

Ekmek Mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) Fabrika Artıklarından Ham İnvvertaz Enzimi Üretimi


The Production of Crude Invertase From The By-products of Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Factory

Neşe ÖZDİNÇ¹, Hasan Murat VELİOĞLU^{1,*}

Öz

İnvvertaz enzimi ülkemizin dışa bağımlı olduğu gıda katkı maddelerinden bir tanesidir. Endüstriyel anlamda invvertaz enziminin kullanım alanları; invert şeker şurubu üretimi, çikolata üretimi, frukto-oligosakkarit sentezi ve bebek gıdası üretimi şeklinde sıralanabilir. Yerli kaynaklardan, düşük maliyetle invvertaz enzimi üretimi konusunda yapılacak çalışmalar ülkemizin katkı maddelerinde dışa bağımlılığının azaltılmasına hizmet edecektir. Bu çalışmada endüstriyel ekmek mayası üretiminde artık olarak açığa çıkan eleküstü mayadan ham enzim ekstraktı üretilmesi amaçlanmıştır. Eleküstü mayadan ekstrakte edilen ve ham enzim ekstraktı olarak tanımlanabilecek, yüksek invvertaz aktivitesine sahip ürün (i) püskürtülerek kurutulmuş, (ii) liyofilize ve (iii) ham enzim ekstraktı halinde aktivite ölçümüne tabi tutularak (iv) ticari muadili ile karşılaştırılmıştır. Her örnek öncelikle sabit sıcaklık 40°C ve 4-7 arası değişen pH değerlerinde enzim aktivitesi yönünden incelenmiştir. Bu analizler sonucunda belirlenen optimum pH değeri sabit tutularak bu kez 30-65°C aralığında optimum çalışma sıcaklığının belirlenmesi denemeleri yürütülmüştür. Yapılan çalışmalara göre sıcaklığın sabit tutulduğu pH denemelerinde, tüm ürünlerde optimum pH 4.5 olarak tespit edilmiştir. pH değerinin optimize edilmesinin ardından gerçekleştirilen sıcaklık optimizasyonu çalışmasında ise ham enzim ekstraktının en yüksek invvertaz aktivitesi gösterdiği sıcaklık 40°C olarak tespit edilmiştir. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinde yapılan aktivite ölçümleri sonucunda, ticari invvertaz enziminde 3.30 U/mL, püskürtmeli kurutucudan elde edilen üründe 2.90 U/mL, liyofilize üründe 2.93 U/mL ve son olarak ham enzim ekstraktında 1.73 U/mL invvertaz aktivite değerleri bulunmuştur. Veriler incelendiğinde 60°C üzerindeki sıcaklıkların ve pH 5 değeri üzerindeki pH seviyelerinin enzim aktivitesini olumsuz etkilediği gözlenmiştir. Çalışma sonucunda endüstride artık olarak değerlendirilen ve genelde hayvan yemi olarak oldukça ucuz fiyata satışı yapılan artık bir maddenin enzim kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ekmek mayası, İnvvertaz, Enzim aktivitesi, Optimizasyon, Karakterizasyon

¹: Neşe ÖZDİNÇ. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, B Blok, Tekirdağ, Türkiye. E-mail: nescozdn@gmail.com  ORCID: 0000-0001-7523-4387

²* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Hasan Murat Velioglu. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, B Blok, Tekirdağ, Türkiye.

E-mail: mvelioglu@nku.edu.tr  ORCID: 0000-0002-8275-6965

Atıf/Citation: Özdiñç, N., Velioglu, H.M. Ekmek Mayası (*Saccharomyces cerevisiae*) Fabrika Artıklarından Ham İnvvertaz Enzimi Üretimi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (2), 456-464.

*Bu çalışma Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

©Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi tarafından Creative Commons Lisansı (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) kapsamında yayınlanmıştır. Tekirdağ 2022

Abstract

Invertase enzyme is one of the food additives that our country is dependent on foreign sources. Industrial usage areas of invertase enzyme are invert sugar syrup production, chocolate production, fructo-oligosaccharide synthesis and baby food production. Studies on the production of invertase enzyme from domestic sources at low cost will serve to reduce the foreign dependency of our country in additives. In the present study, the production possibility of invertase enzyme from sieve residue yeast, by-product of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) factory, was investigated. Crude enzyme extracts obtained from sieve residue yeast (i) spray dried, (ii) lyophilized and (iii) collected in aqueous form were compared with (iv) industrial invertase enzyme sample in terms of enzymatic activity. Every sample was analyzed for enzymatic activity at constant temperature (40°C) and at different pH values between 4 and 7 in order to find out the optimum pH value for highest enzymatic activity. Then, the pH value was kept constant at optimum value and the enzymatic activity was determined at different temperature levels between 30- 65°C. Optimum pH value was determined as 4.5 for all samples and the enzymatic activity was found as 3.30, 2.90, 2.93 and 1.73 U/mL for industrial invertase enzyme, spray dried, lyophilized and aqueous extract, respectively. The analysis at optimum pH of 4.5 and at different temperatures showed that the highest enzymatic activity was screened at 40°C for all samples. Additionally, there was a significant loss of enzymatic activity over 60°C for all samples. Finally, the study showed that sieve residue yeast has a usage potential in invertase production. While this by-product is sold at low price for animal feeding purposes, advanced purification techniques can be used to create value-added product in this sector.

Keywords: Baker's yeast, Invertase, Enzyme Activity, Optimization, Characterization

1. Giriş

Kimyasal tepkimelerin hızını arttıran biyomoleküllere enzim adı verilmektedir. Enzimler, kimyasal tepkimeleri koordine eden protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir. (Garret ve ark. 1999). Kimyasal tepkimenin başlangıcında enzimlerin etki ettiği maddeler substrat, tepkime sonucu olarak artan ve açığa çıkan madde de ürün olarak adlandırılır.

Enzimlerin mikroorganizma, bitki ve hayvanların canlı hücreleri tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Yaşam için gerekli (elzem) olan enzimler, *in vivo* (hücre içinde) ve *in vitro* (hücre dışında) koşullarda aktivite gösterirler.

Enzimler, endüstride kullanılan kimyasal katalizörlerle kıyaslandığında kullanımı oldukça kolay ajanlar olup, yüksek katalitik etkinlikleri ve sahip oldukları spesifik özellikleriyle öne çıkmaktadır. Enzimler substrat özgüllüğüne sahip olmasından dolayı, tek bir son ürün oluşumunu sağlamakta ve gereksiz yan ürünün oluşmasını da engellemektedir. Bu durumda, yüksek tepkime verimi sağlamasından dolayı üretim maliyetini düşürmektedir. Çevre boyutuna bakılırsa, enzimlerin protein yapıya sahip olmaları biyolojik olarak bozunabilmelerine imkân tanır, böylelikle artık yönetimini kolaylaştırır (Krajewska, 2003; Aehle, 2004; Kasavi, 2006; Özçömlekçi 2006).

İnvvertaz (-fruktofuranozidaz, E.C 3.2.1.26) enzimi, sakkarozun früktoz ve glukozu çevrilmesinde kullanılan biyolojik katalizördür. İlk olarak keşfedilen enzimler arasında olan invvertaz, ekmekek mayasından izole edilmiştir. İnvvertaz enzimi kimliği belirlenen proteinler arasında en önemli enzimlerden birisidir. Enzim kinetiğinin prensiplerinin çıkartılmasında kullanılmıştır (Michaelis ve Menten, 1913).

Tarımsal üretim ve gıda endüstrisinde invvertaz enzimi kullanımı yaygındır, bunlara örnek olarak; şekerleme sanayiinde uygulamalar, ekmekekçilik sektörü uygulamaları, şeker kamışı melasının etanole fermantasyonu, invvert şeker şuruplarının hazırlanması, silaj üretimi verilebilir (Polat ve ark., 2005; Velioglu ve Çelikyurt, 2016). Literatür incelendiğinde proteinler ve enzimlerin saflaştırılması, farklı enzimlerin aktivitelerinin hesaplanması, enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması konusundaki çalışmalar oldukça dikkat çekicidir. Son yıllarda farklı kaynaklardan enzim eldesi, artık ve atıkların geri kazanımı yoluyla enzim üretimi konularında yapılan bilimsel çalışmaların sayısı artmıştır. Ülkemizde endüstriyel gıda üretiminde ortaya çıkan artıkların değerlendirilmesi ve yeniden ekonomiye kazandırılması konusunda yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Dünyanın en büyük ekmekek mayası üreticilerinden olan ülkemizde bu sektörün artıkları konusunda yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada, maya fabrikası artığı elek üstü mayadan elde edilen püskürtülerek kurutulmuş, liyofilize edilmiş, ham enzim ekstraktı ve ticari enzim formları kullanılarak farklı sıcaklık ve pH aralıkları denenerek invvertaz aktivite tayini yapılması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçların endüstriyel bir artığın yeniden değerlendirilmesi konusunda yeni veriler sağlayabileceği öngörülmüştür.

2. Materyal ve Metot

Çalışma kapsamında invvertaz enziminin elde edileceği hammadde olarak kullanılan eleküstü maya, ekmekek mayası (*Saccharomyces cerevisia*) üretimi gerçekleştiren Lesaffre Turquie A.Ş fabrikasından temin edilmiştir. Çalışma kapsamında karşılaştırma amacıyla kullanılan ticari toz invvertaz enzimi yerel bir tedarikçiden temin edilmiştir.

2.1. Eleküstü Mayanın Hidroliz İşlemi

Temin edilen eleküstü maya topaklanmış halde olduğundan havanda toz hale getirilmiştir. Ultrasonikasyon öncesi örneğin çözdürülmesinde kullanılacak pH 7.6'lık 50 mM sodyum fosfat tamponu, 8.9 g Na₂HPO₄ * 2H₂O 1000 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlanmış ve pH değeri 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak sabitlenmiştir.

10 g örnek üzerine 500 mL saf su eklenerek manyetik karıştırıcıda 15 d boyunca tam bir çözünme sağlanacak şekilde karıştırılmıştır. Homojen hale gelen sıvı karışımdan 250 mL alınarak ayrı bir kaptan 250 mL tampon çözelti ile karıştırılmıştır. Ultrasonikatör (Q Sonica, Q125, LLC, NY, ABD) ile 20 KHz frekansta 10 s süreli 8 tekrarda parçalanmış hücre yapısından salınan proteince yoğun sıvı kısmın ortamdan toplanması için santrifüj aşamasına geçilmiştir. Karışımdan 50 mL'lik falkon tüplerine aktarılan örnekler 10000 rpm'de 10 d boyunca oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir (Sigma, 3-18K, Almanya). Protein ve enzim açısından zengin olan, ham enzim ekstraktı olarak kabul edilen süpernatant falkon tüplerinden ağzı kapalı cam kaplara aktararak ileri analizler yapılınca dek buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

2.2. Püskürterek Kurutma

Püskürterek kurutma, sıvı örneklerin sıcak hava ortamına püskürtülmesiyle örneğin içindeki suyun evaporasyonu sonucunda toz halde elde edilmesine dayanan işlemdir. Püskürtülen örnek emülsiyon, süspansiyon veya solüsyon halinde olabilir. Elde edilen ürün de granül yapıya da partikül halinde olabilir. Sonuç olarak elde edilen ürünün formu, verilen solüsyonun özelliklerine göre ve kurutucunun dizaynına göre değişmektedir.

Ultrasonikasyon ve santrifügasyon sonrası elde edilen ham enzim ekstraktı püskürtmeli kurutucu (Büchi mini spray dry, B-290, İsviçre) kullanılarak, giriş sıcaklığı 90°C, çıkış sıcaklığı 53°C, emiş gücü %97, %20 vakum gücü ile kontrollü takip edilerek örnek toz hale getirilmiştir. Enzim aktivitesi çalışmalarında kullanılmaya yetecek bir miktar toplanana dek tekrar edilen kurutma işlemi neticesinde yaklaşık 10 g toz örnek ağız kapalı saklama kaplarında buzdolabı koşullarında ileriki analizlere kadar muhafaza edilmiştir.

2.3. Dondurarak Kurutma

Dondurarak kurutma (liyoofilizasyon) süspansiyon halde veya çözelti halinde bulunan ürünlerin dondurulması ve sonrasında süblimasyon yoluyla gaz fazının uzaklaştırılması yöntemine dayalı bir işlemdir. Bu aşamada ürünler katı halden sıvı faza geçmeden düşük basınca maruz kalarak kurutulmaktadır.

Ultrasonikasyon ve santrifügasyon sonrası elde edilen ham enzim ekstraktı liyoofilizatör (Christ, Alpha 2-4 LD Plus, Almanya) kullanılarak toz hale getirilmiştir. Örnekte su miktarının yüksek olması dolayı liyoofilizasyon işlemi neticesinde yarı yapışkan katı ürün elde edilmiştir. Elde edilen ürün buzdolabı koşullarında ileriki analizler için muhafaza edilmiştir.

2.4. İvertaz Aktivite Tayini

Çalışmada invertaz enzim aktivitesi belirlemek ve elde edilen ham enzim ekstraktının ticari muadili ile karşılaştırmasını yapmak amacıyla titrasyon yöntemi kullanılmıştır. Titrasyon yöntemiyle elde edilen sonuçlar elektü mayada invertaz varlığını ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır. Ham enzim ekstraktı (i), püskürtülerek kurutulmuş (ii), liyofile edilmiş (iii), ve ticari olarak temin edilmiş (iv) örnekler invertaz aktivitesi açısından değerlendirilmiştir.

Titrasyon metodu ile enzim aktivite tayini için, invertaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı olan 40°C'de pH aralıkları 4-7 arasında değişiklikler yapılarak aktivite ölçümüne alınmıştır. Ardından, ilk aşamada belirlenen optimum pH'da sıcaklık 30-65°C arasında değiştirilerek aktivite ölçülmüştür. Çalışmada analiz sırasında kullanılacak olan kimyasallar, titrasyon metodu ile enzim aktivite tayinine göre hazırlanmıştır.

Yapılan invertaz aktivitesi hesaplanması aşağıdaki eşitlik 1' e göre yapılmıştır.

$$Hacim\ aktivitesi\left(\frac{U}{mL}\right) = \Delta titre (b - t) \times F \times df \quad 0,600 \times Vs = \Delta titre \times F \times 1,66 \times df \quad (Eş.1)$$

U: Unit

mL :Mililitre

Δ titre: Titrasyon Farkı

b: Kör

t: Test

F: Konstrasyon Faktörü

df: Dilüsyon Farkı

0,600: 50 mM Na Titrasyon Farkı

1,66: Sabit

Vs: Örnek Hacmi

2.5 İstatistik Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri SPSS 22.0 paket programında tek yönlü varyans analizi (one way-ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu çıkan ortalamalar arasındaki farklılık, Duncan's çoklu karşılaştırma testi ile $P < 0.05$ düzeyinde test edilmiştir.

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

3.1. Ham Enzim Eldesi

Ön hazırlık aşamaları dikkate alındığında, ultrasonikasyon sonrası santrifüje alınan 1000 mL çözelti içerisinde 10 g eleküstü maya bulunmaktadır. Püskürtmeli kurutucuya beslenen 1000 mL süpernatanttan 2 g toz halde ham enzim elde edilmiş olup verim %20 olarak hesaplanmıştır. İkinci yöntem olan liyofilizasyonda ise cihaza konan 1000 mL süpernatanttan yaklaşık 6 g yarı yapışkan halde ham enzim elde edilmiştir. Kuru madde analizi de yapılan bu üründe verimin prosesin tamamı için %18 olduğu görülmüştür. Ham enzim ekstraktı olarak kullanılan süpernatant için herhangi bir verim hesabı yapılmamıştır. Her ne kadar ileri saflaştırma basamakları ile bu verimin bir miktar daha düşeceği kabul edilse de proses edilen her 100 g eleküstü mayadan yaklaşık 20 g ham enzim elde edilebileceği anlaşılmaktadır.

3.2. İnvertz Aktivite Tayini

Çalışma kapsamında aktivite tayini modifiye Fehling-Lehmann-Schoorl metodu kullanılarak yapılmıştır (Yamamoto ve ark. 1957). Titrasyon temelli bu methoda elde edilen aktivite dakikada bir mikromol sakkarozu hidrolize edebilen enzim aktivitesi olan birime eşittir. Bu metod kullanılarak; sıcaklık 40°C'de sabit tutulup 4-7 arasında değiştirilen pH değerleri ve tespit edilen optimum pH kullanılarak 30-65°C'de denemeler yapılmıştır.

3.2.1. Sabit Sıcaklık Değişen pH Değerlerinde Enzim Aktivite Tayini

Enzimler, protein yapısında bulduklarından yüksek sıcaklık enzimlerin yapısına ve aktivitesinin hesaplanmasına olumsuz sonuç göstermektedir. Bu sebepten yapılan araştırmalarda invertzın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40-45°C olarak verilmiştir (Jones ve ark. 1970; Mensonides ve ark. 2014). Çalışmamızda sıcaklık sabit tutulup, pH denemeleri için yapılan analizde sıcaklık 40°C olarak seçilmiştir. Çalışma neticesinde elde edilen sonuçlar *Tablo 1*'de sunulmuştur.

Tablo 1. Değişen pH değerlerinde enzim aktiviteleri

Table 1. Enzyme activities at different pH levels

pH	Enzim aktivitesi (U/mL)*			
	Ticari	Püskürtülerek kurutulmuş	Liyofilize	Ham ekstrakt
4.0	2.90±0.05 ^b	2.33±0.03 ^b	1.93±0.03 ^b	1.45±0.05 ^b
4.5	3.33±0.03 ^a	2.90±0.05 ^a	2.93±0.03 ^a	1.73±0.03 ^a
5.0	2.60±0.00 ^c	1.73±0.03 ^c	1.34±0.02 ^c	0.96±0.01 ^c
5.5	1.73±0.03 ^d	0.85±0.05 ^d	0.85±0.05 ^d	0.96±0.01 ^c
6.0	1.73±0.03 ^d	0.48±0.08 ^e	0.45±0.05 ^e	0.45±0.05 ^d
6.5	0.96±0.01 ^f	0.48±0.08 ^e	0.43±0.08 ^e	0.43±0.08 ^d
7.0	1.45±0.00 ^e	0.48±0.08 ^e	0.43±0.08 ^e	0.48±0.08 ^d

*Tablodaki enzim aktivitesi değerleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı üst indisle gösterilen değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır (P<0.05).

Tablo 1 incelendiğinde, ortam pH değerindeki değişimin 4 örnek için de enzim aktivite değerini önemli (P<0.05) şekilde değiştirdiği görülmektedir. pH 4.5 değeri her örnek için en yüksek aktivitenin tespit edildiği değer olarak öne çıkmaktadır. Enzimatik aktivitenin pH değerine bağlı değişimi *Şekil 1*'de görsel olarak daha anlaşılır olmaktadır.

Şekil 1'de sıcaklığın 40°C'de sabit tutulan ve pH aralıkları 4-7 arasında değiştirilen ürünlerin invertz aktivite değerleri verilmiştir. Ticari invertz (*Şekil 1a*) enziminin sonuçlarına bakıldığında, piyasadan satın alınan Tito marka ticari invertz enzimin prosedüre göre invertz aktivite değerleri verilmiştir. 40°C'de optimum pH 4.5'ta 3.30 U/mL, pH 6.5'ta ise en düşük aktivite değeri 0.96 U/mL olarak bulunmuştur. Püskürterek kurutulmuş (*Şekil 1b*) örnekten elde edilen sonuçlar incelendiğinde, sıcaklık yeniden 40°C'de sabit tutulup optimum aktivitenin bulunduğu pH değeri 4.5 invertz aktivite değeri 2.90 U/mL bulunurken, en düşük aktivitenin hesaplandığı pH değerleri 6/6.5 ve 7 olarak görülmektedir. Liyofilize (*Şekil 1c*) ürününden verilen invertz aktivite değerine göre optimum pH yeniden 4.5 olarak tespit edilirken, bulunan değer ise 2.91 U/mL olarak görülmektedir. Buna karşılık en düşük aktivitenin görüldüğü pH değeri 7 iken, buradaki aktivite değeri 0.43 U/mL olarak görülmektedir.

Son olarak ham enzim ekstraktı (*Şekil 1d*) invertz aktivitesine bakıldığında optimum pH 4.5 ve değeri 1.73 iken, en düşük aktivite pH 6.5'ta 0.43 U/mL olarak hesaplanmıştır. İnvertz aktivitesi hesaplanan tüm örneklere bakıldığında, tüm örneklerin ölçümünde bulunan optimum pH değeri 4.5 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla bir sonraki deneme olan

optimum pH değeri 4.5 kullanılarak, 30-70°C arası sıcaklıkların denemesi yapılmıştır.

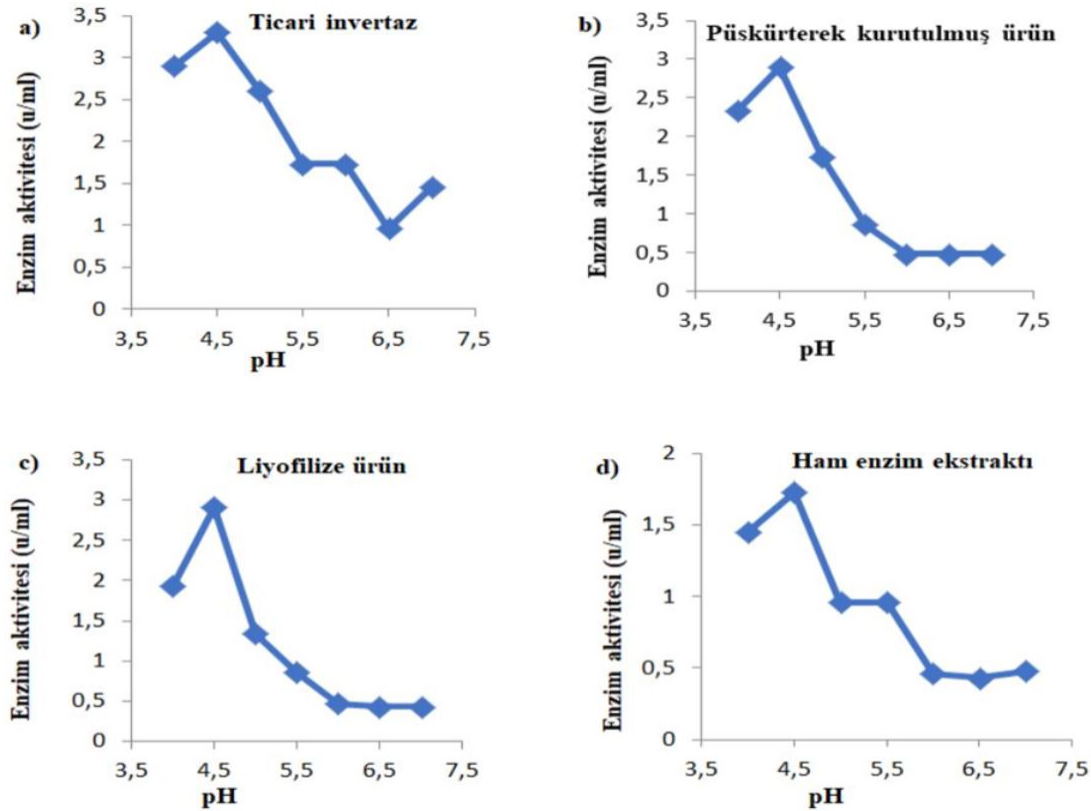


Figure 1. Temperature 40°C, 4-7 pH experiment results of different samples

Şekil 1. Farklı örneklerin sıcaklık 40°C, 4-7 pH deneme sonuçları

3.2.2. Optimum pH Değişen Sıcaklık Değerlerinde Enzim Aktivite Tayini

Sıcaklığın sabit tutulduğu, optimum pH aralığında en iyi aktivite sonucunu veren pH ilk aktivite ölçümünde hesaplanmıştır. Optimum pH kullanılarak sıcaklık denemeleri yapılmıştır. Sıcaklıklar 30 ile 65°C arası değişen su banyosu ayarlanarak invertaz aktivitesi hesaplanmıştır. Tablo 2’de sunulan analiz sonuçları incelendiğinde, daha önce atf yapılan literature uyumlu şekilde 4 örnek için de en yüksek enzim aktivitesinin 40°C seviyesinde tespit edildiği ve sıcaklığın enzim aktivitesi üzerinde önemli ($P < 0.05$) etkiye sahip olduğu anlaşılmaktadır. Enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişimi Şekil 2’de görsel olarak ifade edilmiştir.

Tablo 2. Değişen sıcaklık değerlerinde enzim aktiviteleri

Table 2. Enzyme activities at different temperature levels

Sıcaklık (°C)	Enzim aktivitesi (U/mL)*			
	Ticari	Püskürtülerek kurutulmuş	Liyofilize	Ham ekstrakt
30	1.65±0.05 ^b	1.05±0.05 ^b	1.40±0.00 ^b	0.85±0.05 ^c
35	1.30±0.00 ^c	1.05±0.05 ^b	0.96±0.01 ^c	0.85±0.05 ^c
40	3.30±0.20 ^a	2.90±0.05 ^a	2.90±0.00 ^a	1.73±0.03 ^a
45	1.60±0.00 ^b	0.50±0.00 ^c	0.96±0.01 ^c	1.03±0.03 ^b
50	0.85±0.05 ^d	0.28±0.03 ^d	0.55±0.05 ^d	0.65±0.05 ^d
55	0.43±0.08 ^e	0.33±0.03 ^d	0.31±0.01 ^e	0.50±0.05 ^e
60	0.65±0.00 ^{d,c}	0.50±0.05 ^c	0.25±0.00 ^e	0.25±0.00 ^f
65	0.43±0.08 ^e	0.50±0.05 ^c	0.28±0.03 ^e	0.28±0.03 ^f

*Tablodaki enzim aktivitesi değerleri ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı üst indisle gösterilen değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0.05$).

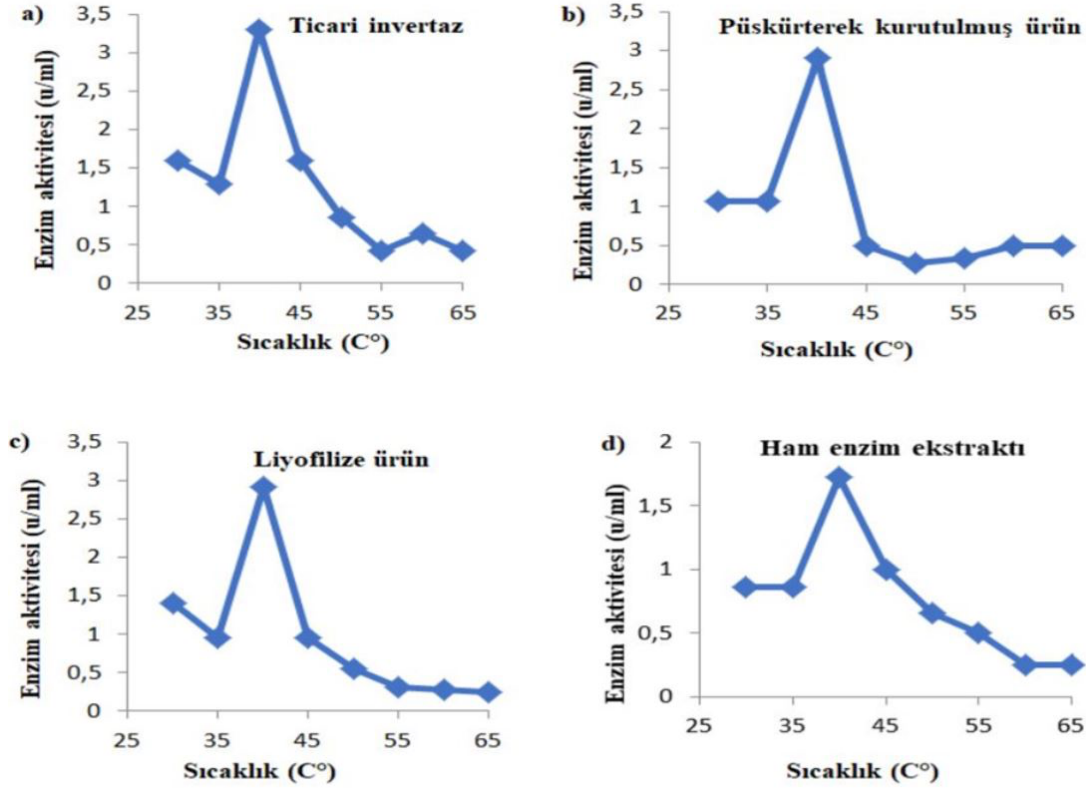


Figure 2. Trial results of different samples at optimum pH and temperature 30 to 70°C

Şekil 2. Farklı örneklerin optimum pH ile sıcaklık 30 ile 70°C deneme sonuçları

Şekil 2’de optimum pH 4.5 kullanılarak sıcaklığın 30-65°C arası denemiş invertaz aktivite sonuçları verilmiştir. Sıcaklıklar tek tek incelendiğinde, en yüksek invertaz aktivitesinin optimum olduğu sıcaklığın 40°C olduğu görülmektedir. Bu sıcaklığı takiben 30 ve 45°C noktalarında da optimuma yakın değerler elde edilmiştir. En düşük invertaz aktivitesinin görüldüğü sıcaklık değeri 65°C olduğu söylenebilir. Elde edilen 4 farklı ürünün, invertaz aktivite değerine bakıldığında; ticari invertazın (Şekil 2a) optimum pH’da ve optimum sıcaklık olan 40°C’de aktivite değeri 3.30 U/mL’dir. En düşük aktivitenin görüldüğü sıcaklık 55 ve 65°C olup, aktivite değerleri 0.43 U/mL dir. Püskürterek kurutulmuş (Şekil 2b) örneğin optimum pH’da ve 40°C’de aktivite değerinin 2.90 U/mL olarak bulunduğu görülmektedir. En düşük aktivite 50°C’de okunan 0.28 U/mL değeridir. Liyofilize (Şekil 2c) edilen örneğin optimum pH ve optimum sıcaklıkta aktivite değeri 2.91 U/mL olarak bulunmuştur. En düşük aktiviteye sahip olan sıcaklık değeri 65°C olup, aktivitesi 0.25 u/ ml olarak hesaplanmıştır. Son ürün olan ham enzim ekstraktına (Şekil 2d) bakıldığında optimum pH ve optimum sıcaklık değerinde aktivitenin en yüksek değeri 1.73 U/mL’dir. 60-65°C sıcaklarına baktığımızda iki sıcaklık değerinde aktivitenin düşük olduğu görülmekte olup, aktivite değeri 0.25 U/mL olarak tespit edilmiştir.

Endüstride kullanılan invertaz enziminin yerli kaynaklar kullanılarak düşük maliyetli üretimi ülkemizin dışa bağımlılığını azaltacak potansiyele sahip bir araştırma alanıdır. İnvertz enzimi birçok çalışmada model enzim olarak kullanılmış ve farklı kaynaklardan eldesi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu enzimin karakterizasyonu da literatürde başarılı bir şekilde yapılmış durumdadır. Ancak yapılan çalışmalar incelendiğinde bitkiler ve mikroorganizmaların kaynak olarak kullanıldığı ve dolayısıyla bu canlıların kontrollü şartlarda geliştirilerek enzim üretiminin sağlandığı görülmektedir. Karkaş (2009) tarafından yapılan çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*’den ekstrakte edilerek saflaştırılan invertaz enziminin endüstride rahatlıkla kullanılabilir özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Mikrobiyal invertaz üretiminin denendiği ve kaynak mikroorganizma olarak *Aspergillus oryzae*’nin kullanıldığı bir çalışmada aktivite geri kazanımı %50 seviyesinde kalmıştır (Dhananjay ve Mulimani, 2008). Yapılan bir diğer çalışmada ak dut meyvesinden ekstrakte edilen bitkisel kaynaklı invertazın ham hali ile 4.01 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuş olup ileri saflaştırma teknikleri ile bu aktivitenin yaklaşık 5 kat arttığı ifade edilmiştir

(Şahin, 2015). Yine bitki kaynaklı invertaz üretimi çalışmasında enzim kaynağı olarak domates kullanılmış olup araştırmacı tarafından bildirilen spesifik aktivite değeri saf enzim için 31 U/mg seviyesindedir (Yücekan, 2008). Patatesten invertaz eldesine yönelik yapılan bir çalışmada ise saflaştırılan enzimin kinetik özellikleri araştırılmış olup bitkiden enzim geri kazanım oranının oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir

Ekmek mayası olarak da bilinen ve ülkemizde başarılı bir şekilde ticari üretimi yapılan *S.cerevisiae* iyi bir invertaz üreticisidir. Ancak ekmekçilikte mayanın bu özelliğinden ziyade ortamda amilaz (dışarıdan una eklenen veya doğal olarak bulunan) tarafından oluşturulan basit şekerleri kullanarak CO₂ oluşturma yeteneği dikkate alınmaktadır. *S.cerevisiae* “bulk” halinde üretilmesi sırasında doğal olarak hücre içinde invertaz enzimi üretmektedir. İleri aşamalarda ürünün yaş, kuru veya instant ekmek mayasına dönüştürülmesinde de bu enzim hücre yapısında kalmaktadır. Ancak kuru maya üretiminin bir aşaması olan, sulu ortamdaki ekmek mayasının kurutulması sırasında, kurutucu tamburların eleklerinden geçemeyen veya topaklanan mayalar son ürün aşamasına ulaşmadan sistemden ayrılmakta ve “eleküstü maya” adıyla artık olarak işlem görmektedir. Bu artık üründe “maya aktivitesinin” düşük olduğu, paketlemede soruna yol açtığı ve markete sevk edilemeyeceği kabul edildiğinden bazı durumlarda imha yoluna gidilmekte, bazı durumlarda da çok düşük bir bedelle hayvan yemi üreticilerine satışı yapılmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen verilerin literatürde bildirilen invertaz aktivite değerlerinden bazılarına yakın olduğu görülmekle beraber, ileri saflaştırma halinde invertaz üretiminin bu hammaddeden mümkün olabileceği düşünülmektedir.

4.Sonuç

Eleküstü mayadan 3 farklı yolla elde edilen ham enzimlerin ticari muadili ile karşılaştırılması yapılmıştır. Bu ürünlerdeki aktivitelerin ticari enzimde bulunan aktiviteden düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak ulaşılan sonuçların literatür ile uyumlu olduğu ve eleküstü mayanın invertaz kaynağı olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmada elde edilen verilerin ışığında daha ileri saflaştırma ve karakterizasyon basamakları içeren çalışmaların yapılabileceği öngörülmektedir. Artık olarak değerlendirilen bir ürünün katma değeri yüksek başka bir ürüne dönüştürülmesi yönünde önemli sonuçlara ulaşılan bu çalışmanın invertaz enziminin endüstriyel üretiminde fayda sağlayabileceği düşünülmektedir.

Kaynakça

- Aehle, W. (2004). *Enzymes in İndustry: Production and Applications* (2. Baskı). Germany: Weinheim.
- Dhananjay, S.K., Mulimani, V.H. (2008). Three-phase partitioning of α -galactosidase from fermented media of *Aspergillus oryzae* and comparison with conventional purification techniques. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36:123-128.
- Garrett, R.H., Grisham, C.M. (1999). *Biochemistry, Second Edition* Saunders College Publishing: Harcourt Brace, Orlando. 426-427.
- Jones, R.C., Hough, J.S. (1970). The effect of temperature on the metabolism of baker's yeast growing on continuous culture. *Journal of General Microbiology* 60:107-116.
- Karkaş, T. (2009). *İnvvertaz enziminin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için sulu ikili-faz afinite sistemlerinin geliştirilmesi*. (Yüksek Lisans Tezi) Biyokimya, İzmir.
- Kasavi, C. (2006). *Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları ile Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu*. (Yüksek Lisans Tezi) İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Krajewska, B. (2003). Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations, a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35:126-139.
- Mensonides F, Brul S, Hellingwerf KJ, Bakker BM, Teixeira de Mattos MJ (2014) A kinetic model of catabolic adaptation and protein reprofiling in *Saccharomyces cerevisiae* during temperature shifts. *The FEBS Journal* 281: 825-841
- Michaelis, L., Menten, M.L. (1913) Die Kinetik Der İnvvertin-Wirkung, *Biochemische Zeitschrift*.
- Özçömlekçi, E. (2006). *Proteaz Enziminin Glutaraldehit Kullanarak Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyonunda Optimum Şartların Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi) İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Polat, C., Koç, F., Özdüven, M.L. (2005). Mısır silajında laktik asit bakteri ve laktik asit bakteri+enzim karışımı inokulantlarının fermentasyon ve toklularda ham besin maddelerinin sindirilme dereceleri üzerine etkileri. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2(1):13-22.
- Şahin, İ. (2015). *İnvvertaz enziminin akduttan (*Morus alba*) üçlü faz sistemi ile saflaştırılması ve karakterizasyonu*. (Yüksek Lisans Tezi) Biyokimya, Sakarya.
- Veliöđlu, H.M., Çelikyurt, G. (2016). Farklı tarım artığı ürünlerden fungal ve bakteriyel alfaamilaz enzimi üretiminin optimizasyonu. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 13(1):12-24.
- Yamamoto, T., Kumada, J., Sawai, T. (1957). The chromatographic purification of yeast invertase by an ion-exchange resin method and some properties of the enzyme obtained. *Bulletin of the Agricultural Society of Japan* 21:185-191.
- Yücekan, İ. (2008). *İnvvertaz Enziminin Afiniteye Dayalı Teknikler ile Saflaştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi) Biyokimya, İzmir.