

PORTAKAL SUYUNDAKİ PEKTİNESTERAZ AKTİFLİĞİ ÜZERİNE
SÜPERKRİTİK KOŞULLARDAKİ CO₂ İN ETKİSİ*

Şule PEKYARDIMCI
A.Ü.Fen Fak.Kimya Bölümü Beşevler-ANKARA

Murat DALABAN
Food Science and Human Nutrition Department University of
Florida,Gainesville 32611-0163 U.S.A.

BZET : Bu çalışmada, Valencia cinsi portakallardan elde edilen portakal suyu, süperkritik koşullardaki CO₂ ile muamele edilmiş ve pektinesteraz (PE) aktifiği üzerinde basıncın, sıcaklığın ve zamanın etkileri araştırılmıştır. Aktivasyon enerjisi (E_a) ve reaksiyon hız sabiti (k) gibi kinetik parametreler hesaplanmış atmosferik basınçtaki değerlerle karşılaştırılmıştır. Aktivasyon enerjisi (E_a) 31,7 MPa'da, 97,4 kJ/mol; atmosferik basınçta 166,6 kJ/mol k değerleri ise 31,7 MPa'da 9,45x10⁻² /dakika, atmosferik basınçta 1,77x10⁻² /dakika olarak bulunmuştur. Bu çalışma sonunda, pektinesteraz (PE) enziminin süperkritik CO₂ ile termal inaktivasyon sıcaklığının altında inaktive edilebileceği bulunmuştur.

EFFECTS OF SUPERCRITICAL CO₂ ON THE ACTIVITY OF PECTINESTERASE IN
ORANGE JUICE

SUMMARY : In this study, Valencia orange juice was treated with supercritical CO₂ and effect of pressure, temperature and time on pectinesterase (PE) activity was explored. Kinetic parameters such as activation energies (E_a); reaction rate constant (k) calculated and compared to temperature and atmospheric pressure values. E_a at 31,7 MPa 97,4 kJ/mol, at 1 atm. 166,6 kJ/mol; k at 31,7 MPa 9,45x10⁻² /min., at atm 1,77x10⁻² /min. Supercritical CO₂ inactivated pectinesterase (PE) below thermal inactivation temperatures.

* Bu çalışma "Food Science and Human Nutrition Department"
University of Florida U.S.A.'da yapılmıştır.

GİRİŞ

Gıda sanayiinde, yiyeceklerin endüstriyel amaçlarla hazırlanması sırasında, süperkritik koşullardaki CO₂ ile ekstraksiyon ve fraksiyonlama yapmak çok yeni, aynı zamanda da ünit verici bir uygulamadır(1,2,3). Süperkritik CO₂'in olası uygulamalarından biri de istenmeyen enzimlerin inaktivasyonudur. Taniguchi ve arkadaşları tarafından 20,3 MPa'da ve 35 C'da 1 saat süreyle birkaç enzim üzerinde süperkritik CO₂'in etkisi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre, süperkritik CO₂ ile muamele edilen enzimlerin aktivitelelerinde sadece $\times 10^3$ luk bir düşme gözlenmiş ve süperkritik ortamında su miktarı az olduğu zaman α -amilaz, glikozoksidaz, lipaz ve katalazın inaktive edilemeyeceği belirtilmiştir(4). Haas ve arkadaşlarının çalışmalarına göre de portakal suyundaki pektinesteraz(PE)'in, 6,2 MPa'da süperkritik CO₂ ile inaktive olmadığı gösterilmiş, bunun olası sebebi olarak da basıncın yeterince yüksek olmaması gösterilmiştir(5).

Doğadaki bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan pektinesteraz(pektin metilesteraz), poligalakturonik asitlerin metil esterlerinin hidrolizini katalizleyen bir enzimdir(6). Meyva ve sebzelerin endüstriyel amaçlı hazırlanmaları sırasında bu enzimlerin etkisiyle istenmeyen çökelmeler gözlenir. Portakal suyu hazırlanırken pektinesterazın etki göstermesi sonucu, meyva suyunun dibinde, onun pazar değerini düşüren tortulaşmalar ortaya çıkmaktadır. Bu durumu önleyip, homojenliği sağlamak için PE'in inaktive edilmesi gerekmektedir. En basit ve en yaygın olarak kullanılan yöntem ısı inaktivasyonudur. Ancak bu yöntemin meyvaların doğal lezzetini bozduğu gözlenmiştir(7). Yapılan çalışmalara

Ş.PEKYARDIMCI, M.BALABAN/PORTAKAL SUYUNDAKİ PEKTİNESTERAZ AKTİFLİĞİ ÜZERİNE SÜPER.

göre, portakal suyundaki PE enzimi, ortamın pH'ını düşürerek inaktive edilebilmektedir. 1960 yılında Pointing (8) tarafından, pH 2,5-2,7 arasında tutularak, elma suyunda bulunan polifenoloksidaz (PPO) enzimi inaktive edilmiş ve meyva suyunun homojenliği sağlanmıştır. Ancak bu yolla yapılan işlemlerde, pH'ı düşürmek için asit kullanmak gerektiğinden, meyva suyunun aromasının bozulduğu belirtilmiştir(9)...

Yüksek basınçtaki CO₂ sulu ortamdaki gıdalarla muamele edildiğinde karbonik asit oluşturarak geçici bir pH düşmesine neden olur. Meyvalarda bulunan ve istenmeyen iki enzim olan polifenoloksidaz (PPO) ve pektinesterazın (PE) süperkritik CO₂ ortamındaki inaktivasyonu Zemel(10) ve Aerola(11) tarafından çalışılmış ve 4 saat sonunda inaktivasyonun gerçekleştiği belirtilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kullanılan Aletler

Süperkritik sistemin, belirlenen sıcaklık değerinde tutulması için elektrikli bir ceket kullanılmıştır (Brisk, Heat corporation, Columbus, OH). Sıvı CO₂'i maksimum 31,7 MPa'da pompalama işlemi, hızı 11 dm³/saat olan bir pompa yardımıyla yapılmış (American Lewa, Inc. Hollison, MA) ve fazların daha iyi karışabilmesi, hızla denge durumuna ulaşılması için devir sağlayıcı bir pompa kullanılmıştır Model 12206, Baydatco USA, Inc). Enzim çözeltisinin süperkritik CO₂ aletine konulmadan ve konulduktan sonraki pH değerleri bir pH metre yardımıyla ölçülmüştür (EA-920 Orion Inc., Cambridge, MA). Portakal suyunun pH ölçümleri için ise, süperkritik aletine monte edilen, yüksek basınca dayanıklı ve pH'ı zamana karşı kaydeden bir

Ş. PEKYARDIMCI, M. BALABAN/PORTAKAL SUYUNDAKİ PEKTİNESTERAZ AKTİFLİĞİ ÜZERİNE SÜPER.

kaydediciye bağlı bir elektrot kullanılmıştır (pH sensor model 513, InterOcean Systems Inc., San Diego, CA).

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Substrat olarak, 0,15 M NaCl (Sigma) ve 1 mM sodyum azid (NaN₃) ilave edilen metoksil pektinin (Kodak, Rochester, NY) x 1'lik çözeltisi kullanılmıştır.

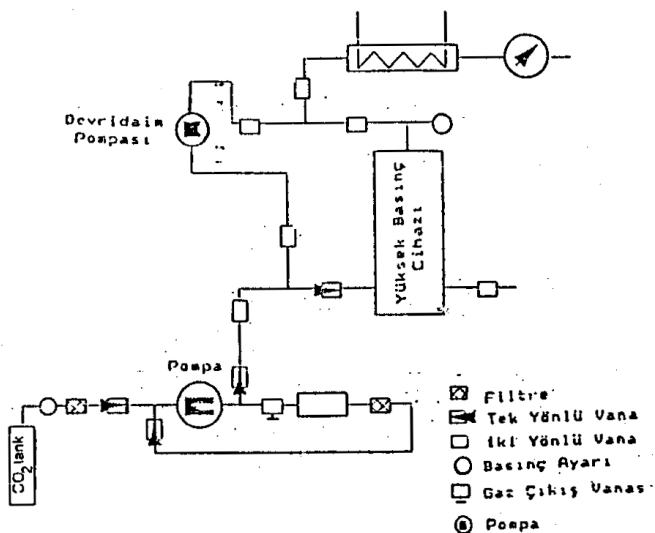
Valencia türü portakallardan elde edilen portakal suyu, sıvı azot ile dondurulup konservelenmiş ve -20.0 C'de saklanmıştır. Deney yapılacağı zaman, kapalı olan konserve kutularının üzerinden musluk suyu akıtarak çözünmeleri sağlanmış ve yaklaşık 5 saat sonra açılarak deneylere başlanmıştır.

Portakal suyundaki PE'ı incelemek için basınç (P), sıcaklık (T) ve zaman (t) değişken olarak seçilmiştir. Minimum P değeri olarak 8,3 MPa, maksimum P değeri olarak da aletin dayanabileceği en büyük basınca yakın olan 31,7 MPa alınmıştır. Sıcaklık değerleri olarak 40 C, 50 C ve 60 C alınmıştır. Maksimum T değeri olarak 60 C seçilmesinin nedeni, pektinesterazın izoenzimlerinden en az birinin termal olarak bu sıcaklıkta inaktive edildiğinin bildirilmesidir (12). Süre ise 50-145 dakika arasında seçilmiştir.

Atmosferik basınçta belirli sıcaklıklarda yapılan aktivite ölçümleri için 200 ml, süperkritik CO₂ aletinde yapılan ölçümler için ise 150 ml portakal suyu kullanılmıştır. 150 ml portakal suyu, çalışma öncesi deney sıcaklığına getirilmiş olan süperkritik aletine konularak deney basıncına getirilmiştir. Deney sırasında örnekler, periyodik olarak dipteki vanadan alınmıştır. Deney basıncında bulunan CO₂, atmosferik basınca çıkınca, gaz faza geçerek hemen meyve suyundan ayrılır. Çalışma sistemi şekil 1'de şematik olarak verilmiştir.

Ş. PEKYARDIMCI, M. BALABAN/PORTAKAL SUYUNDAKİ PEKTİNESTERAZ AKTİFLİĞİ ÜZERİNE SÜPER.

ŞEKİL 1- ÇALIŞMA SİSTEMİ:



Portakal suyu numunelerinin PE aktiviteleri pH 7'de otomatik titrasyon yöntemi ile tayin edilmiştir. Buna göre, 27 °C ve pH 7'de pektik asitteki serbest karboksil gruplarını nötralize etmek üzere ilave edilen 0,05 N NaOH miktarı zamana karşı kaydedilmiştir (13). Pektinesteraz aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$PE \text{ ünite/ml} = \frac{(ml \text{ NaOH}) (N \text{ NaOH})}{(t) (ml \text{ numune})} \times 1000$$

SONUÇ VE TARTIŞMA

Portakal suyuna süperkritik CO₂ uygulaması sırasında, yüksek

Ş. PEKYARDIMCI, M. BALABAN/PORTAKAL SUYUNDAKİ PEKTİNESTERAZ AKTİFLİĞİ ÜZERİNE SÜPER.

basıncıdaki CO sulu ortamdaki karbonik asit oluşturarak pH düşme-
lerine yol açtığı için enzim inaktivasyonunda rolü olduğu düşü-
nılmektedir. Basıç kalkınca CO meyva suyundan ayrılır ve pH baş-
langıç değeri olan 3,78 civarına döner(11). 31,7 MPa'lık bir basınç
uygulandığında portakal suyunun pH'ı 3,1'e kadar düşmektedir. Ancak
yüksek basınca dayanıklı pH elektrodu ile yapılan ölçümler 60 da-
kikadan sonra kararsızlık gösterdiğinden bundan sonraki pH değer-
leri alınmamıştır. Dwusu-Yaw ve arkadaşlarının(14) atmosferik ba-
sıncıta yaptıkları çalışmalara göre, verimli bir PE inaktivasyonu
için pH değerinin 2,4'e kadar düşürülmesi gerekmektedir. Buna göre
süperkritik CO ile geçici olarak pH'ın düşürülmesi inaktivasyon
için yeterli değildir. Yüksek basınçta azot ile yapılan çalışma-
larda da önemli bir inaktivasyon sağlanamamıştır. Suzuki ve Tani-
guchi(15) 101,3 MPa'lık bir hidrostatik basınç uygulayarak enzim
inaktivasyonunu başarmışlardır. Ancak bu işlem süperkritik (SK) CO
yönteminden farklıdır ve çok yüksek basınçlar gerektirir.

Bu çalışmada, PE enzimi inaktive etmek için basınç, sıcaklık,
CO ve zamanın ortak etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, bu enzimin SK
CO ile ve ısı yoldan inaktivasyon kinetikleri incelenmiş, k ve E_a
değerleri hem atmosferik basınçtaki ve hem de SK CO ile muamele
edilen numuneler için hesaplanmıştır. Tablo 1'de SK CO muamelesin-
den önce ve sonra portakal suyunun enzim aktivitesi Ünite/ml ola-
rak verilmiştir.

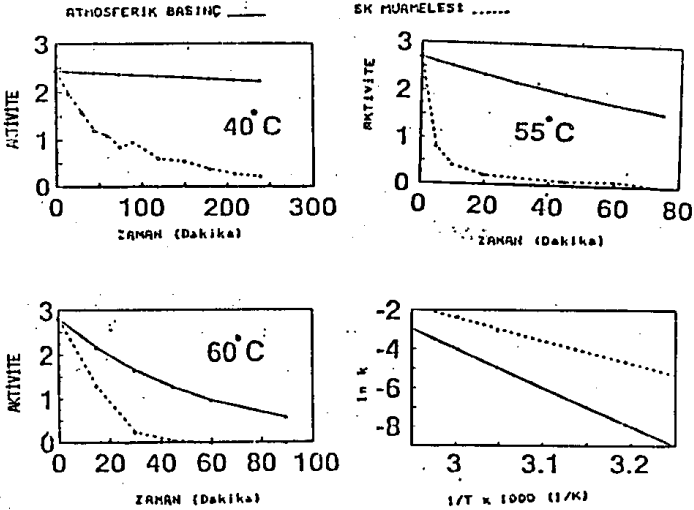
26,9 MPa'lık SK CO uygulamasına bakılacak olursa, 40°C da 50
dakikalık bir uygulama ile PE aktivitesi, başlangıç değeri olan
2,78'den 0,81'e kadar düşmektedir. Aynı koşullarda yapılan ısı
inaktivasyonda ise PE aktivitesi 2,67 olarak bulunmuştur. Yine

Ş. PEKYARDIMCI, M. BALABAN/PORTAKAL SUYUNDAKİ PEKTİNESTERAZ AKTİFLİĞİ ÜZERİNE SÜPER.

Tablo 1. PE aktivitesi üzerinde süperkritik (SK) CO₂ etkileri

Sıcaklık (C)	Zaman (Dakika)	SK öncesi PE Ünite/ml	Atm. PE Ünite/ml	P (MPa)	SK Sonrası PE Ünite/ml	% PE Azalması
50	97,50	3,30	2,53	0,3	0,10	96,2
55	50,00	3,20	2,09	13,1	0,16	92,5
55	145,00	3,20	0,93	13,1	0,27	70,6
50	97,50	2,66	2,04	20,0	0,09	95,8
60	97,50	1,66	0,30	20,0	0,09	68,7
40	50,00	2,78	2,67	26,9	0,81	69,5
40	145,00	2,78	2,46	26,9	0,98	60,3
55	50,00	3,82	2,50	26,9	0,24	90,4
55	145,00	3,82	1,12	26,9	0,00	100,0
50	97,50	3,13	2,39	31,7	0,28	88,4

26,9 MPa, 55 C'da ve 145 dakikalık süperkritik CO₂ uygulaması yapıldığında PE'nin tamamen inaktive olduğu görülmektedir. Uygulanan basınç ile birlikte, sıcaklık ve sürenin artması gibi etkenler devreye girince enzim inaktivasyonu artmaktadır. Aynı deneyler atmosferik basınçta yapıldığında inaktivasyon daha az olmaktadır (Tablo 1). 13,1 MPa ve 55 C'deki 145 dakikalık SK CO₂ uygulamasında aktivitenin aynı şartlardaki 50 dakikalık SK CO₂ uygulamasına göre daha yüksek bulunması çelişkili görülmektedir. Ancak bu sonuç, Zemel ve arkadaşlarının (10) bulgularını destekler niteliktedir. Bu çalışmaya göre, polifenol oksidaz enzimi, SK CO₂ ile inaktive edilirken ilk 60 dakikalık uygulamada, enzim inaktivasyonu artan miktarlarda gerçekleşmiş, daha sonra ise aktivasyonda bir miktar artma gözlenmiştir. Bu durumun muhtemel sebebi de, uzun süre uygulanan basıncın, meyva suyundaki hücreleri parçalayıp henüz çözeltiye geçmeyen enzimlerin de aktivite göstermesine yol açmasıdır. Ancak deney bulgularımıza göre, böyle geçici bir aktivasyon artışından sonra, 130. dakikadan sonra, aktivasyon kademeli olarak düşmüş ve 3. saat sonunda ortamda hiç aktif enzim kalmamıştır.



Şekil 2- 31,7 MPa'da ve farklı sıcaklıklarda PE aktivitesi (a) 40 C (b) 55 C, (c) 60 C (d) Arrhenius Grafiği

Atmosferik basınçta yapılan deney sonuçlarının Arrhenius denklemine göre, sıklık faktörü (A) $1,7 \times 10^2$ /dakika ve aktivasyon enerjisi (E_a) ısı inaktivasyon için 166,6 kJ/mol olarak bulunmuştur. Alınan sonuçlardan PE enziminin ısı inaktivasyonunun "1.derece" kinetiği izlediği sonucuna varılmıştır. Şekil 2, 31,7 MPa; 40 C (a), 55 C (b), 60 C (c)'da SK CD ile muamele edilen portakal suyunun ve atmosferik basınçta yapılan kontrol numunelerinin, PE aktivitelerini göstermektedir. Bu grafiklere göre 40 C gibi düşük sıcaklık-

Ş. PEKYARDIMCI, M. BALABAN/PORTAKAL SUYUNDAKİ PEKTİNESTERAZ AKTİFLİĞİ ÜZERİNE SÜPER.

larda, atmosferik basınçta yapılan ısı PE inaktivasyonu oldukça düşüktür. Şekil 2'den görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça ısı inaktivasyon da artmaktadır. Halbuki aynı sıcaklıklardaki SK CO₂ uygulamaları sonuçta, PE enziminin önemli miktarlarda inaktivasyona uğradığı açıkça görülmektedir.

Tablo 2 - Süperkritik uygulaması ve atmosferik basınçta PE inaktivasyonu kinetik parametreleri

Atmosferik Basınç Sıcaklık	D(dakika)	Z(°C)	k(dakika)	Ea(kJ/mol)
40° C	2673,8		3,76x10 ⁻⁴	
55° C	141,8	8,8	7,05x10 ⁻³	166,6
60° C	56,6		1,77x10 ⁻²	
13.1 MPa (süperkritik CO ₂)				
60° C	12,1		8,26x10 ⁻²	
31.7 MPa (süperkritik CO ₂)				
40° C	104,6		9,56x10 ⁻³	
55° C	20,9	5,2	4,79x10 ⁻²	97,4
60° C	10,6		9,45x10 ⁻²	

Tablo 2'de SK CO₂ koşullarındaki ve atmosferik basınçtaki portakal suyu numunelerinin D, Z, k ve Ea değerleri 40 C, 55 C ve 60 C için verilmiştir. Versteeg'in(12) belirttiğine göre PE enziminin 3 izoenzimi bulunmaktadır. Wicker ve Temelli(16) tarafından, inaktivasyon süresini x90'a kadar düşürmek için gereken sıcaklık artışını gösteren Z değerleri, PE-I ve PE-III için 6,5 C, PE-II için ise 10,5 C olarak verilmiştir. Çalışmamızda Z = 8,8 C olarak hesaplanan bu değer pektinesterazın sıcaklığa dayanıklı ve dayanıksız formlarının Z değerlerinin arasındadır. Portakal suyunda doğal olarak bulunan izoenzimlerin tek tek SK CO₂ muamelesi yapılamadığı için 8,8 C ortalama değer olarak alınmıştır.

Tablo 2'de verilen k değerlerini inceleyecek olursak, atmosferik basınçtan 31,7 MPa'a yükseldikçe bu değerler artmaktadır. Atmosferik basınçta $k=1,77 \times 10^{-2}$ /dakika, 31,7 MPa'da ise $k=9,45 \times 10^{-2}$ dakikadır.

Şekil 2 (d)'de gösterilen Arrhenius grafiği incelendiğinde, atmosferik basınçtaki $E_a=166,6$ kJ/mol, 31,7 MPa'daki $E_a=97,4$ kJ/mol olduğu görülür. Bu grafiğe göre, belli bir sıcaklıkta, basınçtaki artışla paralel olarak aktivasyon enerjilerinin düştüğü, bunun sonucu olarak da PE enziminin, inaktivasyon hızının arttığı görülmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, portakal suyunun endüstriyel amaçlı hazırlanması sırasında önemli bir enzim olan pektinesterazın, süperkritik ortamda CO₂ ile inaktive edilebileceği görülmektedir. İnaktivasyon hızı, basınç, sıcaklık ve zamanın ortak etkisi ile yakından ilgilidir. Süperkritik CO₂ uygulaması sırasındaki yüksek basınç, sıcaklık ve süre artışı inaktivasyon hızını artırır. Isıl inaktivasyonun hemen hiç olmadığı düşük sıcaklıklarda bile SK CO₂ yöntemi kullanılarak PE enzimi inaktive edilebilmektedir. Basınç, atmosferik basınçtan 31,7 MPa'a yükseldiği zaman reaksiyonun aktivasyon enerjisinde ve D değerinde önemli ölçüde düşmeler görülmüştür. Bu sonuçlara göre, enzim inaktivasyonunda SK CO₂ kullanarak enzimlerin inaktive edilmesini oldukça avantajlı görülmektedir. Ancak bu uygulama çok yenidir ve bu konu ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle farklı basınç ve sıcaklıklarda ve değişik enzimler kullanılarak daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- R.A.Novak and R.J.Robey "Supercritical fluid extraction of flavoring material" the AIChE annual meeting Washington D.C.1988
- 2- P.Hubert and D.G.Vitzthum "Fluid extraction of hops,spices and tobacco with supercritical gases" 93.Deerfield Beach, FL.Verlag Chemie 1980.
- 3- S.S.H.Rizvi, A.L.Benado and J.A.Zollweg "Supercritical fluid extraction: Fundamental principles and food applikation" Food Technol. 40(7):57. 1986.
- 4- M.Taniguchi and M.Kamihira "Effect of treatment with supercritical CO2 on enzymatic activity"Agric.Biol.Chem.2:593 1987.
- 5- G.J.Haas, H.E.Presscott and E.Dudley "Inactivation of micro organisms by CO2 under pressure" J.Food Safety 9,253-265 1989.
- 6- Z.I.Kertesz "Pectic Enzymes" 3rd Ed. Acedemic Press 18,158-162 N.Y.1979.
- 7- J.D.Pointing "The control of enzymatic browning in fruits" Ch.9 H.W.Shultz 105. AVI Publishing Co. Westport, CT. 1960.
- 8- J.D.Pointing and M.A.Joslyn "Browning in apple tissue extracts" Arch. Biochem. 19:47. 1948.
- 9- G.P.Zeael "Low pH inactivation in apple juice"J.Food Sci. 55 (2) 562-563 1990.
- 10- G.P.Zeael "Low pH inactivation of polyphenol-oxidase "M.Sc.Thesis. Univ. Florida, Gainesville 1989.
- 11- A.G.Arreola. "Effects of supercritical CO2 on some quality attributes of orange juice" M.Sc.Thesis Univ.Florida Gainesville 1990.

12- C. Versteeg and F. M. Rombutus "Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pectinesterases from orange" J. Food Sci. 45: 969 1980.

13- A. H. Rouse ve C. D. Atkins "Pectinesterase and pectin in commercial citrus juices as determined by methods used at the citrus experiment station" Univ. Florida Agric. Exp. Stn. Bulletin 570 1955.

14- J. Owusu-Yaw M. R. Marshall and J. A. Koburger "Low pH inactivation of pectinesterase in single strength orange juice" J. Food Sci. 53: 504 1980.

15- A. Suzuki ve M. Taniguchi Pressure effects on bacteria. ch. 4. In "High Pressure Effects on Cellular Processes" A. M. Zimmerman (Ed). Academic Press, Inc. New York.

16- L. Wicker ve F. Temelli "Heat inactivation of pectinesterase in orange juice pulp" J. Food Sci. 53: 162 1988.