

*DOMAT ZEYTİNİ POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Determination of Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Domat Olive

Ceren TAŞ
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

M. Ümit Ünal
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Özet

Bu çalışmada, Çukurova bölgesinde yetiştirilen Domat çeşidi zeytinden izole edilen ve kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz enziminin (PFO) optimum sıcaklık, optimum pH, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır.

Substrat olarak 4-metil kateşol kullanılmış ve enzimin K_m değerinin 14.52 mM, V_m değerinin ise 1.73 Abs/dk olduğu bulunmuştur. PFO aktivitesi için optimum pH değeri 4,5 olarak bulunmuş ve optimum pH'dan sonra enzim aktivitesinde hızlı bir düşüş görülmüştür. Enzimin optimum sıcaklığı 30°C olarak bulunmuştur. Enzim 20-50°C gibi sıcaklık aralığında %70'in üzerinde aktivite göstermiştir. Enzimin aktivasyon enerjisi (E_a) ve Z değerleri sırasıyla, 121 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0.9496$) ve 18.55°C ($r^2=0.9532$) olarak bulunmuştur. Denenen inhibitörlerden en düşük inhibisyon etkisi Askorbik asit'te görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Zeytin, enzimatik esmerleşme, polifenol oksidaz, kinetik, termal inaktivasyon.

Abstract

This research was undertaken to determine some of the biochemical properties (substrate specificity, optimum pH, optimum temperature, heat inactivation, and effect of inhibitors) of polyphenol oxidase (PPO) which was isolated from Domat olives grown in Çukurova region and partially purified.

4-methylcatechol was used as substrate and K_m and V_m values of the enzyme were found to be 14.52 mM and 1.73 Abs/dk, respectively. The optimum pH and temperature for PPO activity was found to be 4.5 and 30°C, respectively. After the optimum pH enzyme activity declined rapidly. The enzyme had more than 70% activity between 20-50°C. Energy of activation (E_a) and Z values were found to be 121 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0.9496$) and 18.55°C ($r^2=0.9532$), respectively. Of the inhibitors tested, ascorbic acid was the least effective inhibitor.

Key Words: Olive, enzymatic browning, polyphenol oxidase, kinetics, thermal inactivation.

GİRİŞ

Zeytin ağacı, tarihin her aşamasında Akdeniz'de kurulan bütün uygarlıkların vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuştur. Anadolu'nun en eski kültür

* Yüksek Lisans Tezi- Msc. Thesis

bitkilerinden olan zeytin, oleaceae familyasının, *Olea* cinsinin *Oleauropea* türünün *Oleauropea sativa* alt türünü teşkil etmektedir (Bozdoğan, 2002) Hasat sonrası depolama veya meyve ve sebzelerin işlenmesi sırasında mekanik zedelenmelerden kaynaklanan esmerleşme reaksiyonları çok sık görülmektedir. Meyve ve sebzelerde görülen bu esmerleşme reaksiyonları Polifenol oksidaz (PFO) enziminin fenolik bileşiklerle reaksiyonu sonucu meydana gelmektedir (Godfrey ve West, 1996).

Zeytinde bulunan fenol bileşikleri, sofralık zeytin veya zeytinyağının oksidatif stabilitesini ve duyuşal özelliklerini etkilediği için oldukça önemlidirler. Bunun dışında fenol bileşenlerinin beslenme ve farmakolojik etkileri doğal antioksidatif ve antimikrobiyel özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca bu işlemler renk ve tadı etkilediğinden meyvenin işlenmesinde de önemlidirler (Esti ve ark., 1998). Meyvenin doğal savunma sisteminin oluşturulmasında da fenol bileşenleri önemli rol oynamaktadır (Siciancalepore ve Longone; 1984; Brenes-Balbuena ve ark., 1995; Robards ve ark., 1999).

Polifenol oksidazlar (PFO enzimleri), oksidoredüktaz grubuna giren enzimlerdir ve bakır içerirler. Substratları fenolik bileşiklerdir. Özellikle bitkiler âleminde yaygın olarak bulunan PFO'lar hayvansal dokular ve küf mantarlarında da bulunmaktadır. Substratlarını oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler. Bu olay gıda teknolojisinde enzimatik esmerleşme olarak da bilinmektedir (Godfrey ve West, 1996).

Bu çalışmada Domat zeytini kullanılmıştır. Domat zeytini Türkiye'nin en önemli yeşil sofralık çeşididir. Meyvesi iri, silindirik yapıda olup, saptan meyve ucuna doğru bir sırt bulunur. Kilogramdaki ortalama dane adedi; 180–200 arasında değişir. Et- çekirdek oranı 5/1 ve yağ miktarı %20–22 dir. En uygun hasat zamanı Ekim ayıdır. Zeytinler hasattan sonra tatlandırılır ve fermantasyon kaplarında stoklanır. Fermantasyonunu tamamlamış zeytin karakteristik bir sarı renk alır.

Ülkemizde zeytin PFO'su üzerine çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı zeytinden PFO enzimini ekstrakte ederek kısmen saflaştırmak ve enzimin optimum pH, sıcaklık, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi ve kinetik parametreler gibi özelliklerini belirlemektir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Denemelerde Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bahçesinden temin edilen Domat zeytini kullanılmıştır.

Metot

Polifenol Oksidaz Ekstraktının Hazırlanması

Dondurulmuş (-25°C), 150 g çekirdeği çıkarılmış zeytin, 1.875 g polietilen glikol (PEG) içeren 225 ml önceden soğutulmuş (-18°C) aseton içerisinde 2 dk Waring blendorda homojenize edilmiştir. Homojenat vakumlu filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtre keki 150 ml soğutulmuş aseton ile karıştırılarak aynı işlemler uygulanmıştır. Filtre üzerinde kalan kısım, beyaz aseton tozu elde edilene kadar

150 ml soğuk aseton kullanımlarıyla ekstrakte edilmiştir. Elde edilen aseton tozu bir gece oda sıcaklığında kurutulduktan sonra cam kavanoz içerisinde -25°C 'de saklanmıştır (Coseteng ve Lee, 1987).

Enzimin Kısmi Saflaştırılması

Elde edilen aseton tozundan 10g alınarak 10 mM askorbik asit, %0.1 polivinilpoliprolidon, %0.5 Triton X-100 ve 1mM PMSF içeren 300 ml, 0.1 M, pH 6.8 fosfat tamponunda 40 saniye homojenize edilmiştir. Homojenat 3 saat, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de magnetik karıştırıcı ile karıştırılmış ve daha sonra 10.000 x g'de 45 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası, berrak kısma %90 amonyum sülfat çökeltmesi uygulanmıştır. Çökeltilen fraksiyonlar 10 000 x g'de 45 dakika, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edilerek ayrılmıştır. Çökelti, az miktarda 0.01 M pH 6.8 fosfat tamponunda çözülmüş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de aynı tampona karşı bir gece boyunca diyaliz edilmiştir (Serradell ve ark., 2000).

İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma

Diyaliz edilen enzim çözeltisi, 0.01 M pH 6.8 fosfat tamponu ile dengelenmiş DEAE-Toyopearl 650-M iyon değişim kolonuna (2.5 x 30 cm) 0.5 ml.dk⁻¹ hızla verilmiştir. Enzim çözeltisi verildikten sonra 0.5 ml.dk⁻¹ hızla yaklaşık 200 ml başlangıç tamponu geçirildikten sonra 0.01–0.20 M, pH 6.8 fosfat tamponu kullanılarak gradient elüsyon yapılmıştır. Toplam 40 ml enzim çözeltisi kolona verilmiştir. Fraksiyonlar 4'er ml olacak şekilde toplanmış ve elde edilen fraksiyonlarda enzim aktivitesi ve protein tayini yapılmıştır.

Protein Tayini

Enzimlerin protein içeriği standart olarak sığır serum albumini kullanılan Bradford metoduna göre belirlenmiştir (Bradford, 1976).

Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Enzim aktivitesi 30°C 'de 410 nm'de 40 sn boyunca absorbanstaki artıştan belirlenmiştir. Absorbans-zaman grafiğinin lineer kısmının eğiminden enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Ölçümler iki paralelli olarak yapılmış ve sonuçlar ortalama değerler şeklinde ifade edilmiştir. Optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış ve 30°C 'ye ısıtılmış 0.9 ml substrat çözeltisi 0.1 ml enzim çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra absorbanstaki artış otomatik olarak kaydedilmiştir. Sadece inhibitörün etkisini belirlemek için yapılan enzim aktivitesi ölçümlerinde 0.8 ml substrat, 0.1 ml inhibitor ve 0.1 ml enzim çözeltisi kullanılmıştır. Kontrol olarak fosfat tamponunda hazırlanmış substrat kullanılmıştır. 1 ünite PFO aktivitesi 30°C 'de dakikada 0.001 birimlik absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Ünal ve Şener, 2006).

Enzimin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Enzimin optimum pH ve sıcaklığı, kinetik parametreler, termal inaktivasyon, inhibitörlerin etkisi gibi biyokimyasal özellikleri Ünal (2007)'a göre belirlenmiştir.

Optimum pH

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'yı bulabilmek için 3.04-6.7 pH aralıklarında aktiviteler ölçülmüştür. pH 3.04-5.80 için 0.2 M sitrat tamponu, pH 6.30-6.70 için 0.2 M fosfat tamponu kullanılmıştır. PFO aktivitesi farklı tamponlarda, standart reaksiyon karışımı kullanılarak ölçülmüştür. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri optimum pH olarak belirlenmiş ve diğer deneyler bu pH'da gerçekleştirilmiştir. .

Optimum Sıcaklık

Optimum sıcaklığı belirleyebilmek için 20-70°C'ler arasında enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için optimum pH'daki tamponla hazırlanmış 0.9 ml 4-metil kateşol çözeltisi ilgili sıcaklıkta su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 0.1 ml enzim çözeltisi ilave edilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. Maksimum enzim aktivitesinin görüldüğü sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

Kinetik Parametreler

Enzimin Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız V_m değerlerini bulabilmek için optimum pH ve sıcaklıkta değişik konsantrasyonlarda 4-metil kateşol kullanılarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Kinetik parametreler Lineweaver-Burk metoduyla grafiksel olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla $1/\text{Substrat}-1/\text{Reaksiyon}$ hızı grafiği çizilmiş ve eğim ve y eksenini kestiği noktalardan K_m ve V_m değerleri hesaplanmıştır.

Termal İnaktivasyon

Sıcaklığın enzim stabilitesine etkisini belirlemek için enzim 65, 70 ve 75°C'de (5, 10, 15 dk) ısıtıldıktan sonra enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Vidalı deney tüpü ilgili sıcaklıktaki su banyosunda 5 dk bekletildikten sonra içerisine 0.3 ml enzim konulup değişik sürelerde sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Süre sonunda enzim hızlı bir şekilde su banyosundan çıkarılıp buz banyosunda soğutulmuş, ardından oda sıcaklığına getirildikten sonra enzim aktivitesi standart reaksiyon karışımı kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol olarak sıcaklığa maruz bırakılmayan enzim kullanılmıştır. Sıcaklığa maruz kalan enzimlerdeki kalıntı aktivite (E_t), sıcaklığa maruz kalmamış enzimin aktivitesi (E_o) ile kıyaslanarak birinci dereceli inaktivasyon sabiti (k_d), yarı ömür ($t_{1/2}$), aktivasyon enerjisi E_a , sabit bir sıcaklıktaki enzim aktivitesinin %90'ını inaktive etmek için gereken süre (D değeri) ve D değerinde bir log10 azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışı (Z değeri) hesaplanmıştır.

İnhibitörlerin Etkileri

İnhibitörlerin enzim aktivitesine etkisini belirleyebilmek için 0.01, 0.10 ve 1.00 mM konsantrasyonlarda 3 farklı inhibitör (askorbik asit, sodyum disülfid ve L-sistein) kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bunun için optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış 4-metil kateşol çözeltisinden 0.8 ml ve optimum pH'daki tampon ile hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki inhibitör çözeltilerinden 0.1 ml deney tüpüne konularak 5 dk 30 °C'de su banyosunda bekletilmiş ve daha sonra üzerine 0.1 ml enzim ilave edilerek aktivite ölçümü yapılmıştır. Kontrol olarak inhibitör kullanılmadan hazırlanan standart reaksiyon karışımında enzim aktivitesi belirlenmiştir. İnhibisyon yüzdesi ise aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [(A_o - A_i)/A_o] * 100$$

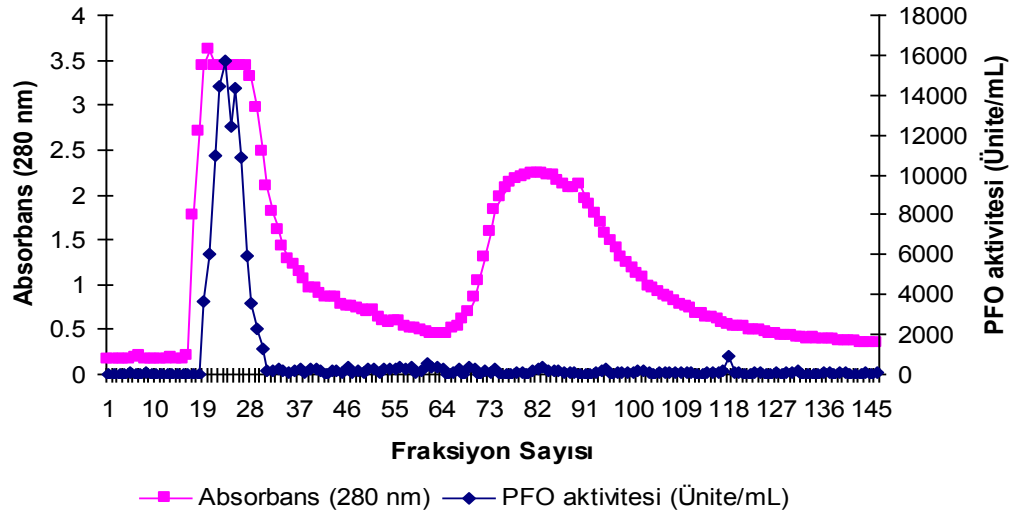
A_o: İnhibitör kullanmadan belirlenen enzim aktivitesi

A_i: İnhibitör varlığında enzim aktivitesi.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Enzimin Saflaştırılması

İyon değişim kromatografisinde elde edilen fraksiyonlarda her birinde absorbands (280 nm) ve enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Aktivite ölçümleri pH'sı 4.98 olan 0.2 M sitrat tamponunda hazırlanmış, 100 mM 4-metil kateşol kullanılarak yapılmış ve absorbands ve aktivite değerlerinden elde edilen grafik Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi iki protein piki elde edilmiş, fakat bunlardan sadece bir tanesinde enzim aktivitesi görülmüştür. Bu aktivite pikinde 21-26'nci fraksiyonlar birleştirilerek biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Optimum pH değeri (pH 4.5) ve 50 mM 4-metil kateşol ile yapılan enzim aktivitesi ölçümlerine göre elde edilen saflaştırma çizelgesi Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi PFO enzimi % 24.5 verimle 11.7 kat saflaştırılmıştır.



Şekil 1. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile zeytin pfo'sunun saflaştırılması.

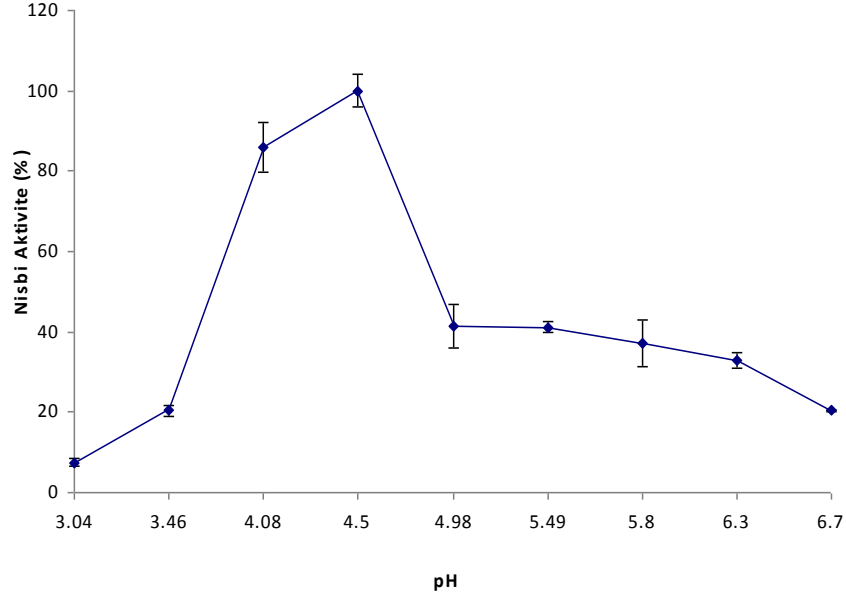
Çizelge 1. Zeytin pfo'sunun saflaştırma çizelgesi

Saflaştırma Adımları	Hacim (ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (ünite)	Spesifik aktivite (ünite/mg protein)	Saflaştırma Katsayısı	Verim (%)
Kaba ekstrakt	270	67.446	3759210	55736.6	1.00	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ çökeltmesi ve diyaliz	40	20.6	494280	23994.2	0.43	13.1
DEAE-Toyoparl 650M	24	1.41	922320	654127.7	11.7	24.5

Optimum pH

Zeytin PFO'nun en yüksek aktivite gösterdiği optimum pH'sını belirleyebilmek için standart reaksiyon karışımında pH'sı 3.04–6.7 arasında değişen tamponlar kullanılarak enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar % nisbi aktivite olarak Şekil 2'de gösterilmiştir. Şekilden de görüleceği gibi pH 3.04'ten 4.50'a doğru aktivite açmış

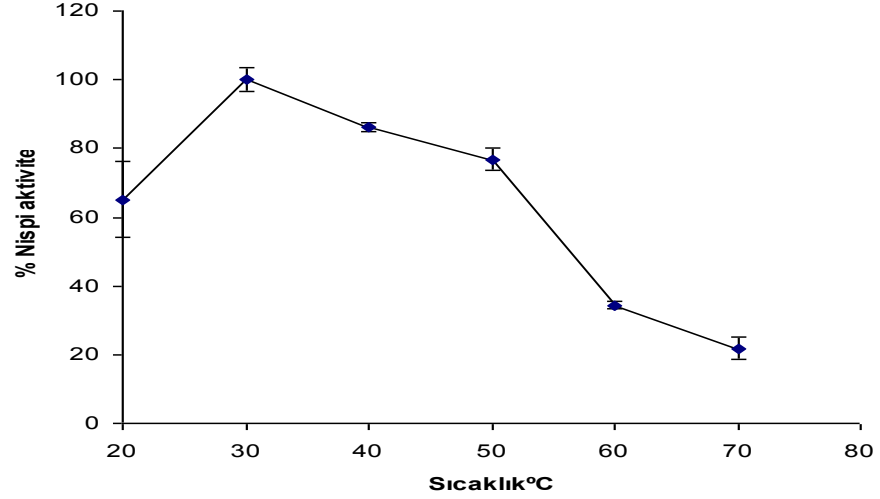
en yüksek aktivite pH 4.5'te görülmüştür. Optimum pH'dan sonra enzim aktivitesi önemli ölçüde azalarak % 20'lere kadar düşmüştür.



Şekil 2. pH'nın zeytin pfo aktivitesine etkisi

Optimum Sıcaklık

Zeytin PFO'sunun en yüksek aktivite gösterdiği optimum sıcaklığı belirleyebilmek için 20–80°C'ler arasında enzim aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar % nisbi aktivite olarak şekil 3'de verilmiştir. Ölçümlerde standart reaksiyon karışımı kullanılmıştır.



Şekil 3. Sıcaklığın zeytin pfo'suna etkisi

Şekilden de görüldüğü gibi enzim en yüksek aktiviteyi 30°C'de göstermiştir. 30°C'den itibaren sıcaklıktaki artışla beraber enzim aktivitesi azalarak % 30'lara kadar düşmüştür.

Kinetik Parametreler

Enzimin Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_m) değerlerini bulabilmek için optimum pH ve sıcaklıkta değişik konsantrasyonlarda 4-metil kateşol kullanılarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Kinetik parametreler Lineweaver-Burk metoduyla grafiksel olarak hesaplanmıştır. Bu amaçla 1/Substrat-1/Reaksiyon hızı grafiği çizilmiş ve eğim ve y eksenini kestiği noktalardan K_m ve V_m değerleri hesaplanmıştır.

Bu çalışmada 3.125mM – 50mM substrat konsantrasyonlarında, K_m değeri 14.52 mM, V_m değeri 1.73 Abs/dk olarak bulunmuştur.

Termal İnaktivasyon

PFO'in termal inaktivasyon kinetiği 65, 70 ve 75°C'de 5, 10, 15 dk sürelerde çalışılmıştır. Termal inaktivasyon parametreleri ısıtılmış maruz kalmış enzimlerin aktivitelerinin ısıtılmamış örneğin aktivitesine kıyaslanmasıyla kD (inaktivasyon sabiti), $t_{1/2}$ (yarı ömür) ve D (desimal indigenme süresi) değerleri hesaplanmıştır. Sıcaklık arttıkça kD değerleri artmış buna karşılık enzim aktivitesini yarı yarıya azaltmak için gereken süre ve D değerleri azalmıştır. 65°C'de enzimin yarı ömür değeri 31.9 dk iken 75°C'de 9.24 dk olmuştur.

Çizelge 2. Zeytin pfo'sunun termal inaktivasyon parametreleri

Sıcaklık (°C)	KD (dak ⁻¹)	r ²	t ^{1/2} (dak)	D (dak)
65	0.0217	0.9556	31.9	106.1
70	0.0318	0.9983	21.8	72.4
75	0.0750	0.9808	9.24	30.7

Termal inaktivasyon çalışmalarının diğer önemli parametreleri aktivasyon enerjisi (E_a) ve enzimin D değerinde bir log10 azalma için (% 90 azalma için) gereken sıcaklık artışı ifade eden Z değeridir. Bu çalışmada, Z ve E_a değerleri sırasıyla 18.6°C ($r^2=0.9532$) ve 121.043 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0.9496$) olarak hesaplanmıştır.

Inhibitörlerin Etkisi

Bu çalışmada, askorbik asit, sodyum disülfid ve L-sisteinin zeytin PFO'suna olan inhibite edici etkileri 0.01, 0.10 ve 1.00 mM konsantrasyonlarda incelenmiştir. Sonuçlar % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Denenen tüm inhibitörlerde % 100 inhibisyon görülmemiş, en yüksek inhibisyon derecesi % 69.63'lük inhibisyon derecesi ile 1 mM konsantrasyonda L-Sisteinle olmuştur. L-Sistein ve Sodyum Disülfidin inhibe edici etkileri birbirine yakın olmuş, buna karşılık Askorbik Asit en düşük inhibisyonu göstermiştir.

Sonuç

Bu çalışmada Domat çeşidi zeytinden izole edilerek kısmen saflaştırılan polifenol oksidaz'ın (PFO) biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Bu bağlamda, enzimin optimum pH ve sıcaklığı, kinetik parametreleri, termal inaktivasyonu ve bazı inhibitörlerin etkisi incelenmiştir.

Elde edilen bulgulardan; substrat olarak 4-metil kateşol kullanılmış ve enzimin K_m değerinin 14.52 mM, V_m değerinin ise 1.73 Abs/dk olduğu, pH 3.04'den pH 4.5'a doğru arttırıldıkça, enzim aktivitenin de arttığı, en yüksek aktivitenin pH 4.5'da görüldüğü ve enzim aktivitesinin optimum pH'dan sonra önce hızlı sonra yavaş olarak düştüğü, enzimin en yüksek aktiviteyi 30°C'de gösterdiği, 30°C'den itibaren sıcaklıktaki artışla beraber enzim aktivitesinin hızla azalarak 70 °C'de yaklaşık % 20'ye düştüğü, enzimin Z ve E_a değerlerinin 18.55°C ($r^2=0.9532$) ve 121.043 kJ.mol⁻¹ ($r^2=0.9496$) olduğu, L-Sistein ve sodyum disülfidin inhibe edici etkilerinin birbirine yakın olduğu buna karşılık askorbik asitin inhibisyon etkisinin denenen diğer inhibitörlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Kaynaklar

BRADFORD, M. M., 1976. a Rapid and Sensitive for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding, Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

- BRENES-BALBUENA, M., ROMERO, C., GARCIA, P. ve GARRIDO, A., 1995. Effect of pH on the Colour Formed by Fe-Phenolic Complexes in Ripe Olives. *J. Sci. Food Agric.*, 67: p. 35-41.
- COSETENG, M.Y., LEE, C.Y., 1987. Changes in Apple Polyphenoloxidase and Polyphenol Concentrations in Relation to Degree of Browning, *Journal of Food Science*, 4, 985-989.
- ESTÍ, M., CİNQUANTA, L. ve LA NOTTE, E., 1998. Phenolic Compounds in Different Olive Varieties. *J. Agric. Food Chemistry*, 46 (1): s. 32-35.
- GODFREY, T., WEST, S., 1996. *Industrial Enzymology*. Stockton Pres, New York.
- ROBARDS, K., PRENZLER, P. D., TUCKER, G., SWATS_TANG, P. ve GLOVER, W., 1999. Phenolic Compounds and Their Role in Oxidative Process in Fruits. *Food Chemistry.*, 66 (4): s. 401-436.
- SERRADELL, M. A., ROZENFELD, P. A., MARTINEZ, G. A., CIVELLO, P. M., CHAVES, A. V. ve ANON, M. C., 2000. Polyphenoloxidase Activity From Strawberry Fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch., cv Selva): Characterisation and Partial Purification, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1421-1427.
- SCIANCELEPORE, V., LONGONE, V. 1984. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 32:320.
- ÜNAL, M. Ü. ve ŞENER, A., 2006. Determination of Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Emir Grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 2374–2379.