

Gıdalarda polifenol oksidaz enzimi inaktivasyonunun modellenmesi ve simülasyonu

Gonca Bilge^{ID}

Cite this article as:

Bilge, G. (2020). Gıdalarda polifenol oksidaz enzimi inaktivasyonunun modellenmesi ve simülasyonu. *Food and Health*, 6(4), 248-260.

<https://doi.org/10.3153/FH20025>

Konya Gıda ve Tarım Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 42080 Konya, Türkiye

ORCID IDs of the authors:

G.B. 0000-0002-2906-3369

Submitted: 07.02.2020

Revision requested: 25.03.2020

Last revision received: 07.05.2020

Accepted: 16.05.2020

Published online: 19.08.2020

Correspondence: Gonca BİLGE

E-mail: gonca.bilge@gidatarim.edu.tr



© 2020 The Author(s)

Available online at
<http://jfhscscientificwebjournals.com>

ÖZ

Bu çalışmanın amacı polifenol oksidaz (PPO) enziminin gerçek sıcaklık ve basınç senaryolarındaki inaktivasyon simülasyonlarının yapılması ile meyve ve sebzelerin daha taze kalması, esmerleşme reaksiyonlarının ve besin kayıplarının önlenmesinde daha gerçekçi modellerin ortaya konulmasıdır. Isıl işlem ve yüksek basınç uygulamaları dinamik yöntemler olup sabit sıcaklık ve basınç değerlerinde yapılan modeller yetersiz olmaktadır. Modellerin endüstride uygulandığı şekilde yani ısınma-soğuma süreleri ve sıcaklık değişimleri ile basınçlama-genleşme süreleri ve basınç değişimleri göz önüne alınarak yapılması gerekmektedir. Bu amaçla sabit sıcaklık ve basınç koşullarında ananas püresi ve elma suyu örneklerinde PPO enziminin inaktivasyonu üzerine yapılan çalışmaları modellenerek sabit olmayan sıcaklık ve basınç değerlerindeki inaktivasyon profilleri tahmin edilmiştir. En yüksek PPO inaktivasyonun % 98,8'lik oranla üç tekrarlı basınç döngüsünün uygulandığı senaryoda elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu simülasyon modellerinin farklı meyve ve sebzelerdeki farklı enzimlere de uyarlanması ile gıda endüstrisinde enzim inaktivasyonu için uygulanan yöntemlerden maksimum fayda sağlamak mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Isıl işlem, Yüksek basınç, Polifenol oksidaz, Enzim inaktivasyonu, Modelleme, Simülasyon

ABSTRACT

Modeling and simulation of the inactivation of polyphenol oxidase enzyme in foods

The aim of this study was to realize more realistic models for the inhibition of browning reactions and nutritional losses and for keeping the fruit vegetables fresh, by inactivating of polyphenol oxidase (PPO) enzyme in real temperature and pressure scenarios. High pressure and heat treatment applications are dynamic methods and modeling should be done by taking into consideration the heating-cooling times and temperature changes, pressurization-expansion times and pressure changes as applied in the industry, not at constant pressure and temperature values. For this purpose, the studies on inactivation of polyphenol oxidase (PPO) enzyme in pineapple puree and apple juice samples under constant pressure and temperature conditions were modeled and the inactivation profile in non-constant temperature and pressure values were predicted. It was observed that the highest PPO inactivation was achieved with a rate of 98.8% in the scenario where three repetitive pressure cycles were applied. By adapting these simulation models to different enzymes in different fruits and vegetables, it would be possible to benefit from the methods applied for enzyme inactivation in the food industry.

Keywords: Heat treatment, High pressure, Polyphenol oxidase, Enzyme inactivation, Modelling, Simulation

Giriş

Birçok meyve ve sebze gıda endüstrisinde meyve suyu veya şaraba işlenerek, yoğurtlara, tatlılara ve hazır gıdalara katılarak kullanılmaktadır. Ancak birçok kullanım alanı bulunan bu gıdalar taşıma, işleme ve depolama gibi aşamalarda besinsel kayıplara uğramakta, renk ve tekstürlerinde bozulmalar görülmektedir. Bu bozulmaların temel sebebi yapılarında bulunan polifenol oksidaz (PPO) (EC 1.14.18.1) ve peroksidaz (PO) (EC 1.11.1.7) enzimlerinin antosiyaninler, flavanoller ve fenolik asitleri degradasyona uğratmasıdır (Terefe ve ark., 2010).

PPO enzimi bakır içeren ve yüksek yapılı tüm bitkilerde bulunan bir enzimdir. Bu enzim monofenollerin hidrosilasyonunu katalize ederek o-difenollere; o-difenollerin oksidasyonunu katalizleyerek de o-kinonlara dönüşmesini sağlarlar. Reaksiyon sonucu açığa çıkan heterojen kahverengi-kırmızı pigmentlere melanin adı verilir (Golan-Goldhirsh ve ark., 1984). Oluşan bu yeni bileşenler ürünün renk kalitesini bozmaktadır. Ayrıca fenolik bileşenlerin oksidasyonunun tat ve aroma bileşenlerini etkilediği de bilinmektedir. Bundan dolayı oluşabilecek kalite kayıplarını önlemek için ısıl işlem, soğutma, asitlendirme, esmerleşmeyi önleyecek kimyasal ajanların ya da enzim inhibitörlerinin kullanımı ile enzim aktivitesinin azaltılması oldukça yaygındır. Isıl işlem uygulaması enzim ve mikroorganizmaların inaktivasyonunda oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Genel olarak meyve ve sebzelerde 60-85°C'de ısıl işlem ile PPO'nun katalizlediği esmerleşme reaksiyonları önlenmektedir (Sulaiman ve ark., 2015). Tipik olarak meyve sularına uygulanan 80°C, bozulmaya sebep olan mikroorganizmaları ve PPO gibi oksidatif enzimleri etkisizleştirebilmektedir. Turpta ise PPO aktivitesini % 90 oranında azaltmak için 90°C'de 2 dakikalık bir işlem gerekmektedir (Goyeneche ve ark., 2013). Ancak ısıl işlemler renk kalitesinin bozulmasına neden olmakta ve ilave renk maddesi kullanımını gerektirmektedir. Bundan dolayı gıdanın taze görünümünü bozmayacak yenilikçi teknolojilere olan eğilim artmıştır. Enzim inaktivasyonu için kullanılan önemli bir alternatif teknoloji ise yüksek basınç (YB) uygulamasıdır. Yüksek basınç kovalent bağları etkilemediği için pigment maddeleri ve duyuusal özellikleri etkilenmemekte aynı zamanda mikroorganizmaları ve enzimleri inhibe edebilmektedir (Hendrickx ve ark., 1998). Oda sıcaklığında 600 MPa'a kadar olan birkaç dakikalık YB uygulamasının meyve sularında vejetatif bakteri ve mayaları öldürebildiği rapor edilmiştir. Ultrasonikasyon bir diğer alternatif enzim inaktivasyon yöntemidir (Islam ve ark., 2014). Yöntemde oluşan hava kabarcıklarının etkisiyle sıcak bölgelerin oluşması, mikroakış ve şok dalgalarının yarattığı kesme kuvveti ile serbest radikallerin ortaya çıkması enzim inaktivasyonunu sağlamaktadır

(Kadkhodae ark., 2008). Ayrıca ultrasonikasyonun ısıl işlemle kombine edilmesi (termosonikasyon) ile birlikte inaktivasyon hızının arttığı da gözlenmiştir (Cheng ve ark., 2013). Vurgulu elektrik alan (VEA) uygulaması da son zamanlarda enzim inaktivasyonunda kullanılan bir diğer yöntem olmuştur (Giner ve ark., 2002). Ayrıca ultrasonikasyondaki gibi VEA'nın ısıl işlemle kombinasyonu sonucu enzim inaktivasyonunda daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Amiali ve ark., 2007). Literatürdeki çalışmalar enzim inaktivasyonu için kullanılan tüm yöntemlerde sıcaklığın önemli bir parametre olduğunu ve inaktivasyon hızını/oranını arttırdığını göstermektedir. Sıcaklığın diğer yöntemlerle kombine olarak kullanılması daha düşük sıcaklıklarda işlem yapılabilmesine olanak sağlayarak kalite kayıplarını minimuma indirmektedir.

Literatürdeki çalışmalar PPO enziminin sabit sıcaklık ve basınç değerlerindeki inaktivasyon oranları üzerine kurgulanmış olup gıda sanayiinde uygulanan pastörizasyon gibi değişken koşullarda elde edilecek sonuçlara ilişkin fikir vermemektedir. Bu çalışmanın amacı (i) yüksek basınç ile ilgili yayımlanmış bilimsel makalelerdeki verileri kullanarak ananas püresi ve elma suyu örneklerindeki PPO inaktivasyonunun (sabit sıcaklık ve basınçta) uygun bir modelle tanımlanması; (ii) bu modelden elde edilen parametrelerle sabit olmayan sıcaklık ve basınç koşullarındaki PPO inaktivasyonunun simüle edilmesidir. Yapılan bu çalışma ile gıda sanayinde uygulanan gerçek sıcaklık, basınç senaryolarına göre PPO enziminin inaktivasyonu belirlenmiştir. Bu sayede PPO inaktivasyonunun daha etkin bir şekilde yapılması ile flavor, aroma ve renk maddelerinin bozulmadan korunabilmesi sağlanabilecektir.

Materyal ve Metot

Model

Enzim inaktivasyonu genellikle doğrusal model (Denklem 1) kullanılarak tanımlanır (Crelier ve ark., 2001):

$$\log_{10} \left(\frac{A}{A_0} \right) = -k \cdot t \quad (1)$$

Burada A_0 enzimin başlangıçtaki aktivitesi, A enzimin herhangi bir t zamanındaki aktivitesi, k (s^{-1}) enzimin inaktivasyon hız sabitidir (zaman-1). Denklem 1 herhangi bir veriye uygulandığında bir doğru elde edilir. Ancak, enzim inaktivasyonunu tanımlamak için üstel modeli (Denklem 2) kullanmak daha uygun olabilir:

$$\log_{10} \left(\frac{A}{A_0} \right) = -b \cdot t^n \quad (2)$$

Burada b enzimin inaktivasyon hız sabiti (zaman-n), n ise şekil değişkenidir. Bu parametreye şekil değişkeni

denilmesinin sebebi enzimin inaktivasyon eğrisinin bu parametreye bağlı olmasıdır. Şöyle ki, eğer $n > 1$ ise enzim inaktivasyonu dış bükey bir eğri olarak, $n < 1$ ise eğri iç bükey bir eğri olarak ve $n = 1$ ise doğrusal olarak gözlemlenir (Şekil 1).

Bu denklem (Denklem 2) çoğunlukla mikroorganizmaların inaktivasyonunu tanımlamak için kullanılmış (Bermúdez-Aguirre ve ark., 2012; Periago ve ark., 2004) ancak enzim inaktivasyonu için hiç uygulanmamıştır.

Veri Setleri

Bu çalışmada yer alan veriler daha önce yayımlanmış bilimsel makalelerden (Buckow ve ark., 2009; Chakraborty ve ark., 2015) alınmış olup, söz konusu makalelerde yer alan şekillerdeki veriler “Graph Grabber” programı ile sayısal hale getirilerek kullanılmıştır. Verilerin modellenmesi (doğrusal ve doğrusal olmayan regresyon) SigmaPlot programı kullanılarak gerçekleştirilmiş, simülasyon çalışması için diferansiyel denklemler MATLAB kullanılarak numerik olarak çözülmüştür. Çalışmada yer alan bütün şekiller (modelleme + simülasyon) SigmaPlot programı kullanılarak çizilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

PPO'nun Sıcaklık Kullanılarak İnaktivasyonu

Chakraborty ve ark. (2015) ananas püresindeki PPO'nun hem sıcaklık (30, 40, 50, 60 ve 70°C) hem de yüksek basınçla (200, 300, 400, 500, 600 ve 700 MPa, 30 ve 70°C'lerde) inaktivasyonunu çalışmışlardır. Söz konusu çalışmada sadece sıcaklıkla (30, 40, 50, 60 ve 70°C) gerçekleştirilen PPO inaktivasyon verileri doğrusal bir eğilim göstermektedir ve Chakraborty ve ark. (2015) da bu verileri doğrusal modelle tanımlamışlardır. PPO'nun farklı sıcaklıklardaki inaktivasyonunun doğrusal modelle tanımlanması Şekil 2' de gösterilmektedir. Doğrusal model veriye uygun gibi görünse de üstel model (Denklem 2) aynı veriye uygulandığında (Şekil 3a) aslında doğrusal modelden çok daha iyi bir model olduğu ortaya çıkmaktadır. Tablo 1'deki ayarlı R^2 ve ortalama karesel hataların karekökü (RMSE) değerleri karşılaştırıldığında, üstel modelin (Denklem 2) doğrusal modelden (Denklem 1) daha iyi sonuç verdiği görülebilir çünkü üstel model bütün sıcaklık değerleri için daha yüksek ayarlı R^2 ve daha düşük RMSE değerlerine sahiptir. R^2 , ayarlı R^2 ve RMSE değerlerinin hesaplamaları Denklem 3-5'te verilmiştir. Dahası Şekil 3b'de her bir sıcaklık için elde edilen üstel modelin şekil parametresinin (n) 1'den küçük olduğu görülmekte ve bu da verilerin doğrusal değil hafifte olsa iç bükey bir eğriyle tanımlanması anlamını taşımaktadır. Şekil parametresi (n) genellikle sıcaklığa bağlı olarak değişmez ya da sıcaklığın bir fonksiyonu değildir (Chen ve ark., 2013; van Boekel, 2002). Dolayısıyla, n 'yi sabitlemek yaygın bir uygulamadır (Buzrul, 2009). Burada şekil parametresi (n) beş

sıcaklığın ortalama değeri olan 0.91'e sabitlenmiş ve aynı veriye Denklem 2 n değeri 0.91 olarak tekrar uygulanmıştır (Şekil 3b). Şekil parametresinin sabitlenmesi hem modelin parametrelerinin ikiden bire indirilmesini yani modelin basitleştirilmesini hem de doğrusal regresyon kullanılmasını sağlamaktadır (Mafart ve ark., 2002). Şöyle ki, üstel model (Denklem 2) b parametresine göre doğrusal olarak (b 'ye göre kısmi türev alınır kısmi türevde b bulunmaz) n parametresine göre doğrusal değildir (n 'ye göre kısmi türev alınır kısmi türevde n bulunur). Dolayısıyla n değeri sabit bir sayı olursa elde edilen denklem b parametresine göre doğrusal olacağından doğrusal regresyon kullanmak mümkündür.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum(y_{veri} - y_{model})^2}{\sum(y_{veri} - y_{veri,ortalama})^2} \quad (3)$$

$$R^2_{ayarlı} = 1 - (1 - R^2) \cdot \frac{(n-1)}{(n-p)} \quad (4)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(y_{veri} - y_{model})^2}{n-p}} \quad (5)$$

n : veri sayısı

p : modeldeki parametre sayısı

Şekil 4a' da Denklem 2' nin n değerinin sabitlenmiş ve sabitlenmemiş haliyle veriye uygulanması gösterilmektedir. Her iki modelde neredeyse veriye aynı uyumu göstermiştir. Tablo 2' de Denklem 2'nin bu iki halinin karşılaştırmaları yapılmıştır. Görüldüğü gibi n değerinin sabitlenmesi model uyumunda bariz bir kayba neden olmadığı gibi 40°C'de daha iyi sonuç vermiştir. Şekil 4b'de sabit n değeriyle (0.91) uygulanan modelden elde edilen inaktivasyon hızlarının (b) sıcaklığa bağlı tanımlanması yapılmıştır. Burada veriye özgü (polinom, üstel vb.) herhangi bir model kullanılabilir.

Denklem 2'den t 'yi çekersek:

$$t = - \left[\frac{\log_{10}\left(\frac{A}{A_0}\right)}{b} \right]^{1/n} \quad (6)$$

Enzim inaktivasyonunun zamana bağlı değişimini de aşağıdaki denklemle (Denklem 4) ifade edebiliriz:

$$\frac{d[\log_{10}\left(\frac{A}{A_0}\right)]}{dt} = b \cdot n \cdot t^{n-1} \quad (7)$$

Tablo 1. Doğrusal model (Denklem 1) ile üstel modelin (Denklem 2) farklı sıcaklıklarda ananas püresindeki PPO enzim inaktivasyon verilerine uyumluluklarının karşılaştırılması.

Table 1. Comparison of the linear model (Equation 1) and the exponential model (Equation 2) for compatibility with PPO enzyme inactivation data in pineapple puree at different temperatures.

T (°C)	Ayarlı R ²		RMSE ^b	
	Doğrusal model	Üstel model	Doğrusal model	Üstel model
30	0.9985	0.9997	0.0005	0.0003
40	0.9851	0.9889	0.0032	0.0028
50	0.9935	0.9999	0.0031	0.0004
60	0.9965	0.9999	0.0037	0.0004
70	0.9989	0.9989	0.0026	0.0026

^b Ortalama karesel hataların karekökü

Tablo 2. Üstel modelin (Denklem 2) değişken şekil parametrelili (n) hali ile sabitlenmiş şekil parametrelili ($n=0.91$) halinin farklı sıcaklıklarda ananas püresindeki PPO enzim inaktivasyon verilerine uyumluluklarının karşılaştırılması.

Table 2. Comparison of the exponential model (Equation 2) with the variable shape parameter (n) and the fixed shape parameter ($n=0.91$) compatibility of PPO enzyme inactivation data in pineapple puree at different temperatures.

T (°C)	Ayarlı R ²		RMSE ^b	
	Üstel model	Üstel model ($n = 0.91$)	Üstel model	Üstel model ($n = 0.91$)
30	0.9997	0.9994	0.0003	0.0003
40	0.9889	0.9909	0.0028	0.0025
50	0.9999	0.9993	0.0004	0.0010
60	0.9999	0.9999	0.0004	0.0005
70	0.9989	0.9978	0.0026	0.0037

Denklem 7'de t 'nin yerine Denklem 6 yerleştirilirse elde edilen eşitlikte sıcaklığa bağlı tek değişken b olacaktır. Eğer sıcaklığın zamana bağlı değişimi biliniyorsa (sıcaklık profili) bu denklemi numerik olarak çözmek mümkündür. Bu durumda, enzim inaktivasyonunu sabit olmayan sıcaklık koşullarında tahmin etmek mümkün olacaktır. Bu gıda sanayi için önemlidir çünkü gıda sanayinde uygulanan ısı işlemler sıcaklığın artışı, sabit sıcaklıkta belli bir süre bekletme ve hızlı bir şekilde soğutma şeklinde olup (örneğin pastörizasyon işlemi), sabit olmayan sıcaklık profili oldukça yaygındır.

PPO'nun zamana bağlı inaktivasyonu iki farklı sıcaklık profilinde Şekil 5'te gösterilmiştir. İlk simülasyonda sıcaklık

profili başlangıçta 30°C'deki ananas püresini doğrusal ve yavaş bir şekilde (1.5°C/dakika) 55°C'ye ısıtılarak bu sıcaklıkta 84 dakika kadar bekletilmesi şeklindedir (Şekil 5a). Bu uygulama ile PPO enziminin % 67 oranında inaktive edildiği ve hafifçe dış bükey bir eğilim gösterdiği görülmektedir. İkinci simülasyonda ise sıcaklık profili başlangıç sıcaklığı 4°C'e olan ananas püresinin 72°C'ye hızlı bir şekilde (136 °C/dakika) ısıtılarak bu sıcaklıkta 30 dakika kadar bekletildikten sonra yine hızlı şekilde 4°C'ye soğutulması şeklindedir (Şekil 5b). Bu sıcaklık profilinde ise PPO enzimi % 54 oranında inaktive edilmiş olup doğrusal bir inaktivasyon göstermektedir. Sabit sıcaklıkta doğrusala yakın ancak iç bükey bir inaktivasyon gösteren PPO enziminin inaktivasyonu sıcaklığın sabit olmadığı durumlarda hafifçe dış bükey ve doğrusal bir eğilim göstermektedir. İnaktivasyon oranının Şekil 5a'da daha yüksek çıkmasının sebebi sıcaklığın daha düşük olmasına rağmen (55°C) enzimin bu sıcaklığa daha uzun süre maruz kalması ile ilgilidir. Ayrıca enzimin sıcaklığa karşı gösterdiği stabilite ortam pH'sı ile direkt olarak ilgilidir. Bundan dolayı enzimin orjinine göre sıcaklığa karşı stabilite de değişebilmektedir. Ananas püresindeki PPO enziminin pH 6.8' de en yüksek stabiliteye sahip olduğu, pH'nın 5 ve 4'e düşmesi ile bu stabilitenin azaldığı rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2013). Ananas püresinde yapılan bu çalışmada ise pH 3.8 olarak kaydedilmiştir (Chakraborty ve ark., 2015). Dolayısıyla Şekil 5a'da uygulanan 55°C sıcaklık ile enzim aktivitesinin % 67 oranında inaktive etmek mümkün olmuştur.

PPO'nun Basınç Kullanılarak İnaktivasyonu

Yüksek (hidrostatik) basınç kullanarak birçok farklı enzim inaktive edilmeye çalışılmıştır (Garcia-Palazon ve ark., 2004; Marszałek ve ark., 2019; Nienaber ve ark., 2001). Buckow ve ark. (2009) elma suyundaki PPO'yu yüksek basınç (200, 300, 400 ve 500 MPa – 70°C) ile inaktive etmişlerdir. Söz konusu inaktivasyon verileri yukarıda kullanılan modeller ve yöntem kullanılarak tanımlanmıştır. Şekil 6a'da n değerinin (Denklem 2'deki) değişken ve sabit olarak veriye uygulanması gösterilmiştir. İç bükey enzim inaktivasyonu açık bir şekilde gözlenmekte olup, değişken ve sabit n değeriyle yapılan model uygulamalarının hemen hemen aynı sonucu verdiği ortaya çıkmıştır. Buckow ve ark. (2009) da iç bükey inaktivasyonu modellemek için doğrusal modelden farklı bir model kullanmışlardır. Şekil 6b'de n değerinin basınca karşılık değişimi ve sabitlenmesi ($n = 0.62$) yer almaktadır. Burada n değerinin sabitlenmesi 200 ve 500 MPa'da model uyumunun hafifçe azalmasına neden olmuş, 300 MPa'da daha iyi bir sonuç vermiş, 400 MPa'da ise hemen hemen aynı uyum elde edilmiştir. (Tablo 3). Ancak, n değerinin sabitlenmesi daha önce bahsedildiği gibi avantajlı bir durum sağladığından, model uyumunun azalması ihmal edilebilir bir

durumdur. Şekil 6c' de sabit n değerine sahip modelle elde edilen b değerinin basınca göre modellenmesi gösterilmiştir.

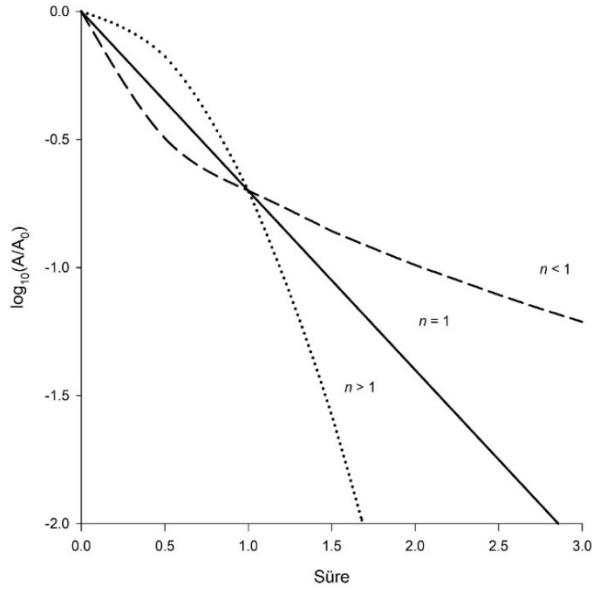
PPO'nun zamana bağlı inaktivasyonu dört farklı basınç profilinde Şekil 7' de gösterilmiştir. Yüksek basınç endüstriyel ölçekte uygulanan bir işlem olup, 600 MPa limit değeridir (Campus, 2010). Bu nedenle ilk profile endüstride uygulanan klasik bir basınç işlemi gösterilmiştir: 2 dakika içinde sıkıştırma, 5 dakika 600 MPa'da bekletme ve 1 dakika içinde atmosferik basınca geri indirme. Bu profile görüldüğü gibi enzim inaktivasyonu "ters S" şeklinde ya da dış bükey başlayıp iç bükey biten bir eğilim göstermiştir (Şekil 7a). Yüksek basınç işlemi tek bir basınç döngüsünden oluşabileceği gibi çoklu döngülerden de oluşabilir (Del Olmo ve ark., 2010). Literatürde çoklu YB döngü uygulamasının aynı sürede tekli YB uygulamasından daha etkin sonuçlar verdiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu kapsamda sıvı yumurta ve tavuk göğsü filetolarında *Salmonella* inhibisyonu için olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Morales ve ark., 2009; Ponce ve ark., 1999). Şekil 7b'de bu profil gösterilmiştir. Görüldüğü gibi enzim inaktivasyonu basınç döngülerine göre hızlanıp yavaşlamaktadır. Basınçla ilgili yapılmış bazı çalışmalardan farklı basınç profilleri de kullanılarak enzim inaktivasyonları tahmin edilmeye çalışılmıştır. Örneğin sadece sıkıştırma ve genleştirme işleminden oluşan (Şekil 7c) ya da basıncın sürekli artırılarak uygulanan yüksek basınç işlemi (Şekil 7d) profilleri gibi durumlarda da enzim inaktivasyonunu tahmin etmek mümkündür. Elde edilen sonuçlara göre Şekil 7a-d'deki inaktivasyon oranları sırasıyla % 97.7, % 98.8, % 68 ve % 71'dir. Uygulanan basınç profilleri içerisinde üç tekrarlı basınç döngüsünün (Şekil 7b) enzim inaktivasyonunda en iyi sonucu verdiği gözlenmiştir. Enzim inaktivasyonundaki başarı enzime uygulanan basıncın yüksekliği ve maruz kalma süresi ile ilgilidir. Şekil 7b'deki işlemde 3 dakika 600 MPa'da tutuş, 2'şer dakika basıncın artması ve 1'er dakika basıncın azalması ve 2 periyot 0.5 dakikalık beklemler ile toplam 13

dakikalık bir işlem söz konusu olmuştur. Şekil 7a' da da toplam 3 dakika 600 MPa'da tutuş, 2 dakika basıncın artması ve 1 dakika basıncın azalması ile toplam 6 dakikalık bir işlem söz konusu olup Şekil 7b' deki inaktivasyon oranına çok yakın bir başarı elde edilmiştir. Basınca maruz kalma süresi enzime uygulanan mekanik stres ile ilişkili olup enzimin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini kaybetmesine sebep olmaktadır (Denys ve ark., 2000). En düşük inaktivasyon oranı ise Şekil 7c' de görülmüştür. Bu durum anlık basınç uygulamasının enzimin yapısında sadece sıkıştırma işlemi boyunca bir yapısal bozulmaya sebep olması ile ilgilidir (Riahi ve ark., 2004). Bu tarz uygulamalardan sonra enzimin daha aktif hale geldiği bile görülmüştür (Terefe ve ark., 2010).

Tablo 3. Üstel modelin (Denklem 2) değişken şekil parametrelili (n) hali ile sabitlenmiş şekil parametrelili ($n = 0,62$) halinin farklı basınçlarda elma suyundaki PPO enzim inaktivasyon verilerine uyumluluklarının karşılaştırılması.

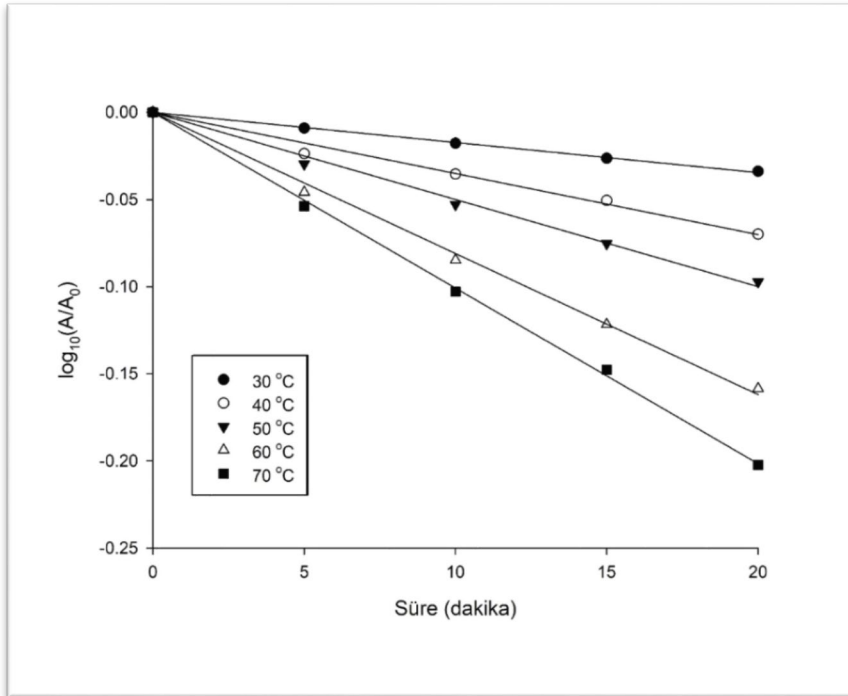
Table 3. Comparison of the compatibility of the exponential model (Equation 2) with the variable shape parameter (n) and the fixed shape parameter ($n = 0.62$) at different pressures in PPO enzyme inactivation data in apple juice.

P (MPa)	Ayarlı R ²		RMSE ^b	
	Üstel model	Üstel model ($n = 0.62$)	Üstel model	Üstel model ($n = 0.62$)
200	0.9769	0.9566	0.0328	0.0449
300	0.9794	0.9822	0.0403	0.0374
400	0.9855	0.9836	0.0456	0.0485
500	0.9953	0.9745	0.0497	0.1153



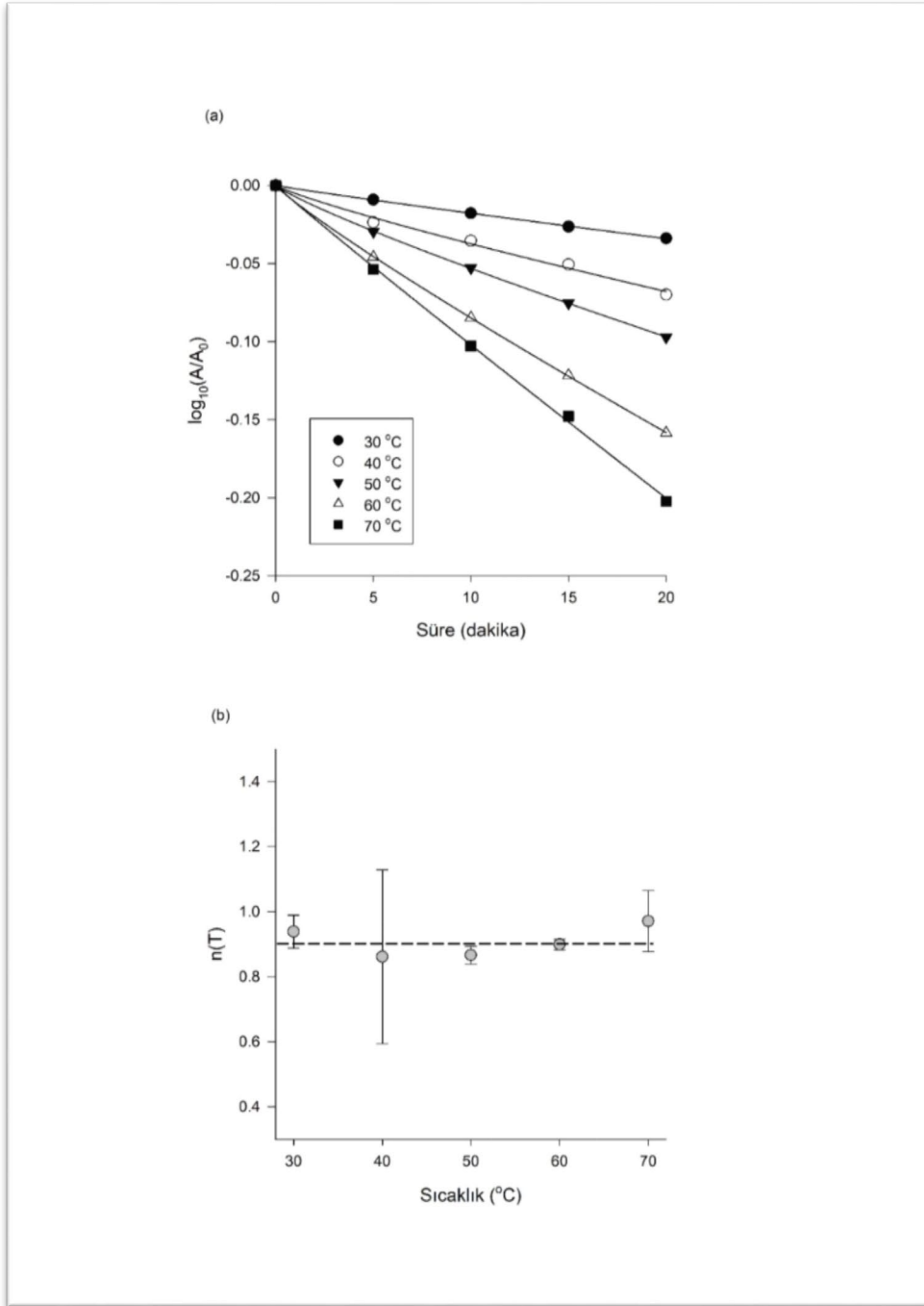
Şekil 1. Üstel modelin (Denklem 2) şekil parametresinin (n) enzim inaktivasyonu üzerindeki etkisi. Kesikli çizgi iç bükey ($n < 1$), düz çizgi doğrusal ($n = 1$), noktalı çizgi ise dış bükey ($n > 1$) inaktivasyonu temsil etmektedir.

Figure 1. Effect of the exponential model (Equation 2) of the shape parameter (n) on enzyme inactivation. The dashed line represents concave ($n < 1$), the straight line is linear ($n = 1$), and the dotted line represents convex ($n > 1$) inactivation.



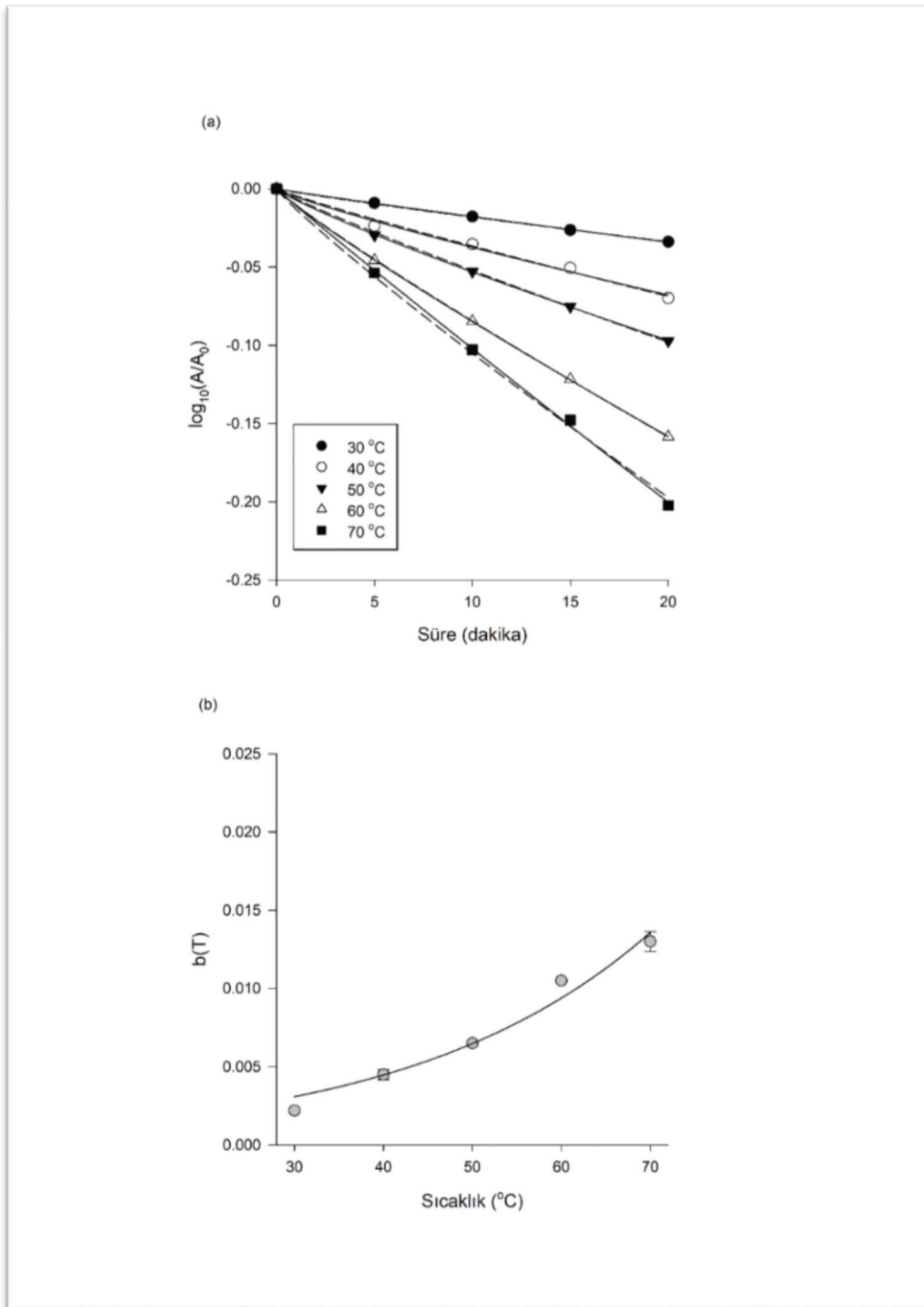
Şekil 2. Doğrusal modelin (Denklem 1) farklı sıcaklıklarda ananas püresindeki PPO enzimi inaktivasyonuna uygulanması. Orijinal veriler Chakraborty ve ark. (2015)'dan alınmıştır.

Figure 2. Application of the linear model (Equation 1) to PPO enzyme inactivation in pineapple puree at different temperatures. Original data Chakraborty et al. (2015).



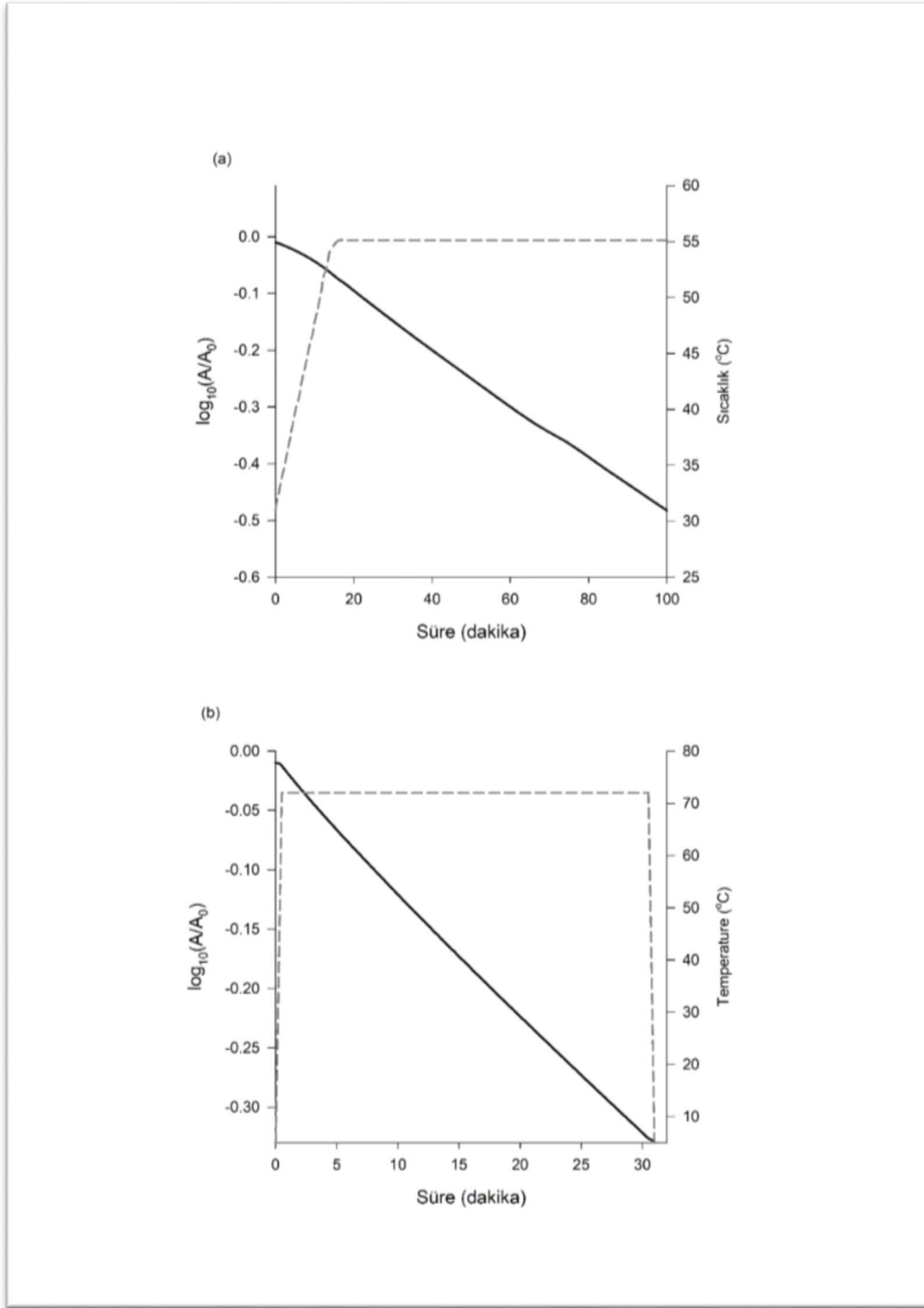
Şekil 3. (a): Üstel modelin (Denklem 2) farklı sıcaklıklarda ananas püresindeki PPO enzimi inaktivasyonuna uygulanması. Orijinal veriler Chakraborty ve ark. (2015)'dan alınmıştır. (b): Üstel modelin (Denklem 2) şekil parametresinin (n) sıcaklığa (T) bağlı değişimi (gri daireler). Hata barları % 95 güven aralığını temsil etmektedir. Kesikli çizgi ise 5 farklı sıcaklıktaki n değerinin ortalamasını göstermektedir ($n= 0.91$).

Figure 3. Application of the exponential model (Equation 2) to PPO enzyme inactivation in pineapple puree at different temperatures. Original data Chakraborty et al. (2015). (b): Change of the shape parameter (n) of the exponential model (Equation 2) depending on the temperature (T) (gray circles). Error bars represent the 95% confidence interval. The dotted line shows the average of the value of n at 5 different temperatures ($n= 0.91$).



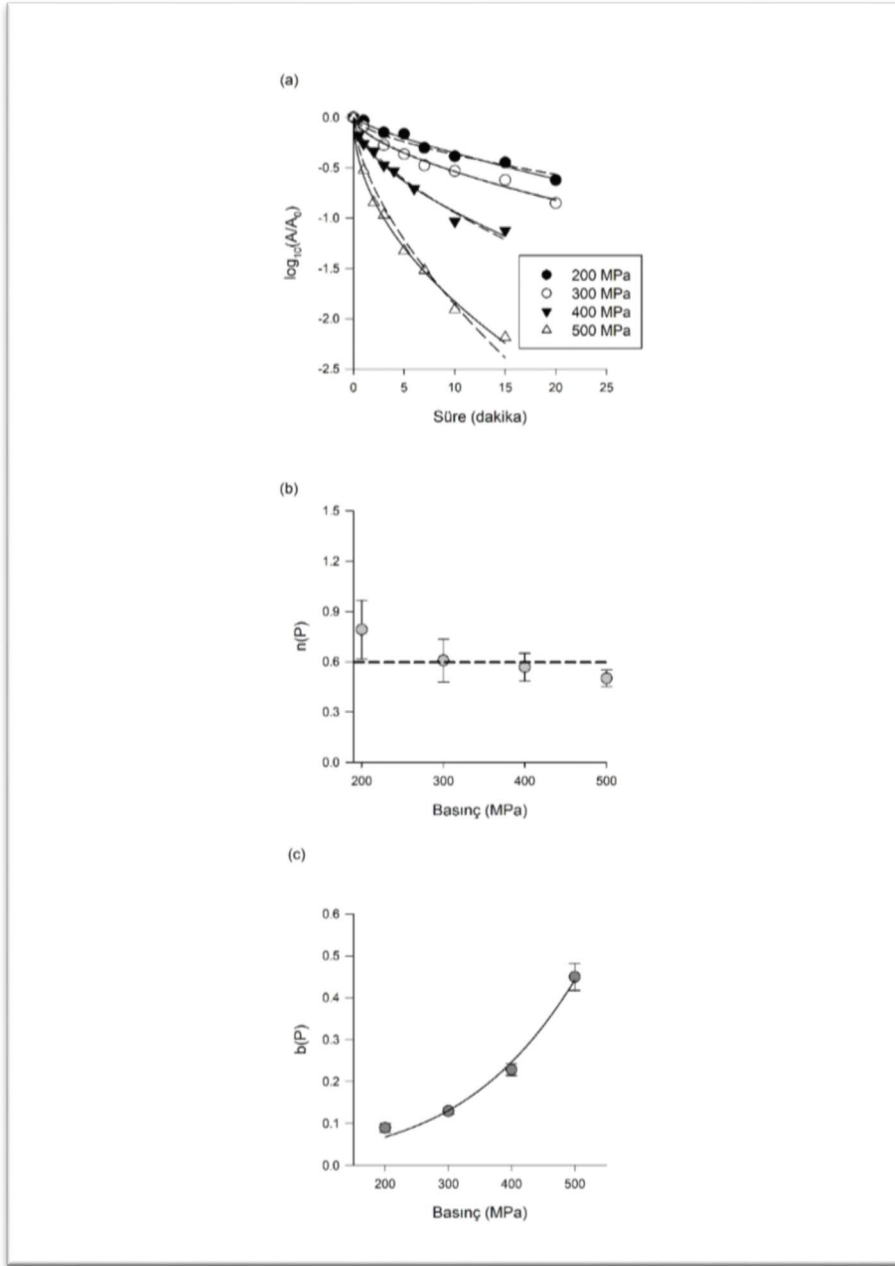
Şekil 4. (a): Üstel modelin (Denklem 2) farklı sıcaklıklarda ananas püresindeki PPO enzimi inaktivasyonuna uygulanması. Düz çizgiler değişken şekil parametrelili (n) üstel model uyumunu, kesikli çizgiler ise sabitlenmiş şekil parametrelili ($n=0.91$) üstel model uyumunu göstermektedir. Orijinal veriler Chakraborty ve ark. (2015)'dan alınmıştır. (b): Üstel modelin (Denklem 2) inaktivasyon hızı parametresinin (b) sıcaklığa (T) bağlı değişimi (gri daireler). Hata barları %95 güven aralığını temsil etmektedir.

Figure 4. (a): Application of the exponential model (Equation 2) to PPO enzyme inactivation in pineapple puree at different temperatures. Straight lines represent exponential model with variable shape parameter (n) and the dashed lines show the exponential model fit with fixed shape parameter ($n = 0.91$). Original data Chakraborty ve ark. (2015). (b): Change of the inactivation rate parameter (b) of the exponential model (Equation 2) depending on the temperature (T) (gray circles). Error bars represent the 95% confidence interval.



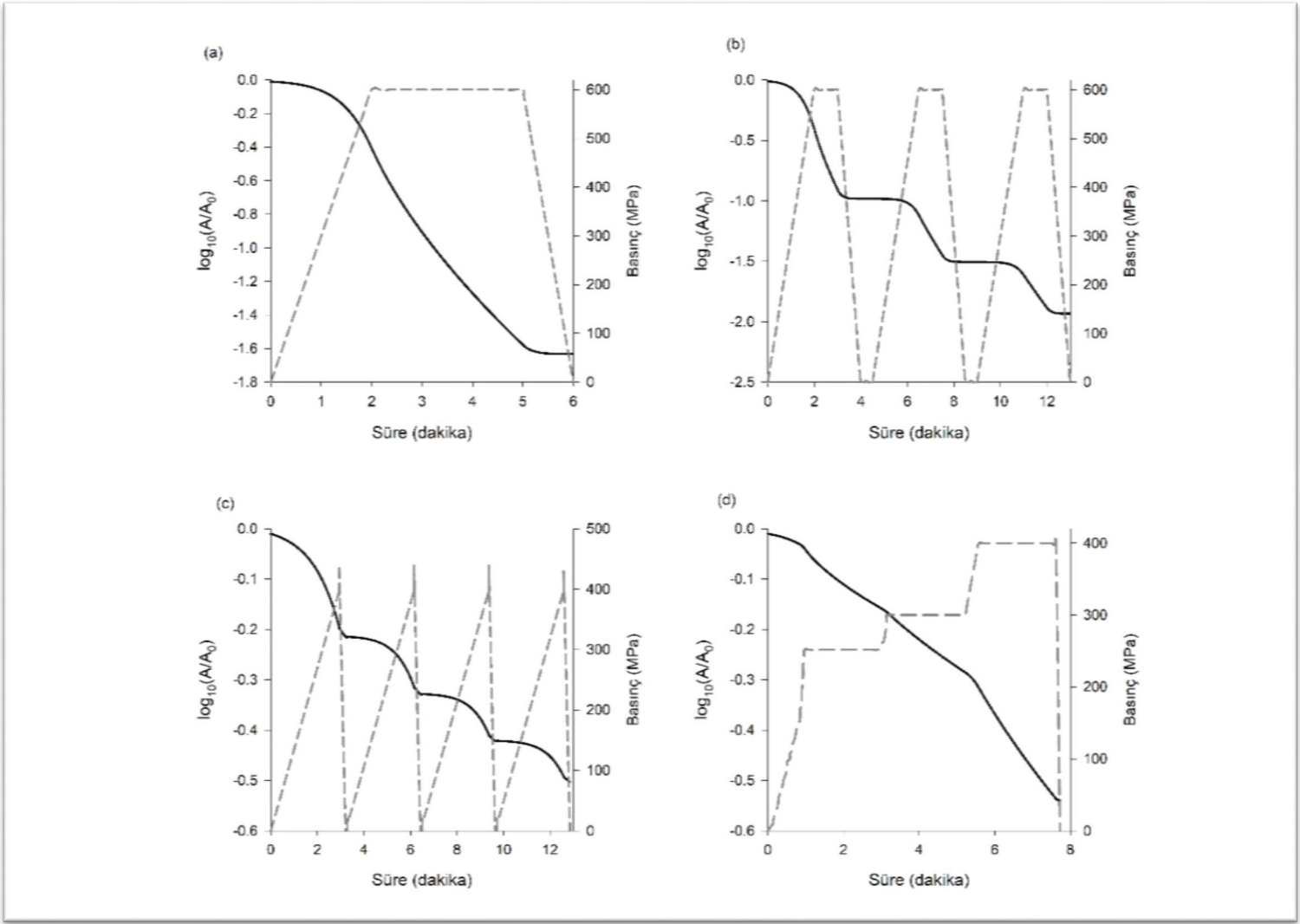
Şekil 5. İki farklı sıcaklık profilinde (kesikli gri çizgiler) ananas püresindeki PPO enziminin inaktivasyonunun (siyah düz çizgiler) tahmin edilmesi. (a): 30°C’ deki ananas püresinin 1.5°C/dakika olacak şekilde 55°C’ ye ısıtılması ve bu sıcaklıkta 84 dakika kadar bekletilmesi. (b) 4°C’ deki ananas püresinin 72°C’ye 136°C/dakika olacak şekilde ısıtılarak bu sıcaklıkta 30 dakika kadar bekletildikten sonra yine 136°C/dakika olacak şekilde 4 °C’ye soğutulması.

Figure 5. Prediction of inactivation (black straight lines) of PPO enzyme in pineapple puree in two different temperature profiles (dashed gray lines). (a): The pineapple puree at 30 °C is heated to 55°C at 1.5°C / minute and kept at this temperature for 84 minutes. (b) The pineapple puree at 4°C is heated to 72°C at 136°C/minute and kept at this temperature for 30 minutes and then cooled to 4°C at 136°C/minute.



Şekil 6. (a): Üstel modelin (Denklem 2) farklı basınçlarda elma suyundaki PPO enzimi inaktivasyonuna uygulanması. Düz çizgiler değişken şekil parametrelili (n) üstel model uyumunu, kesikli çizgiler ise sabitlenmiş şekil parametrelili ($n = 0,62$) üstel model uyumunu göstermektedir. Orijinal veriler Buckow ve ark. (2009)'dan alınmıştır. (b): Üstel modelin (Denklem 2) şekil parametresinin (n) basınca (P) bağlı değişimi (gri daireler). Hata barları % 95 güven aralığını temsil etmektedir. Kesikli çizgi ise 5 farklı sıcaklıktaki n değerinin ortalamasını göstermektedir ($n = 0.62$). (c): Üstel modelin (Denklem 2) inaktivasyon hızı parametresinin (b) sıcaklığa (T) bağlı değişimi (gri daireler). Hata barları % 95 güven aralığını temsil etmektedir.

Figure 6. (a): Application of the exponential model (Equation 2) to PPO enzyme inactivation in apple juice at different pressures. Straight lines with variable shape parameter (n), shows the exponential pattern fit, and dashed lines with fixed shape parameter ($n = 0.62$) shows the exponential model fit. Original data Buckow et al. (2009). (b): Pressure (P) change of shape parameter (n) of the exponential model (Equation 2) (gray circles). Error bars represent the 95% confidence interval. The dotted line shows the average of the value of n at 5 different temperatures ($n = 0.62$). (c): Change of the inactivation rate parameter (b) of the exponential model (Equation 2) depending on the temperature (T) (gray circles). Error bars represent the 95% confidence interval.



Şekil 7. Dört farklı basınç profilinde (kesikli gri çizgiler) elma suyundaki PPO enziminin inaktivasyonunun (siyah düz çizgiler) tahmin edilmesi. (a): Endüstride uygulanan klasik basınç döngüsü 600 MPa, 5 dakika; (b): Üç tekrarlı basınç döngüsü; (c): Sadece sıkıştırma ve genişmeden oluşan dörtlü basınç döngüsü (Shao ve ark., 2007); (d): Basıncın sürekli artırılarak uygulanması (Koseki ve Yamamoto, 2007).

Figure 7. Estimating the inactivation (black straight lines) of the PPO enzyme in apple juice in four different pressure profiles (dashed gray lines). (a): The classical pressure cycle applied in the industry is 600 MPa, 5 minutes; (b): Three repetitive pressure cycles; (c): Quadruple pressure cycle consisting of compression and expansion only (Shao et al., 2007); (d): Continuously increasing pressure (Koseki & Yamamoto, 2007).

Sonuç

Bu çalışmada PPO enziminin sabit koşullarda (sıcaklık veya basınç) inaktivasyonu uygun bir model kullanılarak tanımlanmış ve bu modelden elde edilen veriler PPO inaktivasyonunun sabit olmayan gerçekçi koşullar altında tahmin edilmesi için kullanılmıştır. Sonuçlar göstermektedir ki, sabit sıcaklık veya basınçta iç bükey eğilim gösteren inaktivasyon

sabit olmayan koşullarda dış bükey ya da ters S şekline dönebilmektedir. Dahası bu tarz simülasyon çalışmaları gıdalarda bulunan başka enzimler için ve farklı sıcaklık (veya basınç) profilleri kullanılarak da yapılabilir. Aynı zamanda istenilen enzim inaktivasyon seviyesini hangi profilin karşılayabileceği de simülasyonla anlaşılabilir. Bu çalışmanın gıda sanayi için önemli olacağı değerlendirilmektedir.

Etik Standart ile Uyumluluk

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Araştırma niteliği bakımından etik izin gerektirmemektedir.

Finansal destek: -

Teşekkür: Bu makaledeki bilgi birikiminin oluşmasına katkı sağlayan Prof. Dr. Sencer Buzrul'a teşekkür ederim.

Açıklama: -

Kaynaklar

Amiali, M., Ngadi, M., Smith, J. ve Raghavan, G. (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 689-694.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.029>

Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G. (2012). Inactivation kinetics of *Salmonella spp.* under thermal and emerging treatments: a review. *Food Research International*, 45(2), 700-712.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.040>

Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 441-448.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.005>

Buzrul, S. (2009). A predictive model for high-pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms. *Journal of Food Safety*, 29(2), 208-223.

<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00151.x>

Campus, M. (2010). High pressure processing of meat, meat products and seafood. *Food Engineering Reviews*, 2(4), 256-273.

<https://doi.org/10.1007/s12393-010-9028-y>

Chakraborty, S., Rao, P. S., Mishra, H.N. (2015). Kinetic modeling of polyphenoloxidase and peroxidase inactivation in pineapple (*Ananas comosus* L.) puree during high-pressure and thermal treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 57-68.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.11.003>

Chen, G. (2013). Estimating microbial survival parameters from dynamic survival data using Microsoft Excel. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(9), 1841-1846.

<https://doi.org/10.1111/ijfs.12159>

Cheng, X.-F., Zhang, M., Adhikari, B. (2013). The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(2), 674-679.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.09.012>

Crelier, S., Robert, M.-C., Claude, J., Juillerat, M.A. (2001). Tomato (*Lycopersicon esculentum*) pectin methylesterase and polygalacturonase behaviors regarding heat- and pressure-induced inactivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5566-5575.

<https://doi.org/10.1021/jf010202u>

Del Olmo, A., Morales, P., Ávila, M., Calzada, J., Nuñez, M. (2010). Effect of single-cycle and multiple-cycle high-pressure treatments on the colour and texture of chicken breast fillets. *Innovative food science & emerging technologies*, 11(3), 441-444.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.012>

Denys, S., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2000). A modeling approach for evaluating process uniformity during batch high hydrostatic pressure processing: combination of a numerical heat transfer model and enzyme inactivation kinetics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(1), 5-19.

[https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(99\)00003-X](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(99)00003-X)

Garcia-Palazon, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P., Zabetakis, I. (2004). The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Food Chemistry*, 88(1), 7-10.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.019>

Giner, J., Ortega, M., Mesgué, M., Gimeno, V., Barbosa-Cánovas, G. Martín, O. (2002). Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 67(4), 1467-1472.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10307.x>

Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, J.R. Kahn, V. (1984). Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety* (pp. 437-456): Springer.

- Goyeneche, R., Di Scala, K., Roura, S. (2013). Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish (*Raphanus sativus* var. *sativus*). *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 57-62.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.04.014>
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 197-203.
[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00039-9)
- Islam, M.N., Zhang, M., Adhikari, B. (2014). The inactivation of enzymes by ultrasound—a review of potential mechanisms. *Food Reviews International*, 30(1), 1-21.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2013.853772>
- Kadkhodae, R., Povey, M.J. (2008). Ultrasonic inactivation of Bacillus α -amylase. I. Effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2), 133-142.
<https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2007.02.005>
- Liu, F., Niu, L., Li, D., Liu, C., Jin, B. (2013). Kinetic characterization and thermal inactivation of peroxidase in aqueous extracts from sweet corn and waxy corn. *Food and Bioprocess Technology*, 6(10), 2800-2807.
<https://doi.org/10.1007/s11947-012-0996-1>
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguérinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1-2), 107-113.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00624-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00624-9)
- Marszałek, K., Szczepańska, J., Starzonek, S., Woźniak, Ł., Trych, U., Skąpska, S., Rzoska, S., Saraiva, J.A., Lorenzo, J. M. Barba, F.J. (2019). Enzyme inactivation and evaluation of physicochemical properties, sugar and phenolic profile changes in cloudy apple juices after high pressure processing, and subsequent refrigerated storage. *Journal of Food Process Engineering*, 42(4), e13034.
<https://doi.org/10.1111/jfpe.13034>
- Morales, P., Calzada, J., Rodriguez, B., De Paz, M., Nunez, M. (2009). Inactivation of *Salmonella enteritidis* in chicken breast fillets by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(5), 577-581.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0218>
- Nienaber, U., Shellhammer, T. (2001). High-pressure processing of orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation. *Journal of Food Science*, 66(2), 328-331.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb11341.x>
- Periago, P., Van Zuijlen, A., Fernandez, P., Klapwijk, P., Ter Steeg, P., Corradini, M. Peleg, M. (2004). Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 205-218.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.015>
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., Mor-Mur, M. (1999). Destruction of *Salmonella enteritidis* inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. *Food Microbiology*, 16(4), 357-365.
<https://doi.org/10.1006/fmic.1998.0248>
- Riahi, E., Ramaswamy, H.S. (2004). High pressure inactivation kinetics of amylase in apple juice. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 151-160.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.09.025>
- Sulaiman, A., Soo, M.J., Farid, M., Silva, F.V. (2015). Thermosonication for polyphenoloxidase inactivation in fruits: Modeling the ultrasound and thermal kinetics in pear, apple and strawberry purees at different temperatures. *Journal of Food Engineering*, 165, 133-140.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.06.020>
- Terefe, N.S., Yang, Y.H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. (2010). High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 52-60.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.009>
- van Boekel, M.A. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1-2), 139-159.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00742-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00742-5)