

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağrı UYAR

***Bacillus* sp.'den ALKALİ PEKTİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ
VE KARAKTERİZASYONU**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2017

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus sp.*'den ALKALİ PEKTİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Çağrı UYAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ
GÜVENMEZ
DANIŞMAN

.....
Doç. Dr. Deniz YILDIRIM
ÜYE

.....
Yard. Doç. Dr. Akın YİĞİN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2015-3423**

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Bacillus sp.*'den ALKALİ PEKTİNOLİTİK ENZİM ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

Çağrı UYAR
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
İkinci Danışman : Öğr. Gör. Dr. Dilek ALAGÖZ
Yıl: 2017, Sayfa: 87
Jüri : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Doç. Dr. Deniz YILDIRIM
: Yrd. Doç. Dr. Akın YİĞİN

Bu çalışmada, farklı meyve ağaçlarının bulunduğu toprak örneklerinden izole edilen *Paenibacillus illinoisensis* (CUHK1)'den alkali pektinaz enzimi üretilmiştir ve enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Pektinaz aktivitesini saptamak amacı ile izole edilen suşlar %0,5 pektin içeren agar besiyerinde 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bakteri kültürü 5 ml iyot solüsyonu ile boyanmıştır.

Toplam 117 suş pektinaz aktivitesi için test edilmiştir ve 18 tanesi pektinaz aktivitesi göstermiştir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı %10'luk SDS-PAGE ve Zimogram analizi ile 32 kDa olarak belirlenmiştir. Optimum enzim aktivitesi 50°C ve pH 10,0'da saptanmıştır. Üretilen enzim 20-90 °C aralığındaki sıcaklıklarda 60 dakika inkübe edilmiştir. 50 °C'de %80 enzim aktivitesi korunmuştur. 60 °C üzerinde ise açık bir şekilde aktivite kaybı görülmüştür. Enzim pH 6,0-11,0 değerleri aralığında 60 dakika inkübe edilerek pH stabilitesi test edilmiştir. Pektinaz enzimi pH 9,0'da stabiliken aktivite pH 12,0'de yaklaşık %77'ye düşmüştür. Pektinaz aktivitesine farklı kimyasalların etkisi araştırılmıştır. 1 ve 10 mM CaCl₂ ile enzim aktivitesinin arttığı, Triton X-100 ve SDS'nin ise aktiviteye etkisinin olmadığı saptanmıştır. 1 mM CuCl₂ ve CoCl₂ varlığında yaklaşık %60 enzim aktivitesi korunmuştur.

Bu sonuçlara göre; üretilen alkali pektinaz enzimi tekstil endüstrisinde pamuklu kumaşlardan pektik maddelerin uzaklaştırılması sürecinde kullanımının uygun olacağı önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Pektin, pektinaz, *Bacillus sp.*, karakterizasyon

ABSTRACT

MSc THESIS

PRODUCTION OF ALKALINE PECTINASE FROM *Bacillus* sp. AND IT'S CHARACTERIZATION

Çağrı UYAR

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Co-Supervisor : Lecturer Dr. Dilek ALAGÖZ
Year: 2017, Pages: 87
Jury : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Prof. Dr. Deniz YILDIRIM
: Asst. Prof. Dr. Akin YİĞİN

In this study, the alkaline pectinase was produced by *Paenibacillus illinoisensis*(CUHK1) isolated from different areas of fruit tree soil and the produced enzyme has been characterized.

The strains were inoculated into producing media (containing %0.5 pectin) and incubated at 37 °C for 48 hours. Then the bacteria culture was stained with 5 ml iodine solution for the detection of pectinase activity

Total 117 strains were tested for the enzyme activity and 18 of them showed pectinase activity. The molecular weight of partially purified pectinase was determined as 32 kDa by SDS-PAGE and zymogram analysis. Optimum activity of pectinase was determined at pH 10.0 and 50 °C. After 60 min of incubation at 20-90 °C, 80% of the activity was maintained at 50 °C. The activity loss was clearly seen at the temperatures over °60 C. pH stability of pectinase was tested at the pH range of 6-11 with an incubation of 60 min. The enzyme activity was stable at pH 9.0, however, it decreased to 77% at pH 12. The effect of some different chemicals on pectinase activity was examined. The activity induced with 1 mM and 10 mM CaCl₂. It also conserved its activity in presence of Triton X-100 and SDS. Approximately 60% of the enzyme activity was retained with 1mM CuCl₂ and CoCl₂.

According to these results, The produced alkaline pectinase maybe used in the textile industry in the process of removal of pectic substances from cotton knitted fabrics.

Key Words: Pectin, pectinase, *Bacillus* sp., characterization

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada, farklı meyve ağaçlarının bulunduğu toprak örneklerinden izole edilen *Paenibacillus illinoisensis* (CUHK1)'den alkali pektinaz enzimi üretilmiştir ve enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam 117 suş pektinaz aktivitesi için test edilmiştir ve 18 tanesi pektinaz aktivitesi göstermiştir.

Pektinaz enzimi üretimi için seçilen CUHK1 suşu pH 8,0-12,0 aralığında hazırlanmış katı besi yerlerinde inkübe edildiğinde; alkali pH'nın bakterinin optimum üremesini ve enzim sentezini negatif yönde etkilememiştir. Test edilen tüm alkali katı besi yerlerinde aktivite zon çapları geniş ve birbirine çok yakın bulunmuştur. Enzimin katı besi yerinde oluşturduğu en geniş aktivite zon çapı pH 9,0'da belirlenmiştir.

Sıvı besiyerinde pektinaz üretimi en iyi pH 10,0'da saptanmıştır. pH 7,0-9,0 aralığında ortalama %90 aktivite gözlemlenirken pH 11,0-12,0 aralığında aktivite %60 olarak belirlenmiştir. CUHK1 suşunun sıvı besiyerinde üretildiğinde, en yüksek enzim aktivitesi 35°C sıcaklıkta saptanmıştır. 25 ve 45°C'de aktivitenin ortalama %58 olduğu gözlenmiştir.

Substrat konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi test edildiğinde en yüksek üretim %0,1 pektinli besi yerinde saptanmıştır. Konsantrasyon arttıkça enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim üretimi için en uygun substrat konsantrasyonu oranı sırası ile 0,1>0,05 >0,5 >1>1,5 olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada üretilen pektinazın karakterizasyon sonuçlarına göre; optimum aktivite pH 10,0'da saptanmış ve test edilen tüm pH'larda ortalama %70,4 enzim aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 3,0-7,0 aralığında ortalama %53, pH 8,0-12,0 aralığında ise ortalama %87,8 aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.

CUHK1 suşundan üretilen pektinazın değişen pH'larda kararlılığı test etmek için pH 3,0-12,0 aralığında 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlara göre enzim orijinal aktivitesini ortalama %83,9 oranında korumaktadır.

CUHK1 suşundan üretilen pektinolitik enzim; 50°C'de optimum aktivite 20-40°C aralığında ortalama %74,33, 50 ve 60°C'de ise ortalama %88 oranında aktivite göstermiştir.

Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi test edildiğinde; (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 °C) 60 dk ön inkübasyon işleminden sonra aktivite ortalama %57,25 oranında korunmuştur. Enzim aktivitesi; 50°C'de %82, 20-40°C'lerde %65,33, 60-90°C'lerde ortalama %45 oranında korunmuştur.

Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerindeki etkisini saptamak amacıyla; farklı kimyasallar ile enzim muamele edilmiş ve kalan aktivite standart aktivite metoduyla ölçülmüştür.

Enzim aktivitesinin 1 mM ve 10 mM CaCl₂ varlığında sırası ile %2 ve %15 oranında indüklendiği saptanmıştır.

Üretilen pektinaz %1 Triton X-100 ile muamele edildiğinde enzim orijinal aktitesini %98 oranında korumuştur. Enzim %0,1-%0,5 SDS ile muamele edildiğinde orijinal aktivitenin sırası ile %13 ve %24 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir.

Enzim 1 mM FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ ile sırasıyla, %5, %10, %12 ve %15 oranlarında inhibe olmuştur. Bu metal iyonları 10 mM kullanıldığında ise sırasıyla, %12, %20, %35 ve %22 oranlarında inhibe olmuştur. Enzim 1 ve 10 mM EDTA ile sırasıyla %86 ve %84 oranlarında orijinal aktivitesini korumuştur.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan üretilen pektinaz enzimi 1 mM CoCl₂ ve CuCl₂ ile sırasıyla %61 ve %70 oranında orijinal aktivitesini korumuştur. 10 mM CoCl₂ ve CuCl₂ varlığında %48 ve %25 oranında orijinal enzim aktivitesini korumuştur. 1mM üre varlığında ise aktivite %91 oranında korunmuştur.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan üretilerek, Et-OH ile kısmen saflaştırılmış pektinaz, pektin içeren SDS-PAGE ile analiz edilmiş (zimogram) ve pektinolitik aktivite gösteren 32 kDa moleküler ağırlığında enzim bandı saptanmıştır.





TEŞEKKÜR

Eđitim ve öğretim hayatımda beni bilgi ve deneyimleriyle aydınlatan, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol göstererek her türlü desteği sağlayan, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim boyunca verdiği bilgiler ile beni aydınlatan hocalarım Prof. Dr. Burhan ARIKAN ve Öğr. Gör. Dr. Dilek ALAGÖZ'e teşekkür ederim.

Moleküler Biyoloji Anabilimdalı'nda her zaman yanımda olan Doktora ve Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Üniversitemizin bana kazandırdığı önemli dostlarım olan Uzman Biyolog Seçil Berna KUZU, Biyolog Damla ŞİHAY, Uzman Biyolog Deniz TANRISEVER, Biyolog Mustafa GENÇOĞLU, Biyolog Tuğçe BOĞA ve Uzman Biyolog Esra Sündüz YİĞİTTEKİN'e ayrı ayrı teşekkür ederim.

Ayrıca canım ailem Cansuret UYAR, Çağla UYAR ve Damla UYAR'a teşekkür ederim.

Tezimi 2210 C Öncelikli Alanlar kapsamında değerlendirip burs ile destek olan TÜBİTAK- BİDEB'e, bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na ve maddi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET.....	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Enzimler.....	1
1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	3
1.1.2. Alkalifilik Enzimler.....	4
1.2. Alkalifilik Mikroorganizmalar.....	4
1.2.1 Bacillus.....	4
1.3. Pektin.....	6
1.3.1. Pektinin yapısı.....	7
1.3.2. Pektinolitik enzimler (Pektinaz).....	9
1.3.3. Mikrobiyal Pektinazlar.....	11
1.3.4. Pektinaz Enziminin Endüstriyel Uygulama Alanları.....	12
1.3.4.1 Alkali Pektinazların Endüstriyel Uygulama Alanları.....	12
1.3.4.2 Asidik Pektinazların Endüstriyel Uygulama Alanları.....	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	17
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Materyal.....	23
3.1.1. <i>Bacillus</i> sp. İzolasyonu, Üretimi ve Tanılanmasında Kullanılan Besiyerleri.....	23
3.1.1.1. N1 Besiyeri.....	23

3.1.1.2. Pektinli Besiyeri	24
3.1.1.3. Pektinli Sıvı Besiyeri	24
3.1.1.4. Simon's Sitrat Agar	24
3.1.1.5. İndol Besiyeri (Tryptophan/Peptone Broth)	25
3.1.1.6. Kanlı Agar	25
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	26
3.1.2.1. Lugol Çözeltisi	26
3.1.2.2. NaOH Çözeltisi	26
3.1.2.3. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)	26
3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler	27
3.1.3.1. Sodyum-Asetat Tamponu	27
3.1.3.2. Sodyum-Fosfat Tamponu	27
3.1.3.3. Glisin-NaOH Tamponu	28
3.1.3.4. Boraks-NaOH Tamponu	28
3.1.4. Elektroforez Analizinde Kullanılan Solüsyonlar	28
3.1.4.1. Solüsyon A (Stok solüsyon)	28
3.1.4.2. Solüsyon-B (4X Ayırıcı jel tamponu) Ayırma jelinin hazırlanması	29
3.1.4.3. Solüsyon C (4X Dengeleme jeli tamponu) (Bollag ve ark, 1996).	29
3.1.4.4. AMPS (Amonyumpersülfat, %10)	29
3.1.4.5. Elektroforez Yürütme Tamponu (pH 8,3)	30
3.1.4.6. Örnek Hazırlama Tamponu (5X),	30
3.1.4.7. SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (Coomassie Brilliant Blue, CBB-250)	30
3.1.4.8. Jelden Boyayı Geri Alma (destaining) Solüsyonu	31
3.1.4.9. Renatürasyon Solüsyonu	31
3.2. Metod	31
3.2.1. <i>Bacillus</i> sp. suşlarının izolasyonu	31

3.2.2. Bacillus sp. Suşlarının Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	32
3.2.2.1. Pektinaz Aktivitesinin Pektin-Agarda Saptanması	32
3.2.2.2 Pektinaz Üretici Bacillus sp. Suşlarının Tanımlanması.....	33
3.2.3. Pektinaz Aktivitesinin Pektinli Buyyonda Saptanması	33
3.2.4. Pektinaz Üretiminde Sıcaklık ve pH'nın Etkisi.....	35
3.2.4.1. Katı Besiyerinde Optimum Sıcaklık ve pH'nın Saptanması ...	35
3.2.4.2. Sıvı Besiyerinde Optimum Sıcaklık ve pH'nın Saptanması....	35
3.2.5. Pektinin farklı Konsantrasyonlarının Pektinaz Üretimine Etkisi.....	36
3.2.6. Pektinaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi	37
3.2.7. Pektinaz Üretiminde Optimum İnokulum Miktarının Saptanması... 37	
3.2.8. Pektinaz Üretimi ve Kısmi Saflaştırma	37
3.2.9. Pektinolitik Aktivite Üzerine pH'nın Etkisi	38
3.2.10. Pektinolitik Aktivite Üzerine Sıcaklığın Etkisi	38
3.2.11. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi.....	39
3.2.12. pH'nın Enzim Kararlılığına Etkisi.....	39
3.2.13. Kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkisi	39
3.2.14. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi.....	40
3.2.14.1. Ayırıcı jelin (%10) bileşimi ve hazırlanışı.....	41
3.2.14.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi.....	41
3.2.14.3. Elektroforez Koşulları	41
3.2.14.4. SDS- PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram analizi	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Bacillus sp. Suşlarının İzolasyonu.....	43
4.2. İzolatların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	46
4.2.1. Katı Besiyerinde Aktivite Saptanması.....	46
4.2.2. Sıvı Besiyerinde Aktivite Saptanması	48
4.3. H1 ve L8 (pektinaz üreticisi) Suşlarının Tanılanması	48
4.4. Pektinaz Üretimini Etkileyen Koşulların Optimizasyonu	49
4.4.1. Pektin Agarda Optimum pH'nın Saptanması	49

4.4.2. Pektin Agarda Optimum Sıcaklığın Saptanması	50
4.4.3. Sıcaklık ve pH'nın Sıvı Besiyerinde Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	52
4.4.4. Pektinaz Üretiminde Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi....	54
4.4.5. Pektinaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi	55
4.4.6. Pektinaz Üretiminde Bakteri Aşılama (inokulum) Oranının Etkisi... 56	
4.5. Pektinaz Üretimi ve Kısmi Saflaştırma	57
4.6. Optimum pH.....	58
4.7. Optimum Sıcaklık.....	60
4.8. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi	62
4.9. pH'nın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi	63
4.10. Kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkileri.....	64
4.11. Elektroforetik Analiz (SDS-PAGE, Zimogram)	67
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Sodyum Asetat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	27
Çizelge 3.2. Sodyum Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	27
Çizelge 3.3. Glisin-NaOH Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması.....	28
Çizelge 4.1. H1 ve L8 izolatlarının pektin-agarda üreme alanı ve enzim aktivite zon çapları.....	47
Çizelge 4.2. H1 ve L8 izolatlarına uygulanan testler	49
Çizelge 4.3. Pektinli Agarda pH'ın Bakteri (CUHK1) Üremesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi.....	50
Çizelge 4.4. Pektinli Agarda Sıcaklığın Bakteri (CUHK1) Üremesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi.....	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1.	Pektinin temel yapısı. Şematik gösterimi (A) Son önerilen alternatif (B) Pektinin yapısı (Willats ve ark., 2006).....	8
Şekil 1.2.	Bazı pektinaz enzimlerinin etki şekilleri (Jayani ve ark., 2005).....	11
Şekil 3.1.	DNS yöntemi ile ortamda bulunan serbest şeker miktarının belirlenmesini sağlayan reaksiyon.	34
Şekil 3.2.	PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) sistemi	40
Şekil 4.1.	<i>Bacillus</i> sp.'nin (CUHK1) Gram boyanma karakteristiği (ışık mikroskobu 10x100).....	44
Şekil 4.2.	<i>Bacillus</i> sp.'nin (L8) Gram boyanma karakteristiği (ışık mikroskobu 10x100).....	45
Şekil 4.3.	Pektinli besiyerinde pektinolitik (48 saat) aktivite zonları	47
Şekil 4.4.	CUHK1 suşunun Pektinli Agarda 20 ve 37°C'de aktivite zonu	51
Şekil 4.5.	Pektinli sıvı besiyerinde pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi	52
Şekil 4.6.	Pektinli sıvı besiyerinde sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	53
Şekil 4.7.	Pektin konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi.....	55
Şekil 4.8.	Enzim üretiminde inkübasyon süresinin etkinliği.....	56
Şekil 4.9.	Pektinaz üretiminde inokulum miktarının etkisi	57
Şekil 4.10.	Et-OH presipitasyonundan sonra pektinolitik aktivite.....	58
Şekil 4.11.	pH'ın enzim aktivitesine etkisi	59
Şekil 4.12.	Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi.....	61
Şekil 4.13.	Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi	62
Şekil 4.14.	pH'nın enzim kararlılığına etkisi	64
Şekil 4.15.	Kimyasalların enzim aktivitesine etkileri	65
Şekil 4.16.	Pektinaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram analizi sonucu.....	68



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
AMPS	: Amonyum persülfat
Da	: Dalton
EDTA	: Etilendiaminotetra-asetik asit
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
mM	: Milimolar
OD	: Optik Dansite
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
rpm	: Dakikada devir sayısı
sp.	: Species (tür, tekil)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin
PGA	: Poligalakturonik Asit



1. GİRİŞ

Biyoteknoloji çağında güncel yaklaşımlar, mevcut ve yeni ortaya çıkan/çıkabilecek sorunların saptanması ve bu sorunların çözümleri için canlı ya da canlı ürünlerini kullanmayı öngörmektedir. Özellikle endüstrinin hızlı gelişimi, artan nüfusun gereksinimlerinin karşılanması, bilimin her alanında mikrobiyal enzimlerin yoğun şekilde kullanılmasını zorunlu kılmaktadır.

Dünya ülkelerinin birçoğu günümüzün en popüler ve global pazar payı oranı oldukça yüksek olan biyoteknolojinin gerisinde kalmamak için yoğun çalışmalar gerçekleştirmektedirler. Gelişime adaptasyon gösteren ülkeler farklı biyoteknoloji ürünlerinin pazara sunulması noktasında bir yarış içerisindeyler.

Biyoteknoloji, çok disiplinli bir bilim dalıdır. Biyoloji, moleküler biyoloji, kimya, fizik, biyokimya, fizyoloji, genetik, mikrobiyoloji ve daha birçok bilim dalının katkı sağladığı bir alandır. Biyoteknoloji genel olarak; gıda biyoteknolojisi, tıbbi biyoteknoloji, tarım ve hayvancılık biyoteknolojisi, endüstriyel biyoteknoloji ve çevre biyoteknolojisi olmak üzere beş gruptan oluşmaktadır. Günümüzde ve gelecekte biyoteknolojinin dahil olmadığı bir dünya düşünülemez.

1.1. Enzimler

Enzimler; canlı organizmalar tarafından hücrede sentez edilen organik katalizörlerdir. Organik ve inorganik katalizörler çok sayıda farklı substratlara etkili olurken, enzimler hem katalizleyeceği substratın cinsi hem de reaksiyon tipi açısından son derece seçicidirler. Enzimlerin reaksiyonları katalizlemesi diğer katalizörlerden daha hızlıdır.

Günümüzde enzimler endüstriyel uygulamalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Gıda sanayisinin hemen hemen bütün dallarında, tüketilen enerjiyi azaltmak ve uygulanan işlemleri hızlandırmak amacıyla kullanılmaktadır ve endüstriyel enzimlerin kullanım alanları buna bağlı olarak artmaktadır (Wingard, 1972).

Enzimlerden faydalanmak geçmiş dönemlerden beri bilinçli ya da bilinçsiz bir şekilde insanların hayatında yer almıştır. Enzimlerin yapılarını ve fonksiyonlarını, işleyiş mekanizmalarını ve enzimlerin rol aldığı bütün reaksiyonları araştıran enzimolojinin tarihi ilk olarak 19. yüzyıldan daha erken tarihlere kadar dayanmaktadır.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon, 1981). Enzimlerin daha çok mikroorganizmalardan elde edilmesinin nedeni üretilen enzimlerin; katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ve daha fazla miktarda üretilibilmeleridir (Wiseman, 1987).

Mikrobiyal enzimlerin, kimyasal kazalizörlere göre canlılara zararsız, doğa ve çevreye dost olmaları nedeniyle endüstriyel işlemlerde kullanımı her geçen gün artmaktadır. Çünkü; mikrobiyal enzimler daha yüksek substrat spesifitesi gösterirler. Çok farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite gösterebilirler. Çeşitli kimyasallara, tuzlara toleransları ve direnci yüksektir. Üretilmeleri daha ucuz ve kolaydır. Yüksek oranda üretim yapılabilir hatta biyolojik atıklar substrat olarak kullanılarak hem enzim üretimi gerçekleştirilirken hem de doğadaki kullanılabilir atıkların geri dönüşümü sağlanmaktadır. Mikrobiyal enzimlerin üretim süreçlerinde çevreye ve canlılara zararlı atıkların oluşmaması ve enzimlerin de hiçbir şekilde zararlı bileşenler olmaması nedeniyle endüstrinin her alanında kullanılmaktadır.

Enzimlerin endüstriyel boyutlarda üretilmesi ve kullanılması süreçleri “enzim teknolojisi” olarak ifade edilmektedir. Enzim teknolojisi, mikrobiyal aşamalar (*üretici suşların seçimi, geliştirilmesi vb.*), enzimlerin fermentasyon yoluyla üretilmesi (*enzimin üretimi için en uygun besiyeri kombinasyonları ve ortam koşullarının optimizasyonları*), üretilen enzimin saflaştırılması, katalitik etkinliğin artırılması için enzimlerin üç boyutlu yapılarının değiştirilmesi (*protein*

mühendisliği), immobilizasyonları (*enzimlerin destek materyaller yardımı ile suda çözünmeyen hale getirilmesi*) gibi çalışmaları kapsamaktadır.

1.1.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler hücrelerden salınım şekillerine göre 2 ana gruba ayrılırlar. Bu sınıflandırmada hücre içinde bulunup, orada aktivitesini gösteren enzimlere “hücre içi”(intraselüler), salgılandıkları yerden başka yerde faaliyet gösterenlere ise “hücre dışı”(ekstraselüler) enzimler denir. Hücre dışı enzimler genellikle değişken hücre içi enzimlere göre stabilitesi daha yüksek olup birçok koşulda aktivitelerini uzun süre koruyabilmektedirler.

1961 yılında Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliğinin (IUBMB) oluşturduğu rapora göre enzimler katalizledikleri reaksiyon tipleri temel alınarak 6 sınıfa ayrılmışlardır. Böylece bilinen ve yenileri keşfedilerek çeşitliliği hala artan enzimlerin arasında oluşan karışıklılığın önüne geçilmiştir.

E.C sınıflandırma sistemine göre enzimlerin 6 sınıfı bulunmaktadır;

- **E.C.1. Oksidoredüktazlar:** Oksidasyon-redüksiyon (yükseltgenme indirgenme) reaksiyonlarını katalize eden enzimlerdir.
- **E.C.2. Transferazlar:** Hidrojen dışında bir atomun veya atom grubunun bir molekülden diğerine aktarılması sağlar. Örnek transaminaz, fosforilaz vb.
- **E.C.3. Hidrolazlar:** Kimyasal tepkimede büyük moleküllerin yıkılması için kimyasal bağa su ekleyen veya başka bir grubu suya çevirerek kolay kullanılabilir hale getiren enzimlerdir. Örnek; proteazlar, karbonhidrazlar, lipazlar vb.
- **E.C.4. Liyazlar:** Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir.
- **E.C.5. İzomerazlar:** Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.

- **E.C.6. Ligazlar:** Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirine bağlanmasını sağlayan enzimlerdir. Örnek; aminoasitlerin veya yağ asitlerinin aktifleşmesi.

1.1.2. Alkalifilik Enzimler

Alkalifilik mikroorganizmaların araştırılması ile birlikte alkali özellikte olan birçok enzim grubu keşfedilmeye başlamıştır. Alkali enzimler ilk kez 1971 yılında *Bacillus* sp. 221 suşu tarafından üretilen alkali proteaz enziminin üretilmesi ile dikkat çekmiştir. Daha sonra 35 yeni enzim laboratuvarında üretilip saflaştırılmıştır ve bazıları endüstriyel alanlarda kullanılmıştır (Horikoshi, 1999).

1.2. Alkalifilik Mikroorganizmalar

Mikroorganizmaların optimal üreyebilmeleri için pH büyük önem taşımaktadır. Birçok mikroorganizmanın bağımlı olduğu pH; nötr ya da nötre yakındır. Nötr pH değerlerinin üzerindeki alkali pH'larda üreyebilme özelliğindeki mikroorganizmalar alkalifilik mikroorganizmalar olarak adlandırılır. Bu mikroorganizmalar kendilerine uygun alkali ortamlarda canlılığını sürdürebilir ve genellikle çeşitli alkali enzimler üretebilir.

Alkali ortamlarda optimal üreyebilen mikroorganizmalar da alkalifilik ve alkalitolerant olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Eğer mikroorganizmanın optimal üremesi pH 9,0 ise ve pH 10,0'un üstünde üreyebiliyor, pH 7,0 ve daha düşük pH'larda üreyemiyorsa bu mikroorganizma **alkalifil** olarak adlandırılır. Mikroorganizma eğer alkali pH'da üreyebiliyor ancak optimal üremesi nötral pH'a yakın aralıkta ise **alkalitolerant** olarak adlandırılır.

1.2.1 Bacillus

Bacillus genusu, *Bacillaceae* familyasının içerisinde yer alan geniş bir ailedir. Ehrenberg 1835 yılında *Vibrio subtilis* bakterisini tanımlamıştır. 1872

yılında ise Cohn isimli araştırmacı *Vibrio subtilis*'e *Bacillus subtilis* adını vererek bu mikroorganizmayı *Bacillus* genusuna dahil etmiştir (Slepecky and Hemphill, 2006).

Bacillus genusunun hücreleri çomak şekilli, gram-pozitif, olumsuz ortamların çoğuna yüksek dirençli, tek endosporu bulunan, peritrik kamçıya sahip, aerobik veya fakültatif bakterilerin oldukça geniş ve heterojen bir ailesidir. Hücre duvarı çapraz bağlı mezo-dinamo pimelik asitten oluşan birçok türü bulunmaktadır. Çoğunlukla mezofiliklerdir ayrıca psikrofilik ve termofilik türleri de bulunmaktadır (Gordon ve ark., 1973; Goto ve ark., 2000).

Bacillus genusu içerisindeki türler çok farklı habitatlarda bulunmakla beraber ayrıca, tuz gölleri, yoğun karbonat içeren topraklar gibi oldukça alkali habitatlarda da bulunabilirler. Büyük kısmı patojen değildir fakat *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* türleri patojeniktir. *Bacillus* genusu üyeleri yüksek ekstraselüler enzim üretme kapasitesine sahiptirler.

Bacillus cinsinin vejetatif olan hücreleri $0,5 \times 1,2$ μm ile $2,5 \times 10$ μm boyutları arasında değişiklik gösterir. *Bacillus* genusu hücreleri bir araya gelerek kısa veya uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücrelerinin içeriğinde parabazal kısım ve protein kristalleri bulunabilmektedir. Protein kristalleri (S-tabakaları) hücre yüzeyinde veya glukoprotein alt birimlerinde bulunur. *Bacillus* cinsi üyelerinde S-tabakaları birbirinden farklılık gösterir ve moleküler ağırlıkları 40 ile 200 kDa arasında değişir (Slepecky ve Hemphill, 2006). Genellikle bu cinsin üyeleri flagellat ile hareket edebilme yeteneğindedir.

Bacillus genusunda bulunan sporun şekli ve sporogoniumun bulunduğu yer türlere göre değişiklik göstermektedir. Hücredeki endosporlar şekil olarak silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlak yapıda olabilirler. Sporogoniumlar hücrenin merkezinde, ucunda, lateralde veya yakınlarında bulunabilirler (Lennete ve ark., 1985). *Bacillus* cinsinde spor oluşumu ilk olarak Cohn tarafından *B. subtilis* bakterisinde gözlemlenmiştir ve sporların yüksek sıcaklıkta dirençli olduklarını belirtmiştir. Koch bir patojen olan *Bacillus anthracis* bakterilerinde

bulunan sporların tanımlanmasını yapmıştır (Keynan ve Sandler, 1983; Slepecky ve Hemphill, 2006).

Bacillus cinsinin hücre duvarı yapısı peptidoglikan tabakaları içermektedir. Bu peptidoglikan tabakaları teikoik asit ve teikuronik asit polimerleri ile kovalent şekilde bağlanmaktadır ve proteinlere sabitlenmiş şekildedirler (Graumann, 2007).

Günümüzde endüstriyel kullanıma uygun birçok mikrobiyal enzim, *Bacillus* cinsinden üretilmektedir. *Bacillus* cinsinden enzim üretilmesi (*ekstraselüler formda enzim*) diğer üretim yöntemlerine göre daha avantajlı olduğu için çok tercih edilen bir yöntemdir.

1.3. Pektin

Bitkilerde bulunan hücre duvarı çok önemli ve özel bir yapıdır. Bitkinin büyümesinde, hücreler arası iletişimde, bitkiyi patojenlere karşı korumada, mekanik direnç sağlamada ve dış ortam ile iletişim gibi pek çok önemli fonksiyonlarda aktif rol oynar. Bitkide hücre duvarı birincil ve ikincil olarak iki çeşittir. Birincil hücre duvarı içeriğinde pektik maddeleri, çeşitli proteinleri, selüloz ve hemiselülozu barındırır. İkincil hücre duvarının içeriğinde ise daha çok polimerize selüloz bulunduğundan ağaç endüstrisinde daha önemli rol oynamaktadır (Alkora ve ark., 1998).

Pektin yunanca kökenli olup koyu kıvamlı, ağır anlamında olan “pektos” kelimesinden türetilmiştir. Pektin, gerçekte özellikleri birbirine benzeyen ve pektik maddeler adı verilen bir madde grubu içinde yer alır. Ancak çoğu zaman bu maddelerin tümü için de pektin sözcüğü kullanılmaktadır.

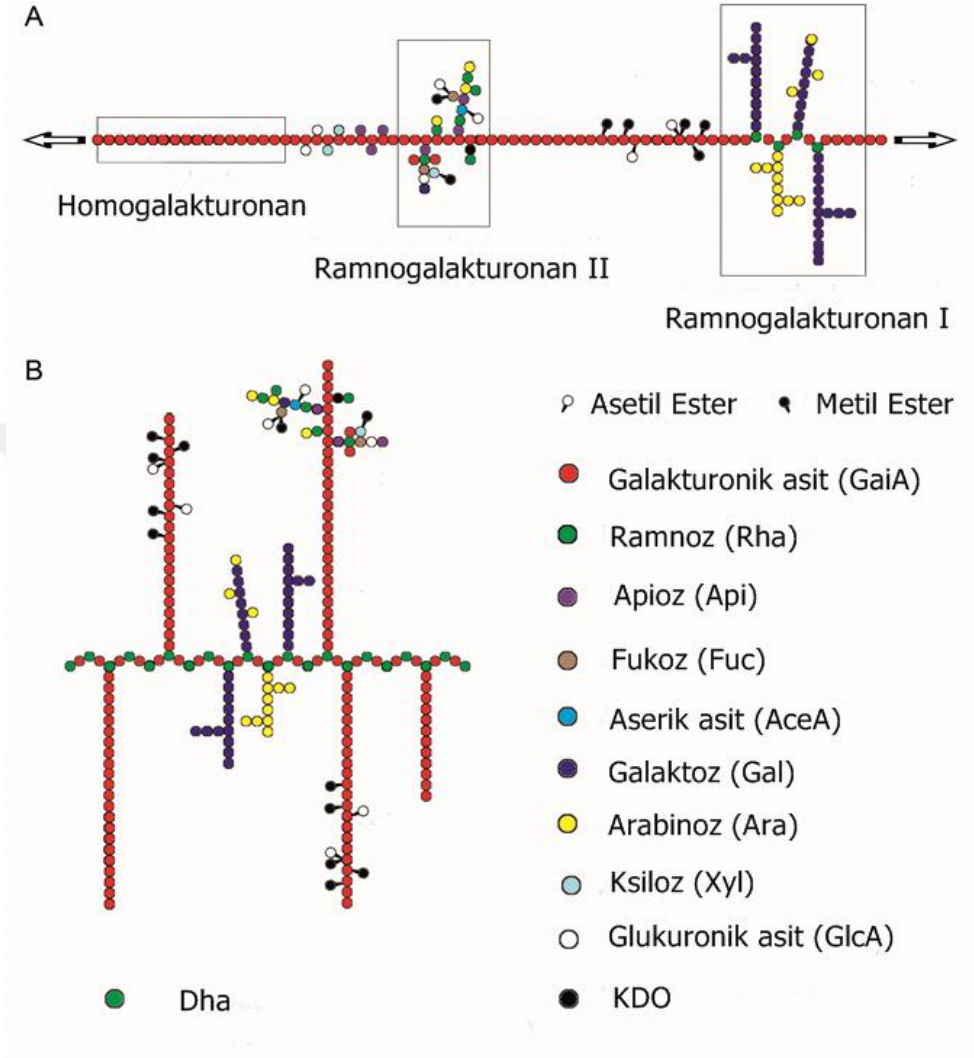
Pektik maddeler, diğer yapı bileşenleriyle birlikte bitkinin hücre çeperinde bulunur ve dokuya sertlik veren temel birleşiklerdendir. Kısaca bunlar bitki kohezyonu ve yapısal bütünlüğünden büyük ölçüde sorumludur. Bitki materyalinin taze ağırlığının yaklaşık %0.5 ila %4'ünü pektik maddeler oluşturur (Jayani ve ark., 2005).

1.3.1. Pektinin yapısı

Kimyasal olarak pektik maddeler, α -(1-4) bağları ile bağlanmış galakturonik asit kalıntısının bir omurgası olan, kompleks koloidal asit polisakaritleridir. Pektin molekülünün yan zincirleri, L-ramnoz, arabinoz, galaktoz ve ksilozdan oluşur. Galakturonik asidin karboksil grupları, kısmen metil grubu ile esterleştirilmiştir ve kısmen ya da tamamen sodyum, potasyum veya amonyum iyonları tarafından nötralize edilmiştir (Be Miller, 1986).

Üç büyük pektik polisakarit grubu bulunmaktadır. Bunlar;

- **Homogalakturonan;** D-galakturonik asit monosakkarit alt ünitelerinin tekrarlarından oluşur. Homogalakturonan, asetillenmiş veya metil esterlenebilir D-galakturonik asit ile oluşturulan lineer bir polimerdir. Bu pektin, düz bölge olarak da adlandırılabilir.
- **Ramnogalakturonan I;** α -(1-5) L-arabinan ve β -(1-4) D-galaktan yan bağlarını içeren ardışık L-ramnoz ve D-galakturonik asit alt ünitelerini içerir.
- **Ramnogalakturonan II;** kompleks çok dallı bir polisakarittir. Vincken ve arkadaşları pektin yapısının, HG ve RGII yan zincirlerinin RGI omurgasına bağlı olduğunu önermiştir. Bu pektik maddeler üç boyutlu bir ağ oluşturan, çapraz bağlanmış jel yapısı oluşturmaya eğilimli maddelerdir. Bu pektik yapı kıllı bölge olarak adlandırılabilir (Pedrolli ve ark., 2009).



Şekil 1.1. Pektinin temel yapısı. Şematik gösterimi (A) Son önerilen alternatif (B) Pektinin yapısı (Willats ve ark., 2006).

Pektik maddelerin endüstride bir çok kullanım alanı bulunmaktadır. Bunlar kısaca ;

Gıda Sektöründe Uygulama Alanları

- Jöle, marmelat, reçel, vb. ürünlerde jelleşmenin sağlanmasında rol oynar.
- Salça, krema, krem peynir, sos, mayonez gibi ürünlerin tat yoğunluğunun ve kıvamının artmasını sağlar.
- Meyveli yoğurdun içeriğindeki meyve tadının artmasında kullanılır.
- Dondurmada stabilizatör görevi görür.
- Fırın ve fırıncılık ürünlerinde bayatlamayı geciktirmede kullanılır.
- Meyve suyu üretiminde homojen ve güzel görünüm sağlamada kullanılır.
- Zeytin posasından zeytin yağının eldesinde rol oynar.
- Kahve ve çay fermantasyonlarında kullanılır.
- Şarap üretiminde büyük rol oynar.

Diğer Sektörler;

Genel olarak kıvam gerekliliği olan pek çok sektörde kullanılmaktadır.

Spesifik olarak ise;

- Tıp alanında kullanılır.
- Kozmetik ürünlerinde stabilizatörlük görevi görür.
- Geviş getiren hayvanların yemlerine ilave edildiğinde sindirilebilirliği ve enerji yoğunluğunu arttırdığı belirtilmiştir.
- Tekstil sektöründe lifli bitkilerin zank oluşumunu önlemede kullanılır.

1.3.2. Pektinolitik enzimler (Pektinaz)

Pektinazlar genel olarak, depolimerizasyon (hidrolazlar ve liyazlar) ve deesterifikasyon (esterazlar) reaksiyonları yoluyla pektik maddeleri katalize edebilen enzim grubuna verilen isimdir.

Pektinazlar etki gösterdiği substrata, etki ettiği substratı parçalama yoluna, enzimin parçalamayı sırası ile ya da rasgele yapmasına göre sınıflandırılmıştır.

Pektinazlar geniş bir yelpazeye sahiptir ve **pektin esterazlar**, **hidrolazlar** ve **liyazlar** olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadırlar. Bu ana gruplar bir çok yan dallara ayrılmıştır.

Protopektinazlar: Protopektinaz protopektin formundaki yüksek miktarda polimerize çözünmüş pektini çözebilen enzimdir (Kashyap ve ark., 2001). Bu enzim çeşidi Tip A ve Tip B olarak ikiye ayrılır.

Pektin Metil Esteraz (PME): Pektin esteraz olarak da bilinen bu enzim pektinin yapısında bulunan pektik asit ve metanolün metoksil grubunun deesterifikasyonunu hidrolizler.

Pektin asetil esterazlar (PAE): Bu enzimler pektinin asetil esterlerini hidrolizler ve pektini pektik asit ve asetata dönüştürürler (Shevchik ve ark., 1997).

Polimetilgalakturonaz: Polimetilgalakturonaz pektinin omurgasında bulunan glikosidik bağlarının hidrolitik olarak ayrılmasını katalizleyerek esterleşmiş pektin formu olan metil galakturonatları meydana getirir (Rastegari ve Karbalaeei-Heidari, 2014).

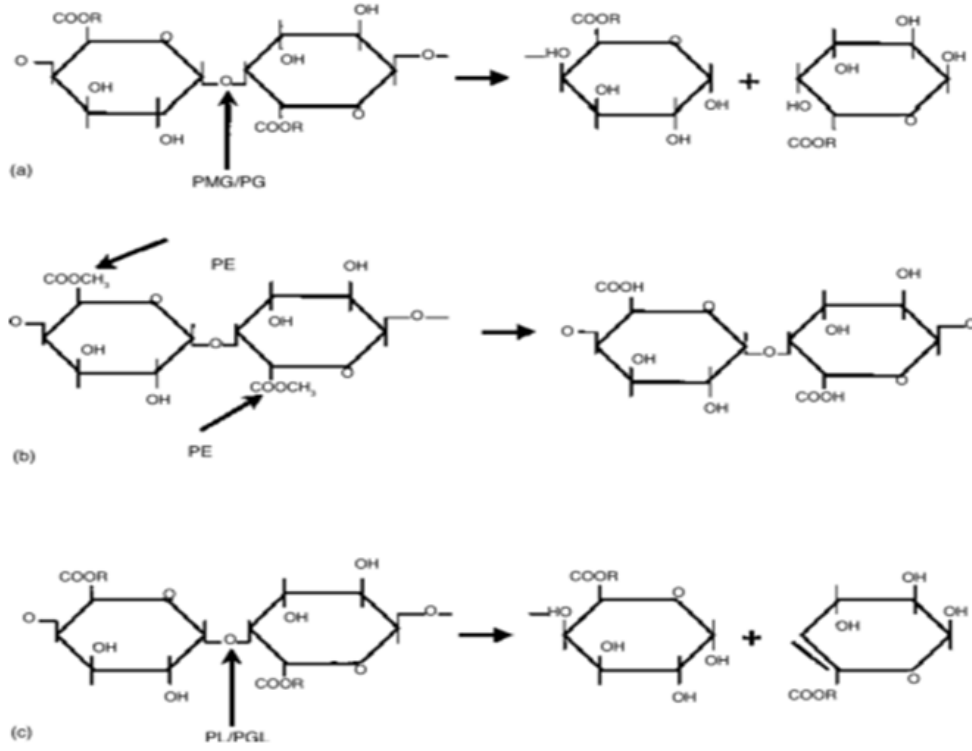
Poligalakturonaz: Poligalakturonazlar pektinin yapısında bulunan poligalakturonik asitler arasındaki alfa-1,4 glikosidik bağları hidrolize eder(Wang ve ark., 2015). Bu reaksiyon sonucunda galakturonik asit meydana gelir.

Pektat liyaz: Pektat liyazlar özellikle poligalakturonik asit formundaki substratın glikosidik bağlarını parçalayarak transeliminasyon yoluyla doymamış ürün meydana getirir. Bu enzim için mutlaka Ca^{2+} iyonu gereklidir ve EDTA ile güçlü bir şekilde inhibe olur (Jayani ve ark., 2005).

Pektin liyaz: Pektin liyazlar glikosidik bağların transeliminasyonu ile özellikle esterleşmiş pektini rastgele parçalayarak doymamış metiloligogalakturonaz üretirler. Pektin liyaz aktivitesinde Ca^{2+} iyonu ve diğer katyonlar gerekli değildir (Jayani ve ark., 2005).

Ayrıca ramnogalakturonan ramnohidrolazlar enzimi aktivitesi sonucu ramnoz, ramnogalakturonan galakturonohidrolaz enzimi aktivitesi sonucu

monogalakturonat, ksilogalakturonan hidrolaz enzimi aktivitesi sonucu ise ksilozgalakturonaz meydana gelir (Yadav ve ark., 2009).



Şekil 1.2. Bazı pektinaz enzimlerinin etki şekilleri (Jayani ve ark., 2005).

1.3.3. Mikrobiyal Pektinazlar

Pektinolitik enzimler doğada bakteriler, mantarlar, bazı böcek türleri, bitkiler gibi birçok canlı tarafından üretilmektedir. Doğada mikroorganizmalar ve bitkiler arasında mikrobiyal pektinolitik enzimler önemli bir bağ oluştururlar.

Pektinolitik enzimler, bitkilerin ve mikroorganizmaların simbiyotik bir yaşam oluşturabilmelerinde, ölü bitki materyallerinin mikroorganizmalar tarafından kullanılarak doğal karbon döngüsünü oluşmasında ve bitkilerde bazı fitopatolojik aşamalarda önemli rol oynamaktadırlar (Pedrolli ve ark., 2009).

Bilimsel araştırmalarda mikrobiyal pektinolitik enzimlerin üretilmesiyle birlikte bu enzimlerin, birçok farklı etki mekanizmalarının ve çeşitli moleküler ağırlıktaki formlarının olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal pektinazlar küresel gıda enzimleri satışlarının %20'sini oluşturmaktadır. Genellikle pektinaz enzimi üreticisi olarak mantarlar kullanılmaktadır (Jayani ve ark., 2005). Günümüzde endüstride kullanılan pektinolitik enzimlerin büyük bir bölümü mikroorganizmalardan üretilmektedir.

1.3.4. Pektinaz Enziminin Endüstriyel Uygulama Alanları

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, enzimlerin ekonomik değerinin çok yüksek olması ve kullanılabilir endüstriyel alanlarının fazla olması nedeni ile biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır.

Pektinaz, endüstriyel pektik enzim preparatları için kullanılan genel bir isimdir. Pektinazlar uzun yıllardır endüstride kullanılmakla birlikte mikrobiyal pektinazlar küresel gıda enzimleri satışlarının %20'sini oluşturmaktadır.

Pektinazlar endüstride kullanım alanlarına göre genelde alkali pektinazlar (optimum pH >7) ve asidik pektinazlar (optimum pH <7) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Alkali pektinazlar genelde bakteriyal kaynaklı olurken asidik pektinazlar genelde mantarlar tarafından üretilmektedirler.

1.3.4.1 Alkali Pektinazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Alkali pektinazlar genelde, bakteriler tarafından özellikle *Bacillus* türü tarafından üretilir. Alkali pektinazlar ilk kez 1972 yılında yayınlanan *Bacillus* sp. P-4-N suşu tarafından üretilen alkali endopoligalakturonaz enzimi ile ilgili çalışmada araştırılmıştır (Horikoshi, 1999).

Gıda atık suyunun giderilmesi: Meyve suyu üretimi endüstrisi gibi pektik artıklarını içeren gıda atık sularının ön muamelesinde alkali pektinazlar kullanılmaktadır. (Kashyap ve ark., 2001) Gıda endüstrisinde yeni bir yöntem

olarak kullanılan alkali pektinaz enzimleri diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Bu enzimlerin kullanılması fiziksel susuzlaştırma, sprey sulama, kimyasal koagülasyon, doğrudan aktif çamur iyileştirilmesi ve metan fermantasyonunu takiben kimyasal hidroliz yöntemleri ile atık su giderilmesine göre maliyeti daha düşük, daha az karmaşık ve işlem süreci daha kısadır (Tanabe ve ark., 1986).

Tekstil endüstrisi: Alkali pektinolitik enzimler tekstil endüstrisinde keten, kenevir ve hindistan cevizinde lif zamkı gidermede kullanılarak pektik bileşenler ortamdaki elimine edilmektedir. Zamklama, içeriğe alkali pektinolitik karışım eklenerek ya da elyaf fermantasyonu için pektinaz üreten mikroorganizmalar kullanılarak yapılabilir.

Ham pamuktan selülozik olmayan kirleticileri özel pektinolitik enzimlerle uzaklaştırma yüzeyin daha hidrofilik hale getirilmesi için alternatif ve çevre dostu bir yöntemdir. Klug-Santner ve ark., (2007), *Bacillus pumilus* BK2'den elde edilen saflaştırılmış endo-pektat liyazı ile pamuk dış tabakasından pektinin giderilmesini %80'e kadar sağladıklarını bildirmiştir.

Japon kağıdı üretimi endüstrisi: Alkali pektinaz enziminin, japon kağıdı üretiminde kullanılması diğer yöntemlere göre kağıt sayfalarının pürüzsüz homojen görünümü ve yumuşak olmaları bakımından avantaj sağlamaktadır.

Kağıt üretimi endüstrisi: Günümüzde kağıt hamuru ve kağıt fabrikaları ürünlerinin üretim süreçlerinde bir takım sorunları çözmek amacıyla enzimlerden faydalanılmaktadır. Kağıt üretiminde kullanılacak materyallerin içerisinde bulunan istenmeyen partiküller filtre yardımı ile ya da bazı tutucu kimyasallar yardımı ile uzaklaştırılmaktadır (Kashyap ve ark., 2001). Ayrıca kağıt hamurunu beyazlatmak amacıyla alkali peroksit ağartıcı kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler alkali pektinolitik enzim kullanımına göre daha zahmetli ve maliyeti daha yüksek bir yöntemdir. Pektinaz ile muamele gören kağıt hamuru içeriğinde bulunan pektin ve poligalakturonik asitleri parçalayarak istenmeyen sorunları ortadan kaldırmaktadır.

Biktisel yağ üretim endüstrisi: Endüstride hindistan cevizi tohumu, hurma, ayçiçeği tohumu, kolza tohumu, pamuk yağı ve zeytinyağı, potansiyel bir

kanserojen olan hekzan gibi organik çözücüler ile çıkarılarak üretilmektedir. Günümüzde bu yöntemin dışında pektinaz enzimi gibi bitki hücre çeperi polisakaritlerinin parçalanmasında yer alan enzimler bitkisel yağların üretilmesinde kullanılarak verimin artması sağlanmıştır.

Tohum yağı üretiminde öğütülmüş tohuma enzim ile müdahale edilerek hücre duvarlarının yıkımı gerçekleştirilir böylece su ile ekstraksiyon işlemi kolaylaşır (Ramadan ve ark., 2009). Yağ ekstraksiyonunda sulu enzimatik yöntemin kullanılması geleneksel organik çözücü kullanımına göre avantajlıdır. Bu yöntemle doğal çevreye zarar verilmez ve hava kirliliğine neden olan uçucu organik bileşikler oluşmaz. Araştırmalarda bu yöntemle üretilen ürün kalitesinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir ve üretilen mısır yağındaki serbest yağ asidi oranının peroksit ve hekzan kullanılarak üretilen mısır yağı ile değerlerinin aynı olduğu gözlemlenmiştir (Dunford ve ark., 2004).

Kahve ve çay fermantasyonu: Alkali pektinazlar kahve ve çay fermantasyonunda önemli işlev görürler. Kahve fermantasyonunda pektinaz üreten mikroorganizmalar sayesinde kahve çekirdeklerinden zamklı dış tabaka ayrılmaktadır. Çay yaprağı fermente banyosuna selülazlar, hemiselülazlar ve proteinaz ile birlikte pektinazlar eklenmesi ise %5 oranında çayın kalitesini yükseltir (Angayarkanni ve ark., 2002).

1.3.4.2 Asidik Pektinazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Asidik pektinaz üretiminde genellikle mantarlardan yararlanır. Gıda ve şarap endüstrisinde kullanılan asidik pektinazlar çoğunlukla *Aspergillus niger*'den üretilmektedir.

Meyve suyu üretilirken baskı yaparak suyun çıkarılma sürecini engelleyen, yüksek yoğunluklu pektin açısından zengin meyve suları, jelatinimsi bir yapıda posta bağlı kalır. Çıkarma işleminde, daha kolay işlemlerle meyve suyu verimini arttırmak için pektinaz ek olarak kullanılır. Bu yöntem geleneksel mekanik meyve suyu sıkma işlemine kıyasla %90 oranında verimi arttırabilir.

Endüstride asidik pektinazlar elma suyu, elma şarabı, armut suyu, üzüm suyu ve şarabı, çilek suyu, böğürtlen suyu, portakal ve limon suyu, turuncgil kabuklarından yağ eldesi, kuru hayvan yemi, mango, şeftali, guava, papaya, ananas ve muz suyu gibi birçok meyve suyu üretiminde kullanılmaktadır (Kashyap ve ark., 2001).

Çalışmanın Amacı: Endüstriyel enzim üretim süreçlerinde, doğaya ve canlıya zararsız, hızlı ve ekonomik üretilen, geniş substrat spesifitesi gösteren, zor koşullarda (yüksek ve düşük; pH, sıcaklık, tuzluluk) aktivitesini kaybetmeyen mikrobiyal kökenli enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır.

Pektinazlar; gıda (meyve suyu üretimi, bitkisel yağ eldesi, kahve/çay fermentasyonu), tekstil, kağıt üretimi gibi endüstrilerde etkin olarak kullanılmaktadır.

Bu araştırmada alkali pH'da pektinolitik aktivite gösteren *Bacillus* cinsi bakterilerin bitkisel atık ihtiva eden doğal ortamlardan izolasyonu, izolatların tanılanması, en yüksek pektinolitik aktivite gösteren suş/ların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle tanılanması, laboratuvar ölçeğinde pektinaz üretimi, üretim koşullarının optimizasyonu ve enzimin karakterizasyonu amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Soares ve ark. (1999), toprak örneğinden izole ettikleri P4.3 numaralı *Bacillus* sp. suşundan ürettikleri pektinolitik enzimin 6,5 pH'da ve 50 °C sıcaklıkta optimum enzim aktivitesi gösterdiğini ve 60 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini yüksek oranda koruduğunu saptamışlardır.

Kobayashi ve ark. (2001), *Bacillus* sp. suşundan alkali pektinolitik enzim üreterek aktivitesini saptamışlardır. Üretilen pektinazın, pH 8,0'da ve 55 °C'de optimum enzim aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığı 115 kDa, izoelektrik noktası pH 4,6 olarak saptanmıştır. EDTA, Zn⁺², Cu⁺² ve Ni⁺² iyonlarının orijinal enzim aktivitesini sırasıyla %80, %94 %69 %28 düzeyinde inhibe ettiğini Ca⁺², Mn⁺², Fe⁺³ iyonlarının ise orijinal enzim aktivitesini arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Cabeza ve ark. (2011), *Bacillus subtilis* suşundan düşük sıcaklıkta (3°C) aktivite gösteren pektinaz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin pH 5,0 ve 30°C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Mei ve ark. (2013), *Bacillus halodurans* M29 suşundan alkalik pektinaz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin pH 10,0'da ve 80°C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlığının 44 kDa olduğu gösterilmiştir.

Soriano ve ark. (2000), *Bacillus* sp. BP-23 suşundan alkalik pektinaz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin pH 10,0'da ve 50°C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Zimogram analizi sonucu enzimin moleküler ağırlığı 25 kDa bulunmuştur.

Kashyap ve ark. (2000), *Bacillus* sp. DT7 suşundan alkalik pektinaz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin pH 8,0'de ve 60°C sıcaklıkta optimum aktivite gösterdiğini ve zimogram analizi ile moleküler ağırlığının 106 kDa olduğunu bildirmişlerdir. 1,0 mM CaCl₂'nin varlığında üretilen enzimin aktivitesinin %50 arttığını ve MgSO₄'ün enzim aktivitesine etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir.

HgCl₂, EDTA ve FeCl₃ varlığında enzim aktivitesinin sırasıyla %98,1, %83,0 ve %30,5 oranında azaldığını saptamışlardır.

Mukesh ve ark. (2012), *Bacillus* sp MFW7 suşundan pektinaz üretimi için optimum üretim koşullarını pH 6,5 ve 35°C (72 saat inkübasyon süresi) olarak rapor etmişlerdir. SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlığını 37 kDa saptamışlardır.

Amid ve ark. (2014), *Hylocereus polyrhizus*'den üreterek saflaştırdıkları termoalkali pektinazın pH 8,0'da ve 75°C'de optimum enzim aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Enzimin 10-85°C'ler aralığında 1 saatlik ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini %90'a kadar koruduğunu, pH 3,0-11,0 aralığında 1 saatlik ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini yaklaşık %90 oranında koruduğunu ve pH 11,0 ve üzerindeki pH değerlerinde orijinal aktivitesini yüksek oranda kaybettiğini gözlemlemişlerdir. SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlığını 34,2 kDa saptamışlardır. Ca⁺² ve Mg⁺² iyonlarının varlığında orijinal enzim aktivitesinin %112 arttığı, Ni⁺², Al⁺² ve Fe⁺² iyonlarının varlığında orijinal enzim aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir.

Moyo ve ark. (2003), *Kluyveromyces wickerhamii*'den pektinolitik enzim üretimi için optimum koşulların pH 5,0 ve 32°C (91 saat inkübasyon süresi) olduğunu saptamışlardır.

Patil ve ark. (2010), *Penicillium* sp.'den ekstraselüler pektinolitik enzim üretmişlerdir. Enzimin optimum üretim koşullarını pH 6,0 ve 35°C (72 saat inkübasyon süresi) olarak, SDS-PAGE analizi ile moleküler ağırlığını 35 kDa olarak saptamışlardır.

Horikoshi (1971), *Bacillus* sp. (P-4-N) izolatından alkali pektinolitik enzim üreterek saflaştırmışlardır. Üretilen alkali pektinazın, pH 10,0'da optimum enzim aktivitesi gösterdiğini ancak pH 6'da kararlı olduğunu saptamıştır. Enzimin, 80°C'de 5 dk bekletildiğinde aktivitesini yaklaşık %80 koruduğunu, EDTA'nın orijinal enzimin aktivitesini %100 inhibe ettiğini ve moleküler ağırlığının 60-70 kDa olduğunu bildirmiştir.

Soriano ve ark. (2006), *Paenibacillus barcinonensis* suşundan pektinolitik enzim üretmişler ve pH 10,0'da, 55°C'de optimum enzim aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Üretilen enzimin, pH 7,0'de 24 saat inkübe edildiğinde orijinal aktivitesini %60 kaybettiğini bildirmişlerdir.

Songpim ve ark. (2008), *Paenibacillus polymyxa* N10 suşundan pektinaz enzimi eldesinde üretim koşullarının etkisini araştırmışlar ve optimum üretim koşullarını pH 8,0 ve 35°C (200 rpm) olarak saptamışlardır.

Ahlatwat ve ark. (2007), *Bacillus subtilis* bakterisinden pektinaz enzimi üreterek enzimin karakterizasyonunu yapmışlardır. Üretilen alkali enziminin, pH 9,5'de, 65°C'de 10 dk inkübasyon süresinde optimum enzim aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Banu ve ark. (2010), *Penicillium chrysogenum*'dan pH 6,5 ve 35°C'de optimum enzim üretimi ve enzimin optimum aktivite gösterdiği koşulları pH 6,5 ve 50°C olarak bildirmişlerdir. CaCl₂ varlığında enzimin orijinal aktivitesinin %3,56 oranında arttığı, MgCl₂, ZnCl₂, HgCl₂, CoCl₂, CuSO₄, BaCl₂ ve EDTA varlığında orijinal aktivitesinin sırası ile %26,56, %16,21, %58,77, %58,5, %59,5 %39,47 ve %38,65 oranlarında inhibe olduğunu saptamışlardır. SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlığını 31 kDa saptamışlardır.

Nitinkumar ve ark. (2010), *Penicillium* sp.'den ekstraselüler pektinaz enzimi üretimi için, optimum koşulların pH 6,0'da, %1,5 substratlı (pektin) besiyerinde, 35°C'de 72 saat inkübasyon süresinde gerçekleştiğini saptamışlardır. Üretilen enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE sistemi ile 35 kDa belirlemişlerdir.

Torimiro ve Okonji (2013), tarımsal atıklardan izole ettikleri *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* suşlarından alkali pektinaz enzimi üretmişlerdir. *Bacillus stearothermophilus* suşundan ürettikleri enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C iken *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis* bakterilerinden üretilen enzimlerin 50°C'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis*

suşlarının optimum aktivite gösterdiği pH değerlerini sırası ile 7,5, 8,0 ve 9,0 olarak belirlemişlerdir. Na^{+2} , K^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının üretilen üç pektinaz enzimini de inhibe etmediğini gözlemlemişleridir.

Gainvors ve ark. (1999), *Saccharomyces cerevisiae*'den üretilen pektinaz enziminin pH 3,0-5,5 aralığında aktif olduğunu ve 50°C'de optimum enzim aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizi ile 42 kDa saptamışlardır.

Alana ve ark. (1990), *Penicillium italicum*'dan ürettikleri pektinaz enziminin moleküler ağırlığını 22 kDa olarak saptamışlardır. Enzimin pH 6,0-7,0 aralığında optimum aktivite gösterdiğini, 50°C'de ve pH 8,0'da kararlı olduğunu belirlemişlerdir.

Wang ve ark. (2006), *Bacillus subtilis* WSHB04-02'den elde edilen alkali pektinaz enzimini kullanarak pamuklu örme kumaşlarından pektik maddeleri uzaklaştırmak için gereken optimum koşulları belirlemişlerdir. Enzimin kullanılmasında en önemli etkenin pH olduğunu, optimum koşulların pH 9,1'de 57°C'de 1 saat 25 dakika inkübasyon süresi olduğunu saptamışlardır. Ayrıca pamuk örme kumaşlarının kaynar suda 30 dakika ön inkübasyona bırakılması ile pektinin pektinaz enzimi tarafından daha kolay parçalanmasını sağladığını bildirmişlerdir.

Li ve ark. (2005), alkali toprak örneğinden izole ettikleri *Bacillus gibsonii* S-2 suşundan pancar küspesini substrat kaynağı olarak kullanarak alkali pektinaz enzimi üretmişlerdir. İzolatın gram pozitif, spor oluşturan ve aerobik olduğunu belirtmişlerdir. *B. gibsonii* suşundan enzim üretmek için optimum koşulların, besiyerinde 3600 U/g kuru pancar küspesi kullanıldığında 35°C'de 48 saat olduğunu bildirmişlerdir.

Martins ve ark. (2001), *Thermoascus aurantiacus*'dan pektin liyaz (PI) ve poligalakturonaz (Pg) enzimlerini üretmişlerdir. Enzim üretimini, substrat kaynağı olarak portakal küspesi, şeker kamışı posası ve buğday kepeğini kullanarak katı faz fermentasyonu vasıtası ile gerçekleştirmişlerdir. Pg ve PI enzimlerinin sırası ile pH

5,0 ve 10,5-11,0'de optimum aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Her iki enziminde 65°C'de optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Pl enzimi asidik pH'da 60°C'de 5 saat stabil kalırken, Pg enzimi nötral pH'da 60°C'de 1 saat stabil kalabildiğini saptamışlardır.

Namasivayam ve ark. (2011), market katı atıklarından izole edilen *Bacillus cereus* bakterisinden ekstraselüler pektinaz enzimi üretmişlerdir. Enzimin optimum üretim koşullarını pH 8,5 ve 37°C olarak saptamışlardır. En uygun inkübasyon süresini ise 36. saat olarak belirlemişlerdir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin SDS-PAGE analizi ile moleküler ağırlığının 30-50 kDa arasında değiştiğini göstermişlerdir.

Rehman ve ark. (2013), *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 suşundan pektinaz enzimi üretmişlerdir. Üretilen enzimin serbest ve immobilize halinin optimum aktivite gösterdiği değerleri karşılaştırmışlardır. Serbest enzimin pH 10,0'da, 45°C'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Rehman ve ark. (2012), *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 izolatından pektinolitik bir enzim olan poligalakturonaz enzimini üretmişlerdir. Poligalakturonaz enziminin üretimi için optimum koşulları pH 7,0 ve 37°C olarak saptamışlardır. Enzim üretimi aşamasında izolatın optimum inkübasyon süresini 48 saat ve en uygun substrat miktarını %1 olarak belirlemişlerdir. İnkübasyon süresi arttıkça enzim aktivitesinin 72. saatte %50, 120. saatte ise % 85 oranında azaldığını saptamışlardır.

Roosdiana ve ark. (2013), *Bacillus firmus* bakterisinden üretmiş oldukları pektinaz enziminin optimum üretim koşullarını pH 7.0-8.0 ve 40-50°C sıcaklık olarak saptamışlardır. Üretim için en uygun inkübasyon süresini 18. saat olarak belirlemişlerdir. Üretilen pektinazın, pH 7,0'de 50°C'de 30 dakika inkübasyon süresi ile optimum enzim aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. Pektinaz enzime Zn^{+2} , Mg^{+2} ve K^{+2} iyonlarının önemli şekilde etki ettiklerini tespit etmişlerdir.

Sharma ve Satyanarayana (2005), *Bacillus pumilus* dcsr1 suşundan alkali ve termostabil pektinaz enzimi üretmişlerdir. Enzimin optimum sıcaklığını 50°C,

optimum pH'ını ise 10,5 olarak saptamışlardır. Üretilen enzimin, rami bitkisinden elde edilen iplikte bulunan selülozik olmayan yapışkan materyali selektif olarak parçaladığını ve ipliğin %10,96 oranında ağırlığının azaldığını tespit etmişlerdir. Bu özelliğinden dolayı enzimin iplik üretim endüstrisinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Basu ve ark. (2008), *Bacillus pumilus* DKS1 izolatından yüksek termofil özelliğe sahip ekstraselüler pektat liyaz enzimi üreterek saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığını jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi kullanarak 35 kDa saptamışlardır. Saflaştırılan enzimin pH 8,5'de ve 75°C'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Enzim aktivitesinin 1 mM Ca ve Mn iyonları varlığında artarken, Zn⁺², Ni⁺² ve EDTA varlığında büyük oranda inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada pektinaz üretici mikroorganizma olarak doğal ortamlardan izole edilen *Bacillus* sp. suşları kullanılmıştır.

Mikroorganizmaların doğal habitatlardan izolasyonu, tanılanması, enzim üreten suşların belirlenmesi, pektinaz üreten suşlardan endüstriyel amaçlı üretim yapabilecek özellikteki suşun saptanması, enzim üretimi, üretilen enzimin karakterizasyonu basamaklarında çeşitli ekipmanlar kullanılmıştır.

Söz konusu ekipmanlar; yağ ve su banyosu, soğutmalı santrifuj, otoklav, çalkalamalı inkübatör, spektrofotometre (MultiScan Go), steril kabin, VITEK-2 (bioMerieux) bakteri tanılama sistemi (endüstriyel), SDS-PAGE sistemi ve temel laboratuvar ekipmanlarıdır.

Tüm çalışma sürecinde çok çeşitli kimyasallar, özel substratlar, çözeltiler ve besiyerleri de kullanılmıştır.

3.1.1. *Bacillus* sp. İzolasyonu, Üretimi ve Tanılanmasında Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. N1 Besiyeri

Toprak örneklerinden *Bacillus* sp. suşlarının ilk izolasyonu, tek koloni yöntemiyle saf kültür eldesi, seçilen suşların çoğaltılması ve örneklerin stok kültür olarak saklanması için kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	(g/L)
Pepton	10
Et Özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
Agar	15

Besiyeri pH'sı 1N NaOH kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanıp, otoklavda 121°C'de, 1,2 atm'de 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.2. Pektinli Besiyeri

Bacillus sp. izolatlarının pektinaz aktivitelerinin saptanması amacıyla kullanılmıştır (Mukesh ve ark., 2012).

Bileşimi	(g/L)
Pektin	5
Maya Ekstraktı	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄	6
Agar	20

Besiyeri pH'sı 1N NaOH kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanıp, otoklavda 121°C'de, 1,2 atm'de 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.3. Pektinli Sıvı Besiyeri

Sıvı besiyerinde pektinaz üretimi amacıyla kullanılmıştır (Soares ve ark. 1999).

Bileşimi	(g/L)
Pektin	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,4
KH ₂ PO ₄	2
K ₂ HPO ₄	6
MgSO ₄	0,1

Besiyeri pH'sı 1N NaOH kullanılarak istenilen pH'ya ayarlanıp, otoklavda 121°C'de, 1,2 atm'de 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.1.4. Simon's Sitrat Agar

Günümüzde bakterilerin tanılanmasında modern ve hızlı sonuçlar aldığımız çeşitli tanısal kitler (API vs) ve bakteri tanılama sistemlerini kullanmış olsak da

hala mikrobiyal çalışmaların vazgeçilmezi biyokimyasal testleri kullanmaktayız. Simon's sitrat testi, karbon kaynağı olarak sitratın kullanıldığını saptamak amacıyla kullanılmıştır (Kuzu, 2008).

Bileşimi	(g/L)
NaCl	5
MgSO ₄	0,2
NH ₄ H ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	2
Bromtimol mavisi	0,08
Agar agar	15

Besiyeri pH'sı 7,0'ye ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1,2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.5. İndol Besiyeri (Tryptophan/Peptone Broth)

İzolatların triptofandan indol açığa çıkarma yeteneğini belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Müller, 1986; Kuzu, 2008).

Bileşimi	(g/L)
Kazein peptonu	10
NaCl	5
Triptofan	10

pH 7,0'ye ayarlanmış, otoklavda 121 °C'de, 1,2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.6. Kanlı Agar

İzole edilen bakterilerin kanı hemoliz edebilme yeteneğini belirlemek amacı ile kullanılmıştır. Agar besiyerine %10 oranında kan (EDTA'lı) ilave edilerek hazırlanmıştır (MacFaddin, 2000)

Bileşimi	(g/L)
Pepton	10
Et özütü	10
NaCl	5
Agar agar	15

Not: Kan, besiyeri otoklavda steril edilip, 50°C'ye soğutulduktan sonra ilave edilir.

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. Lugol Çözeltisi

Pektik maddenin enzimatik hidrolizi ile oluşan zonu gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır (Kusuma, 2014).

Bileşimi	(g/330 mL)
İyot	1
Potasyum İyodür	5

Hazırlanan çözelti amber şişede stok olarak saklanmıştır.

3.1.2.2. NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak için 1N, tampon çözeltileri hazırlamak için 0.2 N ve 2 N olmak üzere üç farklı derişimde hazırlanmıştır (Aygan, 2008).

3.1.2.3. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)

Pektinaz enzimi aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacı ile kullanılmıştır. 1g DNS 50 mL distile su içerisinde çözülerek, üzerine 30g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2N NaOH ilave edilmiş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Miller,1951).

3.1.3. Kullanılan Tampon Çözeltiler

3.1.3.1. Sodyum-Asetat Tamponu

Pektinaz enziminin pH 4,0 ve 5,0 aralığında gösterdiği aktivitenin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. İstenilen pH'da 0,1 M Sodyum asetat tamponu hazırlamak için 0,2 M asetik asit ve 0,2 M sodyum asetat çözeltileri, Çizelge 3.1'de belirlenen miktarlarda karıştırılarak distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.1. Sodyum asetat tampon çözeltilerinin hazırlanması

pH	0,2 M Asetik Asit (mL)	0,2 M C ₂ H ₃ O ₂ Na (mL)	dH ₂ O (mL)
4,0	82,0	18,0	100
5,0	29,6	70,4	100

dH₂O: Distile su

3.1.3.2. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimin, pH 6,0-8,0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de verilen tampon çözeltileri ve hacimleri belirtilen miktarlarda karıştırılarak, istenilen pH'ya sahip tamponlar hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.2. Sodyum fosfat tampon çözeltilerinin hazırlanması

pH	0,2 M NaH ₂ PO ₄ (mL)	0,2 M Na ₂ HPO ₄ (mL)	dH ₂ O (mL)
6,0	87,7	12,3	100
6,5	68,5	31,5	100
7,0	39,0	61,0	100
7,5	16,0	84,0	100
8,0	5,3	94,7	100

dH₂O: Distile su

3.1.3.3. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimin pH 8,5-10,5 aralığındaki aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. İstenilen pH'da tampon hazırlamak amacıyla çizelge 3.3.'de belirtilen, 0,2 M Glisin ve 0,2 M NaOH çözeltileri uygun oranlarda karıştırılarak, son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.3. Glisin-NaOH tampon çözeltilerinin hazırlanması

pH	0,2 M Glisin (mL)	0,2 M NaOH (mL)	dH ₂ O (mL)
8,6	4,0	50	146
9,0	8,8	50	141,2
9,6	22,4	50	127,6
10,0	32,0	50	118
10,6	45,5	50	104,5

dH₂O: Distile su

3.1.3.4. Boraks-NaOH Tamponu

Enzimin pH 11,0-12,5 aralığındaki aktivitesini saptamak amacı ile kullanılmıştır.

0,05M Boraks (19,05g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine belirlenen pH elde edilinceye kadar NaOH (0,2N NaOH) çözeltisinden eklenmiş, son hacim distile su 200 mL'ye tamamlanmıştır (Aygan, 2008).

3.1.4. Elektroforez Analizinde Kullanılan Solüsyonlar**3.1.4.1. Solüsyon A (Stok solüsyon)**

-Akrilamid (%30)

-Bisakrilamid (%0,8)

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid 50 ML distile su içerisinde, magnetik karıştırıcıda, ısıtmadan tamamen çözününceye kadar karıştırılır. Son

hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Akrilamid solüsyonu, amber şişede, +4C° de birkaç ay saklanabilir (Laemmli, 1970; Akan,2010).

Önemli not: Polimerize olmamış Akrilamid insan sağlığı için zararlı ve tehlikelidir (irritan ve nörotoksik). Çözeltinin çeker ocakta hazırlanması laboratuvar güvenliği açısından son derece önemlidir.

3.1.4.2. Solüsyon-B (4X Ayırıcı jel tamponu) Ayırma jelinin hazırlanması

Bileşimi	mL/100mL (v/v)
2 M Tris-HCl (pH 8,8)	75 (1,5 M)
SDS (%10)	4 (%0,4)
Distile su	21

Buzdolabında birkaç ay saklanabilir.

3.1.4.3. Solüsyon C (4X Dengeleme jeli tamponu) (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	mL/100 mL(v/v)
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	50
SDS (%10)	4,0
Distile su	46

Buzdolabında +4C° de saklanmalıdır.

3.1.4.4. AMPS (Amonyumpersülfat, %10)

Poliakrilamid jelin polimerizasyonu aşamasında polimerizasyonu başlatıcı olarak kullanılmıştır (Bollag ve ark, 1996).

Bileşimi	g/10 mL
AMPS	1,0

Son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanır ve en fazla 1 hafta içinde kullanılmalıdır.

3.1.4.5. Elektroforez Yürütme Tamponu (pH 8,3)

Bileşimi	g/L
25mM Tris	3,0
192 mM Glisin	14,4
SDS	1,0

3.1.4.6. Örnek Hazırlama Tamponu (5X),

Bileşimi	mL/10 mL (v/v)
1M Tris-HCl (pH 6,8)	0,6
Gliserol (%50)	5,0
SDS (%10)	2,0
β -Mercaptoethanol	0,5
Bromfenol mavisi (%1)	1,0
Distile Su	0,9

Bromfenol mavisi elektroforez sürecinde izlem boyası olarak kullanılmıştır.

3.1.4.7. SDS-PAGE Boyama Solüsyonu (Coomassie Brilliant Blue, CBB-250)

Elektroforez işlemini takiben protein bandlarının görünür hale gelmesi için proteinleri boyama amaçlı kullanılmıştır.

Bileşimi	mL/1000 mL (v/v)
Comassie Brilliant Blue	1 g
Metanol	450
Glasiyel Asetik Asit	100
dH ₂ O	450

Coomassie Brilliant Blue (1 g) metanol (450 mL) ile çözülmüş ve filtre edilmiştir. 100 mL glasiyel asetik asit ve 450 mL distile su eklenmiştir.

Zimogram analizinde boyama amacıyla 0,02%'lik *ruthenium red* boyası kullanılmıştır (Cruickshank ve Wade, 1980).

3.1.4.8. Jelden Boyayı Geri Alma (destaining) Solüsyonu

Uygun ve net bir görüntü elde edebilmek için jel, boyama işleminden sonra destaining solüsyonunda 1 gece bekletilmelidir.

Bileşimi	mL/1000 mL (v/v)
Metanol	100
Asetik asit	100
Distile Su	800

3.1.4.9. Renatürasyon Solüsyonu

Zimogram analizinde renatürasyon amacı ile %2,5'lik Triton X-100 kullanılmıştır (Vatanparast ve ark., 2014).

3.2. Metod

3.2.1. *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu

Çukurova Üniversitesi kampüsünden, çürümüş meyva ve sebze atıkları içeren 4 farklı alandan toprak örneği alınarak karıştırılmıştır.

1 g toprak ve 9 mL steril distile su karıştırılmıştır.



Karışım homojen hale getirilmiştir.



80 °C'de 10 dk inkübasyon (*Bacillus* cinsi endospor oluşturan gram pozitif bakteri cinsi olduğundan, vejetatif hücre formlarının ölmesi ve endospor formlarının örnekte kalabilmesi amacıyla uygulanan ısı şoku aşaması) işlemi gerçekleştirilmiştir.



Örnek steril su (4,5 mL) ile 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} oranlarında sulandırılmıştır.



N1 agara yayma ekim yapılarak 37 °C'de 1 gece inkübe edilmiştir.

İnkübasyonu takiben, tek koloniler, morfolojik karakteristikleri dikkate alınarak (*Bacillus* cinsine ait olduğu düşünülen N1 agara (pH: 7,0 ve 9,0) çizgi şeklinde ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Her izolat gram boyama ile test edilmiş *Bacillus* cinsine ait olanlardan stok kültür hazırlanarak (*eğik katı jelözde*) identifikasyon çalışmaları, pektinaz üretici suşların saptanması amacıyla +4 °C'de korunmuştur.

3.2.2. *Bacillus* sp. Suşlarının Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Pektinaz Aktivitesinin Pektin-Agarda Saptanması

Bu araştırma kapsamında saf kültürü yapılan tüm izolatlar (117 suş) pektin-agara (pH 7,0 ve 9,0) çizgi metoduyla ekilerek 37°C'de 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyondan sonra pektinolitik aktivite test edilmiştir. Bu amaçla

besiyerinin üzerine lügol çözeltisi dökülmüş ve 15-30 dk bekletilmiştir. Ekim çizgisi etrafında ortaya çıkan şeffaf zon pektinolitik aktivite varlığını gösterdiğinden söz konusu suşlar pektinaz üreticisi olarak saptanmıştır (Soares ve ark., 1999).

Pektin ihtiva eden katı besiyerinde, üreme çizgisi etrafında oluşan zonların genişliğine göre en iyi zon veren suş bu araştırmada **enzim üreticisi** olarak kullanılmıştır.

3.2.2.2 Pektinaz Üretici Bacillus sp. Suşlarının Tanımlanması

Test edilen ve enzim üretiminde kullanılacak izolatın tanımlanmasında ilk basamak olarak gram boyama yapılmıştır. Biyokimyasal testlerden; katalaz, β -hemoliz, Simon's sitrat, indol, jelatin, %6,5 tuzlu N1 agar besiyerinde üreme yeteneği uygulanmıştır. Bakteri tanımlanmasında rutin olarak kullanılan biyokimyasal testler yanında Bakteri Tanılama Sistemi (VITEK-2) ve 16S rRNA dizi analizi yöntemleri de kullanılmıştır.

3.2.3. Pektinaz Aktivitesinin Pektinli Buyyonda Saptanması

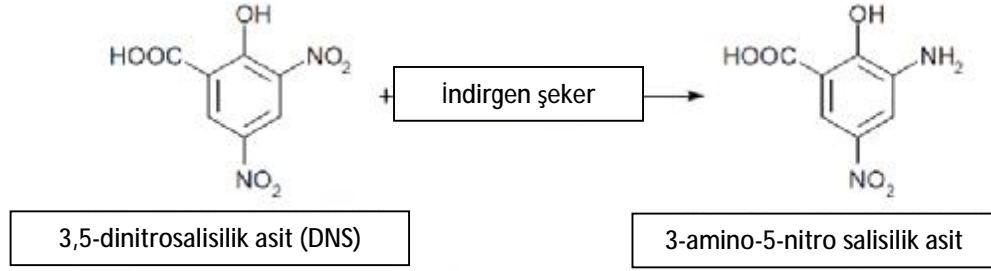
Seçilen en yüksek zon çapına sahip suşlardan enzim üretimi için kullanılacak olanı belirlemek amacı ile katı ve sıvı besiyerlerinde (pH 9,0) enzim aktiviteleri gözlemlenmiştir.

Pektinaz aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını spektrofotometrik olarak belirlemek amacı ile dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılmıştır (Miller, 1959).

Pektinaz aktivitesi ile substratın (PGA) hidrolizi sonucu ortaya çıkan galakturonik asit miktarı spektrofotometre (MultiScan Go) cihazında 540 nm dalga boyunda belirlenmiştir (Asif, 2005).

DNS metodunda 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit, 3-amino-5 nitrosalisilik asite indirgenir ve glukoz birimleri glukonik asite yükseltgenir. Na-K-tartarat, çözeltiyi, çözünmüş oksijenden korumak amacıyla kullanılırken, NaOH,

glukozun yükseltgenmesi için ortamın alkali olması gerektiğinden kullanılır (Miller, 1959).



Şekil 3.1. DNS yöntemi ile ortamda bulunan serbest şeker miktarının belirlenmesini sağlayan reaksiyon.

Pektinaz üretici suşlar, pektin ihtiva eden sıvı besiyerinde üretilerek (37°C'de 24 saat) enzim aktivitesi saptanmıştır.

İnkübasyon sonunda kültürler +4°C'de 8000 d/dk'da santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Üst faz (supernatant) enzim solüsyonu (crude-enzim) olarak kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımı ve koşulları

Enzim solüsyonu	0,5 mL
Poligalakturonik asit (%0.25)	0,5 mL

Kör Karışımı

Tampon	0,5 mL
Poligalakturonik asit (%0.25)	0,5 mL

Reaksiyon karışımı 37°C'de 20 dk su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler buz üzerinde bekletilerek aktivite durdurulmuştur. Reaksiyon tüplerine 0,5 mL DNS çözeltisi ilave edilmiş ve 5 dk kaynayan suda bekletilmiş ve renk değişimi gözlenmiştir. Örnekler köre karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür.

Bir ünite pektinaz aktivitesi (U), standart koşullarda 1 dakikada poligalakturonik asitten 1 μ mol galakturonik asit oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Jayani ve ark., 2005).

3.2.4. Pektinaz Üretiminde Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

3.2.4.1. Katı Besiyerinde Optimum Sıcaklık ve pH'nın Saptanması

Bu amaçla, CUHK1 suşu pH 6,0-12,0 aralığında hazırlanan pektinli agar besiyerlerine çizgi metoduyla inoküle edilmiş, 37 °C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında üreme alanları ve enzim aktivite zonlarının ölçümü yapılarak suşun en iyi ürediği ve yüksek enzim aktivitesi gösterdiği pH değerleri saptanmıştır.

Optimum pH değeri saptandıktan sonra, CUHK1 suşu optimum pH'daki (9,0) besiyerine çizgi metoduyla inoküle edilerek, 4°C , 20°C, 30°C, 37°C ve 50°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında üreme alanı ve enzim aktivite zonlarının ölçümü yapılarak suşun en iyi ürediği ve yüksek enzim aktivitesi gösterdiği sıcaklık değerleri saptanmıştır.

3.2.4.2. Sıvı Besiyerinde Optimum Sıcaklık ve pH'nın Saptanması

Enzim üretici suş olan CUHK1'in katı besiyerinde, optimum üreme ve pektinolitik aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinden hareketle, sıvı besiyerinde aynı koşullar sağlanarak üreme ve aktivite kontrolü yapılmıştır. Pektinli sıvı besiyerinde üreme ve enzim aktivitesi spektrofotometrik analizle test edilerek katı besiyerindeki sonuçlar ile kıyaslanmıştır.

Bu amaçla, CUHK1 suşu N1 besiyerine (sıvı) inoküle edilerek 37 °C'de 150 devir/dk çalkalamalı inkübatörde 18 saat üremeye bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben kültür 600 nm'de, spektrofotometrede ölçümü yapılarak kültürün optik yoğunluğu (O.D.) steril besiyeri ile 0,5'e ayarlanmıştır. Erlenler içerisinde bulunan 100'er mL pektinli sıvı besiyerlerinin başlangıç pH'ları 6,0 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0

ve 12,0'ye ayarlanmıştır ve bakteri kültürü %1 oranında aşılacaktır. Kültürler 35°C'ye ayarlanmış 150 devir/dk çalkalama hızındaki inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra, kültür +4°C'de 8000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edilerek bakteriler çöktürülmüştür. Üst sıvı faz alınarak DNS yöntemi ile farklı pH'lardaki enzim aktiviteleri saptanmıştır. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri %100 kabul edilmiştir ve diğer pH değerleri %100'e göre oranlanıp, bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

CUHK1 suşunun sıvı besiyerinde en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık aralığının saptanması amacıyla belirlenen pH'daki sıvı besiyerlerine taze kültürden ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan sıvı besiyerleri 25°C, 30°C, 35°C, 40°C ve 45°C'de 150 devir/dk çalkalama hızındaki inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültür +4°C'de 8000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst sıvı faz alınarak DNS yöntemi ile farklı sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri saptanmıştır. En yüksek absorbansın gözlemlendiği sıcaklık değeri %100 kabul edilmiş ve bağıl aktivite grafiği hazırlanmıştır.

3.2.5. Pektinin farklı Konsantrasyonlarının Pektinaz Üretimine Etkisi

Pektinaz üretiminde kullanılan karbon kaynağının farklı konsantrasyonları ile (%0.1, %0.5, %1, %1.5, ve %2) hazırlanan sıvı besiyerlerinde üretim yapılmıştır. Bakteri kültürü 0.5 O.D.'ye ayarlanıp sıvı besiyerlerine aşılacaktır. Sıvı besiyerleri 35°C'de 150 devir/dk çalkalama hızındaki inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben +4°C'de 8000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak enzim aktiviteleri saptanmıştır. En yüksek absorbansın saptandığı değer %100 kabul edilmiş ve bağıl aktivite cinsinden grafik hazırlanmıştır.

3.2.6. Pektinaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi

Bu amaçla, optimum pH (10,0) ve karbon (%0,1) kaynağı ihtiva eden sıvı besiyerine enzim üretici suşun 18 saatlik taze kültürü aşılantmıştır. Optimum sıcaklıkta (35°C) inkübasyona devam edilirken, 12., 24., 28., 32., 36., 48., 52., 56., 60. ve 72., saatlerde örnekler alınıp +4°C'de 8000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak enzim aktiviteleri saptanmıştır. En yüksek absorbansın saptandığı inkübasyon süresi %100 kabul edilmiş ve sonuçlar bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.7. Pektinaz Üretiminde Optimum İnokulum Miktarının Saptanması

Enzim üretiminde en uygun inokülasyon oranının saptanması amacı ile optimum koşullarda (pH 10,0 ve 35°C) sıvı besiyeri hazırlanmıştır. 18 saatlik taze bakteri kültürü %0,5, %1, %1,5, %2, %3 ve %4 oranlarında besiyerlerine inoküle edilmiştir. Optimum üretim sıcaklığında, 56 saat üretim yapılarak santrifüj işleminden sonra üst faz alınarak enzim aktiviteleri saptanmıştır.

En yüksek absorbans değerinin saptandığı inokülasyon oranı %100 kabul edilmiş ve sonuçlar bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.8. Pektinaz Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Enzim üreticisi olarak seçilmiş CUHK1 suşu, N1 sıvı besiyerinde 18 saat üretilmiş ve kültür spektrofotometre cihazında 600 nm'de optik yoğunluğu (O.D.) 0,5'e ayarlanarak uygun oranda pektinli sıvı besiyerine aşılantmıştır. Pektinli besiyerinde (tüm optimize edilmiş koşulları sağlayan), 150 devir/dk'da çalkalamalı inkübatörde 56 saat inkübasyona bırakılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyondan sonra kültür +4 °C'de 8000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edilerek bakteriler çöktürölüp, sıvı üst faz steril bir şişeye aktarılmıştır. Sıvı fazın üzerine kendi hacminin %70'i oranında %96'lık soğuk etanol eklenmiştir ve

-20°C'de 24 saat bekletilerek alkol presipitasyonu yapılmıştır. 24 saat sonunda örnek +4 °C'de 15 dk 10000 devir/dk'da santrifuj edilerek, enzim çöktürülüp sıvı fazdan ayrılmıştır. Elde edilen enzim çökeltisi, 0,1 M sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda çözülerek karakterizasyon deneylerinde kullanılmak amacı ile +4°C'de saklanmıştır.

3.2.9. Pektinolitik Aktivite Üzerine pH'nın Etkisi

Üretilen pektinaz alkol presipitasyonu ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için; Sodyum asetat (pH 4,0, 5,0), Na-fosfat (pH 6,0-8,0), Glisin-NaOH (pH 8,5-10,5) ve Borax-NaOH (pH 11,0-12,0) tamponları kullanılmıştır. Bu tamponlar kullanılarak %0,24'lik poligalakturonik asit içeren çözeltiler hazırlanmıştır (Ahlawat ve ark., 2007). Reaksiyon karışımı deney tüplerinde 37°C'de 20 dk su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra aktivite reaksiyonu buz üzerinde durdurulmuştur. Deney tüplerindeki reaksiyon karışımına 0,5 mL DNS çözeltisi ilave edilmiş ve 5 dk kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Örnekler köre karşı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür (Mehar ve Pravendra, 2005).

En yüksek absorbansın saptandığı değer 100 kabul edilmiş, diğer pH değerleri ile kıyaslanarak bağıl aktivite grafiği çizilmiştir.

3.2.10. Pektinolitik Aktivite Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın saptanması için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 °C sıcaklıklarda enzim optimum pH'daki substrat ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonlar 20-80°C aralığında su banyosunda, 90-110°C aralığında ise yağ banyosunda yapılmıştır. Daha sonra DNS metodu ile standart pektinaz aktivitesi tayini yapılmıştır.

En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık %100 kabul edilerek bağıl aktivite grafiği çizilmiştir.

3.2.11. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi

Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisini saptamak amacı ile; enzim 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon sonunda enzim ve substrat (optimum aktivitenin gerçekleştiği pH'da) karıştırılmış ve optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır. Ön inkübasyonsuz aktivite analizinden elde edilen değer %100 kabul edilmiş ve farklı sıcaklıklarda ön inkübasyondan sonra elde edilen aktivite değerleri ile oranlanarak bağıl aktiviteleri saptanıp grafiklendirilmiştir.

3.2.12. pH'nın Enzim Kararlılığına Etkisi

pH'nın enzim kararlılığına etkisini belirlemek amacı ile; enzim örneği, farklı pH'lardaki (4,0-12,0 aralığında) tamponlar kullanılarak 60 dk oda sıcaklığında ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda optimum pH'da substrat ile standart aktivite tayini yapılmıştır. Ön inkübasyona bırakılmamış enzimin aktivite analizi ile elde edilen değer %100 olarak kabul edilmiş ve bağıl aktivite grafiği çizilmiştir.

3.2.13. Kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkisi

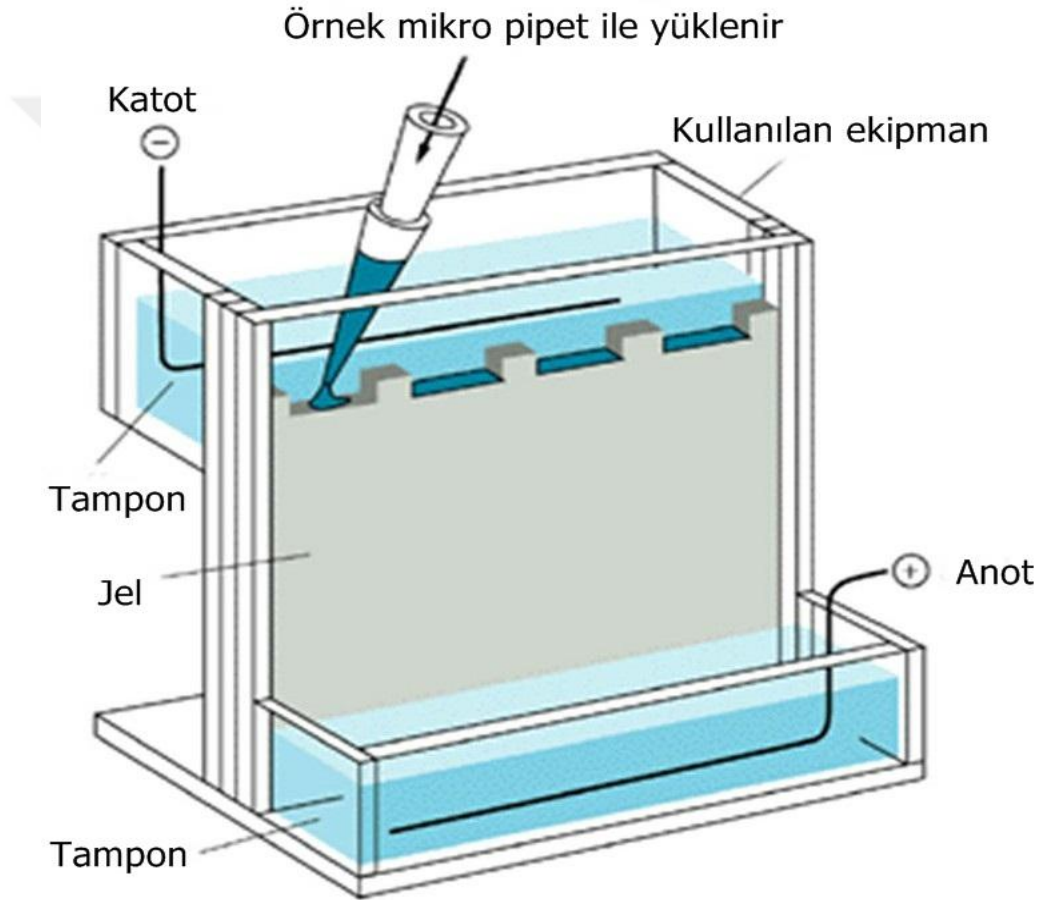
Pektinaz enzimi üzerine çeşitli kimyasalların etkisini saptamak amacı ile seçilen kimyasallar 1 mM ve 10 mM olmak üzere iki konsantrasyonda kullanılmıştır.

Tüplere alınmış enzim örneklerine son konsantrasyon 1 mM ve 10 mM olacak şekilde; EDTA, SDS, MnCl₂, CuCl₂, CoCl₂, FeCl₃, Üre, MgCl₂, Triton-X100, ZnCl₂ ve CaCl₂ ilave edilerek 60 dk ön inkübasyon işleminden sonra optimum pH ve sıcaklıkta standart enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Ön inkübasyona bırakılmamış enzimin aktivitesi %100 kabul edilmiş ve kimyasal eklenmiş aktivite değerleri ile kıyaslanarak bağıl aktivite grafiği çizilmiştir.

3.2.14. SDS-PAGE ve Zimogram Analizi

Bu çalışmada üretilen pektinazın moleküler ağırlığının ve aktivitesinin saptanabilmesi amacıyla SDS-PAGE sistemi kullanılmıştır.

Poligalakturonik asit (%0,1) ihtiva eden ayırıcı jel (separating, %12) ve dengeleyici jel (stacking, %5) hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) sistemi

3.2.14.1. Ayırıcı jelin (%10) bileşimi ve hazırlanışı

Bileşimi	
Sol-A	6,5 mL
Sol-B	5,0 mL
dH ₂ O	7,1 mL
Substrat	1,3 mL
AMPS (% 10)	66 µL
TEMED	15 µL

Sol-A ve Sol-B önceden taze olarak ayrı ayrı hazırlanır, yukarıda verilen miktarlarda karıştırıldıktan sonra 5 dk degaz (çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması) işlemi yapılır. AMPS ve TEMED eklenerek jel kalıbına dökülerek polimerizasyon için oda sıcaklığında bekletilir.

3.2.14.2. Dengeleyici Jelin Bileşimi

Bileşimi	
Sol-A	1,5 mL
Sol-C	2,25 mL
dH ₂ O	5,25 mL
AMPS (% 10)	30 µL
TEMED	10 µL

3.2.14.3. Elektroforez Koşulları

Yüklenen örnek miktarı	80 µL
Yüklenen Marker miktarı	10 µL
Uygulanan akım	örnekler stacking jelden çıkıncaya kadar 15 mA, daha sonra 20 mA
Elektroforez zamanı	6 saat

3.2.14.4. SDS- PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram analizi

Elektroforez işlemini takiben jel, CBB-R250 boya solüsyonunda 2 saat ve 1 gece boyayı geri alma solüsyonunda bekletilmiştir. Boyama ve boyadan kurtarma işlemleri sonrasında jel beyaz ışık üzerinde incelenerek, marker protein bandlarının jeldeki konumlarına göre örneğin moleküler ağırlığı hesaplanmıştır.

Enzimin jeldeki aktivitesini gözlemleyebilmek için enzimin substrat olarak kullanacağı poligalakturonik asit (%2,5) ayırıcı jele eklenmiş ve enzim bu jelde yürütülmüştür.

Elektroforez işleminden sonra, jel %2,5 Triton X-100 solüsyonunda 45 dk bekletilerek proteinin renatürasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir (Vatanparast ve ark., (2014). Renatürasyon işleminden sonra jel uygun pH'da 1 saat inkübe edilmiş ve ruthenium kırmızısıyla (%0,02 boyanmıştır (Cruickshank ve Wade, 1980).

Zimogram analizinde, boyamadan sonra bandların çevresinde şeffaf hidroliz zonlarının görülmesi Pektinaz aktivitesinin doğrulanmasıdır (Mellon ve Cotty, 2004).

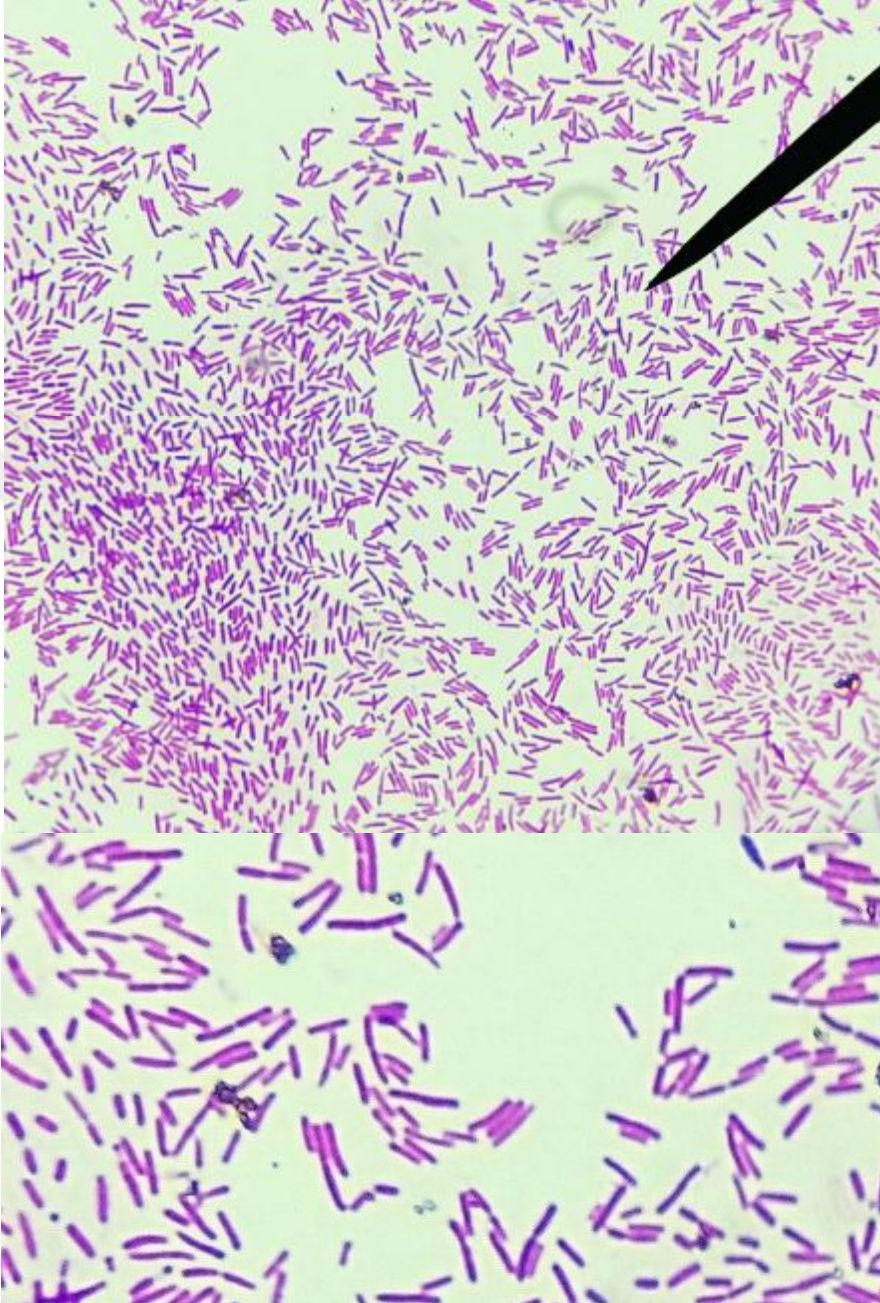
Zimogram analizinde hidroliz zonu görülen bandların, üretilen enzimin moleküler ağırlığını ve izomerlerini saptamak açısından önemi yadsınamaz.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA**4.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu**

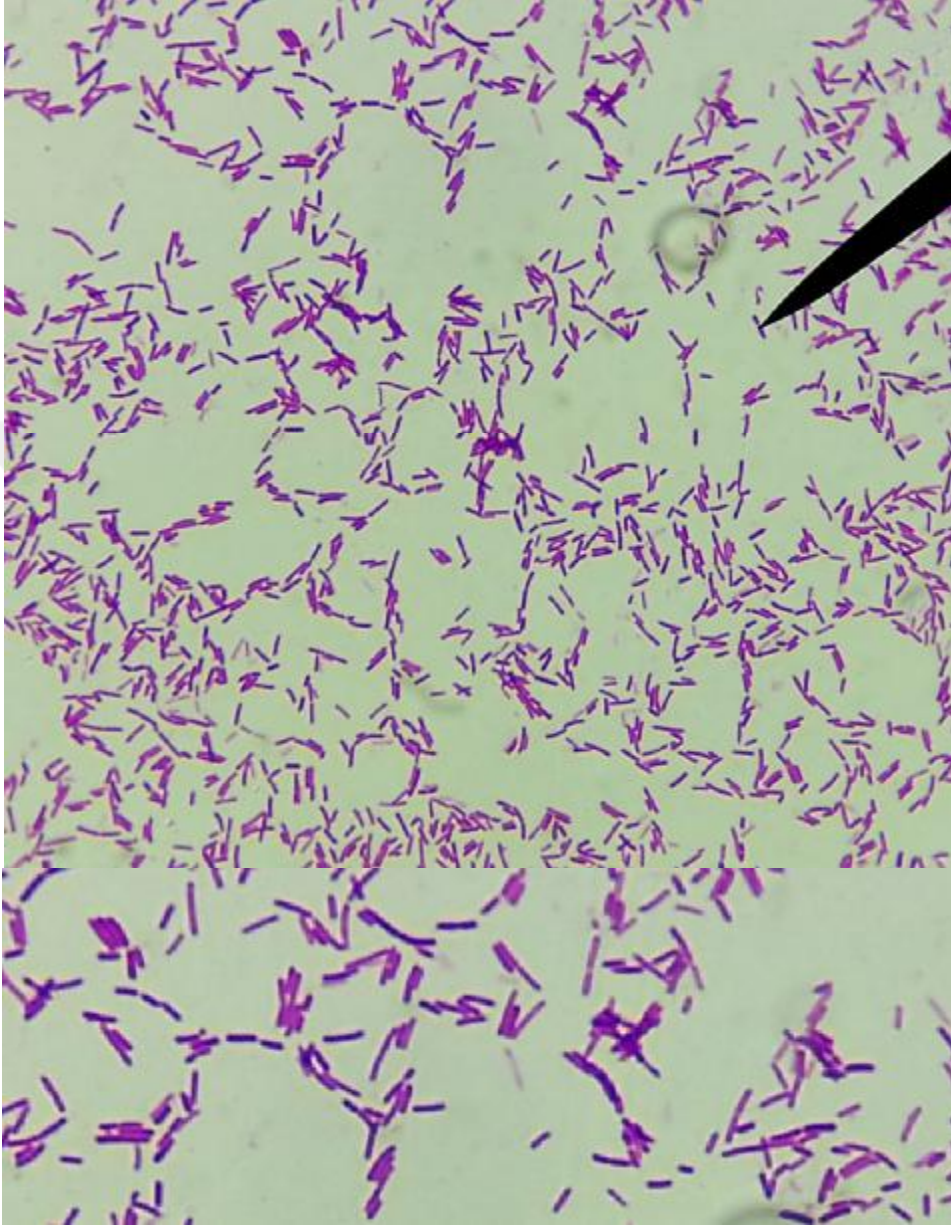
Çukurova Üniversitesi kampüsünden, çürümüş meyve ve sebze atıkları içeren 4 farklı lokasyondan alınan toprak örnekleri bakteri izolasyonu amacıyla kullanılmıştır.

Toprak örneği 80°C'de 10 dk ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra, tek koloni oluşturacak düzeyde seri sulandırmalarla N1 besi yerine ekim yapılmış ve toplam 117 bakteri kolonisi seçilmiştir.

Tek koloni olarak üreyen suşların koloni morfolojileri ve gram boyanma karakteristikleri dikkate alınarak (çubuk şeklinde, gram pozitif, endospor oluşumu; Şekil 4.1, Şekil 4.2.) *Bacillus* cinsine ait olan 117 suşun eğik katı jelözde stok kültürleri hazırlanmış, +4°C'de saklanmıştır. Her suş pektinolitik aktivite yönünden test edilmiştir.



Şekil 4.1. *Bacillus* sp.'nin (CUHK1) Gram boyanma karakteristiği (ışık mikroskobu 10x100)



Şekil 4.2. *Bacillus* sp.'nin (L8) Gram boyanma karakteristiği (ışık mikroskobu 10x100)

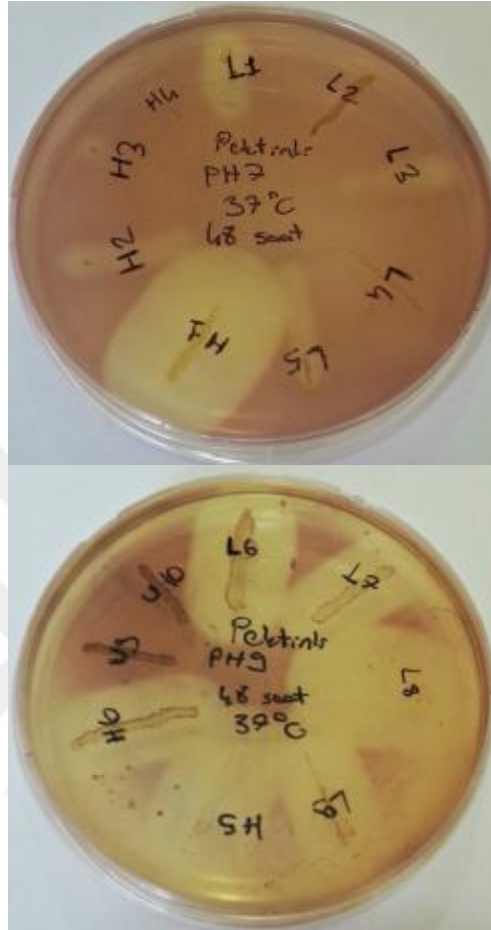
4.2. İzolatların Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

4.2.1. Katı Besiyerinde Aktivite Saptanması

Stok kültürleri hazırlanmış 117 izolatın (*Bacillus* sp.) pektinolitik aktivitesini saptamak amacıyla; suşlar pektin içeren agar besiyerlerine (pH:7,0 ve 9,0) çizgi şeklinde ekilerek 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonu takiben kültürler lügol çözeltisi ile boyanmıştır. Boyamadan sonra 18 adet suşun üreme çizgisi etrafında şeffaf zon (*hidrolitik zon*) oluşumu görülmüştür ve bu suşlar “**pektinaz üretenler**” olarak numaralandırılmıştır (H1, H2, H5, H6, L1, L3, L5, L6, L7, L8, L9, P1, P2, P9, P11, U1, U2 ve U3).

Pektinaz üreten izolatlar arasında H1 ve L8 katı besiyerinde en geniş hidroliz zonu oluşturan suşlar olduğu için, bu araştırmada üretici suşlar olarak kullanılmak üzere tanılanma testleri uygulanmıştır.



Şekil 4.3. Pektinli besiyerinde pektinolitik (48 saat) aktivite zonları

Çizelge 4.1. H1 ve L8 izolatlarının pektin-agarda üreme alanı ve enzim aktivite zon çapları

İzolat No	Bakteri üreme alanı (mm)	Hidroliz Zonu (mm)
H1	5.5	50
L8	6	47

4.2.2. Sıvı Besiyerinde Aktivite Saptanması

Pektinli agarda en yüksek aktivite zonu saptanan H1 (CUHK1) ve L8 suşları pektinli sıvı besiyerinde (pH 9,0) üretilerek, hücreler santrifüj ile çöktürülerek üst fazdan standart yöntemle enzim aktivite tayini yapılmıştır.

Benzer koşullarda üretim yapılmış ve H1 suşundan üretilen enzim aktivitesi L8'den iki kat yüksek bulunmuştur. Bu adımdan sonra çalışmada üretici suş olarak H1 (CUHK1) ile devam etmeye karar verilmiştir.

Soares ve ark (1999), 5 g toprak örneğinden izole ettikleri 168 *Bacillus* sp. suşundan 14 tanesinin yüksek enzimatik zon çapı oluşturduğunu ve çok iyi pektinolitik enzim üreticisi olduklarını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, 88 şusun pektinolitik enzim üreticisi olduğunu, 66 suşun ise pektinaz üretme yeteneği göstermediğini saptamışlardır.

4.3. H1 ve L8 (pektinaz üreticisi) Suşlarının Tanılanması

Pektinli agarda en yüksek hidroliz zonu oluşumu gösteren H1 ve L8 suşları, gram boyama sonucu; gram pozitif, çubuk şeklinde, endospor oluşturan *Bacillus* sp. olarak tanılanmıştır. Bu suşlar için, aşağıdaki biyokimyasal testler yapılmış, testler ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Bu çalışmada **enzim üretici suş olarak H1** kullanılmaya karar verilmiş ve CUHK1 şeklinde isimlendirilmiştir. CUHK1 izolatu VITEK-2 Bakteri Tanılama Sistemi (BioMerieux) ile analiz edilerek *Paenibacillus* cinsi ve tanılama standart olan 16S rRNA dizi analizi ile *Paenibacillus illinoisensis* olarak tür düzeyinde tanılama gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.2. H1 ve L8 izolatlarına uygulanan testler

Suş	Uygulanan Biyokimyasal Test	Sonuç
H1		
Katalaz		+
β -hemoliz		-
Simon's sitrat		-
İndol		-
Jelatinin hidrolizi		-
%6.5 tuzlu N1 agar'da üreme		-
L8		
Katalaz		+
β -hemoliz		-
Simon's sitrat		-
İndol		-
Jelatinin hidrolizi		-
%6.5 tuzlu N1 agar'da üreme		-

4.4. Pektinaz Üretimini Etkileyen Koşulların Optimizasyonu

4.4.1. Pektin Agarda Optimum pH'nın Saptanması

Bu amaçla; pH 6,0-12,0 aralığında pektinli agar hazırlanmıştır. CUHK1 suşu bu farklı pH'lardaki besiyerlerine çizgi metoduyla ekilerek 37°C'de 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteri üreme alanları ve pektinolitik zon çapları ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi pH 9,0 olan agar besiyerinde pektinolitik zon çapının en yüksek, bakteri üreme alanlarının pH 8,0 ve 11,0'de en yüksek, pH 6,0 ve 7,0'de üreme alanları ve aktivitenin en düşük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Pektinli Agarda pH'ın Bakteri (CUHK1) Üremesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi

pH	Bakteri üreme alanı (mm)	Hidroliz Zonu (mm)
6,0	2	26
7,0	2	28
8,0	3,5	30
9,0	3,0	31
10,0	3	30
11,0	3,5	30
12,0	3	29

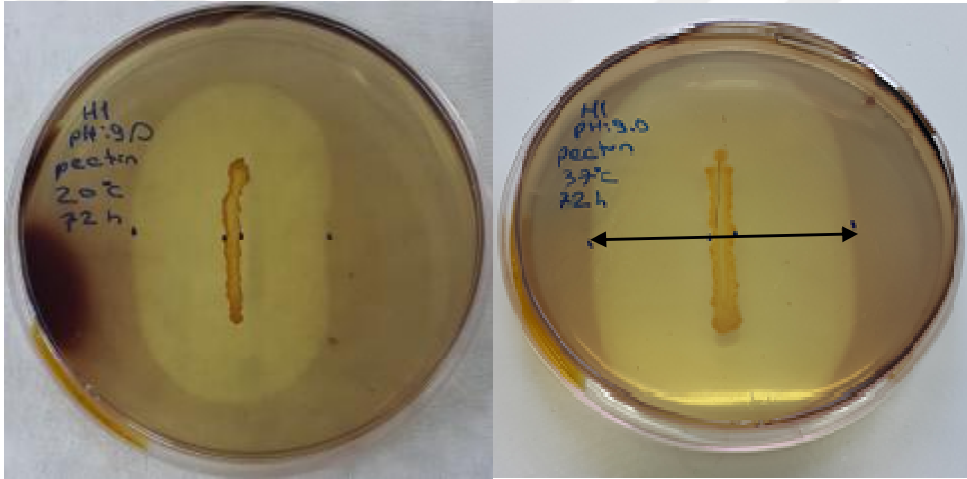
Kusuma ve ark. (2014), izole ettikleri *Bacillus subtilis* (C4) suşunun agar besiyerinde farklı pH'larda pektinaz aktivitesini araştırmışlardır. Enzimin pektinli katı besiyerinde pH 11,0'de en yüksek aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

4.4.2. Pektin Agarda Optimum Sıcaklığın Saptanması

CUHK1 suşu için; en iyi üreme ve en yüksek aktivite pH 9,0'da saptandığı için, sıcaklığın etkisini saptamak amacıyla hazırlanan besiyerinin pH'sı 9,0'a ayarlanmış ve izolat pektinli agara çizgi ekimi ile inoküle edilmiştir. Kültür 4-50°C sıcaklıklar arasında 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra bakteri üreme alanı ve pektinolitik zon çapları ölçülmüştür. Katı besiyerinde en yüksek pektinolitik zon çapı ve üreme alanı 37°C'de saptanmıştır. En düşük aktivite 4 ve 50°C'lerde görülmüştür. Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4.'te görüldüğü gibi enzim üreticisi suşun ve pektinazın **mezofil** olduğu ortaya konmuştur.

Çizelge 4.4. Pektinli Agarda Sıcaklığın Bakteri (CUHK1) Üremesi ve Enzim Aktivitesine Etkisi

Sıcaklık (°C)	Bakteri üreme alanı (mm)	Hidroliz Zonu (mm)
4	1	11
20	3	35
30	3	41
37	5,5	50
40	5,5	49
50	1	10



Şekil 4.4. CUHK1 suşunun Pektinli Agarda 20 ve 37°C’de aktivite zonu

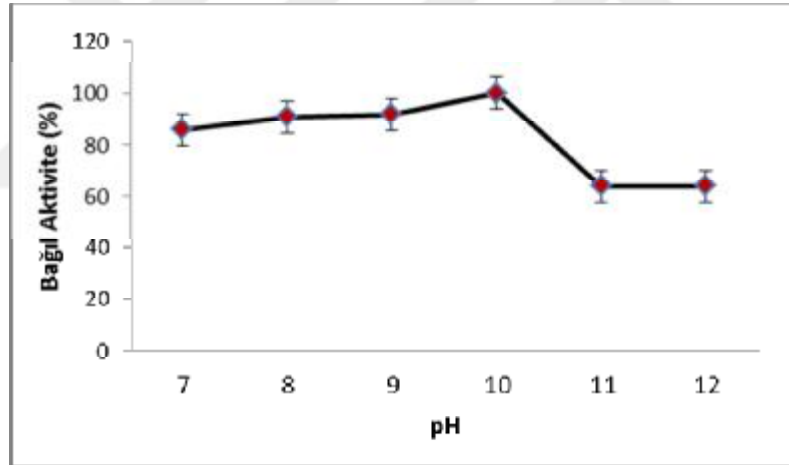
Mukesh ve ark. (2012), *Bacillus* sp. MFW7 suşundan enzim üretimi için en iyi sıcaklığın 35°C olduğunu saptamışlardır.

Patil ve ark (2010), *Penicillium* sp.’den ekstaselüler pektinolitik enzim üretiminde en iyi sıcaklığın 35°C olduğunu gözlemlemişlerdir.

4.4.3. Sıcaklık ve pH'nın Sıvı Besiyerinde Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

CUHK1 suşunun stok kültüründen N1 sıvı besiyerine ekim yapılarak 18 saatlik taze kültür elde edilmiştir. Kültürün optik yoğunluğu (OD_{600}) spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda 0,5'e ayarlanmıştır.

Pektinli sıvı besiyerleri pH 6,0-12,0 aralığında hazırlanarak OD_{600} 0,5'e ayarlanmış taze kültür inoküle edilerek (%1) 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Kültür +4°C'de 8000 devir/dk'da santrifüj edilerek üst faz (enzim solüsyonu) ayrılmıştır. Üst fazda DNS yöntemi ile enzim aktivitesi saptanmıştır. Şekil 4.5.'de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi pH 10,0'da görülmüştür. pH 7,0-9,0 aralığında ortalama %90 aktivite gözlenirken pH 11,0-12,0 aralığında aktivite %60 düzeyinde gözlenmiştir.



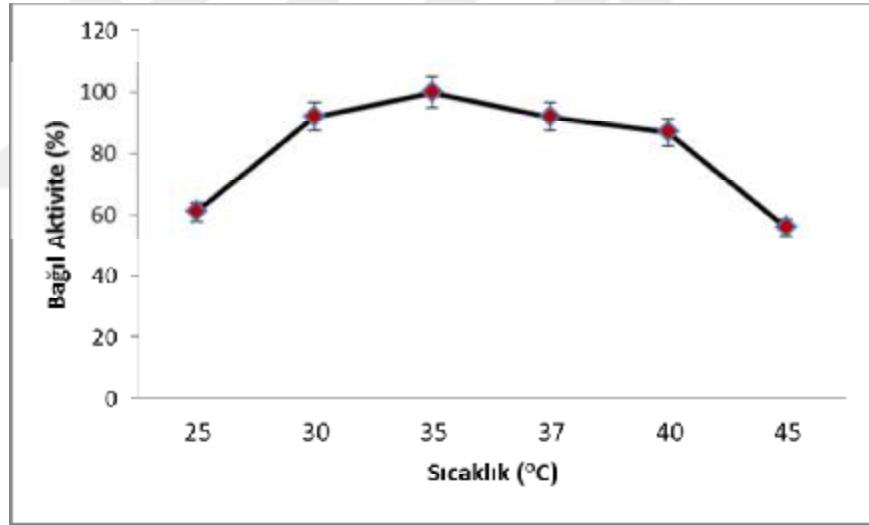
Şekil 4.5. Pektinli sıvı besiyerinde pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Qureshi ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* EFRL 01 nolu suşundan sıvı besiyerinde pektinaz üretimi için en uygun pH'ın 8,0, en düşük enzim üretiminin pH 4,0'de olduğunu saptamışlardır. Enzim üretimi için alkali pH'nın uygunluğunu gözlemlemişlerdir.

Sharma ve Satyanarayana (2006), *Bacillus pumilus* dcsr1 suşundan pektinaz enzimi üretimi için en uygun pH'ın 8,5 olduğunu saptamışlardır.

Kaur ve ark. (2004), termofilik mantar olan *S. termophile*'den pektinaz enzimi üretimi için en uygun pH'ın 7,0 olduğunu saptamışlardır.

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini saptamak amacıyla, CUHK1 suşu pH'sı 10,0 (*optimum pH 10,0 saptandığı için*), olan pektinli sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve 18 saatlik taze kültürü hazırlanmıştır. Taze kültürden inokülasyon yapılan sıvı besiyerleri 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C'de 150 devir/dk çalkalama hızındaki inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteri kültürü +4°C'de 8000 devir/dk'da santrifüj edilmiş üst sıvı faz (enzim solüsyonu) alınarak DNS yöntemi ile farklı sıcaklıklardaki enzim aktiviteleri saptanmıştır. Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi 35°C'de saptanmıştır. 25 ve 45°C'lerde aktivitenin ortalama %58'e düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.6. Pektinli sıvı besiyerinde sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi

Patil ve ark (2010), *Penicillium sp.*'den ekstraselüler pektinolitik enzim üretimi için en uygun sıcaklığın CUHK1 suşunda olduğu gibi 35°C olduğunu saptamışlardır.

Sharma ve Satyanarayana (2006), *Bacillus pumilus* dcsr1 suşundan pektinaz üretimi için en uygun sıcaklığın 50°C olduğunu saptamışlardır.

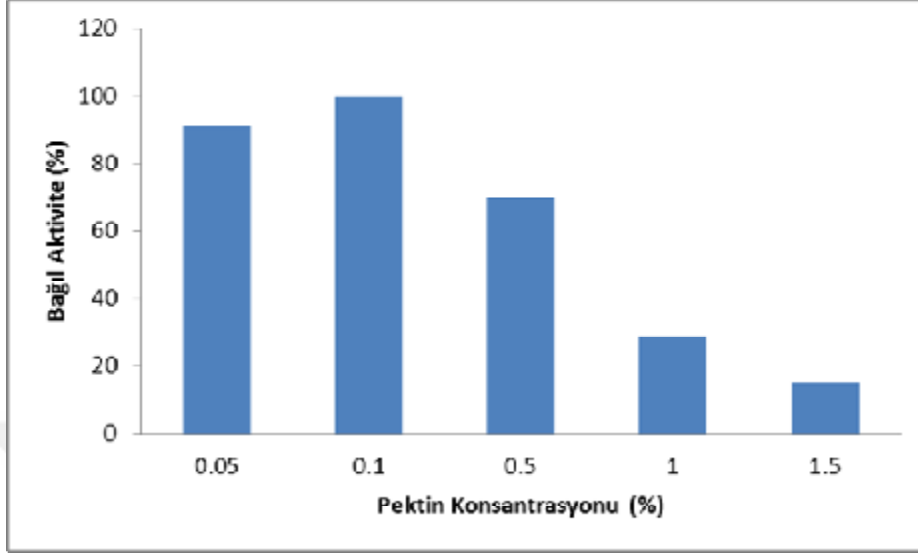
Kaur ve ark. (2004), termofilik mantar olan *S. termophile*'den pektinaz üretimi için en uygun sıcaklığın 45°C olduğunu saptamışlardır.

4.4.4. Pektinaz Üretiminde Pektinin Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Bu çalışmada enzim üretici suşun taranması, enzim üretimi amacıyla kullanılan besiyerine ilave edilen pektin (substrat) temel karbon kaynağını oluşturmaktadır.

Mikroorganizmanın üreyeceği besi ortamına eklenen substrat konsantrasyonu, enzim üretimini etkileyen önemli bir parametredir. Bu çalışmada pektinin farklı konsantrasyonlarını (%0,1, %0,5, %1, %1,5 ve %2) ihtiva eden besi yerlerinde pektinaz üretilerek standart aktivite deneyleri yapılmış ve en iyi konsantrasyon saptanmıştır [Üretim koşulları; pH 10,0, inkübasyon sıcaklığı 35°C, 24 saat]

İnkübasyondan sonra kültürden hücreler ayrılarak üst fazdan DNS yöntemi ile aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.7'de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi %0,1 konsantrasyonunda substrat bulunan besiyerinde saptanmıştır. Yüksek substrat konsantrasyonlarında enzim aktivitesinin oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir.



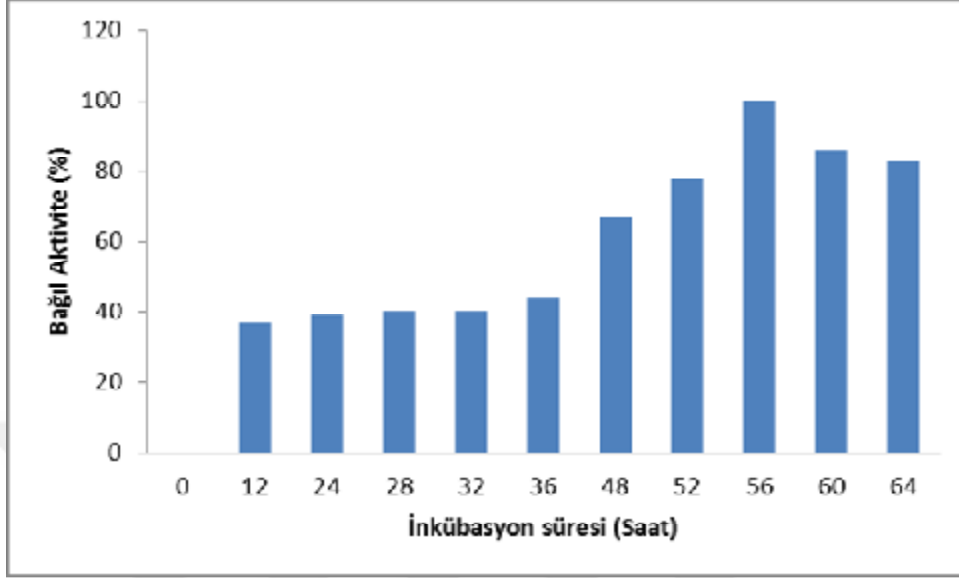
Şekil 4.7. Pektin konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi

Mukesh ve ark. (2012), *Bacillus* sp. MFW7'den pektinaz enzimi üretimi için en uygun substrat konsantrasyonunun %1 olduğunu saptamışlardır. %3,5 substrat konsantrasyonunda aktivitenin giderek azaldığını gözlemlemişlerdir.

4.4.5. Pektinaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi

Endüstride mikroorganizmalardan enzim üretiminde eğer kesikli kültür yapılıyorsa inkübasyon zamanı maksimum enzim verimini sağlayabilmek için son derece önemlidir. Böylece hem gereksiz enerji kullanılması engellenmiş olur hem de maksimum enzim verimi sağlanır.

Bu amaçla optimum koşullarda hazırlanan besiyerinde enzim üretimi devam ederken belirli zaman dilimlerinde standart enzim aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesinin 56. saatte olduğu saptanmıştır. 12-36. saat inkübasyon aralığında enzim aktivitesinin yaklaşık %40 olduğu gözlemlenmiştir.



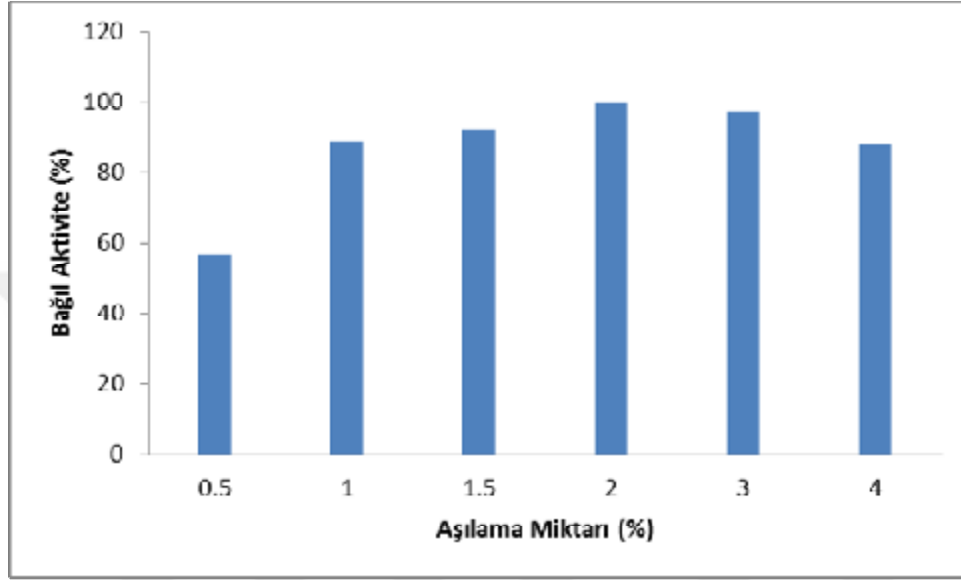
Şekil 4.8. Enzim üretiminde inkübasyon süresinin etkinliği

Qureshi ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* EFRL 01 suşundan sıvı besiyerinde pektinaz üretilmesi için en uygun inkübasyon süresinin 48 saat olduğunu saptamışlardır. 48. saatten sonra inkübasyon süresi devam ettikçe enzim aktivitesinin azalmasını, fermentasyon devam ederken değişen pH, enzimin artıklarla etkileşime girmesi, denatürasyonu ya da dekompozisyonu ile ilişkilendirmişlerdir.

4.4.6. Pektinaz Üretiminde Bakteri Aşılama (inokülüm) Oranının Etkisi

Enzim üretiminde inokülasyon oranı maksimum verim için gerekli parametrelerden biridir. Bu nedenle, optimum koşullarda üretim besiyeri hazırlanmış ve 18 saatlik taze bakteri kültüründen %0,5, %1, %1,5, %2, %3 ve %4 oranlarında aşılama ile besiyerlerine inoküle edilmiştir. 35°C'de inkübasyona bırakılmış ve akabinde üst faz alınarak enzim aktiviteleri saptanmıştır. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesi %2 oranında inokülasyon ile

sağlanmıştır. Sırasıyla enzim üretimi için en uygun aşılama oranı %2>%3>%1,5>%1>%4>%0,5 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Pektinaz üretiminde inokulum miktarının etkisi

4.5. Pektinaz Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşu enzim üreticisi olarak seçilmiş ve çalışmaya bu suş ile devam edilmiştir.

Enzim üretim aşamaları;

CUHK1 suşunun stok kültüründen LB buyyona inokülasyon 18 saat inkübasyonu gerçekleştirilerek taze kültür üretilmiştir.

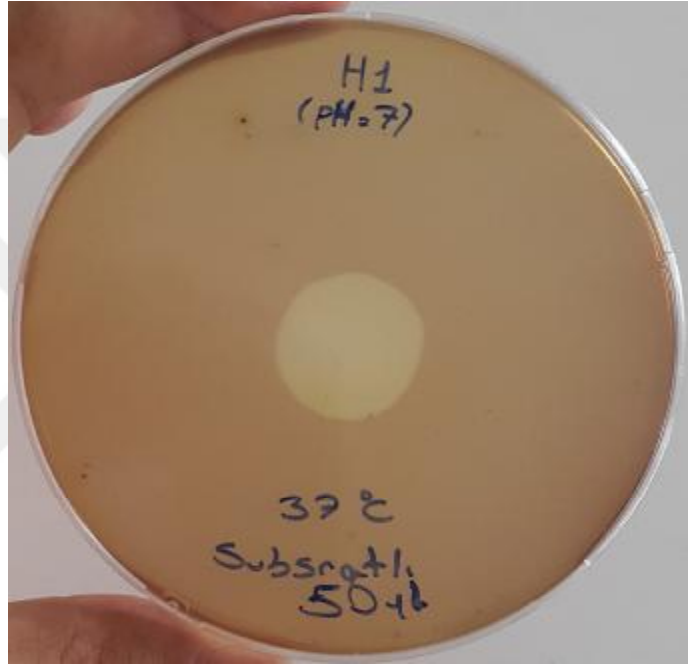
Bu kültürden %2 oranında pektinli (%0,1 pektin, pH 10,0)sıvı besiyerine inoküle edilmiştir ve 35°C’de 56 saat inkübasyonu gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyondan sonra +4 °C’de, 8000 devir/dk santrifüj edilerek, üst fazın ayrılması sağlanmıştır.

Üst faza, toplam hacminin %70 oranında Et-OH ilave edilmiştir.

-20°C’de 1 gece bekletildikten sonra +4 °C’de, 10000 devir/dk santrifüj edilmiş, çökeltilinin tamponda çözülerek ve denemelerde kullanılması sağlanmıştır.

Elde edilen çökeltide enzim aktivite varlığını saptamak amacıyla; Etanol presipitasyonu (kısmi olarak saflaştırılmış) yapılmış çökeltiden 50 µL alınarak %1 pektinli agar besiyerine damlatılmış ve 15 dk 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben agar lügol çözeltisi ile boyanarak enzimin aktivite zonu fotoğraflanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Et-OH presipitasyonundan sonra pektinolitik aktivite

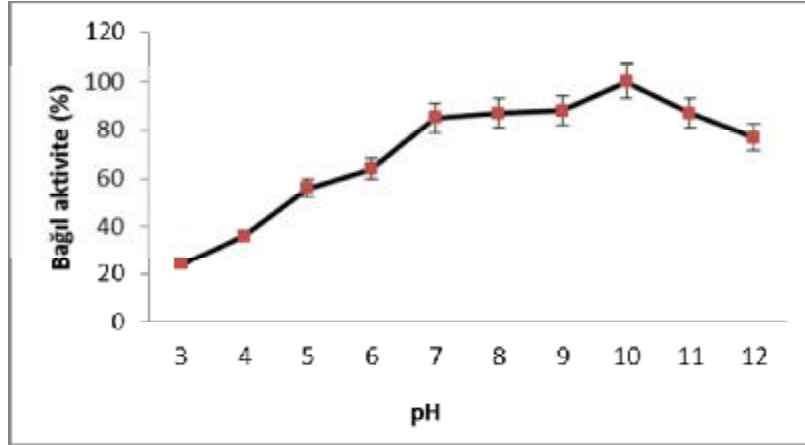
4.6. Optimum pH

Pektinaz aktivitesi ile pH'nın ilişkisini ortaya koyabilmek için farklı tamponlar kullanılmıştır.

Sodyum asetat	pH 4,0, 5,0
Na-fosfat	pH 6,0-8,0
Glisin-NaOH	pH 8,5-10,5
Boraks-NaOH	pH 11,0-12,0

Şekil 4.11’de görüldüğü gibi; pH 3,0’da %24, pH 4,0’de %36, pH 5,0’de %56, pH 6,0’da %64, pH 7,0’da %85, pH 8,0’de %87, pH 9,0’da %88, pH 10,0’da %100, pH 11,0’de %87 ve pH 12,0’de %77 bağıl enzim aktivitesi elde edilmiştir. Optimum enzim aktivitesi pH 10,0’da saptanmıştır. Analizi yapılan bütün pH’larda ortalama olarak %70,4 enzim aktivitesi saptanmıştır. Enzimin pH 3,0-7,0 aralığında ortalama %53 aktiviteye, pH 8,0-12,0 aralığında ortalama %87,8 aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar pektinaz enziminin geniş bir pH aralığında (3,0-12,0) yüksek düzeyde aktif olduğunu (%70,4) ayrıca çok farklı pH’larda verimli olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan izole edilen pektinaz enziminin optimum aktivitesinin pH 10,0’da olması ve pH 11’de %87 aktivite göstermesi enzimin yüksek alkaline özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Enzimin asidik ve ekstrem alkali (pH 6,0’da %64, pH 12,0’de %77) pH değerlerinde yaklaşık %70,5 aktivite göstermesi ekstremofil bir enzim olduğunu göstermektedir. Enzimin ekstremofil özelliği sayesinde özellikle tekstil sektöründe kullanım alanı oldukça fazladır. Saptanan bulgular Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. pH’in enzim aktivitesine etkisi

Mei ve ark (2013), *Bacillus halodurans* M29 suşundan alkalın pektinaz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin pH 10,0'da, Kobayashi ve ark. (2001), *Bacillus* sp. KSM-P576 suşundan alkalın pektinaz enzimi izole etmişler ve pH 8,0'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Horikoshi (1972), *Bacillus* sp. P-4-N numaralı suştan alkalın pektinaz enzimi izole etmiş ve enzimin en yüksek aktivitesinin pH 10,0'da olduğunu saptamıştır.

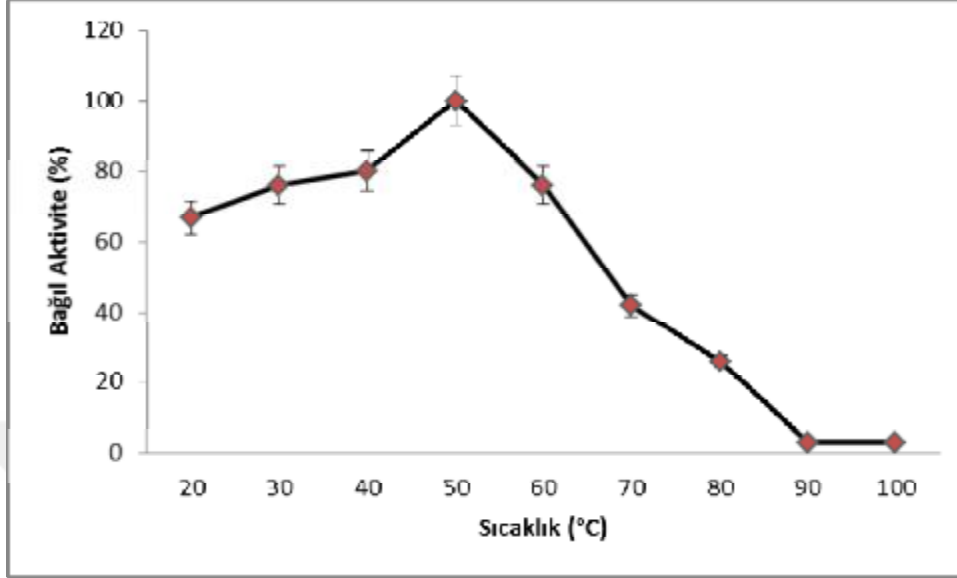
Bu araştırmada “**Pektinaz Üreticisi**” olarak kullanılan *Paenibacillus illinoisensis* CUHK1 suşundan üretilen enzim farklı araştırmacıların ürettikleri enzimlerle benzer/farklı özellik göstermekte olup, alkali bir enzim olduğu ve alkali prosesler için uyumlu olduğu düşünülmektedir.

4.7. Optimum Sıcaklık

Enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığı saptayabilmek için, standart enzim reaksiyon karışımları (enzim+substrat, pH 10,0) hazırlanarak 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 °C sıcaklıklarda 20 dk inkübe edilmiştir ve standart aktivite yöntemi ile spektrofotometrik değerler ölçülmüştür.

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi; 20°C'de %67, 30°C 'de %76, 40°C'de %80, **50°C'de %100**, 60°C'de %76, 70°C'de %42, 80°C'de %26, 90°C'de %9, 100°C'de %3 ve 110°C'de %3 bağıl enzim aktivitesi elde edilmiştir.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan izole edilen pektinaz enzimi için optimum aktivite 50°C'de saptanmıştır. Sıcaklık 60°C'ye yükseldiğinde %76 düzeyinde aktivite varlığı enzimin termofil koşullarda da etkin olduğuna dair önemli bir bulgudur. 20-40°C'lerde ortalama %74,33, 50 ve 60°C'lerde %88 aktivite saptanması, bu enzimin yüksek sıcaklık koşulları gerektirmeyen üretim süreçlerinde kullanılabilceğini, 80-100°C'lerde anlamlı düzeyde aktivite kaybına uğraması nedeniyle söz konusu sıcaklıklar için uygun olmadığı Şekil 4.12'de verilen sonuçlarda görülmektedir.



Şekil 4.12. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

Kant ve ark. (2013), *Aspergillus niger* MTCC 3323'den pektinaz enzimi üretmiş ve 45°C'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Wang ve ark. (2006), *Bacillus subtilis* WSHB04-02 alkali pektinaz enzimi üretmişler ve 57°C'de optimum aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Nagel ve Aughn (1961), *Bacillus polymyxa* suşundan alkali pektinaz enzimi üreten enzimin 45°C'de optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

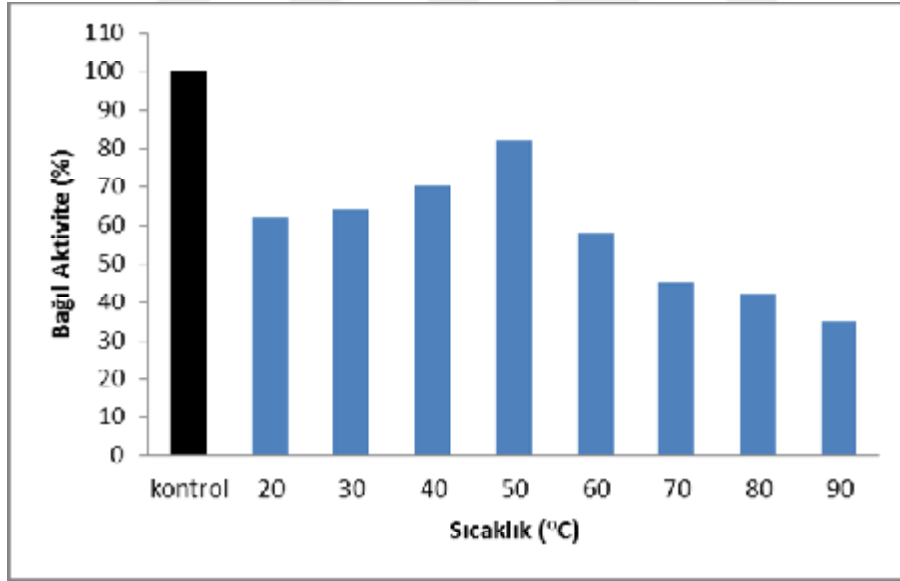
Dave ve Vaughn (1971), *Bacillus pumilis* suşundan alkali pektinaz enzimi üretmişler ve 60°C'de optimum aktivite gösterip 70°C'de %90 aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.

Bu araştırmada *Paenibacillus illinoisensis* CUHK1 suşundan üretilen pektinazın taranan literatürlerdeki bulgular ile benzerlik gösterdiği ve enzimin termofil özellikte olduğu saptanmıştır.

4.8. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi

Sıcaklığın enzimin kararlılığına etkisini saptamak amacıyla; enzim 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra standart aktivite analizi (50°C'de) gerçekleştirilmiştir. Ön işlem uygulanmamış örneğe ait sonuç (kontrol) ile diğerleri kıyaslanmış ve sonuçlar stabiliteye ait bulgular Şekil 4.13'te verilmiştir.

Grafikten görüldüğü gibi; 20°C'de %62, 30°C'de %64, 40°C'de %70, 50°C'de %82, 60°C'de %58, 70°C'de %45, 80°C'de %42 ve 90°C'de %35 oranında enzim aktivitesi korunmuştur. Pektinaz enzimi ön inkübasyon işlemi gerçekleştirilen sıcaklıklarda ortalama %57.25 oranında aktivitesini korumuştur. 20-40°C aralığında ortalama %65,33 oranında, 60-90°C'lerde ortalama %45 düzeyinde aktivite korunmuştur.



Şekil 4.13. Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi

Martins ve ark. (2001), *Thermoascus aurantiacus*'dan ürettikleri pektin liyaz (Pl) ve poligalakturonaz (Pg) enzimlerinin için; Pl enziminin 60°C'de 5 saat stabil kaldığını, Pg enziminin ise 60°C'de 1 saat stabil kalabildiğini saptamışlardır.

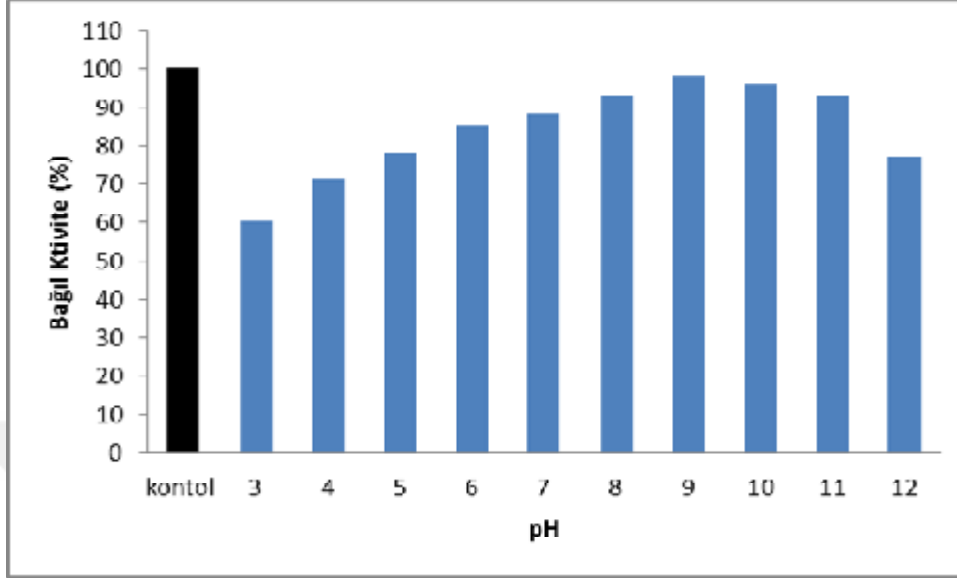
Soares ve ark. (1999), *Bacillus* sp. P.4.3 suşundan ürettikleri pektinolitik enzimin 60 °C'de 1 saat inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini yüksek oranda koruduğunu saptamışlardır.

Amid ve ark. (2014), *Hylocereus polyrhizus*'dan pektinaz enzimi üretmişlerdir. Karakterizasyonunu yaptıkları enzimin 10-85 °C aralığındaki değerlerde 1 saat ön inkübasyon sonucunda aktivitenin ortalama %90 korunduğunu belirtmişlerdir. Fakat enzimin 85 °C sıcaklıktan itibaren stabilitesini yüksek oranda kaybettiğini saptamışlardır. Üretilen enzim 85 °C'de aktivitesini %23 oranında korurken, 85 °C üstündeki sıcaklık değerlerinde enzimin aktivitesini koruyamadığını tespit etmişlerdir.

4.9. pH'nın Enzim Kararlılığına (Stabilitesi) Etkisi

Pektinazın pH stabilitesinin saptanması amacı ile; enzim pH 3,0-12,0 değerleri arasında 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra optimum koşullarda (optimum pH) standart aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Ön inkübasyon uygulanmamış örneğin sonucu (kontrol) ile diğer sonuçlar kıyaslanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.14'te verilmiştir.

Enzimin aktivitesi, pH 3,0'de %60, pH 4,0'de %71, pH 5,0'de %78, pH 6,0'da %85, pH 7,0'de %88, pH 8,0'de %93, pH 9,0'da %98, pH 10,0'da %96, pH 11,0'de %93 ve pH 12,0'de %77 oranında korunmuştur. Pektinaz test edilen pH'larda ortalama %83,9 oranında aktivite göstermiştir. pH 3,0-8,0 aralığında ortalama %79,1 oranında, pH 9,0-12,0 aralığında ortalama %91 oranında aktivite korunmuştur. Sonuçlardan görüldüğü gibi, bu çalışmada üretilen enzim 1 saatlik sürede pH 9,0/pH 10,0'daki alkali koşullarda aktivitesini %96-98 düzeyinde koruduğu için alkali üretim süreçlerinde son derece uygundur.



Şekil 4.14. pH'nın enzim kararlılığına etkisi

Vatanparast ve ark., (2014), elde ettikleri pektinaz enziminin pH 6,0'da stabilitesinin önemli ölçüde koruduğunu belirtmişlerdir.

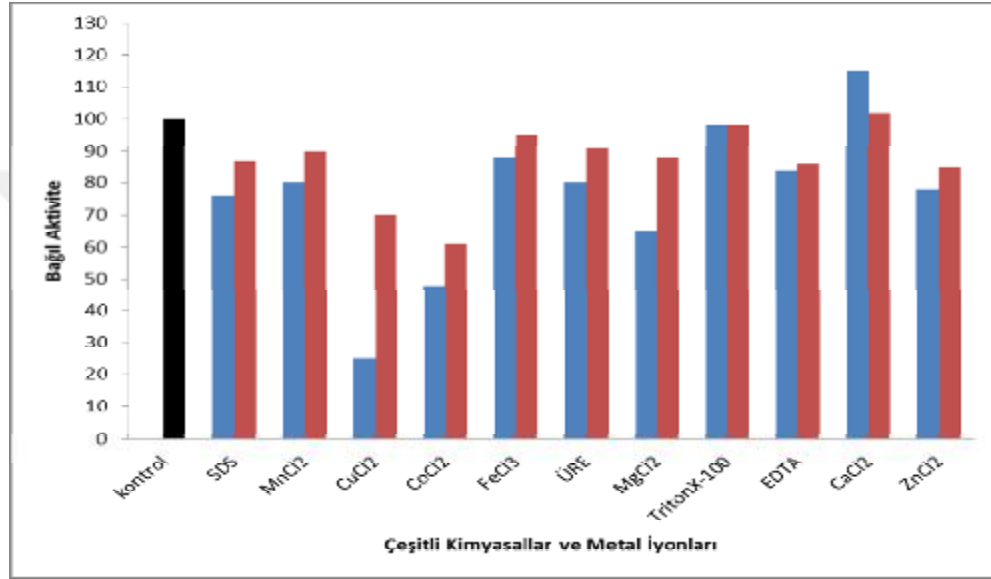
Amid ve ark. (2014), ürettikleri pektinaz enziminin pH 3,0-11,0 aralığında 1 saatlik ön inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini yaklaşık %90 oranında koruyabildiğini ve pH 11,0 ve üstündeki değerlerde orijinal aktivitesini yüksek oranda kaybettiğini gözlemlemişlerdir.

4.10. Kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkileri

Endüstriyel amaçlı üretim süreçlerinde kullanılacak enzimler sıcaklık, pH gibi fiziksel ve kimyasal etkiler nedeniyle aktivite kaybına uğrayabilmektedirler. Ayrıca üretim sırasında enzimin maruz kalacağı çeşitli kimyasallar enzimlerin aktivitesini yüksek düzeyde inhibe/aktive edebilir ya da etkisiz kalabilirler. Bu nedenle kimyasalların enzimin aktivitesi üzerindeki etkinliklerinin test edilmesi önem arz etmektedir.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan üretilen pektinaza son konsantrasyon 1 mM ve 10 mM olmak üzere 2 farklı konsantrasyonda çeşitli

kimyasallar eklenerek 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Herhangi bir kimyasal eklenmeyen örnek kontrol olarak kullanılmış, standart enzim aktivite tayini yapılmış ve kontrol örneğin sonucu diğerleri ile kıyaslanarak elde edilen değerler Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. Kimyasalların enzim aktivitesine etkileri

Grafikten görüldüğü gibi, CaCl₂ enzim aktivitesini hem 1 mM hem de 10 mM konsantrasyonda sırasıyla %2 (%102) ve %15 (%115) oranında artırmıştır. Beg ve ark., (2000) *Streptomyces* sp. QG-11-3'den ürettikleri pektinaz enziminin 1 mM CaCl₂ ile %5 oranında, Amid ve ark., (2014) da 10 mM CaCl₂ ile pektinazın %20 oranında indüklendiğini saptamışlardır. Amid ve ark., (2014) Ca⁺² iyonunun yüksek sıcaklıklarda pektinaz aktivitesini artırmada ve protein stabilizasyonunda anlamlı bir rol oynadığını ayrıca substrat olarak pektin kullanıldığında hidroliz için (pektinaz aktivitesi için) gerekli olduğunu bildirmişlerdir.

Pektinaz %1 Triton X-100 ile orjinal aktivitesini %98 oranında korumuştur. Beg ve ark., (2000) *Streptomyces* sp. QG-11-3'den ürettikleri

pektinazın aktivitesinde Triton X-100 ile değişiklik olmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada SDS'nin %0,1 ve %0,5 konsantrasyonları orijinal aktivitede sırasıyla %13 ve %24 oranında inhibisyona neden olmuştur. Beg ve ark., (2000) ürettikleri pektinazın %0,1 SDS ile %21 oranında inhibe olduğunu saptamışlardır. Amid ve ark., (2014) ise pektinazın %5 SDS ile %18 oranında inhibe olduğunu saptamışlardır.

Üretilen pektinaz 1 mM FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ ile sırasıyla, %95, %90, %88 ve %85 oranlarında orijinal aktivitesini korumuştur. Aynı metal iyonları 10 mM kullanıldığında ise enzim sırasıyla, %88, %80, %65 ve %78 oranlarında aktivitesini korumuştur. Özetle farklı düzeylerde aktivite kaybı olmuş ancak, söz konusu tuzların üretim süreçlerinde 1 mM konsantrasyonda varlığı önemli sorun oluşturmayacaktır.

Beg ve ark., (2000) *Streptomyces* sp. QG-11-3'den ürettikleri pektinazın 1 mM FeCl₂, MnCl₂ ve ZnCl₂ ile sırasıyla, %10, %17 ve %11 oranlarında inhibe olduğunu saptamışlardır. *Paenibacillus illinoisensis* CUHK1 suşundan üretilen pektinaz 1 mM FeCl₂, MnCl₂ ve ZnCl₂ ile sırasıyla, %5, %10 ve %15 oranlarında inhibe olduğu saptanmış ve Beg ve ark., (2000)'nin sonuçlarına yakın bulgular elde edilmiştir.

Amid ve ark., (2014) ürettikleri pektinazın 10 mM FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ ile sırasıyla, %0, %100, %112 ve %100 oranlarında aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Triton X-100 varlığında enzim aktivitesinin %85 oranında olduğunu belirlemişlerdir.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan üretilen pektinaz enzimi 1 mM CoCl₂ ve CuCl₂ ile sırasıyla %61 ve %70 oranında orijinal aktivitesini korumuştur. 10 mM CoCl₂ ve CuCl₂ varlığında %48 ve %25 oranında orijinal enzim aktivitesini korumuştur. Bu bulgu; Beg ve ark., (2000)'nin sonuçları ile büyük oranda örtüşmektedir. *Streptomyces* sp. QG-11-3'den ürettikleri pektinaz enziminin 1 mM CoCl₂ ve CuCl₂ ile sırasıyla %66 ve %78 oranında orijinal aktivitesini koruduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada üretilen pektinaz, 1 ve 10 mM EDTA ile sırasıyla %86 ve %84 oranlarında orijinal enzim aktivitesini korumuştur. Benzer şekilde Kashyap ve ark., (2000) *Bacillus* sp. DT7 suşundan ürettikleri pektinazın EDTA varlığında %83 oranında aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

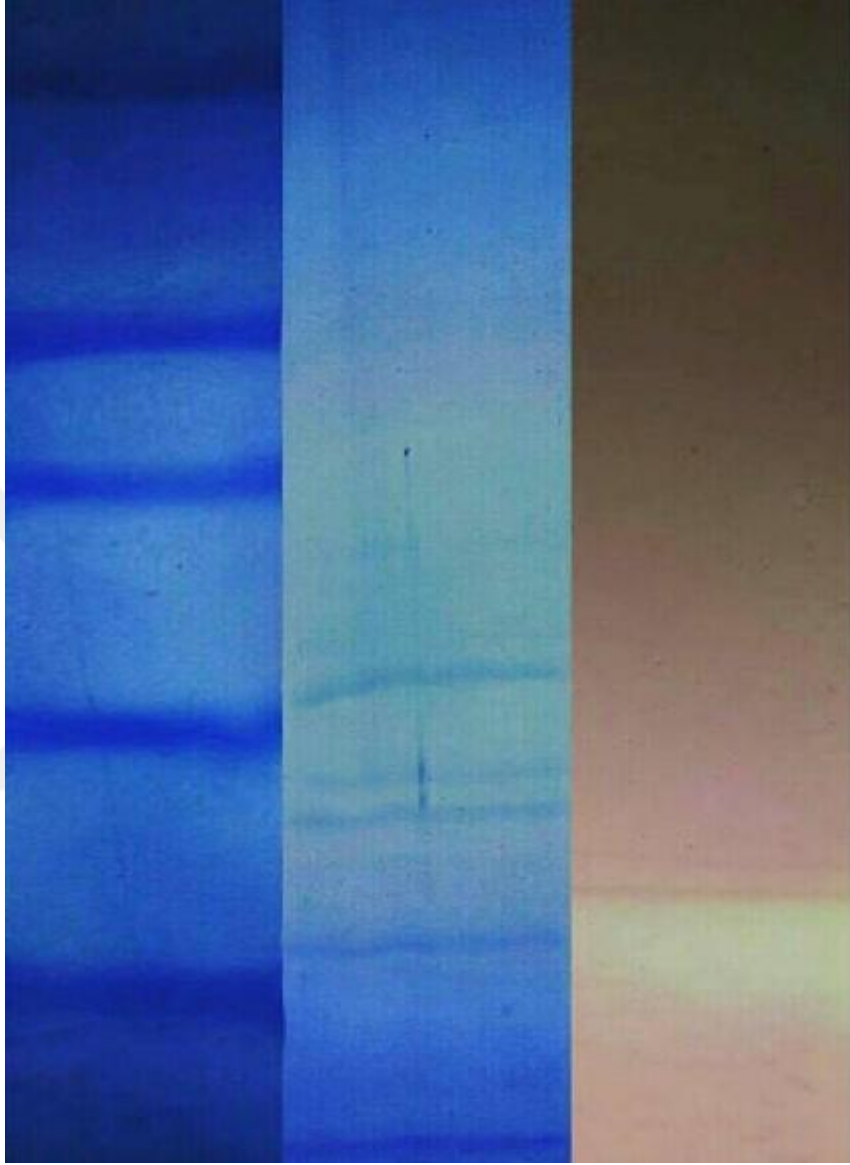
1mM üre ile aktivite %91 oranında korunmuştur. Horikoshi, (1972) *Bacillus* No. P-4-N'den ürettiği alkali pektinaz enziminin aktivitesine ürenin hiçbir etkisinin olmadığını saptamıştır.

Bu araştırmada test edilen kimyasalların, üretilen alkali pektinaz üzerindeki etkileri ile benzer sonuçlara ait literatür bulguları farklı organizmalardan üretilen enzimler için de söz konusudur.

4.11. Elektroforetik Analiz (SDS-PAGE, Zimogram)

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan üretilen ve Et-OH presipitasyonu ile kısmi saflaştırılmış pektinaz enzimi %10'luk SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. Coomassie Blue R-250 ile boyandıktan sonra, jelde 5 protein bandı gözlemlenmiştir. Protein bantlarının moleküler ağırlıkları sırası ile 49, 44, 40, 32 ve 20 kDa olarak hesaplanmıştır.

Enzim araştırmalarında, enzim tipine göre farklı aktivite test yöntemleri kullanılmaktadır. Bu araştırmada pektin substratı ile hazırlanan reaksiyon karışımından sonra aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ancak SDS-PAGE'de saptanan 5 protein bandından hangisinin pektinaz olduğunu saptayabilmek için pektin ihtiva eden jelde pektinazın yürütülerek aktivite bantlarının görülmesi ile enzimin saflık düzeyi ve moleküler ağırlığı netleştirilmiştir. Bu amaçla (Zimogram analizi) enzim %0.1 poligalakturonik asit bulunan SDS-PAGE sisteminde yürütülmüştür. SDS-PAGE'de saptanan 4 protein bandından sadece 32 kDa moleküler ağırlığındaki bant pektinolitik aktivite göstermiştir. Sonuç olarak; bu çalışmada üretici organizma olan *Paenibacillus illinoisensis* CUHK1 suşundan üretilmiş **Alkali Pektinazın moleküler ağırlığı 32 kDa dur.**



Şekil 4.16. Pektinaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram analizi sonucu

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde biyoteknolojik ürünlerin her alanda yaygın/etkin kullanımı nedeniyle biyoteknoloji çağını yakalamak için dünyada birçok ülke adeta yarış içerisinde. Biyoteknolojik ürünlerin hem popüler hem de pazar payının oldukça yüksek olmasından kaynaklı, tarifsiz bir rekabetle bu pazarın dışında kalmamak, ülke ekonomisine önemli katkı sağlamak ve dünyada etkin olmak adına çok yoğun bilimsel çalışmalar yürütülmektedir. Günümüzde ve gelecekte biyoteknolojinin güncelini takip etmeden ve yoğun araştırmaların olmadığı bir dünya düşünülemez.

Söz konusu endüstri olduğunda, enzim kullanımı gerektiren proseslerde mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir. Çünkü mikrobiyal enzimlerin üretilmesi ucuz, kolay hem de hızlıdır. Ayrıca mikroorganizmaların istenilen yönde genetik manipülasyonları mümkün olduğundan istenilen özellikte ürün elde etmek söz konusudur.

Alkali ortamlarda yaşamaya adapte olmuş mikroorganizmalar alkalifilik ve alkali-tolerant olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Bu mikroorganizmalar alkali özellikteki birçok ortamdan izole edilebilirler ve alkali enzimler üretebilirler.

Bacillus genusuna ait birçok tür alkali özellikte farklı habitatlarda bulunabilirler. *Bacillus* genusu Gram (+) organizmalar olup, genellikle enzimlerini dış ortama (ekstraselüler) salgırlar. Bu önemli bir avantaj olup kültürden hücreler uzaklaştırıldığında hedeflenen enzimi üst fazdaki sıvıdan elde etmek kolay ve hızlıdır. Üretim ortamlarına eklenecek spesifik substratlar ile enzim üretimi indüklenebilir. Endüstride kullanılan birçok mikrobiyal enzim, *Bacillus* genusundan üretilmektedir.

Pektik maddeler, diğer yapı bileşenleriyle birlikte bitkinin hücre çeperinde bulunur ve dokuya sertlik veren temel birleşiklerdendir. Bitki materyalinin taze ağırlığının yaklaşık %0.5-%4.0'ünü pektik maddeler oluşturur (Jayani ve ark., 2005). Kimyasal olarak pektik maddeler, α -(1-4) bağları ile bağlanmış galakturonik asit kalıntısının bir omurgası olan, kompleks kolloidal asit polisakaritleridir. Pektin

molekülünün yan zincirleri, L-ramnoz, arabinoz, galaktoz ve ksilozdan oluşur. Galakturonik asidin karboksil grupları, kısmen metil grubu ile esterleştirilmiştir ve kısmen ya da tamamen sodyum, potasyum veya amonyum iyonları tarafından nötralize edilmiştir (Be Miller, 1986).

Pektinazlar genel olarak, depolimerizasyon (hidrolazlar ve liyazlar) ve deesterifikasyon (esterazlar) reaksiyonları yoluyla pektik maddeleri katalize edebilen enzim grubuna verilen isimdir.

Pektinazlar etki gösterdiği substrata, etki ettiği substratı parçalama yoluna, enzimin parçalamayı sırası ile ya da rastgele yapmasına göre sınıflandırılmıştır. Pektinazlar geniş bir yelpazeye sahiptir ve pektin esterazlar, hidrolazlar ve liyazlar olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadırlar. Bu ana gruplar da birçok yan dallara ayrılmıştır.

Mikrobiyal pektinazlar küresel gıda enzimleri satışlarının %20'sini oluşturmaktadır. Günümüzde endüstride kullanılan pektinolitik enzimlerin büyük bir bölümü mikroorganizmalardan üretilmektedir.

Pektinaz enzimi üretimi için seçilen CUHK1 suşu pH 8,0-12,0 aralığında hazırlanmış katı besi yerlerinde inkübe edildiğinde; alkali pH'nın bakterinin optimum üremesini ve enzim sentezini negatif yönde etkilememiştir. Test edilen tüm alkali katı besi yerlerinde aktivite zon çapları geniş ve birbirine çok yakın bulunmuştur. Enzimin katı besi yerinde oluşturduğu en geniş aktivite zon çapı pH 9,0'da belirlenmiştir. Elde edilen sonuç Kusuma ve ark. (2014)'nın bulguları ile uyum göstermektedir. Kusuma ve ark. (2014), *Bacillus subtilis* (C4) suşunu agar besiyerinde ürettiklerinde en yüksek aktivite zonunun pH 11,0'de olduğunu saptamışlardır. CUHK1 suşunun katı besiyerinde en iyi ürettiği ve enzim aktivitesi gösterdiği sıcaklık ise 37°C olarak saptanmıştır.

Mukesh ve ark. (2012), *Bacillus* sp. MFW7 suşundan enzim üretimi için en iyi sıcaklık değerini 35°C olarak saptamışlardır. Patil ve ark (2010), *Penicillium* sp.'den ekstraselüler pektinolitik enzim üretiminde en iyi sıcaklığın 5 °C olduğunu

gözlemlemişlerdir. Bu araştırmada elde edilen bulgu her iki araştırmanın bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Sıvı besiyerinde pektinaz üretimi en iyi pH 10,0'da saptanmıştır. pH 7,0-9,0 aralığında ortalama %90 aktivite gözlemlenirken pH 11,0-12,0 aralığında aktivite %60 olarak belirlenmiştir. Literatür bilgileri incelendiğinde Qureshi ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* EFRL 01 izolatından pektinaz enzimi üretilmesi için en uygun pH'ın 8,0 olduğunu ve enzim üretimi için alkali pH aralıklarının daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Sharma ve Satyanarayana (2006), *Bacillus pumilus* dcsr1 bakterisinden pektinolitik enzim üretilmesi için en uygun pH'nın 8,5 olduğunu saptamışlardır.

CUHK1 suşunun sıvı besiyerinde üretildiğinde, en yüksek enzim aktivitesi 35°C sıcaklıkta saptanmıştır. 25 ve 45°C'de aktivitenin ortalama %58 olduğu gözlenmiştir. Kaur ve ark. (2004), Termofilik mantar olan *S. termophile*'den pektinaz üretimi için en uygun sıcaklığın 45 °C olduğunu saptamışlardır.

Substrat konsantrasyonunun enzim üretimine etkisi test edildiğinde en yüksek üretim %0,1 pektinli besi yerinde besi yerinde saptanmıştır. Konsantrasyon arttıkça enzim aktivitesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim üretimi için en uygun substrat konsantrasyonu oranı sırası ile 0,1>0,05 >0,5 >1>1,5 olarak tespit edilmiştir. Mukesh ve ark. (2012), *Bacillus sp.* MFW7'den pektinolitik enzim üretilmesi için optimum substrat konsantrasyonunun %1 olduğunu, %3,5 substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesinin giderek azaldığını belirtmişlerdir. **Taranan literatür bilgileri ile kıyaslandığında CUHK1 suşu ile %0,1 pektinli besi yerinde maksimum enzim üretimi sağlanması, endüstriyel üretimler için son derece ekonomik olması nedeniyle avantajlı görünmektedir.**

Bu çalışmada üretilen pektinazın karakterizasyon sonuçlarına göre; optimum aktivite pH 10,0'da saptanmış ve test edilen tüm pH'larda ortalama %70,4 enzim aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 3,0-7,0 aralığında ortalama %53, pH 8,0-12,0 aralığında ise ortalama %87,8 aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre üretilen pektinaz geniş bir pH aralığında (3,0-12,0)

aktivite göstermekte (%70,4) ve pH 8,0-12,0 aralığında değişen alkali üretim proseslerinde başarıyla kullanılabilir özelliktedir.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan izole edilen pektinaz enziminin optimum aktivitesinin pH 10,0'da olması ve pH 11,0'de %87 aktivite göstermesi enzimin yüksek alkali özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Enzimin asidik ve ekstrem alkali (örneğin; pH 6,0'da %64, pH 12,0'de %77) pH değerlerinde ortalama %70,5 aktivite göstermesi (*ekstremofil*) nedeniyle özellikle tekstil sektöründe kullanıma uygun görünmektedir. Tekstil endüstrisinde ham pamuktan selülozik olmayan kirleticileri uzaklaştırmak için alkali pektinolitik enzimlerin kullanılması yüzeyin daha hidrofilik hale getirilmesi için alternatif ve çevre dostu bir yöntemdir. Klug-Santner ve ark. (2007), *Bacillus pumilus* BK2'den elde edilen saflaştırılmış pektinaz enzimi ile pamuk dış tabakasından pektinin giderilmesini %80'e kadar sağladıklarını saptamışlardır. *Paenibacillus illinoisensis* CUHK1 suşundan izole edilen pektinaz enziminin alkali özellikte olması tekstil endüstrisinde kullanılabilirliğini sağlamaktadır. Ayrıca keten bitkisinin liflerinin ayrılmasını sağlamak amacı ile yapılan havuzlama işleminde alkali pektinaz enzimi kullanılarak pektik maddeler suda çözülebilen basit bileşiklere dönüştürülür ve üretim hızında artış sağlanır.

CUHK1 suşundan üretilen pektinaza benzer şekilde, Mei ve ark (2013), *Bacillus halodurans* M29 izolatından alkali pektinaz izole etmişlerdir. Enzimin pH 10,0'da optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Horikoshi (1972), *Bacillus* sp. P-4-N numaralı izolattan alkali pektinaz izole etmiş ve enzimin en yüksek aktivitesinin pH 10,0'da olduğunu saptamıştır.

CUHK1 suşundan üretilen pektinazın değişen pH'larda kararlılığı test etmek için pH 3,0-12,0 aralığında 60 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlara göre enzim orijinal aktivitesini ortalama %83,9 oranında korumaktadır. Enzimin farklı pH'larda aktivitesini %83 düzeyinde koruması önemli bir kararlılık göstergesidir. Enzim pH 3,0-8,0 aralığında ortalama %79,1 oranında, pH 9,0-12,0 aralığında ortalama %91 oranında aktivitesini korumuştur. Horikoshi (1971),

Bacillus sp. (P-4-N)'den ürettiği alkali pektinazın, pH 10,0'da optimum aktivite gösterdiğini ve en yüksek kararlılığın pH 6,0'da olduğunu saptamıştır. Soriano ve ark. (2006), *Paenibacillus barcinonensis* suşundan ürettikleri pektinazın pH 7,0'de 24 saat inkübe edildiğinde orijinal aktivitesini %60 kaybettiğini bildirmişlerdir. **CUHK1 suşundan üretilen enzimin değişen pH'lardaki kararlılığı taranan literatürlerdekine göre yüksektir bu da endüstriyel üretim için tercih sebebidir.**

CUHK1 suşundan üretilen pektinolitik enzim; 50°C'de optimum aktivite 20-40°C aralığında ortalama %74.33, 50 ve 60°C'de ise ortalama %88 oranında aktivite göstermiştir. **Sonuçlara göre enzim termofil özellikte olup 50-60°C'lerde endüstriyel üretim/uygulama proseslerinde kullanıma uygundur.**

Kant ve ark. (2013), *Aspergillus niger* MTCC 3323'den izole ettikleri pektinazın 45°C'de, Nagel ve Aughn (1961), *Bacillus polymyxa* suşundan izole ettikleri alkali pektinaz enziminin 45°C'de optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. *Paenibacillus illinoisensis* CUHK1 suşundan üretilen pektinaz enziminin optimum sıcaklık özellikleri literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisi test edildiğinde; (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 ve 110 °C) 60 dk ön inkübasyon işleminden sonra aktivite ortalama %57,25 oranında korunmuştur. Enzim aktivitesi; 50°C'de %82, 20-40°C'lerde %65,33, 60-90°C'lerde ortalama %45 oranında korunmuştur. **50°C'de 60 dk'da %82 düzeyinde aktivite korunurluğu enzimin termostabil olduğuna işaret etmektedir.** Alana ve ark. (1990), *Penicillium italicum*'dan ürettikleri pektinaz enzimin 50°C'de kararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Çeşitli kimyasalların enzim aktivitesi üzerindeki etkisini saptamak amacıyla; farklı kimyasallar ile enzim muamele edilmiş ve kalan aktivite standart aktivite metoduyla ölçülmüştür. Enzim aktivitesinin 1 mM ve 10 mM CaCl₂ varlığında sırası ile %2 ve %15 oranında indüklendiği saptanmıştır. Beg ve ark., (2000) *Streptomyces* sp. QG-11-3'den ürettikleri pektinaz enziminin 1 mM CaCl₂ ile %5 oranında indüklendiğini belirtmişlerdir. Amid ve ark., (2014) ürettikleri

pektinazın 10 mM CaCl₂ ile %20 oranında indüklendiğini saptamışlardır. Amid ve ark., (2014) Ca⁺² iyonu ile pektinaz enziminin orijinal aktivitesinin yüksek sıcaklıklarda artmasında ve protein stabilizasyonunda anlamlı bir rol oynadığını belirtmişlerdir. **Ayrıca, Ca⁺² iyonları, pektinaz enzimi için pektinin substrat olarak kullanıldığında hidroliz için gerekli olduğunu bildirmişlerdir.**

Üretilen pektinaz %1 Triton X-100 ile muamele edildiğinde enzim orijinal aktitesini %98 oranında korumuştur. Beg ve ark., (2000) *Streptomyces* sp. QG-11-3'den ürettikleri pektinaz enziminin Triton X-100'ün aktivite için etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Enzim %0,1-%0,5 SDS ile muamele edildiğinde orijinal aktivitenin sırası ile %13 ve %24 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir. Beg ve ark., (2000) ürettikleri enzimin %0,1 SDS varlığında %21 oranında inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Amid ve ark., (2014) ürettikleri pektinolitik enzimin %5 SDS ile %18 oranında inhibe olduğunu rapor etmişlerdir.

Enzim 1 mM FeCl₂, MnCl₂, MgCl₂ ve ZnCl₂ ile sırasıyla, %5, %10, %12 ve %15 oranlarında inhibe olmuştur. Bu metal iyonları 10 mM kullanıldığında ise sırasıyla, %12, %20, %35 ve %22 oranlarında inhibe olmuştur. Beg ve ark., (2000) *Streptomyces* sp. QG-11-3 izolatından ürettikleri pektinaz enziminin 1 mM FeCl₂, MnCl₂ ve ZnCl₂ varlığında sırası ile, %10, %17 ve %11 oranlarında inhibe olduğunu belirtmişlerdir.

Enzim 1 ve 10 mM EDTA ile sırasıyla %86 ve %84 oranlarında orijinal aktivitesini korumuştur. Horikoshi (1971), *Bacillus* sp. (P-4-N) suşundan ürettiği pektinaz enziminin EDTA ile %100 oranında inhibe edildiği gözlemlenmiştir.

CUHK1 suşundan üretilen enzimin EDTA varlığında kararlı olması taranan literatürlerdeki pektinazlara göre önemli bir özellik gibi görünmektedir.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan üretilerek, Et-OH ile kısmen saflaştırılmış pektinaz, pektin içeren SDS-PAGE ile analiz edilmiş (*zimogram*) ve pektinolitik aktivite gösteren 32 kDa moleküler ağırlığında enzim bandı saptanmıştır.

Mei ve ark. (2013), *Bacillus halodurans* M29 suşundan ürettikleri pektinaz enziminin moleküler ağırlığını 44 kDa, Soriano ve ark. (2000), *Bacillus* sp. BP-23 suşundan ürettikleri enzimin moleküler ağırlığını zimogram analizi ile 25 kDa, Patil ve ark. (2010), *Penicillium* sp.'den ekstraselüler pektinolitik enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE analizi ile 35 kDa, Banu ve ark. (2010), *Penicillium chrysogenum*'dan ürettikleri pektinaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 31 kDa olarak bulmuşlardır. *Paenibacillus illinoisensis* CUHK1 izolatından üretilen pektinazın moleküler ağırlığı literatürde yer alan bulgular ile benzerlik göstermektedir.

Alkali pektinolitik enzimler, tekstil, gıda, kağıt üretimi gibi endüstrilerde yaygın/etkin olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde biyoteknolojik gelişim süreçlerinden uzak kalmamak adına, dünyada kullanılan teknolojileri uygulamak, bu teknolojileri uygularken gereksinim duyulan enzimleri ülkemizde üretilen duruma getirmek, geliştirememiz ve ekonomik olarak hakim olabilmemiz için mutlak zorunluluktur. Gıda, tekstil ve kağıt endüstrisinde kullanılmakta olan alkali pektinaz üreticisi doğal suşların izolasyonu, tanımlanması, ihtiyaç duyulduğunda klonlanarak rekombinant suşların üretilmesi, enzimin karakterizasyonu, ülkemizde ihtiyaç duyulan alkali pektinazın endüstriyel boyutta üretimi ve bu sektörlerde kullanıma sunulması zorunluluk olarak algılanmalıdır. Mikrobiyal enzimlerin avantajları, uygulanabilirliği, kolay ve ucuz üretim teknolojileri, her türlü doğal habitatlardan mikroorganizmanın izole edilebilirliği, enzimlerin dünya pazarındaki payı, ekonomiye sağlayacağı katkı gibi parametreler dikkate alındığında Ülkemizde bu tarz çalışmalara önemle yönelmemiz gerektiği açıktır.

Bacillus sp.'den Alkali pektinaz üretimi ve karakterizasyonu konu başlıklı yüksek lisans tezi ile bu alana katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Paenibacillus illinoisensis CUHK1 suşundan üretilen pektinaz, pH 10,0'da optimum, pH 11,0'de %87 aktivite göstermektedir. Pektik atıklarının içeren gıda atık sularının ön muamelesinde kullanılabilir özelliktedir. Ayrıca diğer

yöntemlere göre maliyeti daha düşük, daha az karmaşık ve işlem süreci daha kısadır.

Tekstil endüstrisi; Alkali pektinolitik enzimler tekstil endüstrisinde Sunn keneviri, keten, kenevir ve hindistan cevizinde lif zankı gidermede kullanılarak pektik bileşenler ortamdaki elimine edilmektedir. Zamklama, içeriğe alkali pektinolitik enzim eklenerek ya da elyaf fermantasyonu için pektinaz üreten mikroorganizmalar kullanılarak yapılabilir.

Ham pamuktan selülozik olmayan kirleticileri özel pektinolitik enzimlerle çıkarıp yüzeyin daha hidrofilik hale getirilmesi alternatif ve çevre dostu bir yöntemdir. Klug-Santner ve arkadaşları, *Bacillus pumilus* BK2'den elde edilen saflaştırılmış endo pektat liyaz ile pamuk dış tabakasından pektinin giderilmesini %80'e kadar sağladıklarını bildirmiştir (Klug-Santner BG. ve ark., 2007).

Kağıt üretimi endüstrisi

Günümüzde kağıt hamuru ve kağıt fabrikaları ürünlerinin üretim süreçlerinde bir takım sorunları çözmek amacıyla enzimlerden yararlanılmaktadır. Kağıt üretiminde kullanılacak materyallerin içerisinde bulunan istenmeyen partiküller filtre yardımı ile ya da bazı tutucu kimyasallar ile uzaklaştırılmaktadır (Kashyap ve ark., 2001). Ayrıca kağıt hamurunu beyazlatmak amacıyla alkali peroksit ağartıcı kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler alkali pektinolitik enzim kullanımına göre daha zahmetli ve maliyeti daha yüksek bir yöntemdir. Pektinaz ile muamele gören kağıt hamuru içeriğinde bulunan pektin ve poligalakturonik asitleri parçalayarak istenmeyen sorunları ortadan kaldırmaktadır.

Biktsel yağ üretim endüstrisi

Endüstride hindistan cevizi tohumu, hurma, ayçiçeği tohumu, kolza tohumu, pamuk yağı ve zeytinyağı, potansiyel bir kanserojen olan heksan gibi organik çözücüler ile çıkarılarak üretilmektedir. Günümüzde bu yöntemin dışında pektinaz enzimi gibi bitki hücre çeperi polisakaritlerinin parçalanmasında yer alan enzimler bitkisel yağların üretilmesinde kullanılarak verimin artması sağlanmıştır.

Tohum yağı üretiminde öğütülmüş tohuma enzim ile müdahale edilerek hücre duvarlarının yıkımı gerçekleştirilir ve böylece su ile ekstraksiyon işlemi kolaylaşır (Ramadan ve ark., 2009). Yağ ekstraksiyonunda sulu enzimatik yöntemin kullanımının geleneksel organik çözücü kullanımına göre avantajları, doğal çevreye zarar vermeyen bir yöntem olması ve hava kirliliğine neden olan uçucu organik bileşikler açığa çıkartmamasıdır. Araştırmalarda bu yöntemle üretilen ürün kalitesinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir ve üretilen mısır yağındaki serbest yağ asidi oranının peroksit ve hekzan kullanılarak üretilen mısır yağı ile değerlerinin aynı olduğu gözlemlenmiştir (Dunford ve ark., 2004).

Kahve ve çay fermantasyonu

Alkali pektinazlar kahve ve çay fermantasyonunda önemli işlev görürler. Kahve fermantasyonunda pektinaz enzimi üreten mikroorganizmalar sayesinde kahve çekirdeklerinden zamlı dış tabaka ayrılmaktadır. Çay yaprağı fermente banyosuna selülozlar, hemiselülozlar ve proteinaz ile birlikte pektinazlar eklenmesi ise çayın kalitesini %5 oranında yükseltir (Angayarkanni ve ark., 2002).

Alkali pektinolitik enzimler, tekstil, gıda, kağıt üretimi gibi Türkiye'nin gelişmiş ya da gelişmekte olduğu sektörlerde birçok kullanım alanına sahiptir. Alkali pektinaz üretiminin araştırılması ve enzimin karakterizasyonu, alkali pektinazın endüstriyel amaçlarla üretimi ve bu sektörlerde kullanıma sunulması açısından gereklidir.

Mikrobiyal alkali pektinaz üretimi, uygulanabilirliği ve doğal bir üretim yöntemi olması açısından sanayide **sürdürülebilir** üretim yöntemlerinin geliştirilmesine fayda sağlayacaktır.

Bu doğrultuda, önerilen tez çalışmasının endüstrinin ihtiyacını karşılayabilecek nitelikte alkali pektinaz üretim yöntemlerinin geliştirilmesi hususuna ışık tutacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Ahlawat, S., Battan, B., Dhiman, S.S., Sharma, J., Mandhan, R.P., 2007. Production of Thermostable Pectinase and Xylanase for Their Potential Application in Bleaching of kraft Pulp. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34(7): 63–70.
- Ahlawat, S., Mandhan, R.P., Dhiman, S.S., Kumar R., Sharma, J., 2008. Potential Application of Alkaline Pectinase from *Bacillus Subtilis* SS in Pulp and Paper Industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149(3): 287-293.
- Alana, A., Alkorta, I., Dominguez, J.B., Llama, M.J., Serra, J.L., 1990. Pectin lyase Activity in a *Penicillium Italicum* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 3755-3759.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M.J., Serra, J.L., 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem*, 33: 21–8.
- Amid, M., Manap, Y., Zohdi, K., 2014. Purification and Characterisation of Thermo-Alkaline Pectinase Enzyme from *Hylocereus Polyrhizus*. *European Food Research and Technology*, 239: 21-29.
- Amid, M., Manap, Y., Zohdi, K., 2014. Purification and Characterisation of Thermo-Alkaline Pectinase Enzyme from *Hylocereus Polyrhizus*. *European Food Research and Technology*, 239: 21-29.
- Angayarkanni, J., Palaniswamy, M., Murugesan, S., Swaminathan, K., 2002. Improvement of Tea Leaves Fermentation with *Aspergillus* spp. Pectinase. *J Biosci Bioeng*, 94: 299-303
- Banu, A.R., Devi, M.K., Gnanaprabhal, G., Pradeep, B., Palaniswamy, M., 2010. Production and Characterization of Pectinase Enzyme from *Penicillium Chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3: 377–381.

- Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M. ., Hoondal, G. S., 2000. Production and Characterization of Thermostable Xylanase and Pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24: 396-402.
- Bhalchandra, A., Davfe, Reese, H., Vaughn, 1971. Purification and Properties of a Polygalacturonic Acid Trans-Eliminase Produced by *Bacillus Pumilus*. *Journal Of Bacteriology*, 108: No. I, 166-174.
- Bollag, D.M., Edelstein, J., Rozycki, M.D., 1996. *Protein Methods*, Willey-Liss Pres. 68-17, 107-128.
- Cabeza, M.S., Baca, F.L., Puentes, E.M., Loto, F., Baigorí, M.D., Morata, V.I., 2011. Selection of Psychrotolerant Microorganisms Producing Cold-Active Pectinases for Biotechnological Processes at Low Temperature. *Food Technology and Biotechnology*, 49(2): 187-195.
- Cruickshank, R.H., Wade, G.C., 1980. Detection of Pectic Enzymes in Pectin-Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 107: 177–181.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*. Scientific American, Freeman &Comp., San Francisco, 3-14.
- Dunford, N.T., Dunford, H.B., 2004. *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*, Ch. 5, AOCS Publishing.
- Gainvors, A., Nedjaoum, N., Gognies, S., Muzart, M., Nedjma, M., Belarbi, A., 2000. Purification and Characterization of Acidic Endo-Polygalacturonase Encoded by the PGL-1 Gene from *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEMS-Microbiol Lett*, 183:1, 131–135.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C., Pang, C.H.N., 1973. *The Genus Bacillus*. Agricultural Reserch Service, United States Department of Agriculture, Washington, 178-207.

- Goto, K., Omura, T., Hara, Y., Sadale, Y., 2000. Application of partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. *Jornal of General Applied Microbiology*, 46: 1-8.
- Graumann, P., 2007. *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*. Caisyer Academic Press, Wymondham, U.K., 331-374.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiol. Mol.Biol.Rev.*,63:735-750.
- Horikoshi, Koki,1972. Production of Alkaline Enzymes by Alkalophilic Microorganisms: Part III. Alkaline Pectinase of *Bacillus* No. P-4-N . *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(2): 285-293.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.*, 40:2931-2944.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review. *Process Biochem*, 40: 2931-2944.
- Kant, S., Vohra, A., Gupta, R., 2013. Purification and Physicochemical Properties of Polygalacturonase from *Aspergillus Niger* MTCC 3323. *Protein Expres Purif*, 87(1):11–16.
- Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, A., Tewari, R., 2000. Production, Purification and Characterization of Pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16:3, 277-282.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Biores. Technol.*, 77: 215–227.
- Kaur, G., Kumar, S., Satyanarayana, T., 2004. Production Characterization and Application of a Thermostable Polygalacturonase of a Thermophilic Mould *Sporotrichum Thermophile Apinis*. *Biores. Technol.* 94: 239–243.
- Klug-Santner, B.G., Schnitzhofer, W., Vrsanská, M., 2006. Purification and Characterization of a New Bioscouring Pectate lyase from *Bacillus Pumilus* BK2. *J Biotechnol*, 121: 390-401.

- Kobayashi, T., Higaki, N., Yajima, N., Suzumatsu, A., Hagihara, H., Kawai, S., Ito, S., 2001. Purification and Properties of a Galacturonic Acid- releasing Exopolygalacturonase from a Strain of Bacillus. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 29(1): 70-75.
- Kobayashi, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Sawada, K., Hagihara, H., Kawai, S., Ito, S., 2001. Purification and Properties of a High Molecular-Weight, Alkaline Exopolygalacturonase from a Strain of Bacillus. *Enzyme Microb. Technol*, 29: 70–75.
- Kusuma, M.P., D.Sri Rami Reddy, Mukund Sharma, 2014. Screening of Alkalophilic and Thermophilic Potential Isolate For Production of Polygalacturonase ; *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3(4).
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Lenette, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.JR., Shadomy, J.H., 1985. *Manual of clinical microbiology*. USA, 1149.
- Li Z., , Bai, Z., Zhang, B., Xie, H., Hu, Q., Hao, C., Xue, W., Zhang, H., 2005. Newly Isolated Bacillus Gibsonii S-2 Capable of Using Sugar Beet Pulp for Alkaline Pectinase Production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(8-9): 1483-1486.
- Martins, E.S., Silva, D., Da Silva, R., Gomes, E., 2002. Solid State Production of Thermostable Pectinases from Thermophilic *Thermoascus Aurantiacus*. *Process Biochemistry*, 37(9): 949-954.
- Mehar, H., Asif, P. N., 2005. Expression of Multiple Forms of Polygalacturonase Gene During Ripening in Banana Fruit, *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 177–184.
- Mei, Y., Chen, Y., Zhai, R., Liu, Y., 2013. Cloning, Purification and Biochemical Properties Of A Thermostable Pectinase From Bacillus Halodurans M29. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 94: 77– 81.

- Meia, Y., Chena, Y., Zhaia, R., Liu, Y., 2013. Cloning, Purification and Biochemical Properties of a Thermostable Pectinase from *Bacillus Halodurans* M29. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 94: 77-81.
- Mellon, J.E., Cotty, P.J., 2004. Expression of Pectinase Activity Among *Aspergillus Flavus* Isolates from South-Western and Southeastern United States. *Mycopathologia*, 157: 333–338.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for the Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426–428.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Moyo, S., Gashe, B.A., Collison, E.K., Mpuchane, S., 2003. Optimising Growth Conditions for The Pectinolytic Activity of *Kluy- Veromyces Wickerhamii* by Using Response Surface Methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 87–100.
- Mukesh Kumar, D.J., Saranya, G.M., Suresh, K., Andal Priyadharshini, D., Rajakumar, R., Kalaichelvan, P.T., 2012. Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste . *Pelagia Research Library ; Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(3): 369-375.
- Muller, H.E., 1986. Production and Degradation of Indole by Gram-Negative Bacteria. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser A.*, 261: 1-11.
- Namasivayam, E., Ravindar, J.D., Mariappan, K., jiji, A., Kumar, M., 2011. Production of Extracellular Pectinase by *Bacillus Cereus* Isolated from Market Solid Waste. *Journal of Bioanalysis Biomedicine*, 3:070-075.
- Nitinkumar P.P., Bhushan, L.C., 2010. Microbiology Production and Purification of pectinase by Poil Isolate *Penicillium* sp and Search for Better Agro-Residue for Its ssf. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7): 36-42.

- Nitinkumar, P., Patil L., Bhushan, L. Chaudhari, 2010. Production And Purification Of Pectinase By Soil Isolate Penicillium SP And Search For Better Agro-Residue For Its SSF. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7): 36-42.
- Nitinkumar, P.P., Bhushan, L.C., 2010. Microbiology Production and Purification of Pectinase by Soil Isolate Penicillium sp and Search for Better agro-Residue for its ssf. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7): 36-42.
- Pedrolli, D. B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E. C., 2009. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3:9-18.
- Qureshi, A. S., Bhutto, M. A., Chisti, Y., Khushk, I., Dahot, M. U., Bano S. Production of Pectinase by *Bacillus Subtilis* EFRL 01 in a Date Syrup Medium. *Afr J Biotechnol*, 11: 12563–12570.
- Ramadan, M. F., Moersel, J., Moersel, T., 2009. Oil extractability from Enzymatically Treated Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) Pomace: Range of Operational Variables. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 435-444.
- Rehman, H., Qader, S.A., Aman, A., 2012. Polygalacturonase: Production of Pectin Depolymerising Enzyme from *Bacillus Licheniformis* KIBGE IB-21. *Carbohydrate Polymers*, 90(1): 387-391.
- Rehman, H., Qader, S.A., Aman, A., Silipo, A., Molinaro, A., Ansari, A., 2013. Degradation of Complex Carbohydrate: Immobilization of Pectinase from *Bacillus Licheniformis* KIBGE-IB21 Using Calcium Alginate as a Support. *Food Chemistry*, 139(1-4): 1081-1086.
- Roosdiana, A., Prasetyawan, S., Mahdi, C., Sutrisno, 2013. Production and Characterization of *Bacillus firmus* Pectinase. *The Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 2: 35-41.

- Sharma, D.C., Satyanarayana, T., 2006. A Marked Enhancement in The Production of a Highly Alkaline and Thermostable Pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in Submerged Fermentation by Using Statistical Methods. *Bioresource Technology*, 97: 727–733.
- Sharma, D.C., Satyanarayana, T., 2006. A Marked Enhancement in The Production of a Highly Alkaline and Thermostable Pectinase by *Bacillus Pumilus* dcsr1 in Submerged Fermentation by Using Statistical Methods. *Bioresource Technology*, 97: 727– 733.
- Shevchik, V.E., Robert-Baudouy, J., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., 1997. Pectate lyase PeII of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Belongs to a New Family. *J Bacteriol*, 179:7321–7330.
- Slepecky, R.A., Hemphill, H.E., 2006. The Genus *Bacillus*- Nonmedical. *The Prokaryotes, Biomedical and Life Sciences*, 4: 530-562.
- Soares, M.M.C.N., da Silva, R., Gomes, E., 1999. Screening of Bacterial Strains for Pectinolytic Activity: Characterization of The Polygalacturonase Produced by *Bacillus* Sp. *Rev. Microb*, 30(4): 299- 303.
- Soriano, M., Blanco, A., Diaz, P., Pastor, F.I.J., 2000. An Unusual Pectate lyase from a *Bacillus* sp. with High Activity on Pectin: Cloning and Characterization. *Microbiology (Reading, England)*, 146: 89-95.
- Soriano, M., Diaz, P., Pastor, F.I.J., 2006. Pectate lyase C from *Bacillus Subtilis*: A Novel Endo-Cleaving Enzyme with Activity on Highly Methylated Pectin. *Microbiology*, 152(3): 617-625.
- Temizkan, G., Arda, N., 2008. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Torimiro, N., Okonji, R.E., 2013. A comparative Study of Pectinolytic Enzyme Production by *Bacillus* Species. *African Journal of Biotechnology*, 12(46): 6498-6503.

- Vatanparast, M., Hosseinnaveh, V., Ghadamyari, V., Minoosajjadi, S., 2014. Plant Cell Wall Degrading Enzymes, Pectinase and Cellulase, in the Digestive System of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus Ferrugineus*. *Plant Protect. Science*, 50: 190–198.
- Wang, Q., Fana, X., Hua, Z., Chen, J., 2007. Optimizing Bioscouring Condition of Cotton Knitted Fabrics with an Alkaline Pectinase from *Bacillus Subtilis* WSHB04-02 by Using Response Surface Methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 37(2): 107-113.
- Wang, S., Lian, Z., Wang, L., Yang, X., Liu, Y., 2015. Preliminary investigations on a polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* in Chinese Pu'er tea fermentation. *Bioresources and Bioprocessing*, 2:33 DOI 10.1186/s40643-015-0061-9.
- Wang, S.H., Zhang, C., Yang, Y.L., Diao, M., Bai, M.F., 2008. Screening of a High Fibrinolytic Enzyme Producing Strain and Characterization of The Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus Subtilis* LD-8547. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 24: 475-482.
- Willats, W.G.T., Knox, P., Mikkelsen, J.D., 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol*, 17: 97-104.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 274-373.
- Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., Yadav, K. D. S., 2009. Pectin lyase: A Review. *Process Biochemistry*, 44: 1–10.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana’da tamamladı. 2009 yılında Çukurova Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2013 yılında bu bölümden mezun oldu. 2014 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

