

## PEKTİNAZ ENZİMİNİN FARKLI İKİ DESTEK ÜZERİNE İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU\*

*Immobilization of Pectinase onto Two Different Support and Its Characterization*

Fadile YENER  
Kimya Anabilim Dalı

Güzide YÜCEBİLGİÇ  
Kimya Anabilim Dalı

### ÖZET

Bir enzim kompleksi olan Pektinaz enzimi alginat ve florisil destek üzerine immobilize edilmiştir. Belirlenen optimum koşullarda serbest ve immobilize Pektinaz için maksimum aktivite sırasıyla 69.4 ve 20.7 U/mg protein olarak ölçülmüş,  $K_M$  değerleri sırasıyla 8.04 ve 0.36 mg/ml olarak belirlenmiştir. Immobilize Pektinaz'ın tekrar kullanılabilirliği kesikli, karıştırılmalı reaktör modelinde araştırılmış ve 20 kullanımdan sonra immobilize Pektinaz'ın başlangıçtaki aktivitesinin % 94'ünü koruduğu belirlenmiştir. Florisil destek üzerine yapılan immobilizasyonda, denenen koşullarda enzimin desteğe bağlandığı bağlandıktan sonra aktivite göstermediği gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Pektik enzimler, exopoligalakturonaz, alginat, florisil.

### ABSTRACT:

Pectinase enzyme, a enzyme complex, was immobilized onto alginate and florisil support. Maximum activity of free Pectinase was measured as 69.4 U/mg protein and maximum activity of immobilize Pectinase was measured as 20.7 U/mg protein at predetermined optimum conditions. The  $K_M$  values for free and immobilized Pectinase were determined as 8.04 and 0.36 mg/ml, respectively. Reusability of the immobilized Pectinase was investigated in a batch type stirred reactor. After 20 reuses, the residual activity of immobilized Pectinase was about 94 % of its initial activity. In the immobilization onto the florisil support, it was observed that the enzyme was bound to the support. However, no activity was observed.

**Keywords:** Pectic enzymes, exopolygalacturonase, alginate, florisil.

### Giriş

Pektik enzimler, genelde polisakkaritleri parçalayan zincir kırıcı enzimler olarak bilinmektedirler. Bitki hücrelerinin orta lamelinin ve primer hücre duvarının yapısını oluşturan pektik asit ve pektini parçalayan bu enzimler bakteri, mantar, böcek, nematod ve protozoada bulunmaktadır. Pektin molekülünde bulunan metanol ile esterleşmiş galakturonik asit miktarının % 50'nin altında ve üstünde olmasına göre düşük ve yüksek esterleşme dereceli pektin şeklinde değerlendirme yapılmaktadır (Acar ve Gökmen, 2004).

---

\* Yüksek Lisans Tezi- MSc Thesis

Pektinin yapısında poligalakturonik asit, rhamnogalakturonik asit, galaktanlar ve arabinogalaktanlar vardır (Celestino ve ark., 2006). Bitkisel kaynaklı pektik enzimler oldukça yüksek molekül ağırlıklı pektik asitleri tercih ederler ve pektatların indirgeyici olmayan uçlarına atak yaparak monogalakturonat oluştururlar. Oligo ve digalakturonatları da parçalarlar. Pektolitik enzimlerin biyosentezi indüksiyon veya katabolik represyon mekanizması ile kontrol edilir (Telefoncu, 1997).

Pektik maddelere etki eden ve kısaca pektik enzimler denilen grupta çok sayıda enzim yer almaktadır (Sunnotel ve Nigam, 2002). Pektik enzimleri, pektin molekülünün galakturonan omurgasına olan etkilerine göre pektinesterazlar (ester bağına hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayırarak incelemek olasıdır (Aksöz, 1985). Depolimerazlar, pektik maddeler üzerinde iki farklı mekanizmayla çalışırlar. Birincisi, glikozidik bağları hidroliz eden hidrolitik reaksiyon. İkincisi, glikozidik bağları su katılması olmaksızın kıran trans-eliminasyon reaksiyonu. Depolimerazların bu sınıfı liyazlar olarak adlandırılır. Bu farklı kırılma reaksiyonları pektinazların sınıflandırılmasında kullanılır (Soares ve ark., 1999).

Alginat tersine çevrilebilir çözünür-çözünmez bir polimerdir. Ayrıca  $Ca^{+2}$  iyonları varlığında çöktürülebilir bir polisakarittir. Toksik etkisinin olmaması, pahallı olmaması ve kolay uygulanabilir olması alginatı endüstriyel amaçlar için kullanışlı hale getirmektedir (Roy ve ark., 2003).

### **Materyal ve Metot**

#### **Materyal**

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup Merck veya Sigma, St. Louis, MO. firmasından sağlanmıştır.

#### **Metot**

Pektinaz'ın alginat destek üzerine immobilizasyonunda Mondal ve ark.(2003), tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. 30 µl enzim çözeltisi (3,75 mg/ml) pH 5.0 sodyum asetat tamponu ile 1 ml'ye tamamlanmış ardından % 2'lik 2 ml alginat çözeltisi eklenmiş ve son hacim asetat tamponu ile 4 ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı 3M asetik asitle pH 3,8'e getirilmiştir. 25°C'de bir saat bekletildikten sonra 2M  $CaCl_2$  eklenmiş ve 20 dk sonra santrifüj edilmiştir. Immobilizasyon işleminden sonra immobilize enzim saf su ile süzültüde protein kalmayınca kadar yıkanmıştır. Toplam süzültüde protein tayini yapılarak g destek başına tutuklanan mg enzim miktarı hesaplanmıştır. Protein tayini Lowry(1951) metoduna göre yapılmıştır.

Pektinaz'ın florisil üzerine immobilizasyonunda önce florisil destek yüzeyi aktiveştirilmiştir. Bunun için 3- aminopropiltrietoksisilan kullanılarak desteğin alkilamin türevi oluşturulmuştur. Alkilamin türevinin hazırlanmasında (silanlama) Weetall, H.H. (1976) tarafından literatürde bildirilen yöntem

kullanılmıştır. Silanlanmış desteğe glutraldehit bağlandıktan sonra enzim destek üzerine doğrudan immobilize edilmeye çalışılmıştır (Costa ve ark., 2001).

Pektinaz enzim kompleksindeki exopoligalakturonaz aktivitesi tayini için Debing ve ark., (2006)'nın önerdiği yöntem kullanılmıştır. Immobilize Pektinaz içeren 0,2 g destek % 1'lik pektin çözeltisinin 250 µl'si ile 45 °C'de 10 dk etkileştirilmiş ve reaksiyon 300 µl DNSA reaktifi ile durdurulmuştur. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz alınmıştır. Galakturonik asit içeren örnekler seyreltikten sonra, ortamdaki indirgen şeker miktarı Sumner, (1921) tarafından önerilen Miller, (1959) tarafından geliştirilen DNSA metoduna göre belirlenmiştir. Açığa çıkan galakturonik asit miktarı standart eğriden yararlanılarak bulunmuştur. Immobilize Pektinaz'ın aktivitesi µmol galakturonik asit dk<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> destek olarak hesaplanmıştır.

Immobilize Pektinaz'ın aktivitesine pH'nın etkisini araştırmak için farklı pH'larda (3.5-5.0 asetat, 6.0 sitrat) 25 mM tampon içinde hazırlanmış % 1'lik pektin çözeltisi kullanılmıştır. 10 dakika sonunda oluşan galakturonik asit miktarı ölçülerek aktivite hesaplanmış ve sonuçlar % maksimum aktivite olarak pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.

Immobilize Pektinaz'ın aktivitesine iyonik gücün etkisini belirleyebilmek için daha önce belirlenmiş olan optimum pH'larda ve farklı tampon derişimlerinde (5, 10, 25, 50, 75, 100 mM) hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılmıştır.

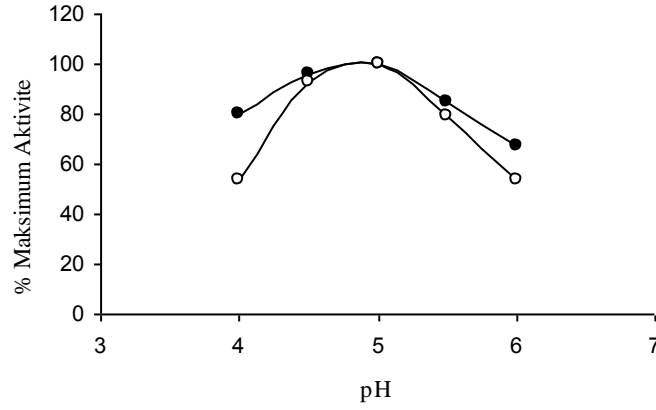
Immobilize Pektinaz'ın aktivitesinin sıcaklıkla değişimini incelemek için daha önce belirlenmiş olan optimum pH ve tampon derişiminde hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılarak farklı sıcaklıklarda (35, 40, 45, 60°C) aktivite tayini yapılmıştır.

Serbest ve immobilize Pektinaz'ın aktiviteleri optimum şartlarda farklı substrat derişimlerinde ölçülmüş ve Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla K<sub>M</sub> ve V<sub>max</sub> değerleri belirlenmiştir. Ayrıca serbest ve immobilize Pektinaz için katalitik etkinlik parametreleri hesaplanmıştır.

Immobilize Pektinaz'ın tekrar kullanım kararlılığı belirlenirken kesikli ve karıştırmalı kolon reaktör kullanılmıştır. 1 g immobilize Pektinaz 1 ml % 1'lik pektin çözeltisi bulunan kolona eklenmiş ve 10 dakika sonunda alttaki musluğun açılması ile kolon boşaltılmıştır. Enzim aktivitesi oluşan galakturonik asit miktarı ölçülerek hesaplanmıştır. Kolon boşaltıldıktan 30 sn sonra aynı kolona tekrar 1 mL substrat çözeltisi eklenerek aynı şekilde aktivite belirlenmiş ve bu işlem 20 kez tekrarlanmıştır. Kalan aktivite ilk kullanımdaki aktivitenin %'si olarak hesaplanmıştır.

#### **Araştırma Bulguları ve Tartışma**

Optimum koşullar, immobilizasyon metoduna, desteğin türüne v.b. bağlı olarak serbest ve immobilize enzimler için farklılıklar gösterirler. Serbest ve alginata immobilize edilmiş Pektinaz'ın aktivitesine pH'nın etkisini araştırmak için 3.5-6.0 aralığındaki farklı pH'lardaki tampon çözeltileri kullanıldı. Sonuçlar Şekil 1'de gösterilmektedir.

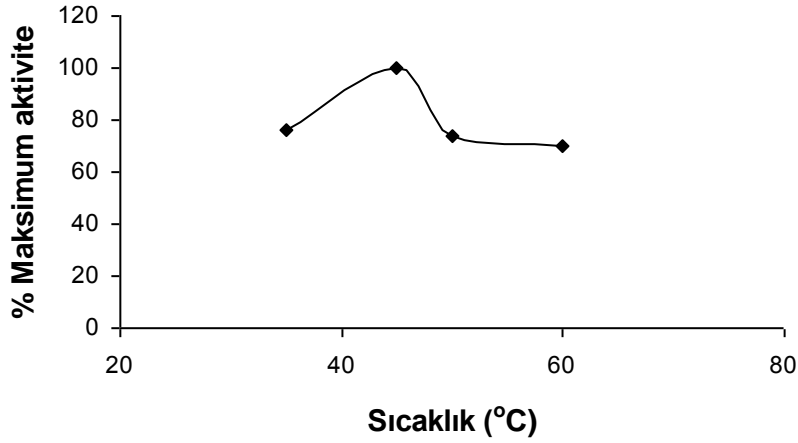


Şekil 1. Serbest ve İmmobilize Pektinaz aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi (●):İmmobilize Pektinaz, (○):Serbest Pektinaz

Serbest ve immobilize Pektinaz için maksimum aktivitenin görüldüğü pH değeri değişmemiş ve 5.0 olarak kalmıştır. farklı desteklere değişik yöntemlerle immobilize edilmiş olan Pektinaz enzimi için pH 3.0-5.0 aralığında değişen farklı optimum pH değerleri rapor edilmiştir (Li ve ark., 2007).

İmmobilize Pektinaz için iyonik gücün aktiviteye etkisi araştırılmış ve maksimum aktivitenin görüldüğü tampon derişimi 25 mM olarak hesaplanmıştır. Genel olarak enzimatik reaksiyonlarda ortamdaki iyonların miktarı enzimin aktivitesini ve kararlılığını etkilemektedir. Düşük iyon derişimi enzimin kararlılığını sağlamada yetersiz kalabileceği gibi, reaksiyon ortamında bulunan yüksek orandaki iyon miktarı enzim ile substratının etkileşiminin azalmasına neden olabilmektedir.İmmobilize Pektinaz için tampon derişiminin artmasıyla birlikte aktivitede de büyük oranda bir azalma görülmüştür.

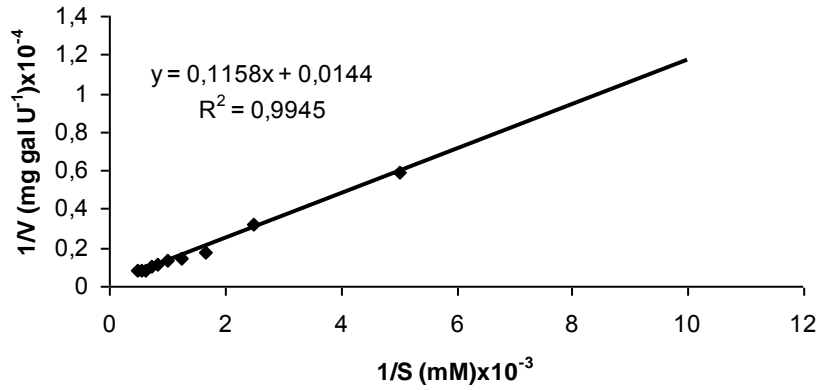
İmmobilize Pektinaz'ın maksimum aktivitesini gösterdiği sıcaklığı belirlemek için 35-60°C sıcaklık aralığı kullanıldı. % maksimum aktivite-sıcaklık grafiği Şekil 3'de gösterilmektedir.İmmobilize Pektinaz için optimum sıcaklık 45°C olarak belirlenmiştir.İmmobilize Pektinaz 50°C'de başlangıç aktivitesinin %73.5'ini gösterirken 60°C'de başlangıç aktivitesinin % 70'ini göstermektedir.Literatürde Pektinaz enzim kompleksleri için 40-60°C arasında farklı optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir (Li ve ark., 2007; Chellegatti ve ark., 2002).



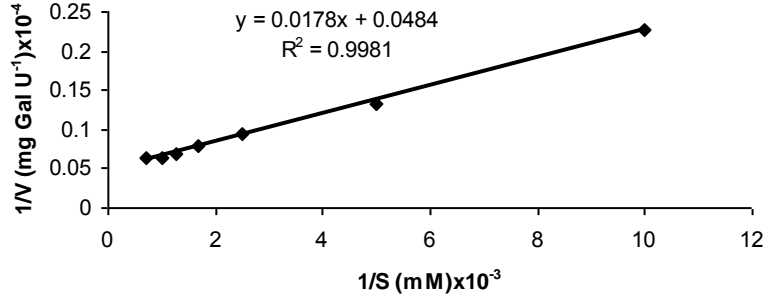
Şekil 3. Immobilize Pektinaz'ın aktivitesine sıcaklığın etkisi

Serbest Pektinaz için 50 mM, pH 5.0 asetat tamponu içerisinde hazırlanan farklı substrat derişimleri kullanılarak 50°C'de belirlenen aktivite değerleri ile elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4'de gösterilmektedir.

İmmobilize Pektinaz için önceden belirlenmiş optimum koşullarda hazırlanan farklı substrat derişimlerinde, belirlenen aktivite değerleri kullanılarak elde edilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 5'de gösterilmektedir.



Şekil 4. Serbest Pektinaz için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 5. İmmobilize Pektinaz için Lineweaver-Burk grafiği

Serbest ve immobilize Pektinaz için  $K_M$ ,  $V_{max}$  ve  $V_{max}/K_M$  değerleri her bir enzim için çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanarak bulunmuştur. Bu sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmektedir.

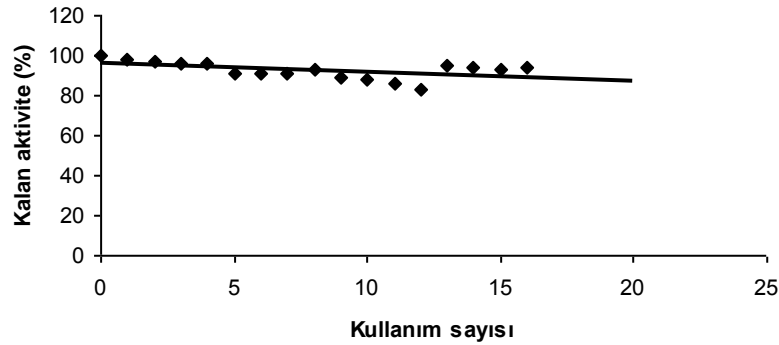
Çizelge 1. Serbest ve immobilize Pektinaz'ın kinetik parametreleri

	Serbest Pektinaz	İmmobilize Pektinaz
$K_M$ (mg/ml)	8,04	0.37
$V_{max}$ (µmolgalakturonik asit/mg protein.dk)	69,4	20,7
$V_{max} / K_M$	8.63	55.9

Çizelge 1'de görüldüğü gibi immobilize Pektinaz'ın  $K_M$  ve  $V_{max}$  değerlerinin ikisinde azalmıştır. Buna göre katalitik etkinlik olarak tanımlanan  $V_{max} / K_M$  değerinin serbest enzim için 8,63 iken, immobilize enzim için bu değer 55,9 olarak hesaplanmıştır. İmmobilize enzimin katalitik etkinliği serbest enzime göre yaklaşık 6.5 kat artmıştır. İmmobilizasyon işlemi sonunda enzimin desteğe bağlanma miktarının yüksek olmasına rağmen (yaklaşık %83) immobilize Pektinaz'ın aktivitesinin daha düşük görülmesi desteğe tutuklanan enzim molekülünün hareketinin kısıtlanmış olmasına ve üç boyutlu yapısında oluşabilecek değişime bağlanabilir. Bunun dışında destek çevresinde proteinlerin üst üste birikerek difüzyon problemlerinin görülmesi söylenebilir.

Literatürde enzimin katalitik etkinliğinin bir ölçüsü olarak  $V_{max} / K_M$  değeri kullanılmıştır.  $V_{max}/K_M$  değerinin endüstriyel uygulamalarda en etkili enzimin seçimi için kullanışlı bir parametre olduğunu rapor etmişlerdir (Roy, 2003; Ortega, 2004; Sardar, 2005).

İmmobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılması maliyet açısından endüstriyel alanda en önemli faktördür. İmmobilize Pektinaz'ın tekrar kullanım kararlılığını gösteren grafik Şekil 6'da verilmektedir. Önceden belirlenmiş optimum koşullarda kesikli reaktörde 20 kullanımdan sonra kalan aktivite başlangıç aktivitesinin % 94'üdür.



Şekil 6. İmmobilize Pektinaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı

Pektinaz enzimi gluteraldehitte aktifleştirilmiş florasil destek üzerine yaklaşık % 72 bağlanma yüzdesiyle bağlanmıştır. Fakat enzim bağlandıktan sonra aktivitesini kaybetmiş yani inaktif hale gelmiştir. Enzimin aktivite göstermemesi amino grubu üzerinden olan bağlanma bölgesinin enzimin aktif bölgesi olduğunu düşündürmektedir.

#### Kaynaklar

- ACAR, J., GÖKMEN, V., 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Cilt 1-Meyve ve Sebze Suları Üretimi, 674 s.
- AKSÖZ, E., AKSÖZ, N., 1985. Pektik Enzimler (derleme).Biyokimya Dergisi,10:38-51.
- BUSTO, M.D., TRAMONTIN, K.E.G., ORTEGA, N., MATEOS, M.P., 2006. Preparation and Properties of an Immobilized Pectinlyase for the Treatment of Fruit Juices. Bioresoure Technology, 97:1477-1483.
- CHELLEGATTI, M.A., SAID, S., 2002. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. Microbiological Research, 157:19-24.
- CELESTINO, S.M.C., FREITAS, S.M., MEDRANO, F.J., SOUSA, M.V., FILHO, E.X.F., 2006.Purification and Characterization of a Novel Pectinase from *Acrophialophora nainiana* with Emphasis on Its Physicochemical Properties. Journal of Biotechnology, 123:33-42.
- COSTA, S.A., TZANOV, T., PAAR, A., GUDELJ, M., GUBITZ, G.M., PAULO, A.C., 2001. Immobilization of Bacillus SF on Alumina for the Treatment of Textile Bleaching Effluents. Enzyme and Microbial Technology, 28:815-819.

- DEBING, J., PEIJUN, L., STAGNITTI, F., XIANZHE, X., LI, L., 2006. Pectinase Production by Solid Fermentation form *Aspergillus niger* by a New Prescription Experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64:244-250.
- LI, T., W, N., LI, S., ZHAO, Q., GUO, M., ZHANG, C., 2007. Optimization of Covalent Immobilization of Pectinase on Sodium Alginate Support. *Biotechnol Lett*, 29:1413-1416.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- MILLER, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31:426-428.
- MONDAL, K., MEHTA, P., GUPTA, M.N., 2004. Affinity Precipitation of *Aspergillus niger* Pectinase by Microwave-treated Alginate. *Protein Expression and Purification*, 33:104-109.
- ORTEGA, N., DIEGO, S., MATEOS, M.P., BUSTO, M.D., 2004. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry* 88:209-217.
- ROY, I., SARDAR, M., GUPTA, M.N., 2003. Evaluation of Smart Bioconjugate of Pectinase for Chitin Hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 16:329-335.
- ROY, I., SARDAR, M., GUPTA, M.N., 2003. Hydrolysis of Chitin by Pectinex. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:582-588.
- SARDAR, M., GUPTA, M.N., 2005. Immobilization of Tomato Pectinase on Con A-Seralose 4B by Bioaffinity Latering. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:355-359.
- SOARES, M.M.C.N., SILVA, R., GOMES, E., 1999. Screening of Bacterial Strains for Pectinolytic Activity: Characterization of the Polygalacturonase Produced by *Bacillus sp.* *Revista de Microbiologia*, 30:299-303.
- SUMNER, J.B., 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.* 47:5-9.
- SUNNOTEL, O., NIGAM, P., 2002. Pectinolytic Activity of Bacteria Isolated from Soil Two Fungal Strains During Submerged Fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18:835-839.
- TELEFONCU, A., 1997. *Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu*. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446 s.
- WEETHALL, H.H., 1976. Covalent Coupling Methods for Inorganic Support Metarials. *Methods of Enzmology*, 44:134-148.