

Pirinanın Enzim Tutuklanmasında Destek Maddesi Olarak Kullanılabilme Kapasitesi

Capacity of Using Olive Pomace as Support Material for Enzyme Immobilization

Yasin YÜCEL

Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 31040 Hatay, Türkiye

Geliş tarihi: 27.10.2010

Kabul tarihi: 27.12.2010

Özet

Bu çalışmada lipaz enzimi (*Thermomyces lanuginosus*) pirina üzerine kovalent bağlama metoduyla tutturulmuştur. *Thermomyces lanuginosus* enziminin en yüksek tutuklanma değeri 18.7 mg/g pirina olarak hesaplanmıştır. Destek maddesi üzerine tutturulan *Thermomyces lanuginosus* enzimi için en yüksek aktivite değeri 20.3 µmol pNP/ g pirina.dk ve en yüksek spesifik aktivite değeri ise 10.3 µmol pNP/mg enzim dk olarak belirlenmiştir. Enzim tutuklanması öncesinde ve sonrasında pirina destek maddesinin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Enzim konsantrasyonu, çözelti pH'sı ve tampon çözeltisinin derişim değerlerinin lipaz tutuklanması ve aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Zeytin katı atığı (pirina), *Thermomyces lanuginosus*, Enzim tutuklanması, Destek maddesi

Abstract

In the present work, microbial lipase from *Thermomyces lanuginosus* was immobilized by covalent binding onto olive pomace. The maximum immobilization of *Thermomyces lanuginosus* was calculated as 18.7 mg/g olive pomace. The highest activity was obtained as 20.3 µmol pNP/ g olive pomace min. and also the highest specific activity was 10.3 µmol pNP/mg enzyme min. for *Thermomyces lanuginosus* which is immobilized on support material. The surface properties of the olive pomace support material were investigated by scanning electron microscopy (SEM) before and after enzyme immobilization. The effects of protein concentration, pH and buffer concentration on the immobilization and lipase activity were investigated.

Keywords: Olive pomace, *Thermomyces lanuginosus*, Lipase immobilization, Support Material

Giriş

Son yıllarda yüksek maliyetler nedeniyle enzimlerin uygun bir destek maddesi üzerine tutturularak defalarca kullanılabilmesi endüstriyel uygulamalar açısından önemli hale gelmiştir (Hasan ve ark., 2006; Yücel, 2010). Enzimlerin çeşitli metotlarla katı bir destek maddesine tutturulması önemli araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır. Enzimlerin tekrar kullanımına ve elde edilen ürünün ortamdaki kolayca ayrılmasına imkân sağladığından ucuz ve kullanıma uygun enzim tutuklama tekniklerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Katalitik proseslerde enzim moleküllerinin katalitik

aktifliğini koruyarak tekrar ve sürekli kullanımını sağlamak amacıyla bir destek maddesine fiziksel veya kimyasal tutturulmasına enzim tutuklanması denir (Yücel, 2008). Böylece enzimlerin tek kullanım yerine defalarca kullanılmasına olanak sağlanarak ekonomik açıdan büyük avantaj elde edilmiş olur (Guang ve ark., 2010; Öztürk, 2001).

Enzim tutuklanmasında kullanılan destek maddesi enzime kazandırdığı biyokimyasal, mekanik ve kinetik özellikler nedeniyle oldukça önemlidir. Destek maddesine tutturulan enzim reaksiyon ortamından kolaylıkla ayrılabilen ve sürekli

proseslere uygulanabilmektedir (Guang ve ark., 2010). Bir çok endüstriyel alanda kullanılan lipaz enzimi celite (Chang ve ark., 2007), Naylon-6 (Pahujani ve ark., 2008), yün lifleri (Monier ve ark., 2010), çitosan (Rodrigues ve ark., 2008) ve zeolit (Yağız ve ark., 2007) gibi farklı türlerdeki destek maddelerine başarılı bir şekilde tutturulmuştur. Enzimler destek maddelerine tutturulmadan önce destek maddelerinin aktive edilmesinde glutaraldehit oldukça çok kullanılmaktadır (Betancor ve ark., 2006). Glutaraldehit ile aktive olan destek maddesine bağlanan enzim çok daha sağlam ve kararlı olmaktadır (Yang ve ark., 2009).

Ülkemiz ekonomisi açısından zeytin tarımı, zeytin işleme ve zeytinyağı sektörü büyük önem taşımaktadır. Türkiye zeytin üretiminde İtalya, İspanya ve Yunanistan'ın ardından dördüncü sırayı almaktadır (Çetin ve ark., 2004). Zeytinyağı üretim işletmelerinde proses sonucu zeytinyağı, katı yan ürün (pirina) ve sıvı yan ürün (karasu) olmak üzere üç faz oluşmaktadır. Ülkemizde zeytin tarımına bağlı olarak yılda ortalama 200-250 bin ton/yıl pirina artığı olduğu bilinmektedir (Tekin ve Dalgıç, 2000). 100 kg zeytinden ortalama 15-22 kg zeytinyağı ve 35-45 kg pirina elde edilirken; 100 kg pirinadan ortalama 6-7,5 kg pirina yağı ve 60-70 kg kuru pirina elde edilmektedir (Göğüş ve Maskan, 2006).

Ülkemizdeki zeytin tarımı ve zeytinyağı işletmeleri dikkate alındığında, yağ fabrikalarından çıkan pirina artığının oldukça önemli miktarlarda olduğu görülmektedir. Pirinanın en yaygın kullanım alanı yakıt amaçlı kullanımdır. Pirinanın direkt yakılmak suretiyle kullanılması ekonomik yönden randımanlı olmamakla birlikte çevre kirliliği açısından da olumsuzluklar getirmektedir. Zeytinyağı tesislerinin yan ürünü olan pirinanın katma değeri yüksek bir maddeye dönüştürülerek tekrar kullanılmasının sağlanması hem ekonomik yönden hem de çevre kirliliği yönünden birçok fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmada pirinanın enzim tutuklanmasında destek maddesi olarak kullanılabilir olup olmadığı araştırılmıştır. *Thermomyces lanuginosus* enzimi pirina destek maddesi üzerine kovalent bağlama

metodu kullanılarak başarılı bir şekilde tutturulmuştur. Enzim tutuklanmasından önce ve sonra pirina destek maddesinin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Enzim tutuklanmasında önemli parametrelerden enzim konsantrasyonu, çözelti pH'sı ve tampon çözeltisinin derişim değerlerinin lipaz tutuklanması ve aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Böylece zeytinyağı işletmelerinden çıkan pirinanın katma değeri yüksek bir maddeye dönüştürülerek tekrar kullanılmasının sağlanması, yılın belli dönemlerinde atıl kalan zeytinyağı işletmelerine ekonomik yönden katkı sağlanması ve zeytin artıklarının bölgesel ekosisteme olan olumsuz etkilerinin önlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Materyal

Ticari olarak Lipozyme TL 100 L (aktivite: 16.05 U/mL) olarak bilinen lipaz enzimi Novo Nordisk (Denmark)'tan temin edilmiştir. Pirina yerel bir yağ fabrikasından alınmıştır. Glutaraldehit, potasyum hidrojen fosfat, dipotasyum hidrojen fosfat, Coomassie brilliant blue G 250, sodyumtetraborat ve HCl Merck'ten temin edilmiştir. Triton X-100, gum arabic, p-nitrofenil palmitat, p-nitrofenol ve bovine serum albumin Sigma'dan satın alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Lipaz Enziminin Pirina'ya Tutturulması

Thermomyces lanuginosus lipaz enzimi pirina tozları üzerine poliglutaraldehit beraberinde kovalent bağlama ile tutturulmuştur. Pirina destek maddesi uygun boyutlara getirilerek behere aktarılmış ve taze hazırlanmış %5'lik poliglutaraldehit çözeltisi ile 24 saat muamele edilerek poliglutaraldehitin pirina yüzeyine tutunması sağlanmıştır. Pirina'nın aktive edilmesinden sonra fosfat tamponunda (45 mL, 20 mM, pH 6.0) hazırlanan 5 mL enzim çözeltisi pirina ile 25 °C'de 24 saat süreyle çalkalanmıştır.

Enzim Tutuklama İşleminde Etkili Parametrelerin İncelenmesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan lipaz çözeltilerinin (%2,5–%20 v/v), farklı pH (5,0, 6,0, 7,0,

8,0 ve 9,0) değerlerinin ve farklı tampon konsantrasyonlarının (10 mM ile 100 mM) lipaz tutuklanması ve aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Enzim Miktarının Belirlenmesi

Tutuklanan enzim miktarı Bradford metodu ile belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bu metotta Coomassie Brilliant Blue boyası kullanılmakta ve kullanılan bu boya ortamdaki proteinlerle kompleks oluşturarak ortamdaki proteinin yoğunluğuna göre açık veya koyu mavi renk vermektedir. Protein tayini için öncelikle 100 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) boyası, 50 mL metanol içerisinde çözülerek üzerine 100 mL %85'lik fosforik asit (H_3PO_4) ilave edilmiş ve saf su ile 200 mL'ye seyreltilerek Bradford boyası hazırlanmıştır. Çözelti kullanılmaya kadar koyu renkli bir şişe içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Protein analiz sırasında belirli oranlarda Bradford boyası, saf su ve 4-aminoantipirin içeren analiz reagentinden 5 mL alınmış 100 µL örnek ile karıştırılarak 5 dk. bekletilmiş ve 595 nm'de UV absorbansı okunmuştur. Farklı derişimlerde Bovin Serum Albumin (BSA) standart protein çözeltileri ile hazırlanan Bradford kalibrasyon grafiği kullanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplanmıştır.

Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi spektrofotometrik metotla belirlenmiştir (Winkler ve Stuckmann, 1979). Metot enzim moleküllerinin birim zamanda pNPP'ı (para-nitrofenil palmitat) pNP'e (para-nitrofenol) dönüştürme miktarının ölçülmesine dayanmaktadır. 1 birim enzim; reaksiyon koşullarında, pNPP'dan (para-nitrofenil palmitat) bir dakikada, 1 mmol pNP (para-nitrofenol) oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla öncelikle standart pNP (para-nitrofenol) çözeltileri hazırlanarak UV spektrofotometresinde 410 nm'de absorbansları ölçülmüş ve kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Daha sonra 0,5 g örnek tartılarak 9 hacim 25 mM fosfat pH 6 tamponu ile 1 hacim 10 mM pNPP, % 0,8 triton X100 ve % 0,2 gum arabic'den oluşan 15 mL'lik çözelti karışımına ilave edilecek ve manyetik balıkla 5 dk. 125

rpm hızla karıştırılmıştır. Sonra örnek beyaz bant süzgeç kağıdı ile süzölmüş ve UV spektrofotometresiyle 410 nm'de absorbansı ölçülerek lipaz aktivitesi ve spesifik aktivite hesaplanmıştır.

Destek Maddesinin Yüzey Analizi

Pirina'nın yüzeyi enzim tutunmasında önce ve sonra SEM (Jeol JSM 500LM Taramalı Elektron Mikroskopu) cihazı ile görüntülenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Enzim Tutuklama İşleminde Etkili Parametrelerin İncelenmesi

Enzim konsantrasyonunun tutuklama üzerinde etkisini gösteren sonuçlar Tablo 1.'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde pirina üzerine tutunan en yüksek enzim miktarı %5 enzim konsantrasyonunda 45 mL, 20 mM, pH 6,0'da elde edilmiştir. Lipaz konsantrasyonu arttıkça enzim-enzim etkileşmeleri nedeniyle tutuklanan enzim miktarında düşme gözlenmiştir.

Tablo 1 Enzim konsantrasyonunun tutuklamaya etkisi

Lipaz konsantrasyonları (%, v/v)	Tutuklanmış enzim miktarı (mg/g)
2.5	9,12
5	16,90
10	7,14
15	5,05
20	4,48

Enzim tutuklama koşulları: Farklı derişimlerdeki lipaz çözeltileri pirina (1 g) ile fosfat tamponu (45 mL, 20 mM, pH 6.0) içinde çalkalandı (125 rpm hızla 25 °C'de 24 saat).

Tablo 2.'de pH değerinin enzim tutuklamaya etkisi görölmektedir. Pirina üzerine tutunan en yüksek enzim miktarı (7,71 mg/g-pirina) pH 6 değerinde 45 mL, 20 mM fosfat tamponunda elde edilmiştir. Yüksek pH değerlerinde enzimin denature olduğu görölmektedir. Tampon konsantrasyonunun enzim tutuklama üzerinde etkisini gösteren sonuçlar ise

Tablo 3'te gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde pirina üzerine tutunan en yüksek enzim miktarı 20 mM tampon konsantrasyonunda (45 mL, pH 6.0) elde edilmiştir.

Tablo 2. pH'nın enzim tutuklamaya etkisi

pH	Tutuklanmış enzim miktarı (mg/g)
5	4,68
6	7,71
7	7,57
8	5,05
9	4,21

Enzim tutuklama koşulları: %5'lik lipaz çözeltisi pirina (1 g) ile farklı pH değerlerinde (5-9) farklı tampon çözeltileri (45 mL, 20 mM) içinde çalkalandı (125 rpm hızla 25°C'de 24 saat). Enzim tutuklama işleminde pH: 5-8 değerleri arasında fosfat tampon çözeltileri, pH:9 değerinde ise sodyumtetraborat-HCl tampon çözeltisi kullanılmıştır.

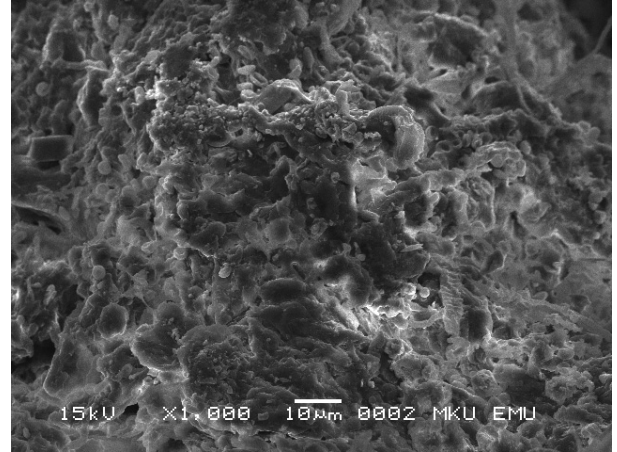
Tablo 3. Tampon konsantrasyonunun immobilizasyona etkisi

Tampon konsantrasyonu (mM)	İmmobilize enzim miktarı (mg/g)
10	14,53
20	16,90
50	7,57
80	5,52
100	4,96

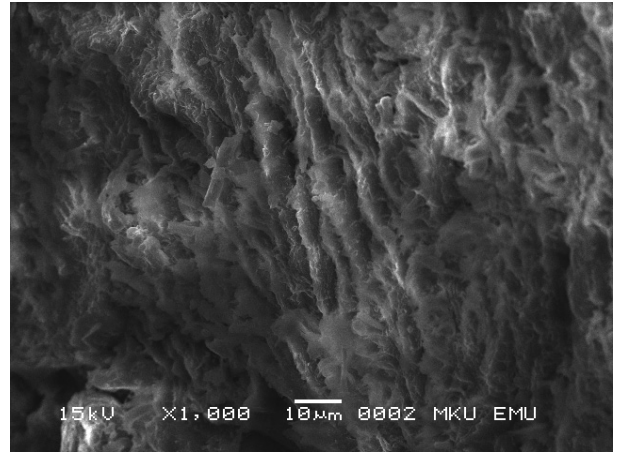
Enzim tutuklama koşulları: %5'lik lipaz çözeltisi pirina (1 g) ile fosfat tamponunda (45 mL, pH 6) farklı tampon konsantrasyonları (10-100 mM) içinde çalkalandı (125 rpm hızla 25°C'de 24 saat).

Destek Maddesinin Yüze Analizi

Şekil 1.'de verilen SEM resimleri incelendiğinde lipaz tutuklama öncesinde pirina yüzeyinde amorf yapı ve farklı geometrik şekiller gözlenirken (Şekil 1a) tutuklama sonrasında daha pürüzsüz ve düzenli yüzey yapısı gözlenmiştir (Şekil 1b). Pirinanın yüzey morfolojisindeki bu değişimler destek üzerine enzimin tutunduğunu göstermektedir.



(a)

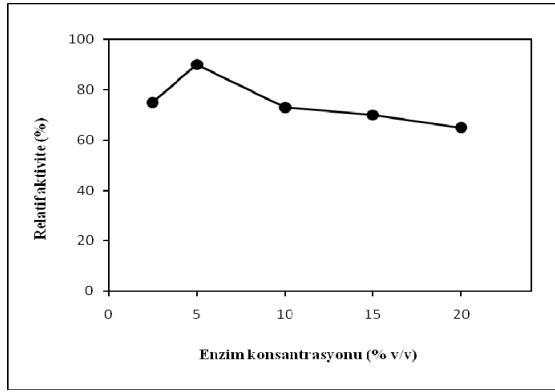


(b)

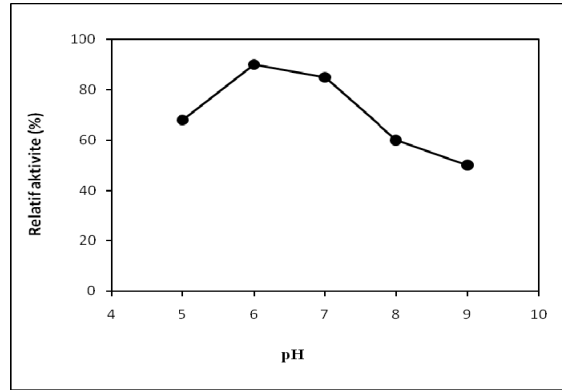
Şekil 1. Pirina'nın SEM resimleri (a) lipaz tutuklanmasından önce (b) lipaz tutuklanmasından sonra

Pirinaya Tutturulan Lipaz Enziminin Karakterizasyonu

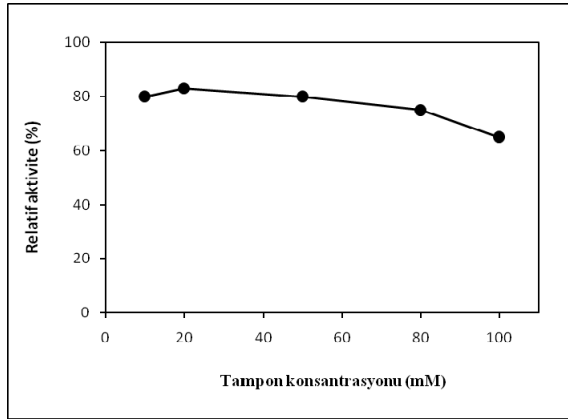
Pirinaya tutturulan lipaz enziminin karakterize edilmesi amacıyla farklı enzim konsantrasyonlarının (%2.5 ile %20 v/v), farklı pH değerlerinin (4 ile 9) ve farklı tampon konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar sırasıyla Şekil 2, 3 ve 4'te gösterilmiştir. Şekiller incelendiğinde pirinaya tutturulan enzim aktivitesinin en yüksek olduğu optimum değerler %5 enzim konsantrasyonu, pH 6 ve 20 mM tampon konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.



Şekil 2. Enzim konsantrasyonunun tutuklanmış lipaz aktivitesine etkisi



Şekil 3. pH'nın tutuklanmış lipaz aktivitesine etkisi



Şekil 4. Tampon derişiminin tutuklanmış lipaz aktivitesine etkisi

Sonuç

Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda önemli tarım ürünlerimizden zeytin meyvesinin yan ürünü olan pirinanın enzim tutuklanmasında doğal destek maddesi olarak kullanılabilir potansiyele sahip

Kaynaklar

- Çetin, B., Yazgan, S., Tipi, T., 2004. Economics of Drip Irrigation of Olives in Turkey. *Agricultural Water Management*. 66:145–151.
- Tekin, A.R., Dalgıç, A.C., 2000. Biogas Production from Olive Pomace Resources. *Conservation and Recycling*. 30:301–313.
- Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006. Industrial Applications of Microbial Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:235–251.
- Guang, Y., Jianping, W., Gang, X., Lirong, Y., 2010. Comparative Study of Properties of Immobilized Lipase onto Glutaraldehyde-Activated Amino-Silica Gel Via Different Methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 78:351–356.
- Göğüş, F., Maskan, M., 2006. Air Drying Characteristics of Solid Waste (pomace) of Olive Oil Processing. *Journal of Food Engineering* 72(4):378-382.

olduğu belirlenmiştir. *Thermomyces lanuginosus* enzimi pirina destek maddesi üzerine kovalent bağlama metodu kullanılarak başarılı bir şekilde tutturulmuştur. Enzim tutuklanmasından önce ve sonra pirina destek maddesinin yüzey özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Lipaz enziminin pirinaya tutturulmasında önemli parametreler için en uygun deneysel koşullar %5 enzim konsantrasyonu, pH 6 ve 20 mM fosfat tampon konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Böylece zeytinyağı işletmelerinden çıkan pirinanın katma değeri yüksek doğal destek maddesine dönüşmesi sağlanmış ve zeytin katı artıklarının bölgesel ekosisteme olan olumsuz etkilerinin giderilmesi amaçlanmıştır.

Teşekkür

Yazar Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına 1001 M 0114 nolu proje ile sağladığı finans desteği için teşekkür eder.

- Yücel, Y., 2008. Bazı Enzimleri Kullanarak Biyodizel Üretimi ve Biyodizel Özelliklerinin Analitik Metotlarla Araştırılması. Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa. 184.
- Öztürk, B., 2001. Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. Master of Science, İzmir Institute of Technology, İzmir. 102.
- Chang, S.F., Chang, S.W., Yen, Y.H., Shieh, C.J., 2007. Optimum Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on Celite by RSM. Appl Clay Sci. 37:67–73.
- Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R., 2008. Glutaraldehyde Activation of Polymer Nylon-6 for Lipase Immobilization: Enzyme Characteristic and Stability. Bioresour Technol. 99:2566–2570.
- Monier, M., El-Sokkary, A.M.A., Sarhan, A.A., 2010. Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on Modified Natural Wool Fibers. Reactive & Functional Polymers. 70:122–128.
- Rodrigues, D.S., Mendes, A.A., Adriano, W.S., Goncalves, L.R.B., Giordano, R.L.C., 2008. Multipoint Covalent Immobilization of Microbial Lipase on Chitosan and Agarose Activated by Different Methods. J. Mol. Catal. B: Enzym. 51, 100–109.
- Yagiz, F., Kazan, D., Akin, A.N., 2007. Biodiesel Production from Waste Oils by Using Lipase Immobilized on Hydrotalcite and Zeolites. Chem. Eng. J. 134:262–267.
- Betancor, L., Gallego, F.L., Hidalgo, A., Morales, N., Mateo, C., Lafuente, R.F., Guisan, J.M., 2006. Different mechanisms of Protein Immobilization on Glutaraldehyde Activated Supports: Effect of Support Activation and Immobilization Conditions. Enzyme and Microbial Technology. 39:877-882.
- Yang, G., Wu, J., Xu, G., Yang, L., 2009. Enhancement of the Activity and Enantioselectivity of Lipase in Organic Systems by Immobilization onto Low-Cost Support. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 57:96–103.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem. 72:242-254.
- Winkler, U.K., Stuckmann, M., 1979. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 38:663-679.
- Yücel, Y., 2010. Biodiesel Production from Pomace Oil by Using Lipase Immobilized onto Olive Pomace. Bioresource Technology, Accepted for Publication, DOI: 10.1016/j.biortech.2010.12.001

İLETİŞİM

Yasin YÜCEL
Mustafa Kemal Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
31040 Hatay
Tel.: +90 0326 245 58 36 /1133
Fax: +90 0326 245 58 67
E-posta: yyucel@mku.edu.tr