

Pektin, poligalakturonik asit ve liyofilize pektinaz enziminin yapısal analizi

Meltem MARAŞ^{*}, Kültiğın ÇAVUŞOĞLU^{*}, Erol AKSÖZ^{**}, Talip KIRINDI^{***}

^{*} Kırıkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 71450, Yahşihan, Kırıkkale

^{**} Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 06532, Beytepe, Ankara

^{***} Kırıkkale Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Bilgisayar ve Öğretim Teknolojileri Eğitim Bölümü, 71450, Yahşihan, Kırıkkale

Özet

Pektik enzimler, yüksek moleküler ağırlıklı pektik asitlerin indirgeyici olmayan uçlarına atak yaparak monogalakturonatları oluşturan enzimlerdir. Bu enzimler Saprofitik fungus, bakteri ve bazı mayalarca oluşturulmaktadır. Meyve ve sebze teknolojilerinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada pektin, poligalakturonik asit ve liyofilize bakteriyel pektinazın kristal yapıları, taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntülenmiştir. SEM'deki görüntülerinde homojen kristal yapı görülmektedir. Pektin poligalakturonik asit ve bakteriyel pektinaz, elektron ışınlarını geçirmeyecek kadar kompakt ve sıkı paketlenmiştir. Ayrıca substrat moleküllerinin kristallerinin pektinaz enziminin daha küçük boyutta olduğu tespit edilmiştir. Pektinazın enzimatik aktivitesini Ca^{++} ve Na^+ gibi katyonların sitimüle ettiği bilinmektedir. Çalışmanın ikinci aşamasında pektinaz enziminin kristal yapısında bulunabilecek elementlerin analizi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pektinaz, taramalı elektron mikroskop (SEM), yapısal analiz, elementer analiz, pektin, poligalakturonik asit.

Structural analysis of pectin, polygalacturonic acid and pectinase enzyme lyophilysed

Abstract

Pectic substances are pectinic acid, pectin, pectic acid and their salts. Pectin is a polysaccharide found in plants like fruits and vegetables etc in high level. Substances which have no methyl group are pectic acid and polygalacturonic acid. Pectic substances are heteropolysaccharides with 30,000-300,000 molecular weight. Pectic enzymes are known as enzyme destroying chain. Pectic enzymes produce monogalacturonates by attacking the nonreducing end of the high molecular weight pectic acids. These are produced by saprophytic fungi, bacteria and some yeasts. They are used in fruit and vegetable technologies. In this research, crystal structures of pectin, polygalacturonic acid and lyophilysed bacterial pectinase samples were studied by scanning electron microscope. Homogenous crystal structure was observed from the images at SEM. Pectin, polygalacturonic acid and pectinase enzyme was packed so compact and tightly that no transiion of beam was observed. Pectin crystals have bigger size than polygalacturonic acid crystals. The crystals of substrat molecules was determined to be smaller than pectinase enzymes. Ca^{++} and Na^+ cations are known to stimulate enzymatic activity In second step of study, the elements which are thought to be present in the crystal structure of pectinase were analysed. Analysis results showed that Na, Zn and Ca elements were found at concentrations of 60 %, 29.296 % and 6.555 %, respectively.

Keywords: Pectinase, scanning electron microscopy (SEM), structural analysis, elementary analysis, pectin, polygalacturonic acid.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Meltem MARAŞ. mel2000@dostmail.com; Tel: (318) 357 35 71 dahili: 242.

Makale metni 23.10.2003 tarihinde dergiye ulaşmış, 16.06.2004 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.04.2005 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Giriş

Pektik maddeler, bitki duvarlarında ve orta lamelde oluşan yapısal polisakkaritlerdir. Bu maddeler büyük oranda anhidro galakturonik asit birimlerinden oluşan karmaşık, koloidal karbonhidrat türevlerinden meydana gelen yüksek su tutma kapasitesine sahiplerdir. Bu durumda pektik maddeleri oluşturan birim, poligalakturonik asit olup, düz bir zincir yapmak üzere birbirleriyle α -1.4 bağı yapmışlardır. 30000-300000 moleküler ağırlıklı heteropolisakkaritlerdir. Pektik maddeler pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir grup maddeye verilen genel addır (Willats vd., 2001).

Pektin, meyve sebze gibi daha yüksek bitkilerde bulunan bir polisakkarittir. D-Galakturonik asit üniteleri ve metoksil gruplarını oluşturmak için α -1.4 bağlanmasıyla oluşan uzun zincirli bir dizidir (Şekil 1).

Metil grubu içermeyen bileşikler ise pektik asit ve poligalakturonik asittir (Harpen, 1981).

Toprak, pektik mikroorganizmaların ana deposudur. Bu mikroorganizmaların üç büyük grubu, fungus, *Actinomyces* ve diğer bakterilerdir. *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Clostridiumlar* gibi bakteriler tarafından üretilmektedirler. Diğer grup bakteriler ise *Micromonospora*, *Azotobacter* ve *Rhizobiumlar*dır (Romboutz ve Pilnik, 1980).

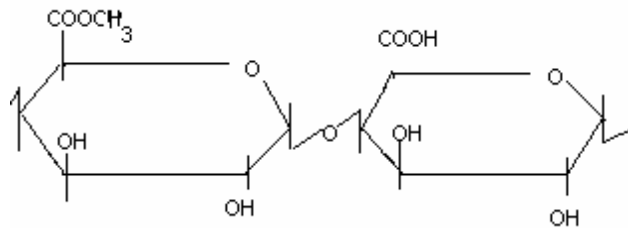
Metanolün en büyük doğal kaynağı pektindir. Metanolü kullanan mikroorganizmaların pektin esterazı ürettiği bilinmektedir. D-galakturonat, pektat ve pektin içeren üreme ortamlarında mikroorganizma tarafından üretilen enzimin üretim hızı değişmektedir (Bonnin vd., 2002).

Pektin, insanlar ve hayvanların intestinal boşluğundaki sindirici enzimler tarafından parçalanamamakta fakat kolondaki bakteriler tarafından kısmen yıkılmaktadır (Romboutz ve Pilnik, 1980).

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. Mikroorganizmal pektin yıkımı bitki patojenitesinde, simbiyotik yaşamda, bitkisel artıkların bozunumunda, bitkisel besinlerin sindiriminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca meyve sularının berraklaştırılması ve pektinin uzaklaştırılması gibi pek çok endüstriyel amaçlar içinde kullanılmaktadırlar (Aksöz, E. ve Aksöz, N., 1985).

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. Substratlarını tek zincir etki mekanizmasına göre ürüne çevirirler. Kalsiyum (Ca^{++}) iyonu varlığında sitimüle olurlar. Pektatların tamamen hidrolize olmamasının nedeni, substratların yapılarındaki düzensizlik nedeniyle olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Federici vd., 2001).

Pektik maddelere etki eden ve kısaca pektik enzimler denilen grupta da çok sayıda enzim yer almaktadır. Pektik enzimleri, pektin molekülünün galakturonan omurgasına olan etkilerine göre pektinesterazlar (ester bağınyı hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (Zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayırarak incelemek olasıdır (Aksöz, E. ve Aksöz, N., 1985).



Şekil 1. Pektin molekülünde tekrarlanan metilli ve metilsiz D-galakturonik asit birimleri, (Romboutz ve Pilnik, 1980; Aksöz, E. ve Aksöz N., 1985)

Endo-poligalakturonazlar çok sayıda bitki patojeni ya da saprofitik fungus, bakteri ve bazı mayalarca oluşturulurlar. Son yıllarda çok sayıda endo-poligalakturonan özellikle funguslardan olmak üzere tam olarak saflaştırılmıştır. Endo-poligalakturonazların da mikroorganizmalara bağlı olarak değişik moleküler formlarda olabilecekleri saptanmış ve çeşitli izoenzimleri bulunmuştur. Bu enzimlerin çoğu 30,000-35,000 Da moleküler ağırlıklı olup bir çoğunda glukoprotein orijini gözlenmiştir (Cho vd., 2001).

Endo-poligalakturonazlar, poligalakturonat için spesifiktir. Enzim aktivitesi için substratın kalsiyum tuzu gereklidir. Serbest tetragalakturonat anyonu, kompetitif bir inhibitördür (Romboutz ve Pilnik, 1980).

Endo-poligalakturonaz aktivitesi substrat yoğunluğunun azalması veya indirgen grupların artma hızı ölçülerek saptanmaktadır. Pektinlerin hidroliz oranı ve derecesi, esterifikasyonun artışıyla hızlıca azalmaktadır (Parenicova vd., 2000).

Endo-poligalakturonazlar, substrat olarak oligogalakturonatlar kullanıldığında farklı atak mekanizmaları göstermektedirler. Bu farklar enzimin aktif merkezinin yapısı ile yakından ilgili olmakla birlikte, özellikle katalitik grupların durumu ve substrat bağlama bölgesinin büyüklüğü ile ilgilidir (Maltei vd., 2001). Substrat molekülündeki karboksil gruplarının ve bazı ikincil alkol gruplarının enzim-substrat ilişkisinde rol aldığı sanılmaktadır (van Santen vd., 1999).

Erwinia cinsinden saflaştırılan ekzo-poligalakturonaz enzimi Ca^{++} iyonuna karşı daha az duyarlı olup, Na^{+} iyonlarının varlığında aktivite artışı gözlenmiştir. Moleküler ağırlıkları 28,000-35,400 Da arasında değişmektedir (Pickersgill vd., 1998).

Endopektinaz enzimi Ca^{++} ve diğer katyonların esterleşme oranı varlığında sitimüle olmaktadır. Özellikle Ca^{++} ve Na^{+} iyonlarının enzimatik aktiviteyi stimüle ettiği bilinmektedir. Bu sitimulasyon, ortamın pH'sine ve substratın esterleşme oranına bağlıdır. Endo-pektinazlar endo enzim olup, substrattaki glikozidik bağları

kopararak substrat çözeltisinin viskozitesini hızlı bir şekilde düşürmektedir. En düşük molekül ağırlıklı ve tamamen metillenmiş tetra ve tri galakturonatları parçalayan endo-pektinaz, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus foncecanus*'tan saflaştırılmış enzim, substratı ile bağlandığında substratta yer alan karboksil gruplarının ve tirozin kalıntılarının etkin olduğuna ait deliller bulunmaktadır. Bir pektik asit (substrat) çözeltisinin endo-poligalakturonazlarla etkileşimi sonucunda, yoğunluğunun %50 düşmesi, α -1.4 glikozit bağlarının ancak %2 kadarının hidrolize olduğunu göstermektedir (Hirose vd., 1999).

Ekzo-poligalakturonaz, pektin polimerinin dış kısımlarındaki α -1.4 glikozit bağlarını hidrolize eder, galakturonik asit kalıntılarını açığa çıkartır. Ekzo-poligalakturonazlar, yüksek bitkilerde, bazı böceklerin barsak sistemlerinde, bazı fungus ve bakterilerde bulunmaktadır. Bu enzimin varlığı genellikle galakturonik asit monomerlerinin serbest indirgenmiş gruplarının tayini ile yapılmaktadır (Kawano vd., 1999).

Pektinaz, endüstriyel pektik enzim preparatları için kullanılan genel bir isimdir. *Aspergillus niger* tarafından pektinaz yapımı, meyve ve sebze suyu teknolojilerinde çok fazla uygulanmaktadır. Pektinaz üretimi pH 3.5-4.5 arasında olmaktadır. Meyve ve sebze teknolojilerinde kullanılmaktadır. Ticari pektinazlar, meyve ürünlerinin tadını etkilemektedir. Enzim üretimi, indükleyici olmadan daha fazla miktarda enzim üreten ve katabolik baskılamaya dirençli mutantların seçimi yoluyla gerçekleştirilebilir (Romboutz ve Pilnik, 1980).

Bu çalışmada pektin, poligalakturonik asit ve liyofilize bakteriyel pektinaz örneğinin kristal yapıları incelenerek pektinaz enzimi ve substrat moleküllerinin büyüklükleri karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca Pektinaz enzim kristalinin elementer analizi ile enzim kristaline yansıyan elektron şiddetlerine ve kristalde yer alan Na ve Ca elementlerinin konsantrasyonlarına bakılarak enzimin aktivite göstermesi için hangi elementlere daha fazla gereksinim duyduğu belirlenmeye çalışılmıştır.

Deneysel çalışmalar

Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) poligalanturonat, pektin ve pektinaz örneklerinin incelenmesi

Ticari poligalakturonat, pektin ve Aksöz E ve Aksöz N. (1985) tarafından bakteriden elde edilmiş liyofilize pektinaz örneği, bir filtre kağıdı üzerine alınarak çapları 1 mm büyüklüğünde olan taneler halinde bir pens yardımıyla ayrıldı. Bu örneklerden yaklaşık 10 adet seçilerek stambalar üzerine yerleştirildi. Stamlardan görüntü elde etmek için Polaron marka SC500 model altın kaplama cihazıyla 2 dakika altın tozuyla kaplandı. Stambalar üzerindeki altın tozu ile kaplanan örnekler Jeol Scanning Microscop (JSM)-5600 taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelendi (Hayat, 1981).

Enzim örneklerinin elementer analizi (EDAX)

Liyofilize bakteriyel pektinaz örneği elementer analiz için stambalar üzerine alındı. Polaron marka CA7615 model karbon kaplama cihazında 2 dk. karbonla kaplanarak SEM'de incelendi.

Sonuçlar

Pektinaz, asidik bir optimum pH'ya sahiptir ve katalizlediği reaksiyon sırasında substrat molekülü, enzimin aktif merkezindeki aspartik asit ve glutamik asit gruplarına bağlanırlar. 353 aminoasitten oluşan 37,676 dalton moleküler ağırlığında ve iki disülfid bağı içermektedirler. (Parenicova vd., 2000).

Bu çalışmada pektinaz enziminin substratlarından pektinin SEM'de x10000 büyütmedeki görüntüsünde kristalin boyutu 1.2 µm (Şekil 2), x14000 büyütmede ise 3 µm'dir (Şekil 3). Diğer bir substrat olan poligalakturonik asitin SEM'deki x10000 büyütmedeki görüntüsünde boyutu 0.6 µm'dir (Şekil 4). Bu kristalin Şekil 5'deki x14000 büyütmedeki görüntüsünde ise 1.6 µm boyuta sahiptir. Bu sonuçlara göre pektin substratı poligalakturonik asit substratına göre daha büyük bir kristal yapıya sahiptir. Pektin kristali poligalakturonik asit kristaline göre daha homojen bir kristal yapı göstermektedir. Poligalakturonik asit kristalleri kıvrımlı yapılar göstermektedir.

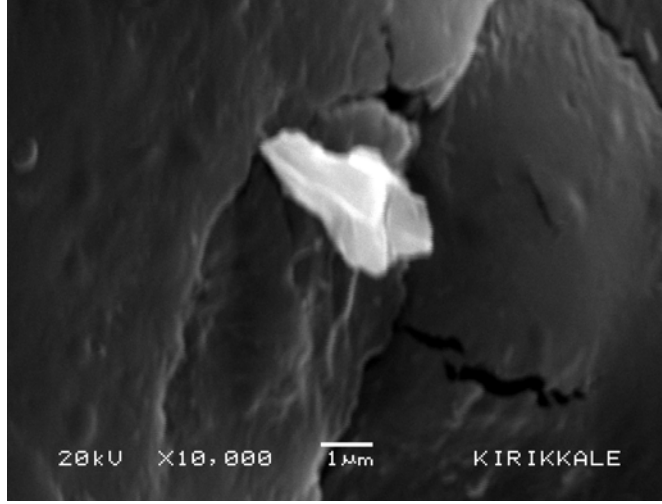
Liyofilize edilmiş bakteriyel pektinaz örneğinin SEM'de x700 büyütmedeki görüntüsünde protein kristallerinin ortalama boyutu 2 µm olarak görülmektedir (Şekil 6). x7500 büyütmede ise kristallerin boyutu 0.6 µm ile 1.8 µm arasında değişmektedir (Şekil 7). x16000 büyütmede ise görülen protein kristallerinin boyutu 0.8 ile 1.7 µm arasında değişmektedir (Şekil 8).

Şekil 6, 7 ve 8'de görülen pektinaz'a ait protein kristalleri homojen bir kristal yapı göstermektedir. Ayrıca elektron ışınlarını geçirmeyecek kadar kompakt ve sıkı paketlenmiştir. Daha önce yapılan yapısal sonuçlar, pektin fragmentinin parçalanması sırasında enzimin Ca⁺⁺ iyonuyla etkileşimini ve konformasyonda kayda değer farklılaşmaların olduğunu göstermektedir. Bir bitki hücresinde *in vivo* reaksiyonda 1mM'lik Ca⁺⁺ konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Herron vd., 2000).

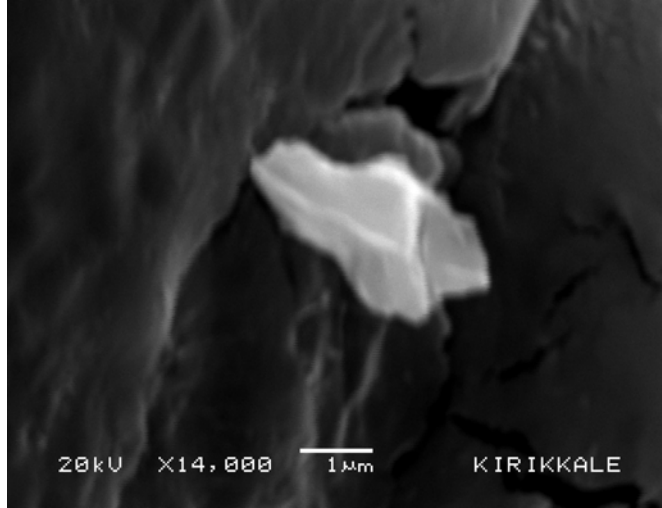
Ca⁺⁺ gibi Na⁺⁺'nda, pH 8'de enzimatik aktiviteyi sitimüle ettiği bilinmektedir. Ağır atom türevleri, Ca⁺⁺ bağlama yerine uygun koordinasyona sahip bir bölgeye bağlanmaktadır. Gerekli Ca⁺⁺ poligalakturonik asit substratı yerine proteine direkt olarak bağlanmaktadır. Bütün protein yüzey yüklerinin, Ca⁺⁺ bağlama bölgesini çevreleyen uzun bir boşluğa yerleştiği bulunmuştur. Ca⁺⁺ bağlama bölgesi, Arg içeren pozitif olarak yüklenmiştir (Vitali vd., 1998).

Çalışmamızda liyofilize edilmiş bakteriyel pektinaz örneğinin elementer analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 9). EDAX analiz cihazı, C ve O elementlerini kör nokta olarak kabul etmesinden dolayı karbonla kaplanmış örnekte bulunan bütün elementlerin konsantrasyonlarını belirleyebilmektedir. Analiz sonucuna göre karbonla kaplanmış pektinaz örneğinde Na elementi % 60 konsantrasyonda bulunmaktadır. Na elementini Kα elektron kabuğundan enerji yansıtmakta olup elementin saniyede yansıyan elektron şiddeti (c/s), 11.81 c/s'dir.

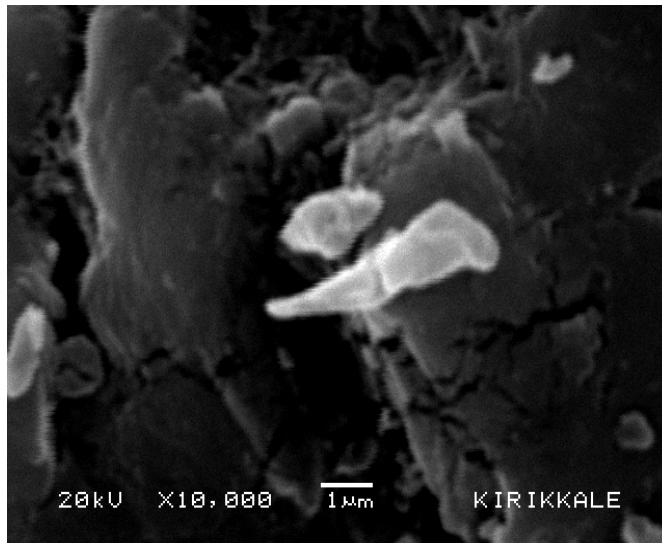
Bu çalışmada, elektron şiddetinin enzimde bulunan diğer elementlere göre en yüksek konsantrasyonda çıkması, Na elementinin pektinazda en yoğun olduğunu göstermektedir. Ca elementi % 6.555 konsantrasyonda bulunmaktadır. Na elementine oranla 10 kat daha az bulunması ilgi çekicidir.



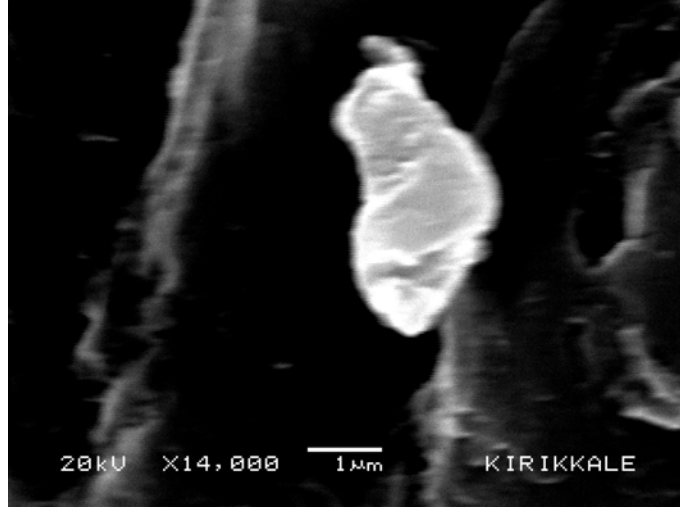
Şekil 2. SEM’de x10000 büyütmede, boyutu 1.2 µm olan pektin kristal yapısının görüntüsü



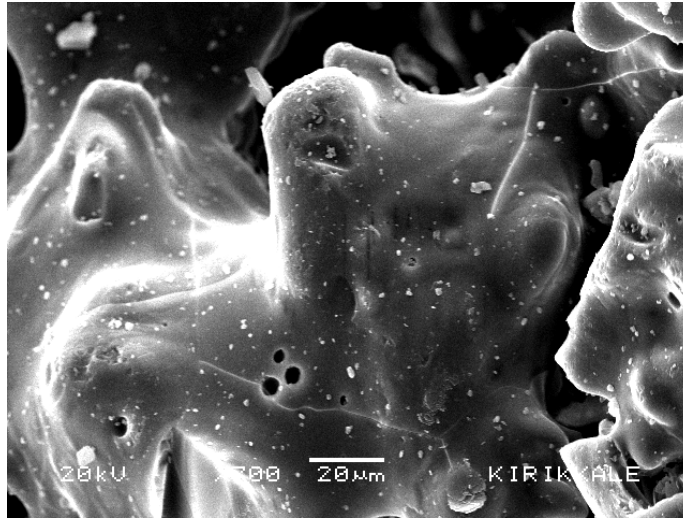
Şekil 3. SEM’de x14000 büyütmede, boyutu 3 µm olan pektin kristal yapısının görüntüsü



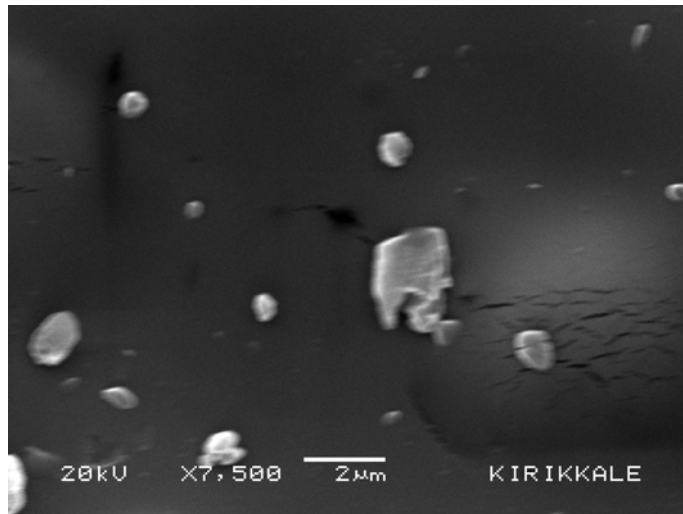
Şekil 4. SEM’de x10000 büyütmede, boyutu 0.6 µm olan poligalakturonik asit kristal yapısının görüntüsü



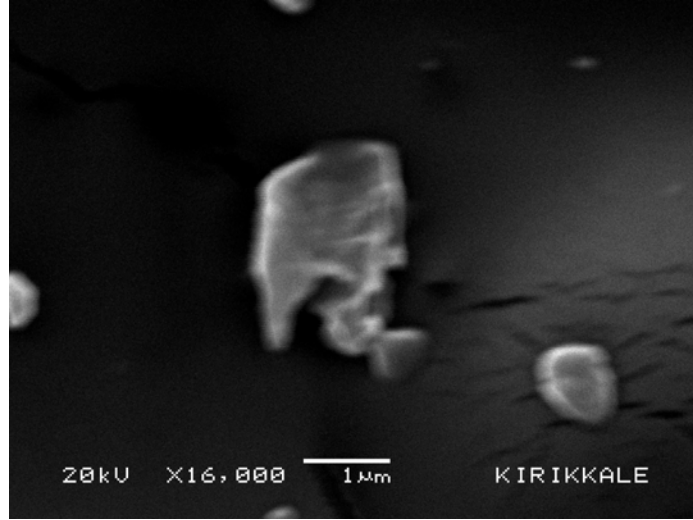
Şekil 5. SEM'de x14000 büyütmede, 1.6 µm boyutundaki poligalakturonik asit kristal yapısının görüntüsü



Şekil 6. SEM'de x700 büyütmede, 2.0 µm boyutundaki pektinaz enziminin kristal yapısının görüntüsü



Şekil 7. SEM'de x7500 büyütmede, boyutu 1.8 µm'ye kadar ulaşan pektinaz enziminin kristal yapısının görüntüsü

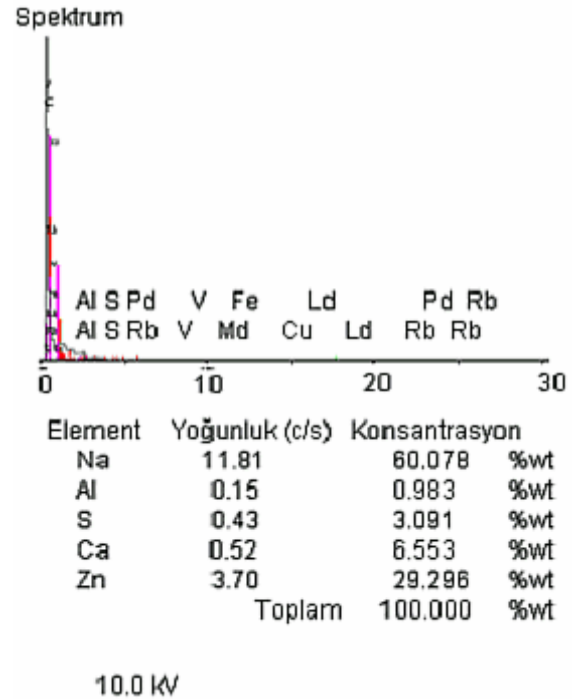


Şekil 8. SEM’de x16000 büyütmede, boyutu 1.7 µm’ye kadar ulaşan pektinaz enziminin kristal yapısının görüntüsü

Na elementi gibi K α elektron kabuğundan enerji yansıtmakta olmasına rağmen saniyede yansıyan elektron şiddeti 0.52 c/s’dir. Bu durum bakteriden elde edilen liyofilize edilmiş pektinaz enziminin stimülasyon için Ca yerine Na’ya daha fazla ihtiyaç duyduğunu göstermektedir. Ağır metal iyonlarından Zn elementi pektinaz enziminde % 29.296 konsantrasyonda bulunmakta ve L α elektron kabuğundan enerji yansıtmaktadır. Yayılan elektron şiddeti ise 370 c/s’dir. Protein kristalinde ayrıca Al ve S elementleri de bulunmakta olup Zn’ye oranla daha az şiddette elektron yansıması Zn’den daha az miktarda elektron bulunduğunu göstermektedir. Alüminyum’un proteindeki konsantrasyonu %0.983 iken sülfür ise %3.091 konsantrasyonda pektinaz protein kristalinde bulunmaktadır. Elementer analiz sırasında Şekil 9’da Rb, Md, V ve Cu elementleri gözlenmektedir, ancak konsantrasyonları % 0.5 değerinden daha küçüktür.

Mikroskobik ve makroskobik metodlar, proteinin atomik ayrıntılarının çözümüne olanak sağlamaktadır (Goodenough, 1992). Bu çalışmaya benzer çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada pektin, poligalakturonik asit ve liyofilize bakteriyel pektinaz örneğinin kristal yapıları SEM’de incelendiğinde pektinaz enziminin x7500 büyütmede 1.8 µm iken enzimin substratı olan poligalakturonik asitin x10000 büyütmede 0.6 µm ve enzimin diğer bir substratı olan pektinin aynı büyütmede 1.2 µm olarak ölçülmesi, pektinaz

enziminin substrat kristallerinin pektinaz enzim kristalinden daha küçük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca pektinaz enzim kristalinin elementer analizi ile enzim kristaline yansıyan elektron şiddetlerine ve kristalde yer alan Na⁺ ve Ca⁺⁺ elementlerinin konsantrasyonlarına bakıldığında enzimin aktivite göstermesi için Ca⁺⁺ yerine Na⁺ya daha fazla gereksinim duyduğu belirlenmiştir.



Şekil 9. Pektinaz enzim kristalinin elementer analizi

Kaynaklar

- Aksöz, E. ve Aksöz, N., (1985). Pektik enzimler (derleme), *Biyokimya Dergisi*, **10**, 1, 38-51.
- Bonnin, E., Le Goff, A., Korner, R., Vigouroux, J., Roepstorff, P. ve Thibault, J. F., (2002). Hydrolysis of pectins with different degrees and patterns of methylation by the endopolygalacturonase of *Fusarium moliniforme*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1596**, 1, 83-94.
- Cho, S.W., Lee, S. ve Shin, W., (2001). The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modelled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex, *Journal of Molecular Biology*, **311**, 4, 863-878.
- Federici, L., Caprari, C., Mattei, B. ve Savino, C., (2001). structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 23, 13425-13430.
- Goodenough, P., (1992). Protein Engineering II, *Proceedings of the Second AFRC Protein Engineering Conference*, Cambridge University, September, Berkshire, UK. 70-71.
- Harpen, M. G., (1981). Industrial enzymes from microbial sources recent advances, *Chemical Technology Review*, 180, 282-284.
- Hayat, M. A., (1981). *Principles and techniques of Electron Microscopy*. Van Nostrand Reinhold Company, Newyork.
- Herron, S. R., Benen, J. A. E., Scavetta, R. D., Visser, J. ve Jurnak, F., (2000). Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 16, 8762-8769.
- Hirose, N., Kishida, M., Kawasaki, H. ve Sakai, T., (1999). Purification and characterisation of an endo-polygalacturonase from a mutant of *Saccharomyces cerevisia*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **63**, 6, 1100-3.
- Kawano, C. Y., Chellegatti, M. A., Said, S. ve Fonseca, M. J., (1999). Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **29(Pt 2)**, 133-140.
- Malttei, B., Belnalda, M. S., Federici, L., Roepstorff, P. ve Cervone, F., (2001). secondary structure and post-translational modifications leusin-rich repeat protein PGIP from *Phaseolus vulgaris*, *Biochemistry*, **40**, 2, 569-76.
- Parenicova, L., Kester, H. C., Benen, J. A. ve Visser, J., (2000). Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties, *FEBS Letter*, **467**, 2-3, 333-336.
- Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K. ve Enkins, J., (1998). crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora*, *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 38, 24660-24664.
- Romboutz, F. M. ve Pilnik, W., (1980). Pectic Enzymes, *Economic Microbiology*, A. H. Rose (Eds.), Academic Press, London, **33**, 227-382.
- Van Santen, Y., Benen, J. A., Schroter, K. H. ve Kalk, K. H., (1999). 1,68-A crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residue, *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 43, 30474-30480.
- Vitali, J., Schick, B., Harry, C. M., Visser, J. ve Jurnak, F., (1998). The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-A resolution *Plant Physiology*, **116**, 69-80.
- Willants, W. G., Mc Cartney, L., Mackie, W. ve Knox, J. P., (2001). Pectin: cell biology and structural prospects for functional analysis, *Plant Molecular Biology*, **47**, 1-2, 9-27.