

## BAZI TARIMSAL ARTIKLARDAN MİKROBİYOLOJİK YOLLA PEKTOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ ÜZERİNDE BİR ARAŞTIRMA

İsmet ŞAHİN\*  
Oğuz KILIÇ\*\*  
Sedat DÖNMEZ\*\*\*

### ÖZET

Ülkemiz gıda sanayiinin gereksinimi olan pektinaz enziminin yurtiçi üretimle karşılanması ve bu alanda mevcut uygulamalardan yararlanılarak yeni hammaddelerin belirlenmesi ve teknolojik işlemlerin incelenmesi için planlanan bu araştırmada çeşitli küf mantarı ve maya suşları denemeye alınmıştır.

Araştırma sırasında hammadde yanında, üretime etkili olabilecek diğer koşullar üzerinde durulmuştur. Elde olunan bulgulara göre pektolitik enzimler üretiminde kullanılan mantar suşunun, yetiştirme ortamının bileşimi ve pH'sının enzimi saflaştırmak için uygulanan işlemlerin, elde edilen enzimin miktarı ve etkinliği üzerinde önemli rol oynadıkları saptanmıştır. Elde olunan enzimin esteraz ve poligalakturonaz etkinliklerinin gıda sanayiinde kullanılan "Ultrazym 100 Spezial" e yakın değerlerde olduğu kimyasal ve fiziksel aktivite ölçümleriyle belirlenmiştir.

Sonuç olarak buğday kepeği gibi ayçiçek tablasının da pektinaz enzimi üretimi için iyi bir hammadde olduğu ve gerektiğinde buğday kepeği yerine kullanılabileceği, ayrıca pektolitik enzim gereksiniminin yurtiçi üretimle karşılanabileceği ortaya konmuştur.

### SUMMARY

#### Production of Pectolytic Enzymes From Some Agricultural By-Products

Several enzymes have been used increasingly in the food industry. The pectinase enzyme is now widely used in fruit juice processing.

The main object of this study was to produce this enzyme domestically, using agricultural by-products. For that purpose 7 fungus and 10 yeast varieties were grown on wheat bran and ground seedless sun flower heads. The most suitable mic-

\* Prof.Dr.; Ondokuzmayıs Üniv. Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü

\*\* Doç.Dr.; Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü.

\*\*\* Yard.Doç.Dr.; Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü.

roorganism variety, substrate composition, pH and the purification method affecting the activity and quantity of the enzyme obtained were investigated.

It was found that no clear difference, between the enzyme we produced and the enzyme imported (Ultrazym-100) in chemical and physical activity have been seen. Meanwhile this research work indicated that either wheat bran or sun flower head can be successfully used as a growing media.

## GİRİŞ

Tarım Ürünlerinin değerlendirilmesi, bu ürünlerin hammadde olarak kullanıldığı gıda sanayiindeki gelişmelere bağlıdır. Gıda sanayiinin gelişmesi ise, tarımsal üretimden elde olunan meyve, sebze ve tahıllar gibi belirli bölgelerde veya mevsimlerde üretilen maddelerin dayanıklı hale getirilerek üretimin yapılamadığı mevsim veya bölgelerde insanların yararına sunma; ayrıca bu ürünlerin kullanıma hazır ve daha değerli duruma getirme çabaları ile gerçekleştirilmektedir. Ancak bu sanayiinin gelişmesi ile birlikte gıda maddelerinin işlenmesinde bazı yardımcı maddelere gerek duyulmuş ve bunun sonucu olarak durultma, süzme vb. maddelerinin üretimi için ayrı bir sanayi gelişmiştir. Bunlardan biri de gıda sanayiinde oldukça yaygın bir kullanım bulan enzim üretimidir. Üretilen enzimlerin en önemlilerinden biri ise pektinazdır. Daha çok meyve suyu sanayiinde durultma materyali olarak kullanılan pektinaz enzimi üretimi, gelişmiş ülkelerde geniş boyutlarda araştırılmışsada, üretim çoğu kez patentlere bağlı olduğundan üretim teknolojisi açıklanmamaktadır. Son yıllarda, ülkemizde giderek gelişen gıda sanayii, pektinaz enzimi gereksinimini artırmış ve bunun tamamı ise dış alımla karşılanmıştır. Bu da önemli bir miktar dövizin bu amaçla harcanması demektir.

Pektinaz üretiminde hammadde olarak çoğunlukla buğday kepeği kullanılmaktadır. Genellikle üst yüzey yöntemiyle yapılan üretimde kepeğin rolü, seçilen küf mantarına gelişme ortamı sağlamaktır. Ayrıca vasata besin maddesi olarak 67 g/kg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> ilave edilir (Rehm 1967). Bu durumda üretim mikroorganizması olan küf mantarları azot ve fosfor dışındaki tüm besin gereksinimlerini kepekten karşılamaktadır. Pektinaz oluşumunu olumlu yönde etkileyen pektin de kepekten karşılanmaktadır.

Pektinaz enzimine gereksinimin yurtiçi üretimle karşılanabilmesi ve ayrıca üretimde kepekten daha ucuz ve ekonomik bir değerlendirme şekli olmayan başka bir hammadde bulunması için bir çalışma yapılmasının yararlı olacağı düşünülerek bu çalışma 1980 yılı faaliyet programına alınmıştır. Ancak üretimde kullanılan hammadde materyalinin sonbaharda sağlanabilmesi nedeniyle çalışmalara 1980 yılı sonlarında başlanabilmiş ve 1982 yılı yazında bitirilmiştir. A.Ü. Ziraat Fakültesinin küt olanakları ile başkaca herhangi bir kurumun katkı ve yardımı olmadan gerçekleştirilen bu araştırma pektinaz enziminin yurtiçi olanaklarla ve tarımsal artıklardan yararlanılarak üretilebileceğini ortaya koymaktadır.

## MATERYAL ve METOD

### Materyal

Pektinaz üretimi için buğday kepeği ve danesi alınmış ayçiçek tablaları kulla-

nılmıştır. Kepek A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarım Ürünleri Teknolojisi Bölümü pilot işletmesinden, ayçiçek tablaları ise aynı Fakültenin Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarhlarından sağlanmıştır.

Pektinaz üretiminde kullanılacak mikroorganizmanın seçimi için Fermantasyon Teknolojisi koleksiyonunda bulunan veya araştırma için izolasyonu yapılan 5 Asp. niger, 1 *Mucor cinerelloides* suşu ile tanısı yapılmamış hammadde olarak kullanılan ayçiçek tablasında izole edilmiş bir küf suşu ayrıca *Kloeckera*, *Pichia*, *Candida*, *Trichosporon*, *Schizosaccharomyces*, *Endomycopsis* ve *Kluyveromyces* cinslerinden 10 maya suşu denemeye alınmıştır.

## Metod

### Mikroorganizmaların pektinaz etkenliklerinin saptanması

Araştırmada kullanılacak uygun mikroorganizmanın seçimi için önce mikroorganizmaların pektinaz etkinlikleri saptanmış ve bu amaçla Tuttobello ve Mill (1961)'in yöntemi uygulanmıştır.

### Üretim materyalinin hazırlanması

Mikroorganizmanın yetiştirildiği, dolayısıyla enzim üretiminin yapıldığı besiyeri olarak kullanılan kalın ve ortakalın buğday kepeğinin hazırlanması Rehm (1967)'e göre gerçekleştirilmiştir. Ayçiçek tablaları ise "Apex. No. 314 Communiting" model çekiçli değirmenlerde 0.097 inç aralıklı elek kullanılarak öğütülmüş ve elde olunan öğütüğün bir kg'mı için 120 g  $(NH_4)_2HPO_4$  110 g glikoz ilave edilerek hazırlanan karışıma 0.1 N HCl ile pH'sı 2, 2.5, 3.5 ve 4.5'a ayarlanmış su veya peynir altı suyundan 2 katı sıvı ilave edilerek yetiştirme ortamı hazırlanmıştır. Ayrıca bazı denemelerde kepek veya öğütülmüş ayçiçek tablasına 250 g için 40 g yonca unu katılmıştır. Hazırlanan kepek veya ayçiçek tablası öğütüğü  $121^\circ C$ 'de 20 dakika sterilize edildikten sonra sterilize veya dezenfekte edilmiş 45 x 60 x 5 cm boyutlarında ve tabanı alüminyum kafesteli ile kaplanmış kasalara yayılarak aşılamaya hazır duruma getirilmiştir.

### Aşılama kültürünün hazırlanması ve aşılama

Aşılama kullanılan küf mantarları stok kültürden aşı gözü ile alınarak 300 ml'lik erlenlerde yatık malt agar besiyeri yerine aşılama ve spor oluşumu için  $30^\circ C$ 'de gelişmeye bırakılmıştır. Tüm yüzeyin siyah spor örtüsü ile kaplanmasından sonra steril fizyolojik su ile spor süspansiyonu hazırlanmıştır. (Sporların suya geçmesi için steril bir cam baget ile katı besiyerinde gelişmiş olan mantar örtüsünün karıştırılması gerekmektedir). Elde olunan 500 ml spor süspansiyonu her kasada 250 g kuru hammadde olacak şekilde hazırlanan besiyeri yerine 150 ml olacak şekilde emdirerek aşılama yapılır.

### Enzim üretimi için küf mantarlarının yetiştirilmesi

Spor süspansiyonu ile aşılama kasalar  $30^\circ C$ 'deki inkübasyon dolabına alınarak misel gelişmesi için inkübe edilmiştir. Yetiştirme sırasında inkübasyon dolabına bir kaptaki sudan geçirilerek yıkanmış ve nemlendirilmiş hava verilir. 24 saat sonunda misel gelişmesi nedeniyle keçeleşmiş olan kitle karıştırılmış, tartılarak ağırlık azalışı saptanmış ve bu eksilme su püskürtülerek tamamlanmıştır. 48 saat sonra (sporlanma izlenmiş ise daha önce) yetiştirmeye son verilerek tüm kitle ya malt ku-

rutma cihazında (Seeger) 40°C'de kurutulmuş veya su ile ekstrakte edilerek enzim sıvısı elde edilmiştir.

### Sıvı veya katı enzimin eldesi

Elde olunan taze mantar kültüründen belirli miktar alınarak ağırlığının 2.5 katı, kurutulmuş kültürde ise ağırlığının 10 katı saf su ile karıştırılarak bir mikserle homojenize edilmiş ve önce bez torbadan sıkılarak parçacıklar ayrılmış daha sonra katlı filtreden berrak olarak süzülerek enzim ekstraktı elde olunmuştur. Elde olunan enzim sıvısı ya olduğu gibi denemeye alınmış veya alkolle çöktürülerek, ya da diyalize edilerek saflaştırılmıştır.

### Toz enzim eldesi

Taze veya kuru mantar kültürünün su ile ekstraksiyonundan elde edilen pektinaz enzimini içeren berrak sıvıdan bir kısım alınarak 1.5-2 kısım — 15-20°C'ye soğutulmuş % 96'lık etilalkol ile karıştırılmış ve 5 dakika — 15-20°C'deki soğutucuda bekletildikten sonra yaklaşık 3500 devirde 5 dakika santrifüj edilerek çözelti ayrılmıştır. (Mill ve Tuttobella, 1961; Keay ve ark., 1972). Elde olunan çözelti alınan ekstraksiyon sıvısının 1/4 kadar saf su içinde çözünerek yeniden santrifüjlenerek suda erimeyen maddeler ayrılmış, üst berrak sıvı alınarak yeniden 1.5-2 katı soğuk alkolle başlangıçtaki çöktürme işlemi uygulanmıştır. Santrifüjle ayrılan enzim çözeltisi alınarak 40°C'den düşük ısıda kurutulup toz haline getirilmiştir.

### Enzim ekstraktının diyalize edilmesi

Diyaliz için temizlenmiş hayvan bağırsağı aseton içinde bekletilerek yağı alınmış ve enzim ekstraktı bu bağırsaklar içine konularak + 4°C'de 48 saat çeşme suyu-na karşı diyalize edilmiştir (Wang and Keen, 1970; Kaji and Okada, 1969).

### Esteraz etkinliğinin saptanması

Elde olunan pektinaz enziminin esteraz etkinlikleri Call ve Emeis (1978) ile Lanzarini ve Zamorani (1975)'ye göre yapılmıştır.

### Pektolitik enzimlerin viskozimetrik etkinlik tayini

Enzimlerin viskozimetrik etkinlikleri Call ve Emeis (1978) tarafından verilen yöntemle (Höppler viskozimetresi kullanılarak) saptanmıştır.

## ARAŞTIRMA SONUÇLARI

### Pektinaz etkinliği

% 2'lik yerfıstığı ekstraktı içinde % 5 pektin içeren ortamda yapılan denemede 7 küf suşu denenmiş ve bunlardan en iyi sonucu melastan izole edilen bir Asp.niger vermiştir. Erik suyundan izole edilen Asp.niger ikinci sırayı alırken diğer suşlar daha sonra gelmişlerdir. Bu nedenle asıl üretim denemelerinde bu iki suşla birlikte bitki patojeni olan diğer A.niger O.Y. suşu alınmıştır. Aynı deney 10 farklı cins veya türden maya suşu ile yapılmış ve turşulardan izole edilmiş bir Trichosporon fermentans türüne ait suş pektolitik etkinlik göstermişse de, bu etkinlik küflere oranla çok az olduğundan sözkonusu maya suşu ile üretim yapılmamıştır.

### Enzim üretimi ile ilgili bulgular

Pektolitik enzim üretiminde kullanılan hammadde, katkı maddeleri ile elde olunan mantar kültürüne ve enzim ekstraktına uygulanan işlemlerin pektolitik et-

kinliğe etkisinin araştırıldığı ilk denemeler oldukça ilginç sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Bunu açıklıkla ortaya koyabilmek için ticari pektolitik enzim preparat olan "Ultrazym 100" ile laboratuvarında elde olunan enzimlerin pektinesteraz ve viskozimetrik etkinlikleri Tablo 1'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Tablo 1'de "O" örneği % 1'lik pektin eriyiğidir ve yalnızca başlangıç viskozitesini göstermesi bakımından tabloya alınmıştır. 2 ve 3 nolu örneklerin eldesinde ayçiçek tablası kullanılmış, 2 nolu örneğin hazırlanmasında musluk suyu, 3 nolu örnekte ise 0.1 N HCl kullanılmıştır. Elde olunan mantar kültürlerinin ekstraksiyonu ile sıvı enzim elde edilmiş ve alkolle çöktürmeden sonra kurutulmuş enzim tortusundan % 1'lik eriyikler hazırlandıktan sonra özellikle pektinesteraz etkinliğinde çok büyük fark ortaya çıkmıştır. Musluk suyu ile hazırlanan ortamdan elde edilen enzimin pektinesteraz etkinliği 2.7 iken 0.1 N HCl ile hazırlananda 80 olmuştur. Her iki şekilde hazır-

Tablo: 1

Değişik Hammadde ve Katkı Kullanılarak Elde Edilen Pektinaz Enziminin Özellikleri

Örnek No.	Kullanılan Hammadde	Yetiştirme ve İşlem Koşulları	Pektinesteraz Etkinliği	% 1'lik pektin eriyiğindeki viskozite	% 1'lik pektin eriyiğinde 100 dakika sonra viskozite azalması %
			$\mu$ M serbest asit ml. enzim sıvısı	(cP)	
0	—	% 1'lik pektin eriyiği	—	6.5011	0.00
1	—	% 1'lik Ultrazim 100 eriyiği	11.7	1.0046	100.00
2	Ayçiçek tablası	0.5 kg ayçiçek tablası 20 gr sakkaroz 60 gr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 litre çeşme suyu	2.7	1.0988	98.29
3	"	Su yerine 0.1 N HCl diğer işlemler aynı	80.0	1.0674	98.86
4	Buğday kepeği	1 kg kepek için 1.7 L 0.1 N HCl + 40 g galaktoz + 120 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.8	1.1301	97.71
5	"	1 kg kepek için 1.7 l 0.1 N HCl + 40.0 g yonca unu + 40 g sakkaroz + 120.0 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13.1	1.1929	96.57
6	"	1 kg kepek için 1.7 litre 0.1 N HCl + 40.0 g sakkaroz + 120.0 gr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.7	1.1301	97.71
7	Ayçiçek tablası	1 kg ayçiçek tablası için 2.0 l, 0.1 N HCl + 40.0 g yonca unu + 40.0 g galaktoz + 120.0 gr (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	87.4	1.0674	98.86
8	Buğday kepeği	No.4'le aynı, enzim saflaştırılmadan	7.4	1.0980	98.29
9	"	No.5'le aynı, enzim saflaştırılmadan	7.5	1.1929	96.57
10	"	No.6'le aynı, enzim saflaştırılmadan	3.7	1.1929	96.57
11	Ayçiçek tablası	No.6'le aynı, enzim saflaştırılmadan	15.3	1.0674	98.56
12	Buğday kepeği	40°C'de kurutulmuş No.4'ün ekstraktı	8.1	1.0674	98.56
13	"	40°C'de kurutulmuş No.5'in ekstraktı	7.6	1.1301	97.71
14	"	40°C'de kurutulmuş No.6'nın ekstraktı	3.9	1.0988	98.29
15	Ayçiçek tablası	40°C'de kurutulmuş No.7'nin ekstraktı	27.5	1.0674	98.56

lanan üretimde enzimlerin viskozimetrik etkinlikleri arasında yalnızca 0.57'lik bir fark ortaya çıkmıştır.

4, 5, 6 ve 7 nolu örnekler buğday kepeği ve ayçiçek tablası alınarak ve üretimde değişik şekerlerle birlikte yonca unu katkısının etkisini incelemek üzere hazırlanmıştır. Elde olunan taze mantar kültürlerinin hemen ekstraksiyonu sonunda alkolle çöktürme ve kurutmadan sonra % 1'lik olarak hazırlanan enzim eriyikleri denemeye alınmıştır. Buğday kepeği hammadde olarak kullanıldığında karbonhidrat katkısı olarak galaktoz ve sakkaroz + yonca unu ayrı ayrı denenmiş ve galaktoz ilavesinin pektin esteraz etkinliğini 2.1  $\mu\text{M}$  artırdığı saptanmıştır. Sakkarozla birlikte yonca unu verilecek olursa pektin esteraz etkinliği 7.4  $\mu\text{M}$  gibi büyük bir artış göstermiştir. Viskozite azalışı bakımından galaktoz ve sakkaroz ilaveleri arasında herhangi bir fark saptanamamış, yonca ilavesi durumunda 1.14 lük bir düşme izlenmiştir. Hammadde olarak ayçiçek tablası kullanılıp galaktoz ve yonca ilavesi ile pektinesteraz etkinliği 3 nolu örneğe göre 7.4 lük bir artış göstermiştir. Aynı miktarda artış, yonca katkılı buğday kepeğinde elde olunan üretimde de sağlanmıştır. Bu durumda yonca ilavesinin pektinesteraz etkinliğini artırdığı kesinlikle söylenebilir. % 1'lik pektin eriyiğinde herhangi bir viskozite azalışı saptanamamıştır. Buna göre yonca ilavesi poligalaktronaz oluşumu üzerinde etkin değildir. Fakat ayçiçek tablası hammadde olarak kullanılacak olursa, buğday kepeğine göre poligalaktronazca daha etkin bir enzim elde edilebilmektedir.

8, 9, 10 ve 11 nolu örnekler 4, 5, 6 ve 7 nolu örneklerin alkolle çöktürme uygulamaksızın sıvı ekstraktı alınarak hazırlanmıştır. Her iki gruptaki değerler karşılaştırılacak olursa mantar kültürünün su ile ekstraksiyonundan elde olunan sıvıdan pektinaz enziminin kimyasal çöktürücüler kullanılarak saflaştırılması pektin esteraz etkinliğinde oldukça fazla, poligalaktronaz etkinliğinde ise genelde az da olsa bir miktar artış sağlamaktadır.

İlk aşamanın son araştırması taze mantar kültürünün hemen ekstrakte edilip enzim preparatına dönüştürülememesi durumunda kurutma işleminin ne gibi etkiler yaptığını saptamaya yöneliktir. 12, 13, 14 ve 15 nolu örnekler 4, 5, 6 ve 7'nin 40°C de kurutulması, elde edilen kuru materyalin ekstraksiyonu ile elde edilen ve saflaştırma uygulanmayan ekstraktlardır. Bu nedenle sonucun 8, 9, 10 ve 11 nolu örneklerle karşılaştırılması gerekir. İki grup örneklerde elde edilen pektinesteraz ve poligalaktronaz etkinliklerine ilişkin sonuçlar karşılaştırıldığında kurutma ile her iki değerde de küçümsenemeyecek artışlar olduğu görülür. Bu farkın kurutma sırasında mantar hücreleri zarında meydana gelen değişimler sonucu hücre içinde kalan pektinaz enziminin su ile daha fazla ekstrakte edilebilmesinden kaynaklanması olasıdır (Tablo 1).

Araştırmanın ikinci bölümünde hammadde olarak yalnızca ayçiçek tablası kullanılmış, suyun etkisini saptamak için daha önce deneylerde en fazla etkinlik gösteren iki mantar suyu enzim üretimi için seçilmiştir. Bu bölümde daha çok farklı pH'larda yetiştirilmenin etkisi araştırılmış, ancak mantar kültürünün bekletilmesinin etkisini belirlemek üzere birinci bölümde elde edilen 1 ve 2 nolu örnekler de birlikte denenmiştir. Mantar suyu, pH, bekletme, diyalize etme ve aktif kömürle renk gidermenin etkilerini ve ayrıca saflaştırma sırasında artık sıvının enzim etkinliğini belirlemek için gerçekleştirilen deney sonuçları ile Tablo 2 oluşturulmuştur.

Öncelikle tablo 1 ve 2'nin ilk bölümü karşılaştırılacak olursa üç ay ara ile yapılan denemeler arasında "Ultrazym 100"ün etkinliğinde de bir azalma olmuştur.

Ambalajın ilk kez açıldığı ilk deneyde pektinesteraz etkinliği 11.7 iken üç ayda 2.4'e poligalaktronaz etkinliği % 100'den % 97.02'ye düşmüştür. Etkinlik kaybı çeşme suyuyla hazırlanan ortamda yetiştirmede özellikle poligalaktronaz bakımından çok büyük olmuştur. 0.1 N HCl ile hazırlananda bu kayıp çok daha azdır. Aynı yetiştirmeden kuru mantar kültürü olarak saklayıp deney sırasında elde edilen sulu ekstrakta hem su, hemde 0.1 N HCl ile hazırlanan yetiştirme ürünlerinde enzim azalması çok daha az poligalaktronaz bakımından "Ultrazym 100" kadardır. Pektinesteraz etkinliğinde ise saflaştırılmış enzime göre artma varken; üç ay öncesine göre su ile hazırlanan kültürde artma, 0.1 N HCl ile hazırlanan kültürde ise azalma izlenmiştir (Tablo 1, Örnek 2, 3 ve Tablo 2, Örnek 1,2). Buna göre kuru kültür olarak saklama üç ay içinde poligalaktronaz etkinliğinde yaklaşık % 1.17'lik bir etki kaybına neden olurken, sulu enzim ekstraktının saflaştırılması bu durumda % 27.67'lik bir kayba neden olmuştur.

A.niger M ve A.niger E suşları kullanılarak pH üzerinde yapılan araştırmada hem saflaştırılmış, yani alkolle çöktürülüp kurutulmuş, hemde sulu ekstrakt kulla-

Tablo: 2  
Değişik Yetiştirme ve İşleme Koşullarının Pektinaz Enzimi Üretimine Etkileri

Örnek No.	Kullanılan Suş	Yetiştirme ve İşleme Koşulları	Pektin esteraz etkinliği $\mu$ M ser. asit ml. enzim	% 1'lik pektin eriyiğindeki viskozite (cP)	% 1'lik pektin eriyiğindeki viskozite azalışı %
0	—	% 1'lik ultrazym 100 eriyiği	2.4	1.1092	97.02
1	A.niger O.Y	1 litre çeşme suyu 0.5 kg Ayçiçek tablası 20.0 g sakkaroz 60.0 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.2	2.3849	60.62
2	" "	No.1'le aynı, su yerine 0.1 N HCl	2.4	1.2453	93.15
3	A. niger M	No.1'le aynı pH 2.5	4.0	1.1851	94.87
4	" "	" " pH 3.5	3.6	1.1551	95.83
5	" "	" " pH 4.5	4.0	1.2118	94.11
6	" "	" " pH 2.5	5.6	1.1197	96.73
7	" "	" " pH 3.5	4.4	1.2243	93.75
8	" "	" " pH 4.5	4.0	1.1851	94.87
9	A.niger O.Y	No.1'in sıvı enzim ekstraktı	14.0	1.1057	97.12
10	" "	No. 2 " " "	7.6	1.1230	96.63
11	" M	No. 3 " " "	7.4	1.1197	96.73
12	" "	No. 4 " " "	8.8	1.0883	97.62
13	" "	No. 5 " " "	8.4	1.0674	98.21
14	" E	No. 6 " " "	7.2	1.0883	97.62
15	" "	No. 7 " " "	11.2	1.0883	97.62
16	" "	No. 8 " " "	9.2	1.0883	97.62
17	A.niger O.Y	No.1'in aktip kömürle rengi alınmış sıvısı	15.2	1.1092	97.02
18	A.niger O.Y	No.2'nin diyaliz edilmiş sıvı	3.47	1.1511	95.83
19	" "	No. 1'in " " "	3.87	1.0883	97.62
20	" "	No. 2'in " " "	6.40	1.1301	96.73
21	" M	No. 3'ün " " "	6.80	1.1001	96.73
22	" "	No. 4'ün " " "	6.80	1.1511	95.83
23	" "	No. 5'in " " "	8.93	1.0883	97.62
24	" E	No. 6'ın " " "	4.13	1.1092	97.02
25	" "	1. Yıkama Suyu	4.8	4.3950	3.57
26	" "	2. Yıkama Suyu	2.8	4.4578	1.79

nılmıştır. A.niger M suşu ile elde olunan kültürlerin su ile ekstraksiyonu ve alkolle çöktürmeden sonra kurutma ile elde olunan saflaştırılmış enzimlerin en yüksek poligalaktronaz etkisi 3.5 pH'da saptanırken en düşük etki 4.5 pH'da yetiştirmede ortaya çıkmıştır. Pektinesteraz etkinliği ise 2.5 ve 4.5 pH'larda aynı ve 3.5 pH'ya göre daha yüksektir. A.niger E suşunda ise pektin esteraz etkinliği 2.5 pH'da en yüksek, 4.5 pH'da en düşük, poligalaktronaz etkinliği ise yine 2.5 pH'da en yüksektir. Aynı mantar kültürlerinin sulu ekstraktlarında pektinesteraz A.niger için 3.5-4.5 pH'larda poligalaktronaz 4.5 pH'da en yüksek etkiyi göstermiştir. A.niger E için en yüksek pektinesteraz etkinliği 3.5 pH'da bulunmuş poligalaktronaz etkinliği her üç pH'da değişmemiştir. Bu sonuçlara göre pektinaz enzimi üretiminde ortamın pH'sı kullanılan mantar suşuna bağlı olarak büyük önem taşımaktadır. Yani enzimin etkinliği kullanılan suşa, ortam pH'sına ve saflaştırma işlemine bağlı olarak değişmektedir. Hatta değişik partilerde üretilen kültürlerde az da olsa farklı etkinlikte enzim elde edilmesi durumun çok karmaşık olduğunu ve üretimin sürekli özen istediğini ortaya koymaktadır.

Aktif kömürle muamelenin etkisinin araştırıldığı bir örnekte elde edilen sonuçlar, sulu ekstraktta renk ve koku maddelerini gidermek için aktif kömürden yararlanılabileceğini ortaya koymuştur. Çünkü kömürle muamelede pektinesterazın bir miktar arttığı ve poligalaktronazın değişmediği saptanmıştır (Tablo 2, Örnek 9 ve 17).

Temizlenmiş ve yağsızlandırılmış bağırsakla musluk suyuna karşı diyalize ise hem pektinesteraz, hem de poligalaktronaz etkinliklerinde az da olsa bir azalma izlenmiştir (Tablo 2).

Alkolle enzimin çöktürülmesi sırasında arta kalan ekstrakt sıvısında oldukça yüksek pektinesteraz etkinliği saptanmış, poligalaktronaz etkinliğinde ise % 3.57'lik bir değer ortaya çıkmıştır. Birinci tortunun suda çözünmesi ve yeniden alkolle çöktürülmesi ile her iki kayıp ta yaklaşık yarıya inmiştir.

### Kuru enzim verimi

Araştırma sırasında kuru enzim üretiminde verimin değişik etkenlere bağlı olduğu saptanmıştır. Örneğin mantar suşu, yetiştirme pH'sı çöktürmede kullanılan alkol miktarı ve kullanılan hammadde elde olunan enzim miktarı üzerinde etkin görünmektedir. 100 g (havada kuru) mantar kültürü esas alınarak yapılan verim denemelerinde 2.5 pH'da A.niger O.Y. 4.06 g kuru enzim verirken, A.niger M 3.91 g A.niger E ise 2.42 g enzim verimi sağlamışlardır. A.niger M 2.5 pH'da 3.91 g, 3.5 pH'da 4.93 g ve 4.5 pH'da 4.87 g; A.niger E ise 2.5 pH'da 2.42 g, 3.5 pH'da 5.12 g ve 4.5 pH'da 4.24 g enzim verimine ulaşmıştır. Tüm bu verimler üretimde ayçiçek tablası ve çöktürmede 1: 1.5 alkol kullanıldığında elde edilen enzim miktarını göstermektedir. Ayrıca A.niger O.Y. ile yapılan üretimlerde buğday kepeği kullanılması durumunda ortalama 2.84 g verim elde edilirken, ayçiçek tablası kullanıldığında 2.5 g enzim verimine ulaşılmıştır. Ayçiçek tablası ve A.niger O.Y. ile 2.5 pH'da yapılan fakat 1: 1.5 ve 1:3 alkolle çöktürmede verim sırasıyla 4.06 ve 2.5 g olmuştur. Bu da çöktürmede alkol oranının artmasının verimi düşürdüğünü göstermektedir. Bu ise alkol miktarının artması ile protein yapısında olup çöken enzimlerin bir bölümünün çökmeden sonra yeniden suda çözünemez bir özellik kazanması ve lipitler ve diğer bazı maddelerin enzimle birlikte çökmesiyle açıklanabilir (Keay ve ark. 1972).



Tüm bu bulgulardan başka normal su ile hazırlanan ortamda 2.5 pH'daki ortama göre A.niger O.Y. ile 0.7 g'lik bir verim artışı saptanmıştır. Bu da adı geçen mantar süşunun düşük pH'da veriminin daha az oluşu ile ilgilidir. Ancak enzim veriminin her zaman enzim etkinliği ile aynı yönde artış göstermediğini hemen belirtmekte yarar vardır. Onun için enzim etkinliği ve verimi arasındaki ortak koşulların ekonomik olduğu nokta üretimden önce mutlaka saptanmalıdır.

## TARTIŞMA

Bu araştırmada pektinaz üretimi için ayçiçek tablasının en az buğday kepeği kadar uygun olduğunu ve hiçbir ekonomik değer taşımayan ve yalnızca bazı yörelerde yakacak olarak kullanılan bu hammaddenin kullanımı ile kepeğin daha ekonomik kullanım amaçlarına ayrılabilmesi ortaya konmuştur. Ayrıca birçok teknik olanaklardan yoksun laboratuvar koşullarında bile üretilen enzimin ticari enzim preparatlarına yakın düzeyde etkinlik göstermesi yurt içi gereksinimin yerli üretimle karşılanabileceğini ortaya koymaktadır. Sulu enzim ekstraktından enzimin çöktürülmesinde kullanılan alkol miktarı kaynaklarda belirtildiği gibi (Rehm 1967) 3-4 katı değil 1.5 katı şeklinde hesaplanmalıdır. Diğer enzim üretimlerinde aynı oran başka araştırmacılarca da verilmiştir (Keay ve ark. 1972). Kullanılan alkolün basit bir damıtma kolonu yardımıyla geri kazanılması üretimde bu yönde önemli bir maliyet artışı getirmeyecektir. Enzim üretiminde kullanılan mantar süşlarının en yüksek verimle enzim üretimi için koşulların değişebildiği bu nedenle koşulların kullanılan süşa göre mutlaka ayarlanması gerektiği ortaya çıkmıştır.

## LİTERATÜR

- Rehm, H.J. 1967. Industrielle Mikrobiologie. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York, 643 s.
- Tuttobello, R. and P.J. Mill, 1961. The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger*. 1. The Production of Active Mixtures of Pectic Enzymes. *Biochem. J.* 79, 51.
- Mill, P.J. and R. Tuttobello, 1961. The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger*. 2. Endopolygalactronase. *Biochem. J.* 79, 57.
- Keay, L.K., M.H. Moseley, R.G. Anderson, R.J. O'connor and B.S. Wildi, 1972. Production and Isolation of Microbial Proteases. *Biotech. and Bioeng. Symp. No.* 3, 63-92.
- Wang., M.C. and N.T. Keen, 1970. Purification and Characterization of Endopolygalactronase from *Verticillium albo-atrum*. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 141, 749-757.
- Kaji, A. and T. Okada, 1969. Purification and Properties of an Unusual Acid-Stable Endo-Polygalactronase Produced by *Corticium rolfsii*. *Arch. of Biochem and Biophys.* 131, 203-209.
- Call, H.P. und C.C. Emeis, 1978. Pektinolytische Aktivitäten von Laktose und Milchsäure assimilierende Hefen. II. Charakterisierung der pektinolytischen Enzyme. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 5, 143-149.
- Lanzarini, G. and A. Zamorani, 1975. Some Simple Methods for The Purification of Pectic Enzymes from *Aspergillus usarii*. *J. Sci. Fd. Agric.* 26, 197-205.