

Bazı *Aspergillus* Suşlarının Poligalakturonaz Aktivite Düzeyi Üzerine Araştırma^(*)

Doç. Dr. Lütfü ÇAKMAKÇI — Doç. Dr. Nezihe TUNAL — Doç. Dr. Aziz EKŞİ
— Dr. Fatih YILDIZ

ÖZET

Denemeye alınan 18 ayrı *Aspergillus* suşunun, sıvı ve katı besiyerinde üreme durumu ile poligalakturonaz aktivite düzeyinin belirlenmesi, araştırmanın konusunu oluşturmaktadır.

Bu açıdan, katı besiyeri sıvı besiyerine göre daha olumlu sonuç vermektedir. Katı besiyerine organik asid, bitkisel yağ vb. katılması, mikroorganizma gelişmesi üzerine olumlu etkide bulunmakta, ancak suşların enzim düzeyini etkilememektedir.

Poligalakturonaz aktivite düzeyi en yüksek suş olarak; *Aspergillus niger* IG ve *Aspergillus niger* 1G ve *Aspergillus niger* 4 S ortaya çıkmaktadır. Adı geçen iki suş, aynı zamanda pektinmetilesteraz aktivitesi de göstermektedir.

GİRİŞ

Gıda endüstrisinde enzim kullanımı, giderek yaygınlaşmaktadır. Enzim uygulamasının önem taşıdığı alanlardan birisi de meyve suyu endüstrisidir. Bu alanda enzim uygulaması, maserasyon ve durultma olmak üzere başlıca iki amaca yöneliktir.

Maserasyon enzimi, preslemeden önce meyve ezmesine uygulanmaktadır. Bu uygulama ile; presleme işlemi kolaylaşmakta, presleme süresi kısalmakta, meyve suyu randımanı artmakta ve meyve suyunun bileşimi zenginleşmektedir (1). Durultma ya da filtrasyon enzimi ise, presten alınan ham meyve suyuna uygulanmaktadır. Durultma işleminde izlenen başlıca aşamalar; meyvede bulunan çözünmez pektinin çözünürlük kazanması, çözünen pekti-

nin parçalanarak viskozitenin azalması ve koloidal bulanıklık yapan bileşiklerin topaklaşarak çökmesidir. Pektolitik enzim katkısı ile filtrasyon kolaylaştığı gibi, meyve suyunun konsantrasyonunda önemli olan ısı iletim katsayısı da artmaktadır (2).

Gerek maserasyon ve gerekse durultma amacı ile değişik firmalar tarafından farklı preparatlar pazarlanmaktadır. Üretim tekniği gizli tutulmakla birlikte; maserasyon amacı ile kullanılan bir preparatta selülotik, pektolitik, proteolitik ve amilolitik aktivite önem taşımaktadır. Durultma amacı ile kullanılan bir preparatın ise, daha çok pektolitik, ancak bazı durumlarda amilolitik aktivite göstermesi de gerekmektedir.

Ülkemizde maserasyon enzimi kullanımı yaygın değildir. Daha çok durultma amacı ile, vişne, elma ve üzüm gibi meyve suyu işlenmesinde enzim kullanılmaktadır. Ve ülkemiz bu ihtiyacını ithal yolu ile karşılamaktadır. Bu durum, döviz kaybı yanında; enzimin zamanında sağlanamaması nedeni ile üretim azalması, aktivite düşmesi nedeni ile de maliyet yükselmesi gibi sonuçlara yol açmaktadır. Anılan bu sakıncalar aynı zamanda, yerli olanaklarla pektolitik enzim üretime gereğini de ortaya koymaktadır.

LİTERATÜR TARAMASI

Berrak tip meyve suyunda bulanıklığa yol açan bileşiklerin başında, pektik madde grubu gelmektedir. Genellikle pektin olarak adlandırılan bu grupta, bileşimi farklı çok sayıda madde yer almaktadır. Bunların bileşim farklılıkları bilinmeden, bu madde grubunu parçala-

(*) Bu araştırma, TÜBİTAK tarafından TOAG-461 no ile desteklenmekte olan «Mikrobiyel Yolla Pektolitik Enzim Üretimi Üzerinde Araştırma» konulu projenin başlangıç dönemine ilişkin bulguları kapsamaktadır.

mak için gerekli enzimin belirlenmesi de olanaksızdır.

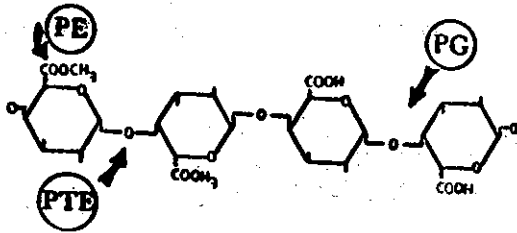
Genel olarak; esterleşmemiş galakturonik asid köklerinden oluşan zincir **pektik asit**; tam veya kısmen esterleşmiş poligalakturonik asid-den oluşan zincir **pektin**; pektin zincirleri Ca ve Mg gibi iyonlarla birbirine bağlanmış olan, suda çözünmeyen ve bitkide dayanıklı formda bulunan bileşik ise **protopektin** olarak tanımlanmaktadır. Pektik asidin az miktarda metoksil grubu içeren nötr veya asid tuzuna **pektat**, az veya çok esterleşmiş pektinin metoksil grubu da içeren tuzuna ise **pektinat** adı verilmektedir (3).

Daha önce de değinildiği gibi, durultma ya da filtrasyon enzim preparatında, daha çok pektolitik aktivite önem kazanmaktadır. Ancak pektolitik aktivite denildiğinde, çok sayıda enzim komponenti akla gelmekte ve bu sayının bir ticari preparatta yediye ulaştığı belirtilmektedir (4).

Meyve suyu durultmada işlevi önemli olan pektolitik enzim sayısı ise; **pektaz** (pektinesteraz, pektinmetilesteraz, PE), **pektinaz** (poligalakturonaz, PG) ve **pektin - liyaz** (pektirranseliminaz, PTE) olmak üzere üçtür. Ayrıca, düşük metoksilli pektini parçalayan **pektat - liyaz** (LMPL) enzimi de önemli bulunmaktadır (5).

Bunlardan pektaz (PE), pektin zincirinde esterleşmiş karboksil grubunu hidrolitik olarak parçalamakta ve metil alkol oluşmaktadır. Pektin - liyaz (PTE) ise, pektik asid veya pektin zincirindeki galakturonik asid ünitesindeki beşinci C atomundan 1 protonu, glikozidik grubdaki oksijene taşıyarak alfa (1,4) - glikozidik bağı parçalamaktadır. Öte yandan pektik asid zincirindeki alfa - (1,4) - glikozidik bağı da, pektinaz (PG) tarafından parçalanarak, oligouronid veya galakturonik asid oluşmaktadır (2,6):

Ticari pektolitik enzim eldesinde, çok sa-



yıda küf mantarı ve bakterinin kullanıldığı belirtilmektedir. Bu amaçla yararlanılan mikroorganizmaların başında **Aspergillus niger** suşlarının geldiği ifade edilmektedir (7, 8). Ayrıca **Aspergillus sojae** ve **Aspergillus japonicus** ile **Aspergillus fonceus** ta, pektin - liyaz izole edilen mikroorganizmalar arasında sayılmakta olup (9, 10), ancak suş ve besiyeri saklı tutulmaktadır.

Besiyerinin birçok mikroorganizmada pektolitik enzim tipi ve aktivite düzeyi üzerine etkisi konusunda da çok sayıda kaynakta bilgi bulunmaktadır (11, 12, 13, 14).

MATERYAL VE METOD

Denemeye alınan suş sayısı 18 dir. Bunlar sırası ile; **A. foetidus**, **A. oryzae** 44242, **A. amstelodami**, **A. parasiticus**, **A. itoconica** 45630, **A. janus** 34361, **A. candidus**, **A. versicolor** 49124, **A. wentii** 16033, **A. niger** 17454, **A. niger** 1942, **A. niger** M1, **A. niger** 10971, **A. niger** A 12, **A. niger** 1G, **A. nigre** 2G, **A. niger** 3G ve **A. niger** 4S dir. Bu suşlardan dördü, Ankara Üniv. Ziraat Fak. Ziraat Mikrobiyolojisi Ünitesi'nde soğan (S) ve greyfurttan (G) izole edilmiş bulunmaktadır.

Suşlar önce CZAPEKS DOX AGAR üzerinde geliştirilmiş ve aktivasyon sağlandıktan sonra esas denemeye alınmıştır. Aradaki farkı belirlemek amacı ile, denemed hem sıvı ve değişik katkı maddeleri kullanılmıştır.

Sıvı besiyeri; 30 g sakkaroz, 3.0 g NaNO₃, 1.0 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄, 0.5 g KCl, 0.01 g FeSO₄ ve 1000 ml damıtık su ile hazırlanmıştır. Katı besiyeri olarak ise buğday kepeği ve değişik katkı maddeleri kullanılmıştır.

Gelişen miseller sıvı besiyerinden filtrasyon yolu ile ayrılmış ve filtrata protein çöktürme işlemi uygulanmıştır. Katı besi yerinde ise ekstraksiyondan sonra filtrasyon ve çöktürme işlemi yapılmıştır. Bu amaçla amonyum sülfat, alkol ve aseton kullanılmıştır.

PG aktivitesinin kanıtlanması için önce alkol testi uygulanmıştır (1). Bu amaçla materyal olarak % 1 lik pektin çözeltisi ve kaba filtre kağıdından geçirilmiş ham elma suyu kullanılmıştır. Bunların 9 ml sine 1 ml ham

enzim ekstraktı konulmuş ve 40°C de 60 dakikalık etkidenden sonra test yapılmıştır. Yine PG aktivitesinin saptanması için, HÖPLER viskozimetresi ile 5-10 dakikalık aralıklarla viskozite (dinamik) azalması santipoiz (cP) olarak belirlenmiştir.

Ham enzim ekstraktında PE aktivitesinin saptanması için ise, pektin ve agarla hazırlanmış besiyeri üzerinde, pektolitik enzim emdirilmiş filtre kağıdı 37°C de bir gece inkübasyona bırakılmış, daha sonra kağıt petri kutusuna alınmış; hidroksilaminhidroklorid, NaOH, HCl ve ferriklorid katılarak kırmızı fon üzerinde berraklaşan zon belirmesi incelenmiştir (15).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Denemeye alınan 18 adet suşun pektinli ve pektinsiz sıvı besiyerindeki üreme durumuna ilişkin bulgular tablo 1 de yer almaktadır. Görüldüğü gibi, her iki sıvı besiyerinde de 5 ve 10 günlük inceleme sonunda çok iyi bir üreme olmaktadır.

Tablo 1. Denemeye Alınan *Aspergillus* Suşlarının Sıvı Besiyerinde Üreme Durumu

Suşun Adı	Pektinli		Pektinsiz	
	5. Gün	10. Gün	5. Gün	10. Gün
<i>A. foetidus</i>	+	+	+	+
<i>A. oryzae</i>	+	+	+	+
<i>A. amstelodami</i>	+	+	+	+
<i>A. praziticus</i>	+	+	+	+
<i>A. tianonica</i>	+	+	+	+
<i>A. janus</i>	+	+	+	+
<i>A. candidus</i>	+	+	+	+
<i>A. versicolor</i>	+	+	+	+
<i>A. wentii</i>	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 17454	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 1942	+	+	+	+
<i>A. niger</i> M1	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 10971	+	+	+	+
<i>A. niger</i> A12	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 1G	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 2G	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 3G	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 4G	+	+	+	+

(+) pozitif gelişme

(—) negatif gelişme

Pektinli ve pektinsiz katı besiyerinde suşların üreme durumu ise tablo 2'de verilmiş bulunmaktadır. Bulgular, katı besiyerinde çoğu suşların üreme durumunun yeterli olmadığını göstermektedir.

Tablo 2. Denemeye Alınan *Aspergillus* Suşlarının Katı Besiyerinde Üreme Durumu

Suşun Adı	Pektinli		Pektinsiz	
	5. Gün	10. Gün	5. Gün	10. Gün
<i>A. foetidus</i>	—	+	—	+
<i>A. oryzae</i>	—	+	—	+
<i>A. amstelodami</i>	—	—	—	—
<i>A. tianonica</i>	—	—	—	—
<i>A. janus</i>	—	—	—	—
<i>A. candidus</i>	—	—	—	—
<i>A. versicolor</i>	—	—	—	—
<i>A. wentii</i>	—	—	—	—
<i>A. niger</i> 17454	—	+	—	+
<i>A. niger</i> 1942	—	—	—	+
<i>A. niger</i> M1	—	—	—	+
<i>A. niger</i> 10971	—	+	—	+
<i>A. niger</i> A12	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 1G	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 2G	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 3G	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 4S	+	+	+	+

(+) pozitif üreme

(—) negatif üreme

Bulgulardan çıkan bir diğer sonuçta, pektin katkısının suşların üreme durumu üzerine belirli bir etkisinin olmadığıdır.

Denemeye alınan suşların PG aktivitesi gösterip göstermediğine ilişkin bulgular tablo 3 te verilmiştir. Bulgulara göre, alkol testi ile viskozimetre değerleri arasında bir bağıntı bulunmaktadır. Bu nedenle, PG aktivitesi belirlenirken, önce alkol testi uygulanmış ve olumlu sonuç alınanlarda viskozite azalması saptanmıştır.

Bulgular topluca değerlendirildiğinde, sıvı ve katı besiyerinde suş gelişimi ve enzim aktivitesi arasında bir bağıntı bulunmadığı görülmektedir. Dolayısı ile, enzim aktivite düzeyi, suşun gelişimi ile değil, suşun içinde bulunduğu özel koşullarla ilişkili bulunmaktadır.

Tablo 3. Alkol Testi ve Viskozite Değişim Durumu

Suşun Adı	Bilye Düşme (San)	Viskozite (cP)	Visk. Azal. (%)	Alkol Testi
A. niger 17454	80	1.062	11.1	—
A. niger 1942	80	1.062	11.1	—
A. niger M1	73	0.962	18.9	—
A. niger 10971	80	1.062	11.1	—
A. niger A12	79	1.049	12.2	—
A. niger 1G	28	0.391	68.9	+
A. niger 2G	22	0.292	75.6	+
A. niger 3G	26	0.345	71.1	+
A. niger 4S	24	0.318	73.3	+
Ultrazim	100	1.195	100.0	+
Pektin çöz. %1	90	1.195	0.0	—

Enzim aktivite düzeyi, sıvı besiyerinde katı olana göre daha azdır. Bu nedenle, enzim üretimi için tava yöntemi ile üretim tekniğinin daha uygun olacağı düşünülmektedir. Bu yöntemin uygunluğuna ilişkin bilgi, bazı kaynaklarda da yer almaktadır.

Katı besiyerine eklenen değişik katkılar (organik asit, bitkisel yağ vb.), hücre gelişimi üzerine olumlu etkide bulunmakla birlikte, enzim üretimini geriletmektedir.

PG aktivite düzeyi yüksek olan **A. niger** 1G ve **A. niger** 4S suşları, aynı zamanda PE aktivitesi de göstermektedir. Bu durum, araştırmanın amacı bakımından büyük önem taşımaktadır.

SUMMARY

The Study on Polygalactronase Activity of *Aspergillus* spp.

In this study, the growth condition of 18 *Aspergillus* spp. were determined. The result showed that the solid medium was found suitable for production of polygalactronase.

Some organic acids and plant oils supple-

mented the mass production of *Aspergillus* spp. In contrast polygalactronase activity was inhibited. *Aspergillus niger* 1G and *Aspergillus niger* 4S exhibited higher polygalactronase activity than the other strains.

KAYNAKLAR

- (1) KARDOS, E. 1978. Obst- und Gemüsesaefte. VEB Verlag. Leipzig. 495.
- (2) SCHOBINGER, U. 1978. Frucht- und Gemüsesaefte. Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart. 504.
- (3) HEIMANN, W. 1976. Grundzüge der Lebensmittelchemie. Steinkopff Verlag. Darmstadt. 622.
- (4) LÜTHI, H.R. und M. JAKOB. 1968. Über den Einfluss einiger Enzympräparate des Handels auf die Qualität von Apfelsäften. Fruchtsaftforschung und -Technologie 9; 137 - 145. Aarus. 253.
- (5) NEUKOM, H. 1963. Über den Abbau von Pektinstoffen. Schweiz. Landw. Forsch. 2; 112 - 121.
- (6) ANONYMOUS. 1980. Pektologie. Firma Grindsted. Braubrand. 4.
- (7) REED, G. 1975. Enzymes in Food Processing. Academic Press. New York.
- (8) BEUCHAT, L.R. 1978. Food and Beverage Mycology. Avi Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut. 380.
- (9) ISHII, S. and T. YOKOTSUKA. 1972. Clarification of Fruit Juice by Pektintranseliminase. Proc. Int. Symp. on Convection and Manufacture of Foodstuffs. Saikon Publishing Co. Tokyo.
- (10) BRUCHMANN, E.E. 1976. Angewandte Biochemie. Eugen Ulmer Verlag. Stuttgart. 255.
- (11) CABZAS de HERRERA, E. and O. GARCIA - JURADO. 1975. Production of Pectic Enzymes by *Pseudomonas viridiflava*. Microbiology Esp. 28; 143 - 152.
- (12) SZAJER, I. and J.F. BOUSQUET. 1975. Some Effects of Carbon Source in the Growth Medium. Ann. Phytopathol. 4; 299 - 307.
- (13) DUBE, H.C. and H.N. GOUR. 1976. Extra-Cellular Pectic Enzymes of *Macrophoma phageolina*. Proc. Indian Natl. Sci. and Part B. 41; 576 - 579.
- (14) ZETELAKI, K. 1976. Optimal Carbon Source Concentration for the Pectolytic Enzyme Formation of *Aspergilli*. Process. Biochem. 11 (6); 11 - 18.
- (15) Mc COMB, E.A. 1958. Use of the Hydroxamic Acid Reaction for Determining Pectinesterase Activity. Stain Technol. 33; 129 - 131.