

SICAKLIK VE SÜRENİN HAVUÇ VE YEŞİL FASULYELERDE BULUNAN PEKTİN METİLESTERAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

TIME-TEMPERATURE CHARACTERISTICS OF PECTIN METHYLESTERASE FROM CARROTS AND GREEN BEANS

Ahmet YEMENİCİOĞLU¹, Bekir CEMEROĞLU²

¹İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir

²Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ÖZET: Havuç ve yeşil fasulyelerden elde edilmiş ekstrakte ve homojenatlarda PME enziminin aktivite düzeyi ve termal karakteristikleri belirlenmiştir. Yeşil fasulyelerden elde edilmiş homojenatlarda havuçlara kıyasla 2.6 kat daha fazla PME aktivitesi bulunduğu saptanmıştır. Çözünür, iyonik ve kovalent bağlı PME fraksiyonlarının yüzde dağılımı y. fasulyelerde sırasıyla; 3, 88,9 ve havuçlarda 0,81, 19 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Homojenatlarda bulunan PME enzimlerinin optimum sıcaklıkları y. fasulyelerde; 40°C, buna karşın havuçlarda; 50°C'dir. Her iki sebze de iyonik olarak bağlı PME enzimleri, benzer termal karakteristiklere sahip olup 40°C'de optimum aktivite göstermektedir. Buna karşın kovalent bağlı enzim fraksiyonunun optimum sıcaklığı, havuçlarda 55°C, y. fasulyelerde 50°C dir.

ABSTRACT: Activity and thermal characteristics of pectin methylesterase were determined in different extracts and homogenates of carrots and green beans. Comparing to carrots, green beans contain 2.6 fold higher PME activity in homogenates. The percent distribution of soluble, ionically bound and covalently bound PME was 3, 88,9 and 0,81, 19 for green beans and carrots, respectively. The temperature optimums of PME in homogenates were 40°C for green beans and 50°C for carrots. In both vegetable ionically bound PME had the same thermal characteristics and gave an optimum at 40°C whereas, covalently bound PME had temperature optimums at 55°C and 50°C for carrots and green beans, respectively.

GİRİŞ

Düşük sıcaklıkta haşlama; (DSH) işlemi, dondurulacak, kurutulacak veya konserveye işlenecek sebzelerin tekstürünü geliştirmek veya sahip oldukları tekstürü muhafaza etmek amacıyla 50-75°C'ler arasındaki sıcaklıklarda belli süre ısıtılmalarıdır (FUCHIGAMI ve ark. 1995; STANLEY ve ark., 1995). DSH işlemi, ısıtmada yüksek sıcaklıkların kullanıldığı klasik haşlama öncesinde uygulanmakta olan bir işlemdir. Bu işlem sırasında üründe bulunan pektin metilesteraz enziminin faaliyetiyle pektik bileşiklerin esterleşme derecesi düşürülmekte ve düşük esterleşme derecesindeki pektinin, ortamda doğal olarak bulunan Ca⁺² ve Mg⁺² gibi çift değerli iyonlarla etkileşime girerek bir ağ yapısı oluşturması sağlanmaktadır. "Egg Box" modeli olarak adlandırılan bu stabil yapının oluşmasıyla hücreler arasında bir harç vazifesi görerek onları birarada tutan pektinin işleme sırasında çözünür hale geçmesi önlenmektedir (ANDERSSON ve ark., 1994). Ayrıca, çift değerli iyonlarla birleşmiş düşük esterleşme derecesindeki pektin zincirleri poligalaktronaz gibi depolimerizasyon enzimlerinin saldırısına ve ısıtım sırasında görülen β-eliminasyonu yoluyla parçalanmaya karşı önemli bir direnç kazanmaktadır (HUDSON ve BUESCHER, 1986; LAATS ve ark., 1997).

Düşük sıcaklıkta haşlama işleminin arzulanan düzeyde bir etki sağlaması; uygulamanın uygun sıcaklıkta ve uygun sürede yürütülmesine bağlıdır. Özellikle işlemin yürütüleceği sıcaklık derecesi büyük bir önem taşımaktadır. Bu sıcaklığın, PME enziminin optimum aktivite göstereceği veya aktive olacağı bir düzeyde bulunması gerekmektedir. Buna göre düşük sıcaklıkta haşlama uygulanacak bir üründe PME enziminin optimum faaliyette bulunacağı sıcaklık ve süreler tam olarak bilinmelidir.

Yeşil fasulyeler ve havuçlar yoğun olarak dondurulan ve konserveye işlenen ürünlerdir. Bu ürünlerde işleme sırasında çoğu zaman arzulanmayan tekstürel değişim ve kayıplar oluşmaktadır. Örneğin konserveye işlenen veya dondurulan havuçların elastiki ve çiğnenmesi güç bir yapı kazanması, y. fasulyelerin ise özellikle konserveye işleme sırasında aşırı yumuşayarak daha sonraki pişirme sırasında dağılması, oluşan en belirgin tekstürel olumsuzluklardır (STEINBUCH, 1976; MITTAL, 1994; STANLEY ve ark., 1995; FUCHIGAMI ve ark., 1995).

Bu çalışmada havuç ve y. fasulyelerde PME enziminin aktivite düzeyi ve termal nitelikleri belirlenerek düşük sıcaklıkta haşlama koşullarının optimize edilmesi için gerekli temel veriler elde edilmiştir.

MATERYAL VE METOD

Materyal

Materyal olarak kullanılan sebzeler, Aralık 1998'de Ankara'da bir satış yerinden temin edilmiştir. Kimyasallardan sitrus pektini Sigma Chem. Co. (St Louis, Mo), diğer gerekli kimyasallar ise Merck firmasından temin edilmiştir.

Metod

Enzim ekstraksiyonu

Homojenat hazırlanması: 30-50 g sebzenin, 150 mL 0.01 N soğuk tris-HCl tamponuyla (pH 7.5) Waring Blender yardımıyla 2 dakika homojenize edilmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan homojenat doğrudan aktivite ölçümleri ve PME enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesinde, veya farklı PME ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çözünür enzim ekstraktının hazırlanması: Bu amaçla belirtilen şekilde hazırlanmış homojenat sekiz katlı bir tülbentten süzülümüş ve elde edilen süzüntü, kaba filtre kağıdından filtre edilmiştir. Elde edilen filtrat "çözünür PME ekstraktı" olarak isimlendirilmiş ve derhal aktivitesi belirlenmiştir.

İyonik bağlı enzim ekstraktının hazırlanması: Bu ekstraktın hazırlanmasında bir önceki aşamada homojenatın tülbentten süzülmesi sonrasında ayrılan hafif nemli, lapa görünümlü kitle kullanılmıştır. Bu amaçla, elde edilen kitle her defasında sekiz katlı bir tülbentten süzülerek 2 kez 150 mL soğuk damıtık suyla yıkanmış ve daha sonra 100 mL, 1 M NaCl içeren 0.01 N soğuk tris-HCl tamponuyla (pH 7.5) birlikte 3 dakika homojenize edilmiştir. Bu homojenatın yeniden ancak bu kez 10 katlı bir tülbentten iyice süzülmesiyle elde edilen süzüntü "iyonik bağlı PME ekstraktı" olarak isimlendirilmiş ve derhal aktivitesi belirlenmiştir. Süzme işlemi sonunda tülbent üzerinde kalan kitle kovalent bağlı enzim ekstraktının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Kovalent bağlı enzim ekstraktının hazırlanması: Bu amaçla bir önceki aşamada ayrılmış olan ve artık neredeyse renksiz bir jel halini almış bulunan kitle, önce 150 mL damıtık soğuk suyla yıkanmış ve daha sonra sekiz katlı bir tülbentten süzülerek 100 mL, 0.01 N soğuk tris-HCl (pH 7.5) içerisinde süspanse edilmiştir. Elde edilmiş süspanسیون "kovalent bağlı enzim ekstraktı" olarak isimlendirilmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra aktivitesi belirlenmiştir.

PME aktivitesinin belirlenmesi

PME enzim aktivitesinin belirlenmesinde YEMENİCİOĞLU ve ark. (1997) tarafından verilmiş titrimetrik yöntem izlenmiştir. Titrasyonda, 0.01 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

Sıcaklık ve sürenin PME aktivitesine etkisinin belirlenmesi

Bu amaçla farklı sıcaklıklarda (40°, 45°, 50°, 55°, 60°C) 40 dakika boyunca titrasyon yürütülerek 10., 20., 30. ve 40. dakikalardaki PME aktiviteleri belirlenmiştir. Ölçümler sonucunda en yüksek aktivitenin ölçüldüğü sıcaklık ve süre 100 olarak alınmış ve diğer tüm değerler buna göre yüzde olarak ifade edilmiştir.

SONUÇLAR

PME aktivitesi

Farklı ekstrakt ve homojenatlarda ölçülmüş bulunan PME aktivitelerine ait değerler Çizelge 1'de verilmiştir. Buna göre y. fasulyelerde PME aktivitesinin havuçlardakine kıyasla belirgin olarak daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır.

Havuçlarda bulunan toplam PME aktivitesinin yaklaşık %23'ü, y. fasulyelerde ise yaklaşık %10'u hücre duvarı materyallerine güçlü kovalent bağlarla bağlıyken; geriye kalan PME enzimlerinin havuçlarda tamamı, y. fasulyelerde ise büyük bir kısmı hücre duvarını oluşturan çeşitli yapılara zayıf iyonik bağlarla bağlıdır. Yeşil fasulyeler çok az da olsa çözünür PME enzimleri içerirken, havuçlarda çözünür

formda PME enzimi bulunmadığı anlaşılmaktadır. PME enziminin çözünür halde bulunmaması veya çok az bir kısmının çözünür halde bulunması, bu enzim için adeta karakteristik bir davranıştır. Nitekim YEMENCİOĞLU ve CEMEROĞLU (1999) hıyarlarda da PME enziminin neredeyse tamamının bağlı olarak bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde ALONSO ve ark. (1996) farklı kiraz çeşitlerinde yürüttükleri çalışmalarında PME enziminin en az %80-90'ının bağlı olarak bulunduğunu belirlemişlerdir.

Sıcaklık ve sürenin PME aktivitesine Etkisi

Havuç ve yeşil fasulyelerden elde edilmiş ekstrakt ve homojenatlarda, farklı sıcaklık ve sürelerin PME aktivitesi üzerindeki etkisine ait bulgular Çizelge 2 ve 3'de verilmiştir.

Yeşil fasulyelerden elde edilmiş homojenatlarda PME 40°C'de optimum olarak faaliyet göstermekte ancak bunun üzerindeki sıcaklıklarda, 30. dakikadan sonra PME faaliyeti oldukça yavaşlamakta veya durmaktadır. Buna karşın havuçlardan elde edilmiş homojenatlarda optimum aktivite 50°C'de görülmekte ve 40-55°C aralığında 40 dakika sonunda bile homojenatta önemi düzeyde PME aktivitesi bulunmaktadır. Buna göre y. fasulyelerde bulunan PME enziminin havuçlardakine kıyasla ısıya oldukça duyarlı olduğu açıktır.

Gerek havuçlardan gerekse y. fasulyelerden elde edilmiş homojenatlarda PME enzimleri 60°C'deki faaliyetlerini uzun süre muhafaza edememektedirler. Nitekim bu sıcaklıkta yeşil fasulye homojenatında 10. dakikadan sonra, havuç homojenatında ise 20. dakikadan sonra PME faaliyeti durma noktasına gelmektedir. Bu durum, düşük sıcaklıkta haşlama sırasında gözönünde bulundurulmalı ve iç sıcaklığı 60°C'ye ulaşmış olan ürünler gereğinden daha uzun süre ısıtılmamalıdır.

Homojenatlarda yürütülmüş ısıtma deneyleri, düşük sıcaklıkta haşlama koşullarının saptanması açısından en anlamlı verileri sağlamaktadır. Ancak homojenatlarda bulunan PME aktivitesinin neredeyse tamamı iyonik ve kovalent bağlı enzim fraksiyonlarından oluşmaktadır. Dolayısıyla sıcaklık ve sürenin bu fraksiyonlar üzerindeki etkisini ayrı ayrı inceleyerek sözkonusu ürünlerde bulunan PME'la ilgili daha ayrıntılı veriler elde etmek mümkündür.

Çizelge 2 ve 3'deki veriler incelenecek olursa gerek havuçlarda, gerekse y. fasulyelerde iyonik bağlı PME enzimlerinin optimum sıcaklığının 40°C olduğu görülmektedir. Ayrıca her iki fraksiyonu teşkil eden PME enzimlerinin 45°, 50° ve 55°C'lerde 30. dakikadan sonra, 60°C'de ise 20. dakikadan sonra faaliyetleri neredeyse durmaktadır. Bu veriler ışığında havuç ve y. fasulyelerde bulunan ve her iki üründe de toplam PME aktivitesinin büyük bir kısmını oluşturan iyonik bağlı enzim fraksiyonlarının tamamen benzer termal niteliklere sahip olduğu

Çizelge 1. Y. Fasulye ve Havuçlardan Elde Edilmiş Farklı Homojenat ve Ekstraktlarda Pektin Metilesteraz Aktiviteleri

Ürün	Çözünür PME aktivitesi		İyonik bağlı PME aktivitesi		Kovalent bağlı PME aktivitesi		Homojenat PME aktivitesi
	a	b	a	b	a	b	
Y. Fasulye	0.06	5.70	1.84	178.50	0.17	17.70	0.67
Havuç	0	0	0.78	81.90	0.16	19.04	0.26

Not:

- a: 5 mL ekstrakt için dakikada harcanan 0.01N NaOH miktarı, mL
- b: Toplam aktivite. (Toplam aktivite = ax enzim ekstraktının toplam hacmi, mL)
- c: 5 g homojenat için dakikada harcanan 0.01 N NaOH miktarı, mL

anlaşılmaktadır. Ancak, her iki üründe bulunan kovalent bağlı enzim fraksiyonlarının termal nitelikleri birbirinden oldukça farklıdır. Nitekim havuçlarda bulunan kovalent bağlı PME'in optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 55°C, buna karşın y. fasulyelerdekini 50°C olması da bunu doğrulamaktadır. Buna göre, havuçlardan elde edilmiş homojenatlarda PME enziminin daha yüksek bir ısı stabilite göstermesinin, bu üründeki ısıya dirençli kovalent bağlı enzim fraksiyonundan kaynaklandığı açıktır. Ayrıca, havuçlarda kovalent bağlı enzim fraksiyonunun iyonik bağlı olana oranının, y. fasulye-

Çizelge 2. Sıcaklık ve Sürenin Y. Fasulyelerden Elde Edilmiş Homojenat ve Ekstraktlarda PME Aktivitesine Etkisi.

Ekstrakt	Sıcaklık (°C)	PME AKTİVİTESİ (%)			
		10. dak.	20. dak.	30. dak.	40. dak.
Homojenat	40	31	65	84	100*
	45	36	67	81	87
	50	47	76	85	88
	55	45	49	72	72
	60	32	36	37	37
İyonik bağlı PME ekstraktı	40	46	79	96	100*
	45	50	83	95	98
	50	53	83	92	94
	55	53	78	84	86
	60	43	49	52	52
Kovalent bağlı PME ekstraktı	40	25	50	71	88
	45	34	62	82	97
	50	39	67	87	100*
	55	40	64	76	82
	60	36	43	47	48

* Çizelge'de homojenat ve enzim ekstraktlarında bulunan PME için en yüksek aktivitenin elde edildiği sıcaklık-süre kombinasyonlarındaki aktivite 100 olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3. Sıcaklık ve Sürenin Havuçlardan Elde Edilmiş Homojenat ve Ekstraktlarda PME Aktivitesine Etkisi.

Ekstrakt	Sıcaklık (°C)	PME AKTİVİTESİ (%)			
		10. dak.	20. dak.	30. dak.	40. dak.
Homojenat	40	33	58	76	93
	45	34	60	79	95
	50	40	66	86	100*
	55	40	64	76	85
	60	39	50	55	57
İyonik bağlı PME ekstraktı	40	31	57	84	100*
	45	38	72	89	91
	50	46	85	94	95
	55	45	79	89	90
	60	44	62	67	68
Kovalent bağlı PME ekstraktı	40	22	42	58	74
	45	25	48	68	86
	50	30	56	79	98
	55	38	65	86	100*
	60	40	54	59	63

* Çizelgede, homojenat ve enzim ekstraktlarında bulunan PME için en yüksek aktivitenin elde edildiği sıcaklık-süre kombinasyonlarındaki aktivite 100 olarak kabul edilmiştir.

lerdekinden daha yüksek olması da bu ürüne ait homojenattaki PME'in ısıya daha dirençli olarak görülmesini sağlamaktadır.

Sonuç olarak elde edilmiş veriler dikkate alınırca ürün iç sıcaklığı havuçlarda 45-55°C, y. fasulyelerde ise 40-50°C ler arasında olacak şekilde yürütülecek bir DSH işleminin, bu ürünlerde bulunan pektik bileşiklerde maksimum demetilasyona neden olacağı anlaşılmaktadır. Özellikle y. fasulyelerde ürün iç sıcaklığının 60°C'ye ulaşmasıyla PME enziminin kısa sürede inaktif hale geçeceği, buna karşın havuçlarda bu sıcaklıkta PME enziminin bir süre daha faliyetine devam edeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- ALONSO, J., RODRIGUEZ, M.T. ve CANET, W. 1996. Purification and characterization of four pectinesterases from sweet cherry (*Prunus avium* L.). *J. Agric. Food Chem.* 44: 3416-3422.
- ANDERSSON, A., GEKAS, V., LIND, I., OLIVEIRA, F. ve ÖSTE, R. 1994. Effect of preheating on potato texture. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34 (3): 229-251.
- FUCHIGAMI, M., MIYAZAKI, K. ve HYAKUMOTO, N. 1995. Frozen carrots texture and pectic components as affected by low temperature-blanching and quick freezing. *J. Food Sci.* 60: 132-136.

- HUDSON, J.M. VE BUESCHER, R.W. 1986. Relationship between degree of pectin methylation and tissue firmness of cucumber pickles. *J. Food Sci.* 51: 138-140, 149.
- LAATS, M.M., GROSDENIS, F., RECOURT, K., VORAGEN, A.G.J. ve WICHERS, H.J. 1997. Partial purification and characterization of pectin methylesterase from green beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *J. Agric. Food Chem.* 45: 572-577.
- MITTAL, G.S. 1994. Thermal softening of potatoes and carrots. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 27: 253-258.
- STANLEY, D.W., BOURNE, M.C., STONE, A.P. ve WISMER, M.V. 1995. Low temperature blanching effects on chemistry, firmness and structure of canned green beans and carrots. *J. Food Sci.* 60: 327-333.
- STEINBUCH, E. 1976. Technical note: Improvement of texture of frozen vegetables by stepwise blanching treatments. *J. Fd. Technol.* 11: 313-316.
- YEMENİCİOĞLU, A. ve CEMEROĞLU, B. 1997. Heat inactivation kinetics of pectin methylesterase from orange and grapefruit peels-peroxidase as an indicator of peel blanching. *Fruit Processing.* 4: 158-161.
- YEMENİCİOĞLU, A. ve CEMEROĞLU, B. 1999. Separation and thermal characterization of ionically and tightly cell-wall-bound pectin methylesterase from cucumbers (*cucumis sativus*). *Z. Lebensm Unters Forsch.* 208: 369-372.