

KORNIŞON (*Cucumis sativus*) PEKTİN METİLESTERAZ ENZİMİNİN BAZI NİTELİKLERİ

SOME CHARACTERISTICS OF PECTIN METHYLESTERASE FROM CUCUMBERS (*Cucumis sativus*)

Ahmet YEMENCİOĞLU, Bekir CEMEROĞLU

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

ÖZET: Bu çalışmada hıyarlarda bulunan pektin metilesteraz enziminin (PME) işleme açısından önemli olabilecek bazı nitelikleri belirlenmiştir. Buna göre hıyar PME enziminin 60°C ve daha düşük sıcaklıklarda ısıya oldukça dirençli olduğu, hatta 55°C'de aktive olduğu, buna karşın 80° ve 90°C'lerde hızla inaktive olduğu belirlenmiştir. Ayrıca PME enziminin optimum sıcaklığı 60°C, optimum pH'sı ise 9.0 olarak belirlenmiştir.

ABSTRACT: In this study some characteristics of pectin methylesterase (PME) from cucumbers were determined. PME from cucumbers was very heat stable below 60°C and showed activation at 55°C. However, it showed rapid inactivation at 80° and 90°C. The optimum temperature and pH of PME activity were 60°C and 9.0, respectively.

GİRİŞ

Bir hıyar (*Cucumis sativus*) türü olan kornişonların salamura içinde saklanması sırasında görülen doku yumuşaması, bunların kalitesi açısından en önemli olumsuzlukların başında gelmektedir. Yumuşamanın başlıca nedeni olarak genellikle, dokuda bulunan pektolitik enzimlerin depolama süresince faaliyette bulunması gösterilmektedir (MCFEETERS ve ark. 1985, HUDSON ve BUESCHER 1986). Kornişonların çiçek uçları, diğer kısımlarına göre daha yoğun pektolitik enzim aktivitesi içerdiklerinden yumuşamanın özellikle bu bölgelerde öncelikle ve daha belirgin olarak ortaya çıktığı ileri sürülmektedir.

Pektolitik enzimlerden, yani pektinazlardan; pektin metilesterazlar (PME), belirtilen bu yumuşama olayının başlıca, fakat dolaylı etmenidirler (BARRETT ve GONZALEZ 1994). Nitekim bu enzimler, ilk aşamada üründe bulunan, esterleşme derecesini düşürmektedirler. Bu şekilde oluşmuş esterleşme derecesi düşük pektin ikinci aşamada, yine dokuda bulunan poligalakturonaz (PG) enzimleriyle depolimerize edilmektedir. Başka bir ifadeyle PME PEKTİNİ, PG enziminin substratı haline getirmek suretiyle yumuşama olayının esas nedenini oluşturmaktadır (GIOVANE ve ark. 1990, GLOVER ve BRADY 1994). Dokunun sert yapısını sağlayan pektinin bu şekilde parçalanmasıyla doku, bütünlüğünü kaybetmekte ve bilinen yumuşama olayı ortaya çıkmaktadır.

Bu açıklamalara göre, yumuşamanın önlenmesinin en kesin yolu, pektolitik enzimlerin inaktive edilmesidir. Nitekim bu nedenle, hıyarların turşuya işlenmesinde ilk işlem olarak haşlama uygulanması önerilmektedir (MCFEETERS ve ark. 1985). Diğer yandan etkin bir haşlama uygulanarak enzimlerin inaktivasyonu yerine, tam aksine ılımlı ve kontrollü bir haşlama uygulamak suretiyle enzimlerin daha da aktive edilmesiyle sertliğin korunup artırılabilceği ileri sürülmekte ve buna ilişkin öneriler yapılmaktadır. Buna göre haşlamanın, PME enziminin aktive olabileceği ılımlı bir sıcaklık derecesinde ve uzun süreli olarak yürütülmesi, bunu izleyerek ürünün bir CaCl₂ çözeltisine daldırılması önerilmektedir. Bu işlemle, önce pektin belli bir düzeyde demetileze edilerek kalsiyum ile kolaylıkla bağ yapabilecek nitelik kazanmakta, ve ortama verilen kalsiyum ile bir ağ yapı oluşturarak dokunun sertleşmesi sağlanmaktadır (ALONSO ve ark. 1995, STANLEY ve ark. 1995). Bu şekilde kalsiyumla bağlanmış pektin ayrıca enzimlerin hücumuna da direnç kazanmaktadır.

Gerek enzimlerin inaktivasyonunun sağlandığı geleneksel haşlamada ve gerekse bunların aktivitelerinin artırabileceği düşük sıcaklıklardaki haşlama işlemlerinde amaca ulaşmanın ön koşulu, materyalde bulunan pektolitik enzimlerin termal niteliklerinin önceden saptanmış olmasıdır. İşte bu nedenle; Türkiye'de yaygın biçimde turşuya işlenerek önemli miktarda ihraç edilen kornişonların, çiçek ucu bölgesinde bulunan PME enzimlerinin termal niteliklerinin belirlenmesi ve böylece haşlama işlemine temel teşkil edecek verilerin elde edilmesi yararlı bulunmuştur.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Araştırmada materyal olarak, Manisa yöresinden temin edilmiş bulunan ve bu yöredeki fabrikalarda yoğun olarak işlenmekte olan kornişonlar kullanılmıştır. Laboratuvara gelen kornişonlar hemen bol su ile yıkanmış ve kurulandıktan sonra çiçek ucu bölgeleri kesilerek toplanmıştır. Bu parçacıklar, küçük polietilen torbalara doldurulmuş ve deneylerde kullanılana kadar -35°C 'deki bir dondurucuda depolanmıştır. PME aktivitesi tayininde gerekli olan turunçgil pektini (Metoksil oranı %3) Sigma Chem Co (St Louis MO), firmasından sağlanmıştır.

PME aktivitesi

PME aktivitesi titrimetrik yöntemle saptanmıştır (BELL ve ark. 1950). Yöntem ana hatlarıyla aşağıda verilmiştir.

Dondurulmuş halde saklanmış hıyarlar, önce damıtık su içerisinde kendi haline bırakılarak çözümleri beklenmiştir. 5-10 dakika süren çözülme sonunda, 1:1 oranında damıtık su eklenerek Waring blenderde homojenat hazırlanmıştır. Bu homojenattan, titrasyonda kullanılmak üzere bir "reaksiyon karışımı" hazırlanmıştır.

Reaksiyon karışımı; tartılarak alınmış 1-2 g arasında değişen belli miktar homojenizat üzerine, 0.1N NaCl çözeltisinde hazırlanmış olan %0.5'lik turunçgil pektini çözeltisinden 20 mL eklemek suretiyle hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı, 50 mL'lik çift duvarlı, özel bir beherde hazırlanmış ve beherin çift duvarı arasında, 30°C 'de su sirkülasyonu sağlanarak reaksiyon karışımının sıcaklığı işlem boyunca tam 30°C 'de sabit tutulmuştur. Bu nedenle karışıma eklenen pektin çözeltisi de önceden 30°C 'ye ısıtılarak karışımın sıcaklığı daha başlangıçtan itibaren işlem boyunca 30°C 'de sabit tutulmuş ve ayrıca magnetik karıştırıcı ile devamlı karıştırılmıştır.

Reaksiyon karışımı hazırlandığı anda, pH derecesi derhal 0.1 N NaOH çözeltisiyle 7.5'e ayarlanmıştır. İşte bu an deneyin başlangıcı, yani sıfır zamanıdır. Bu andan itibaren PME etkisiyle oluşan serbest karboksil grupları, 5 dakika boyunca 0.01 N NaOH çözeltisiyle titre edilerek, reaksiyon karışımının pH derecesi daima tam 7.5'de sabit tutulmuştur. Bu süre içinde harcanan 0.01 N NaOH miktarı kaydedilmiş ve bu aktivitenin değerlendirilmesinde temel değer olarak alınmıştır.

Isıl İnaktivasyon deneyleri

PME enziminin ısıll yolla inaktivasyonuna ait deneyler $50-90^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında, YEMENCİOĞLU ve ark. (1997) tarafından izlenen şekilde yürütülmüştür. Bu amaçla, test tüplerinde (iç çapı 14 mm, duvar kalınlığı 1 mm) 4 mL damıtık su konmuş ve tüpler su banyosuna yerleştirilerek, içeriklerinin bu dereceye kadar ısınması beklenmiştir. Deneylerde $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ duyarlılıkla çalışan bir termostatik su banyosundan (Messtechnic-Ultratermostat) yararlanılmıştır. Tüpler istenen dereceye ulaşınca herbirinin içerisine, daha önceden kalibre edilmiş bir pipetle eşit miktarlarda (1 g veya 1.5 g'a eşdeğer hacimde) homojenat eklenip bir Vorteks ile karıştırılarak derhal yeniden su banyosuna alınmışlardır.

Isıtmaya başlamanın sıfır zamanı bu an olup, tüpler istenen süre termostatik su banyosunda tutulmuşlardır. Belli süre sonunda su banyosundan tüpler, derhal buzlu su banyosuna yerleştirilerek soğutulmak suretiyle ısıtmaya son verilmiştir. Tüplerden biri homojenat eklendikten sonra doğrudan doğruya buzlu suya alınarak ısıya arz edilmemiş ve bu "başlangıç enzim aktivitesini" saptamada kullanılmıştır.

Isıya arzedilmiş tüplerle, başlangıç aktiviteyi yansıtmak üzere hazırlanmış tüpte yukarıda açıklandığı gibi PME aktivitesi saptanmıştır. Bu amaçla tüp içeriğinin tümü (yaklaşık 5.0 veya 5.5 mL) reaksiyon çözeltisi hazırlamada kullanılmıştır.

Aktivite tayininde titrasyonda harcanan 0.01 N NaOH çözeltisi miktarı herhangi bir birime çevrilmeden doğrudan aktiviteyi yansıtırıcı değer olarak kullanılmıştır. Başlangıç aktivite 100 alınarak diğer değerler buna göre hesaplanarak bulunmuştur.

Optimum sıcaklığın saptanması

PME enziminin aktivitesi 20-70°C sıcaklık aralığında ölçülerek optimum sıcaklığı belirlenmiştir. 45°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda pektinin sıcaklık etkisiyle spontan olarak demetilize olduğu saptanmıştır. Bu nedenle bu sıcaklığın üzerindeki deneylerde, enzim içermeyen bir şahit de deneye sokulmuş ve bunların titrasyondaki alkali çözeltisi harcamaları, enzimli deneydeki harcamalardan çıkarılmıştır. Böylece yalnız enzim aktivitesinin neden olduğu demetilasyon dikkate alınmış bulunmaktadır.

Optimum pH derecesinin saptanması

PME enziminin pH optimumu, reaksiyon karışımının pH derecesinin, 0.01 N asetik asit veya gerektiğinde 0.01 N NaOH yardımıyla 5.0-9.5 arasında ayarlanmasıyla oluşan ortamlarda aktivite saptanmasıyla belirlenmiştir. pH 8.5'in üzerinde, pektinin spontan olarak belirli düzeyde bir demetilasyona uğradığı görülmüştür. Bundan kaynaklanacak hata, optimum sıcaklığın saptanmasında izlenen aynı yolla giderilmiştir.

Kinetik parametrelerin hesaplanması

PME enziminin ısı yolla inaktivasyonunda kinetik parametrelerin hesaplanmasında aşağıdaki eşitliklerden yararlanılmıştır (RAMASWAMY ve ark 1989).

Birinci dereceden reaksiyon için hız konstantı:

$$\ln (C/C_0) = -k.t$$

Aktivasyon enerjisi için:

$$k = k_0 \cdot e^{-E_a/RT}$$

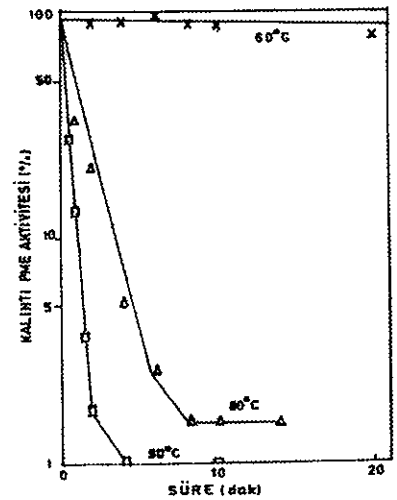
z değerinin hesaplanmasında ise; önce inaktivasyon eğrilerinin eğiminden D değerleri bulunmuş ve sıcaklık derecelerine karşı; D değerlerinin yarı logaritmik grafiğe işlenmesiyle hazırlanan termal inaktivasyon süresi (TIT) eğrisinin eğiminden faydalanılmıştır:

$$z = 1 / \text{Eğim}$$

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

PME enziminin ısı stabilitesi

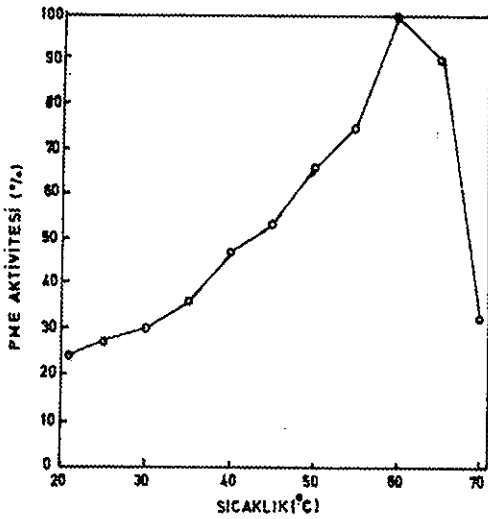
Kornişon PME enziminin 60°, 80° ve 90°C de saptanmış bulunan ısı inaktivasyon kurveleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Alınan sonuçlara göre, PME'in birinci dereceden bir reaksiyon kinetiğine uygun olarak inaktive olduğu ve yüksek sıcaklıklarda inaktivasyonun büyük bir hızda gerçekleştiği görülmüştür. Nitekim 80°C'de 3.6 dakikada aktivitesini %90 oranında kaybeden PME, 90°C'de 1.1 dakikada aynı düzeyde inaktive olmaktadır. Buna karşın 60°C ve altındaki sıcaklıklarda enzimin ısı direncinin oldukça yüksek olduğu ($D_{60} = 556$ dak.) ve hatta 55°C'de bir inaktivasyon değil, kısmen aktivasyon görüldüğü Çizelge 1'deki verilerden anlaşılmaktadır. Enzimlerin inaktivasyonlarının gerçekleştiği sıcaklık derecelerinin al-



Şekil 1. Kornişon PME enziminin ısı inaktivasyonu

tındaki ılımlı sıcaklıklarda aktive olduğu birçok araştırıcı tarafından da rapor edilmektedir (LEE ve ark. 1991, CHAN ve ark. 1996, YEMENCİOĞLU ve ark. 1997). Kornişon PME enziminin 55°C'de aktive olduğunun en azından aktivitesini koruduğunun pratikteki anlamı; bu sıcaklıkta uzun süreli bir haşlamayla sertleştirme uygulanabileceğidir. Buna karşın enzimin 80°-90°C'de hızla inaktive olması onun, yüksek sıcaklıkta uygulanacak haşlamayla tümünden ve kolaylıkla inaktive edilebileceğini göstermektedir. Kornişonların uygulamada geçerli olabilecek haşlanma sıcaklık ve sürelerinin kesin olarak belirlenmesi için, özellikle bütün haldeki materyallerin çiçek ucu bölgesinde ısı iletiminin ölçülmesi gerekmektedir.

Sıcaklık derecesi değişimin inaktivasyon hızına etkisini belirlemek amacıyla "Arrhenius" ve "Termal İnaktivasyon Süresi" (TIT) parametreleri de hesaplanmıştır. Buna göre PME'in 60-90°C sıcaklık aralığında inaktivasyonunda aktivasyon enerjisi 50.9 kcal.mol⁻¹ (r = 0.991) ve z= 10.7°C (r = 0.988) olarak belirlenmiştir. Bu bulgular kornişon PME enziminin ısı inaktivasyonunun, sıcaklık derecesi değişiminden çok etkilendiğinin kanıtlarıdır.



Şekil 2. Kornişon PME enziminin optimum sıcaklığı.

Optimum pH değeri

Kornişon PME enziminin optimum pH derecesini belirlemeye yönelik deney sonuçlarının verilmiş bulunduğu Şekil 3'de görüldüğü gibi, bu enzimin optimum pH değeri 9.0'dur. Bu değer literatür verileriyle uyum içindedir. Nitekim optimum pH değerleri, elma PME'ı için 10 (KING, 1990), domates PME'ı için 9-10 arası (GIOVANE ve ark. 1994) ve şeftali PME'ı için 8 (JAVERI ve WICKER 1991) olarak saptanmıştır. pH derecesinin düşmesiyle PME aktivitesinin hızla azalmakta olduğu da Şekil 3'de görülmektedir. Bunun pratikteki anlamı ise, kornişonların hızla fermente olması veya yapay yolla asitlendirilmesi sonunda PME'in aktivitesinin sona erebileceğidir. Buna göre yumuşama olayına, fermentasyonun yavaş bir şekilde gelişmesinde daha sıklıkla rastlanabileceği anlaşılmaktadır.

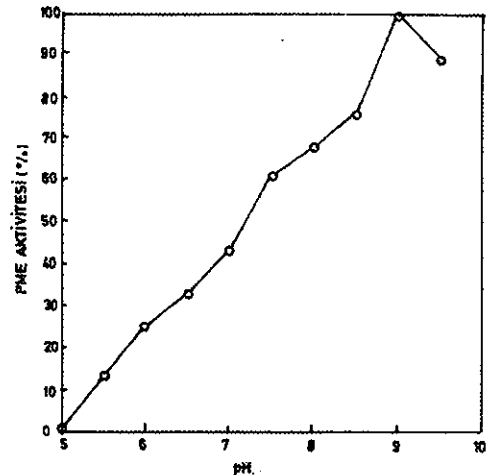
Çizelge 1. Kornişon PME Enzim Aktivitesi Üzerine Düşük Sıcaklık Derecelerinin Etkisi

Süre (dakika)	Kahntı aktivite (%)		
	50°C	55°C	60°C
0	100	100	100
2	86	93	88
4	91	104	90
6	93	104	93
8	87	114	88
10	87	114	85
20	85	103	76
30	90	109	78
40	88	108	82
50	92	112	76

Optimum sıcaklık derecesi

Kornişon PME enziminin optimum çalışma sıcaklığına ait deney sonuçları Şekil 2'de gösterilmiştir. Buna göre optimum sıcaklığın 60°C olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu değer KING'in (1990) elma PME enzimi için belirlediği optimum sıcaklıkla aynıdır. 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzim aktivitesinin hızla azaldığı yani, inaktivasyonun başlamış olduğu Şekil 2'deki verilerden anlaşılmaktadır.

Diğer taraftan, 20-60°C sıcaklık aralığında aktivitenin sıcaklık derecesine bağımlılığını belirlemek amacıyla hesaplanmış aktivasyon enerjisi $E_a = 6.9$ kcal.mol⁻¹ düzeyindedir. Bu ise, sıcaklık değişiminin aktivite üzerine etkisinin, inaktivasyon üzerine etkisinden çok az olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. Kornişon PME enziminin optimum pH'sı.

KAYNAKLAR

- ALONSO, J., RODRIGUEZ, T. ve CANET, W. 1995. Effect of calcium pretreatments on the texture of frozen cherries, role of pectinesterase in the changes in the pectic materials J. Agric. Food Chem. 43, 1011-1016.
- BARRETT, D.M. ve GONZALEZ, C. 1994. Activity of softening enzymes during cherry maturation. J. Food Sci. 59: 574-577.
- BELL, T.A., ETCHELLS, J.L. ve JONES, I.D. 1950. Pectin-esterase in the cucumber. Arch. Biochem. 31: 431-441.
- CHAN, H.T., MAINDONALD, J.M., LAIDLAW, W.G. ve SELTENRICH, M. 1996. ACC oxidase in papaya sections after heat treatment. J. Food Sci. 61: 1182-1185, 1190.
- GIOVANE, A., QUAGLIVOLO, L., CASTALDO, D., SERVILLO, L. BALESTRIERI, C. 1990. Pectin methylesterase from actinidia chinensis fruits. Phytochemistry 29: 2821-2823.
- GIOVANE, A., QUAGLIVOLO, L., SERVILLO, L., BALESTRIERI, C., LARATTA, B., LOIVDICE, R. ve CASTALDO, D. 1994. Purification and characterization of three isoenzymes of pectin methylesterase from tomato fruit. Journal of Food Biochemistry. 17: 339-349.
- GLOVER, H. ve BRADY, C. 1994. Purification of three pectin esterases from ripe peach fruit. Phytochemistry 37: 949-955.
- HUDSON, J.M., BUESCHER, R.W. 1986. Relationship between degree of pectin methylation and tissue firmness of cucumber pickles. J. Food sci. 51: 138-140, 149.
- JAVERI, H. ve WICKER, L. 1991. Partial purification and characterization of peach pectinesterase. Journal of Food Biochemistry. 15: 241-252.
- KING, K. 1990. Partial cahacterization of the in situ activity of pectinesterase in bramley apple. Int. J. Food Sci. Tech. 25: 188-197.
- LEE, P.M., LEE, K.H. ve KARIM, M.I.A. 1991. Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. J. Sci. Food Agric. 55: 251-260.
- McFEETERS, R.F., FLEMING, H.P. ve THOMPSON, R.L. 1985. Pectinesterase activity, pectin methylation, and texture changes during storage of blanched cucumber slices. J. Food Sci. 50: 201-205, 219.
- RAMASWAMY, H.S., VAN DE VOORT, F.R. ve GHAZALA, S. 1989. An analysis of TDT and arrhenius methods for handling process and kinetic data. J. Food Sci. 54: 1322-1326.
- STANLEY, D.W., BOURNE, M.C. STONE, A.P. ve WISMER, W.V. 1995. Low temperature blanching effects on chemistry, firmness and structure of canned green beans and carrots. J. Food Sci. 60: 327-333.
- YEMENCIOĞLU, A., ÖZKAN, M. ve CEMEROĞLU, B. 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation of its latent form J. Food Sci. 62: 508-510.