve pazarlama ile ilgili yeni yöntemler geliştirilmektedir. Meyve ve sebzelerin depolanmaları ve endüstriyel işlenmeleri sırasında meydana gelen zedelenmeler

sonucu ortaya çıkan esmerleşme reaksiyonları ile yiyeceğin lezzet ve aroması değişmekte ve kalite bozulmaktadır. Bu reaksiyonlardan sorumlu tutulan polifenol oksidaz (PPO) enzimi, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan, fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalizleyerek, esmerleşmeyi yapan melanin pigmentlerinin oluşumuna yol açmaktadır (WHITAKER, 1972). Bu tür reaksiyonların olması için PPO enzimi, fenolik substratlar, enzim aktivatörü olarak da oksijen ve bakır gerekmektedir. Meyve sularının ve dondurulmuş sebze ve meyvelerin endüstriyel hazırlanmaları sırasında ortaya çıkan bu tür reaksiyonlar kaliteyi düşürerek, ürünün pazar değerini azaltır. Ayrıca karides, istakoz, yengeç gibi kabuklu deniz hayvanlarının hazırlanmaları ve depo edilmeleri sırasında kabukta meydana gelen ezilmeler sonucu, PPO enziminin etkisiyle ortaya çıkan melanozis sonucu, oluşan siyah renkli lekeler ürünün değerini düşürür. (OTWEL ve MARSHALL, 1936). Bu tür esmerleşme reaksiyonlarının ısı inaktivasyonu ile (PONTING, 1960), süfit ilavesi ile (SAYAVEDRA SOTO ve MONTGOMERY, 1986), substratların elimine edilmesi ile (WHITAKER, 1972), askorbik asit ilavesi ile (GOLAN-GOLDHIRSH WHITAKER, 1984), ortamın pH'ını düşürerek (ZEMEL, 1989) veya yüksek basınç uygulayarak (BALABAN ve PEKYARDIMCI, 1991) önlenebileceği gösterilmiştir.

Esmerleşme reaksiyonuna yol açan sebepler üç grup altında toplanmaktadır.

- 1 — Enzimlerin sebep olduğu Esmerleşme Reaksiyonları
- 2 — Enzimik olmayan oksidatif Esmerleşme Reaksiyonları
- 3 — Maillard Esmerleşmesi.

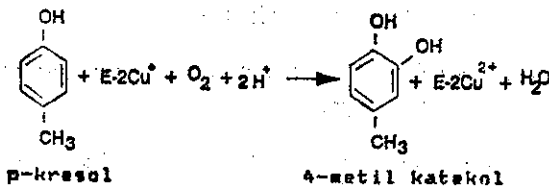
Bu reaksiyonlar içinde en yaygın olarak rastlanan enzimik esmerleşme reaksiyonlarıdır ve bu derlemede özellikle bu konuya ağırlık verilecektir.

### ENZİMLERİN YOL AÇTIĞI ESMERLEŞME REAKSİYONLARI

Meyve ve sebzelerin endüstriyel hazırlanmaları sırasında gözlenen en önemli esmerleşme (NORMAN, 1981). Bu reaksiyona yol açan enzimler substratlarına bağlı olarak kresolaz, katekoloksidaz, katekolaz, polifenol oksidaz ve fenolaz olarak adlandırılır. 1981 yılından itibaren bunların tümü «Fenolazlar» veya «Polifenol oksidazlar» adı altında toplanmıştır. Bu enzimler, oksidoredüktazlar grubuna girer ve enzim terminolojisinde (E.C. 1.14.18.1; PPO) olarak belirtilir. Polifenol oksidazlar doğada hemen hemen tüm bitkilerde, bunun yanı sıra da bazı hayvansal dokularda bulunur. Bitkilerdeki PPO miktarı bitkinin türüne, yaşına, olgunluk durumuna ve yetiştirilmesine bağlıdır. Bu enzimin bitki hücrelerinde bulunduğu yer, her bitki türü için farklılık gösterir. PPO, yeşil yapraklı bitkilerin kloroplastlarında, patatesin yumru kısmında, elmada ise kloroplastlarda ve mitokondride lokalize olmuş durumdadır. Ispanak, buğday, yulaf, bezelye gibi bazı türlerde enzim aktive edilmemiş şekilde bulunur ve aktive edilmesi gerekir. Patates, mantar, fasulye, domates gibi bitkilerde ise aktif durumda bulunur. (WISSEMANN, 1981). Polifenol oksidazlar iki tür reaksiyonu katalizler.

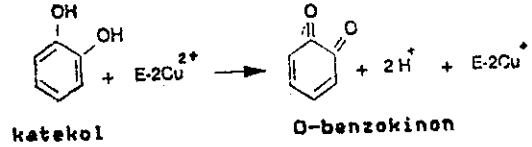
- 1 — Hidroksilleme reaksiyonları
- 2 — Oksitleme reaksiyonları

Birinci kategoriye giren reaksiyonlar fenilhidroksilaz veya kresolaz enzimleri tarafından katalizlenir ve şekil 1'de görüldüğü gibi bu reaksiyonlar sonucu monofenoller, O-dihidroksifenollere dönüşür. (RICHARDSON ve HYSLOP, 1985).



Şekil 1. O - dihidroksifenol Oluşumu

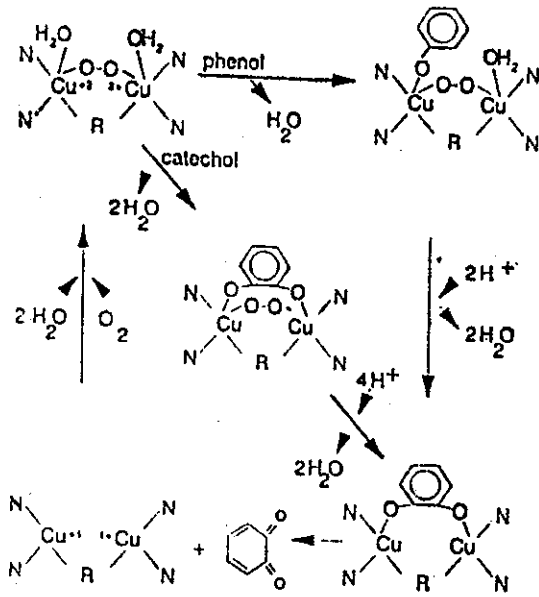
Sonraki aşamada O - dihidroksifenol, E—2 Cu+2'yi E—2Cu+1 haline indirger (WHITAKER, 1972). Difenollerin O - kinonlara oksitlenmesi reaksiyonu katekolaz veya fenoloksidaz enzimleri tarafından katalizlenir (Şekil 2).



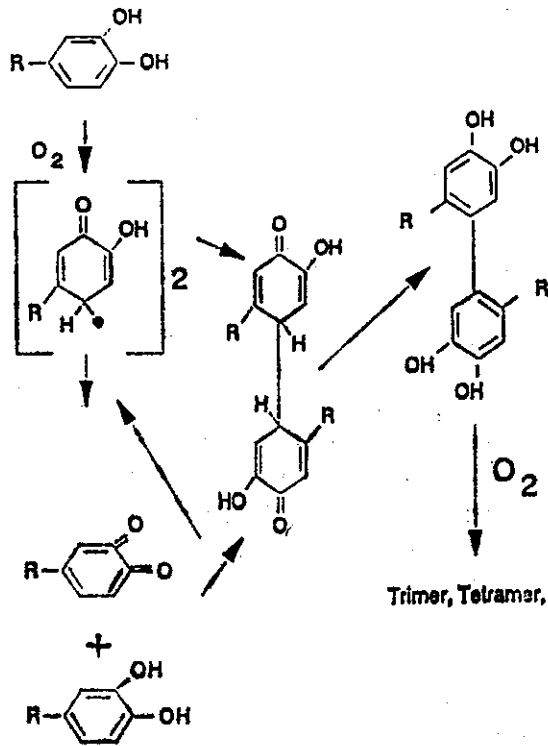
Şekil 2. O - Benzokininon Oluşumu

Muz, patates, şeftali ve tütün yaprağından izole edilen PPO'lar özellikle O - difenolik gruplar üzerinde etkilidir, monofenollerin hidroksilleme yetenekleri yoktur. Mantar, üzüm, elma ve şeker pancarı yaprağından elde edilen PPO'lar ise iki tür aktiviteyi de gösterir (VALERO ve VARON, 1988). Gıdalarda bulunan fenolik substratların büyük bir çoğunluğu dihidroksifenoller olduğundan esmerleşme reaksiyonlarının çoğu ikinci bir PPO'nun katalitik etkisiyle ortaya çıkmaktadır (MATHEW ve PARPIA, 1971). Ortokinonlara oksitlenme olmadan önce monofenollerin hidroksillenmesi gerekir. Hız belirleyici basamak monofenollerin hidroksillenmesidir (RICHARDSON ve HYSLOP, 1985). PPO tarafından kolayca oksitlenen ve O - difenollerini içeren substratlar, tirozin, kafeik asit, klorojenik asit ve katekoldür. Elmada, katekol, klorojenik asit, kafeik asit, p - kumarik asit ve p - hidroksi benzoik asit bulunmaktadır (WILLIAMS, 1953). Elmada bulunan PPO enzimi, bunların tümünün oksidasyonunu katalizler ve enzimik esmerleşme reaksiyonlarına yol açar (DURKEE ve POAPST, 1965). PPO enziminin mekanizmasının tek yönden olduğu sanılmaktadır (INGRAHAM ve MEYER 1985, SPIRO, 1981). İki oksijen atomunun, iki bakır atomu ile birleşmesi sonucu peroksi ana hali oluşur. Reaksiyon mekanizması şekil 3'de verilmektedir. Bu reaksiyonlar kresolaz aktivitesini (bir monofenolden o - hidroksilleme) ve katekolaz aktivitesini (katekolün bir o - kinona oksitlenmesi) açıklanmaktadır (SINGLETON, 1987).

Şekil 4'de fenolik substratların polimerizasyona uğrayarak kahverengi melanin pigmentlerini oluşturması gösterilmektedir. Çiftleşmiş elektronlar kolayca yeni kovalent bağları oluştururlar ve yeni bağlanmış karbonlar üzerindeki H'ler, tekrar oksitlenecek olan hidrokinona göç eder. Sonuçta kompleks yapıdaki büyük polimerler oluşur (SINGLETON, 1987).



Şekil 3. O-Kinon Oluşumu Mekanizması



Şekil 4. Melanın Pigmentlerinin Oluşum Mekanizması

### ENZİMİK OLMAYAN OKSİDATİF ESMERLEŞME

Bu reaksiyon da enzimik reaksiyonlar gibi yürür ve fenolik gruplar arttıkça oksitlenmeye

karşı hassaslık artar. (HARBORNE, 1964). ROSSI ve SINGLETON (1987) fenollerin oksidasyonunun çözeltinin pH'ı ile yakından ilgili olduğunu göstermişlerdir. Fenol düşük pH'larda protonlandığından oksidasyona karşı daha dayanıklıdır. Ancak şarap pH'ında bile bu iyonlar kolayca oksitlenebilir. pH=4 de, pH=3'e göre 9 kat daha fazla fenolat anyonu bulunmaktadır ve dolayısıyla otoksidasyon hızı 9 kat daha fazladır. Şaraptaki toplam fenol miktarı kabaca onun oksijen alma kapasitesi ile ölçülür. Oksidasyon fenol miktarını azalttığından, şarabın aldığı oksijen miktarı ile rengi arasında bir ilişki bulunur.

### MAİLLARD ESMERLEŞMESİ

Esmerleşmeye sebep olan bir başka reaksiyon da Maillard reaksiyonudur. İndirgen şekerler ile amino bileşikleri reaksiyona girdiklerinde pigment oluşumuyla ortaya çıkan esmerleşme gözlenir. Esmerleşmenin derecesi, indirgen şekerlerin ve amino asitlerin miktarına, nem durumuna, bekletme veya pişirme sırasındaki ısıya ve ortamın pH'ına bağlıdır (MCWEENY, 1974). Ticari olarak, Maillard reaksiyonunun arzu edilip, edilmediği durumlar vardır. Kontrolü esmerleşme reaksiyonları karamel, çukulata, pasta ve ekmek üretiminde kullanılmaktadır. Dolayısıyla Maillard reaksiyonu tüketilen gıdaların önemli bir kısmını içine alır (O'BRIEN ve MORRISSEY, 1989). Meyvelerde, az miktarda ortaya çıkan Maillard esmerleşmeleri doğal tadı bozup besleyici değerini azalttığından istenmeyen bir durumdur (SHALLENBERGER ve BIRCH, 1975).

### ESMERLEŞME REAKSİYONLARININ ÖNLENMESİ

#### Sülfitleerin Etkisi

Ortama kükürtdioksit ilave edilmesi enzimik olan veya olmayan esmerleşmeyi önlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu maddenin mikrop öldürücü, beyazlatıcı ve oksitlenmeyi önleyici özellikleri de bulunduğu için tercih edilmektedir (LINDSAY, 1985). Kükürtdiok-

sit 0-3 mg/lit gibi düşük konsantrasyonlarda bile etkin olarak kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan sülfidler, SO<sub>2</sub> gazı, Na ve K tuzlarının sülfidleri, bisülfidleri ve metabisülfidleridir (SAYAVEDRA-SOTO 1986). Sülfidlerin esmerleşmeyi önlemede nasıl bir mekanizmaya göre hareket ettikleri henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. BRAVERMAN'a (1954) göre, SO<sub>2</sub>'ün oksitlenme için gereken oksijen miktarını azalttığı veya PPO etkisiyle oluşan O-kinonlarla reaksiyona girerek etki ettiği belirtilmektedir. Oksijenin indirgenmesi, SO<sub>2</sub>'in yükseltgenmesi ile yürür ve ortamda sülfatlar oluşur. EMBS ve MARKAKİS'e (1965) göre bu sülfatlar enzimatik olarak O-kinonlara bağlanır ve onların kondanse olup melanini meydana getirmesini engeller. Sülfid kullanımının bu kadar olumlu yönlerinin yanısıra, son yıllarda bu ajanların kullanıldığı gıdalarla yapılan çalışmalar sonucu bunların özellikle astımlı hastalar için büyük bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (LECOS, 1986). Bunun sonucu olarak da A.B. Devletlerinde gıdalarda 10 ppm/kg dan fazla sülfidli ajan kullanımı yasaklanmıştır.

#### Isı Etkisi

PPO enziminin inaktivasyonunda en yaygın yöntemdir. PPO'in meyvelerde aktivasyon gösterdiği optimum sıcaklık 25°-35°C arasındadır (YOKOTSUKO ve MAHİNO 1981; CASH ve SISTRUNK, 1976). Meyve pürelindeki PPO'nun 75°C da yavaşça, 90°C da ise hızla inaktive olduğu belirtilmiş ve 82,2°C da inaktivasyon hızında belirgin bir artış gözlenmiştir (PONTING, 1960). VALERO ve arkadaşları (1988) da Airen üzümünden elde edilen PPO'nun 65°C da 20 dakika sonra tamamının inaktive olduğunu belirtmişlerdir. Meyve ve sebzelerdeki enzimlerin ısı ile denatüre edilmesinde, en önemli konu ortamdaki enzimin hangi cins olduğunun bilinmesidir. Şayet PPO ortamdaki tek enzim ise, enzimi kısa bir süre yüksek sıcaklıkta tutma işlemi tercih edilir. Isı ile enzimlerin inaktivasyonu yaygın kullanımına rağmen, Strecker degradasyonu gibi reaksiyonlar sonucu lezzet ve vitamin kaybı olmaktadır. (WİSTER ve DANİEL, 1985). Bu yöntemin meyvelerdeki doğal aroma ve lezzeti de yok ettiği bildirilmiştir (PONTING, 1960).

#### Askorbik Asit Etkisi :

1960 yılında PONTING eima suyuna ilave edilen askorbik asidin, esmerleşme reaksiyonlarını kısmen önlediğini bildirmiştir. Askorbik asit, oluşan O-kinonları indirgeyerek reaksiyon verir ve sonuçta kendisi oksitlenir. Askorbik asidin tamamı oksitlendikten sonra esmerleşme reaksiyonu devam eder. Bu nedenle kullanılan askorbik asit konsantrasyonu önem taşımaktadır.

#### pH Etkisi :

Ortamın pH'ının enzimlerin iyonlaşabilen grupları üzerinde önemli etkisi olduğu için enzim inaktivasyonundaki rolü de büyüktür. Aktif merkezin konformasyonunu koruyup, işlevini yerine getirebilmesi için bu grupların iyonik formda olması gerekir. pH substrattaki iyonlaşabilen grupları da etkileyebilir. Ancak bu değişimlerin büyük bir çoğunluğu tersinirdir ve enzimin tersinmez denatürasyonundan ayırılması gerekir (SEGEL, 1976; TIPTON ve DIXON, 1983). Tersinmez bir denatürasyon için ortamın pH'ının, substratın dayanıklılık ve kararlılığını da etkilemesi gerekmektedir.

Elmadan izole edilen PPO için optimum pH 4,2-7,3 arasındadır (PONTING, 1948; WALKER, 1964; STELZIG 1972). Üzümden ve mandardan elde edilen PPO için optimum pH ise 5,5-7 arasındadır (CASH, 1976; DAWSON, 1962). Optimum pH'ler arasındaki farklılık, değişik kaynaklardan elde edilen PPO'ların değişik formlarının bulunması ile, enzim kaynağının olgunluk durumu ile, enzimin saflaştırma derecesi ile ve substrat tipi ile yakından ilgilidir (VAMOS, 1981).

#### Basıncın Etkisi :

Meyvelerdeki enzimler üzerine basıncın etkisi henüz fazla çalışılmamış bir konudur. Yeterli bir inaktivasyon için basıncın süresi ve miktarı, ortamın kimyasal bileşimi, iki değerli katyonların konsantrasyonu, substratlar ortamın pH'ı, sıcaklık gibi şartların iyi ayarlanması gerekmektedir.

Süperkritik şartlarda CO<sub>2</sub> gazı kullanımı, son yıllarda enzim inaktivasyonu için ümit ve-

rici bir uygulamadır. Yüksek basınç şartlarındaki CO<sub>2</sub>'in diğer gazlarda bulunmayan, oldukça elverişli özellikleri bulunmaktadır. En önemli özelliği ise, gıda sanayi kullanımı için emniyetli ve etkili bir çözücü olmasıdır. Süperkritik CO<sub>2</sub>'in enzim inaktivasyonu ile ilgili birkaç çalışma bulunmaktadır. TANIGUCHI (1987) ve arkadaşları 35°C ve 20 MPa'da bir saatlik bir süperkritik CO<sub>2</sub> uygulaması ile enzim aktivitelerinde fazla bir düşüş gözlemediklerini bildirmişlerdir. Halbuki BALABAN (1991) ve arkadaşları ise 31,7 MPa ve 50°C'da 1 saatlik bir süperkritik CO<sub>2</sub> uygulaması ile PPO enziminin % 90 oranında inaktive olduğunu belirtmişlerdir.

Tüm bu anlatılanların ışığında, esmerleşme reaksiyonlarının önlenmesi için kullanılan yöntemler arasında sülfite kullanımı sağlık açısından sakıncalı olduğundan, ısı ile inaktivasyon da tat kaybına yol açtığından fazla tercih edilmemektedir. Askorbik asit ilavesi, esmerleşmeyi bir süre için erteler, tamamen inaktivasyon için çok büyük miktarlarda ilave etmek gerekmektedir. pH'ı düşürerek veya yüksek basınç CO<sub>2</sub> kullanarak enzimlerin inaktive edilmeleri oldukça yeni uygulamalardır ve alternatif yöntemler olarak ümit verici görülmektedir.

#### KAYNAKLAR

- BALABAN, M. ve PEKYARDIMCI, Ş. 1991. Enzyme inactivation in supercritical fluids. ACS Symposium N.Y. 1991.
- BRAVERMAN, J.B.S. 1954. Preservation of fruit and vegetable products with SO<sub>2</sub>. *Advances in Food Research* 5: 97.
- CASH, J.N.; SISTRUNK, W.A. ve STUTTLE, C.A. 1976. Characteristics of concord grape polyphenol-oxidase involved in juice color loss. *J. Food Sci.* 41: 1398.
- DAWSON, C.R. ve MAGER, R.J. 1962. Plant PPO in «Methods in Enzymology» Vol. 5, Colowick, S.P. and Kaplan, Academic Press N.Y.
- DURKEE, S.B. ve POA PST, P.A. 1965. Phenolic constituents in core tissues and ripe seed of MC Intosh apple. *J. Agr. Food Chem.* 13: 137.
- EMBS, R.J. ve MARKAKIS, P. 1965. Phenolic constituents in core tissues. *J. Agr. Food Chem.* 13: 137.
- GOLAN - GOLDHIRSH, A. ve WHITAKER, J.R. 1984. Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom PPO. *J. Agr. Food Chem.* 32: 1003.
- HARBORNE, J.B. 1964. Biochemistry of Phenolic compounds. p: 15 - 22, Academic Press, N.Y.
- INGRAM, L.L. ve MEYER, D.L. 1985. Biochemistry of dioxygen, p: 287. Plenum Press. N.Y.
- LECOS, C.W. 1986. Sülfides; FDA limits uses. *FDA Consumer*, October: 11.
- LINDSAY, R.C. 1985. Flavors in «Food Chemistry» 2nd Ed. D.R. Fennema Marcel Dekker N.Y.
- MATHEW, A.G. ve PARPIA, H.A.B. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research* 19: 75.
- MCWEENY, D.J. 1974. The chemistry of non-enzymic browning in foods and its control by sulphites. *J. Sci. Food Agric.* 25: 735.
- O'BRIEN, J., MORRISSEY, P.A. 1989. Nutritional and toxicological aspects of the Mallard browning reaction in food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 28, 3 (211 - 237).
- OTWELL, W.S. ve MARSHALL, M.R. 1986. Screening alternatives to sulfiting agents to control shrimp melanosis. 11 th Annual Trop. Fish. Technol. Conf. TAMU-Sg-86-102, 35-44 Texas A.
- PONTING, J.D. ve JOSLYN, M.A. 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.* 19: 47.

- PONTING, J.D. 1960. The control of enzymatic browning in fruits, In «Food Enzymes» Ch. 9 H.W. Schultz (Ed.) p. 105 AVI Publishing Co. Westport, CT.
- RICHARDSON, T. ve HYSLOP, D.B. 1985. Enzymes In «Food and browning in apple tissue. Arch. Biochem. 19: 47.
- ROSSI, Jr. J.A. ve SINGLETON V.L. 1966. Contributions of grape phenols to oxygen absorption and browning of wines. Am J. Enol. Vitic. 17: 231.
- SAYAVEDRA - SOTO, L.A. ve MONTGOMERY, N.W. 1986. Inhibition of PPO by sulfide. J. Food Sci. 51: 1531.
- SEGEL, I.H. 1976. Biochemical Calculations 2nd Ed. John Wiley and Sons, Inc. N.Y.
- SHALLENBERGER, R.S. ve MATTICK, L.M. 1983. Relative stability of glucose and fructose at different acid PH. Food Chemistry. 12: 159.
- SINGLETON, V.L. 1987. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems Am. J. Enol. Vitic. 38 (1): 69.
- SPIRO, T.E. 1981. Copper Proteins, Wiley Interscience p. 363 N.Y.
- STELZIG, D.A. ve AKHTAR, S. 1972. Catechol oxidase of Red Delicious apple peel. Phytochemistry. 11: 535.
- TANIGUCHI, M. ve KAMIHIRA, M. 1987. Effect of treatment with supercritical CO<sub>2</sub> on enzymatic activity. Agric. Biol. Chem. 51 (2): 593.
- TIPTON, K.F. ve DIXON, H.B.F. 1983. Effect of PH on enzymes. In «Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism» D.L. Purich (Ed.) Academic Press, Inc. N.Y.
- VALERO, E., VARON, R. ve GARCIA - CORMONA, F. (1988. Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes J. Food Sci. 53 (5): 1482.
- VAMOS - VIGYAZO, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, September 1981.
- WALKER, J.R.L. ve HULME, A.C. 1966. Enzymatic browning of apple. III. Purification of apple phenolases. Phytochemistry 5: 259.
- WHITTAKER, J.R. 1972. Polyphenol oxidase. In «Principles of Enzymology for the Food Sciences» Ch. 22. O.R. Fennema. (Ed.) Marcel Dekker, Inc. N.Y.
- WILLIAMS, A.H. 1953. The tannin of apple juice and cider. Chem. Ind. LONDON) p. 540.
- WISSEMANN, K.W. 1981. Characterization of PPO. J. Food Sci. 46: 506.
- YOKOTSUKA, K., MAKINO, S. ve SINGLETON, V.L. 1988. Polyphenol oxidase from grapes. Am. J. Enol. Vitic. 39 (4): 293.
- ZEMEL, G.P., SIMS, C.A., MARSHALL, M.R. ve BALABAN, M. 1987. Low inactivation of PPO in apple juice, Agric. Biol. Chem. 51 (2): 593 - 594.