



**TOPRAK BAKTERİLERİNDEN EKSTRASELÜLER PEKTİNAZ ÜRETİMİ,
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

SEVİNÇ BERBER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

2018



**T. C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOPRAK BAKTERİLERİNDEN EKSTRASELÜLER PEKTİNAZ ÜRETİMİ,
İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Sevinç BERBER
(20169247003)**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA**

**SİVAS
ARALIK 2018**

Sevinç BERBER'in hazırladığı ve "TOPRAK BAKTERİLERİNDEN EKSTRASELÜLER PEKTİNAZ ÜRETİMİ, İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA
Cumhuriyet Üniversitesi



Jüri Üyesi Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Çukurova Üniversitesi



Jüri Üyesi Doç. Dr. Musa SARI
Cumhuriyet Üniversitesi



Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. İsmail ÇELİK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.



*Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından **F-558** Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.*



Bütün hakları saklıdır.
Kaynak göstermek koşuluyla alıntı ve gönderme yapılabilir.

© Sevinç BERBER, 2018

ETİK

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

21.12.2018

Sevinç BERBER

TEŐEKKÜR

Tezin her aŐamasında engin bilgileriyle yardımcı olan, beni cesaretlendiren, bilimi ve sabretmeyi öğretene, heyecanımı ve mutluluğumu paylaŐan danışman hocam Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA'ya çok teŐekkür ederim.

Ayrıca izolatların genotipik karakterizasyonunda yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Mustafa Zahir BAKICI'ya çok teŐekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, beni maddi ve manevi destekleyen canım aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-558 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

TOPRAK BAKTERİLERİNDEN EKSTRASELÜLER PEKTİNAZ ÜRETİMİ, İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Sevinç BERBER

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2018, 83+xvii sayfa

Bu çalışma bakterilerde, asidik pektinazlara nazaran, daha nadir görülen alkali pektinazların saflaştırılması ve karakterizasyonunu kapsamaktadır. Bakteri kaynağı için, Koyulhisar (Sivas, Türkiye) elma bahçeleri toprak örnekleri kullanıldı. Elde edilen izolatlar kısmi protein (kütle spektrometri) ve 16S rRNA geni dizi analizleriyle tür düzeyinde tanımlandı. Tümünün *Bacillus clausii* üyeleri oldukları belirlendi. Bu izolatlarla kültürler hazırlandı ve hücreler uzaklaştırıldıktan sonra üst sıvıda bulunan proteinler organik solvent yardımıyla çöktürüldü. Pektinaz taraması yapılırken ortamda mevcut bir proteazın diğer proteinleri sindirdiği fark edildi. Kültür hazırlamada kullanılan ortam sıcaklığı 55°C'e çıkarılarak bu proteolitik aktivite elimine edildi. Sonrasında poligalakturonaz, pektin liyaz, pektat liyaz ve pektin metilesterazdan oluşan dört farklı enzim aktivitesi saptandı. Bu aktivitelere karşılık gelen dört protein bandı, 80 kDa, 58 kDa, 46 kDa ve ~28 kDa, SDS-PAGE ile görüntüldü. Bu enzimlerin herbiri için optimum pH, sıcaklık ve özgün substratlar varlığında zimogram analizleri yapıldı. En küçük protein bandının (28 kDa) pektin metilesteraz olduğu anlaşıldı. Bu enzimin K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,4 ve 217U'dur. *Bacillus clausii* genelde probiyotik ve proteaz üreticisi olarak bilinmektedir. Literatürde bu türün pektinaz enzimleri üzerine yapılmış araştırmalar oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, bu çalışmanın başlıca özgün sonucu dört farklı pektinaz aktivitesinin saptanmasıdır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus clausii*, ekstraselüler enzim, pektik maddeler, pektinaz.

ABSTRACT
PRODUCTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF
EXTRASELULAR PECTINASE FROM SOIL BACTERIA

Sevinç BERBER

Master of Science Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Ali Fazıl YENİDÜNYA

2018, 83+xvii pages

This study involved the purification and characterization of relatively rarer alkaline pectinases in bacteria, compared to acidic pectinases. For the bacterial source, Koyulhisar (Sivas, Turkey) apple orchard soil samples were used. The isolates were identified at the species level by partial protein (mass spectrometry) and 16S rRNA gene sequence analyses. They all belonged to *Bacillus clausii*. Cultures were prepared with these isolates and after removal of the cells; the proteins in the supernatant were precipitated with organic solvents. When performing pectinase screening, it was noticed that a protease activity present in the precipitate was degrading the other proteins. This proteolytic activity was eliminated by increasing the ambient temperature to 55°C. Four different enzyme activities then determined were polygalacturonase, pectin lyase, pectate lyase, and pectin methylesterase. Four protein bands at 80 kDa, 58 kDa, 46 kDa, and ~ 28 kDa, corresponding to these activities were visualized by SDS-PAGE. For each of these enzymes, zimogram analysis was performed at optimum pH, temperature, and using specific substrates. The K_m and V_{max} values of this enzyme were 0,4 and 217U, respectively. *Bacillus clausii* is generally known as a probiotic and protease producer. In the literature, research on pectinase enzymes of this species has been quite limited. Therefore, the main specific result of this thesis was the study of four different pectinase activities.

Key Words: *Bacillus clausii*, extracellular enzyme, pectic substances, pectinase.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	viii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii

1. GİRİŞ	1
1.1 Pektik Maddeler	1
1.1.1 Protopektin.....	3
1.1.2 Pektin	3
1.1.3 Pektik asit.....	3
1.1.4 Pektinik asit	4
1.2 Pektinazlar.....	4
1.2.1 Protopektinaz	5
1.2.2 Poligalakturonaz (PG)	5
1.2.3 Liyazlar	6
1.2.3.1 Pektat liyaz (PGL).....	7
1.2.3.2 Pektin Liyaz (PL)	7
1.2.4 Pektinmetil esteraz (PME).....	8
1.3 Pektinazların Ticari Uygulamaları	9
1.4 Literatür Taraması	10
2.MATERYAL-METOT	17
2.1 Materyaller	17
2.1.1 Kimyasallar.....	17
2.1.2 Besiyerleri.....	17
2.1.3 Kullanılan çözeltiler.....	17
2.1.4 Kalibrasyon eğrileri	17
2.2 Metot	17
2.2.1 Topraktan bakteri izolasyonu ve saklanması	17
2.2.1.1 Toprak örnekleri	17
2.2.1.2 Topraktan bakteri izolasyonu	17
2.2.1.3 Bakterilerin saklanması	17
2.2.2 Bakterilerin fenotipik karakterizasyonu	18
2.2.2.1 İzolatların aktivasyonu	18
2.2.2.2 Gram boyama	18
2.2.2.3 Katalaz testi	18
2.2.2.4 Farklı NaCl konsantrasyonlarında üreme.....	18
2.2.2.5 Farklı sıcaklıklarda üreme	18
2.2.2.6 Farklı pH'larda üreme	18
2.2.3 Ekstraselüler enzim tarama.....	18
2.2.3.1 Pektinaz üretimi.....	18
2.2.3.2 Proteaz üretimi	19
2.2.3.3 Lipaz üretimi	19
2.2.3.4 Selülaz üretimi.....	19
2.2.3.5 Ksilenz üretimi	19

2.2.3.6 Amilaz üretimi.....	19
2.2.4 Bakterilerin genotipik karakterizasyonu.....	19
2.2.4.1 Tür Tayini (Kütle spektrometresi, MALDI-TOF).....	19
2.2.4.2 Genomik DNA izolasyonu.....	19
2.2.4.3 16SrDNA dizileme.....	20
2.2.5 Logaritmik Faz Üreme Takibi.....	20
2.2.6 Protein Miktar Tayini.....	20
2.2.7 Pektinaz Aktivite Çalışmaları.....	20
2.2.7.1 Enzim üretimi.....	20
2.2.7.2 Enzimlerin kısmi saflaştırılması.....	20
2.2.7.2.1 Etanol ile çöktürme.....	20
2.2.7.2.2 Aseton ile çöktürme.....	20
2.2.7.2.3 Amonyum sülfat ile çöktürme.....	21
2.2.7.2.4 Farklı sıcaklıklarda üreme ile.....	21
2.2.7.3 Enzim karakterizasyonu.....	21
2.2.7.3.1 Poligalakturonaz (PG) aktivitesi.....	21
2.2.7.3.1.1 Optimum pH taraması.....	21
2.2.7.3.1.2 Optimum sıcaklık taraması.....	21
2.2.7.3.1.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi.....	22
2.2.7.3.1.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif etkisi.....	22
2.2.7.3.2 Pektin liyaz (PL) aktivitesi.....	22
2.2.7.3.2.1 Optimum pH taraması.....	22
2.2.7.3.2.2 Optimum sıcaklık taraması.....	22
2.2.7.3.2.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi.....	23
2.2.7.3.2.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif etkisi.....	23
2.2.7.3.3 Pektat liyaz (PGL) aktivitesi.....	23
2.2.7.3.3.1 Optimum pH taraması.....	23
2.2.7.3.3.2 Optimum sıcaklık taraması.....	23
2.2.7.3.3.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi.....	24
2.2.7.3.3.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif.....	24
2.2.7.3.4 Pektin metilesteraz (PME) aktivitesi.....	24
2.2.7.3.4.1 Optimum pH taraması.....	24
2.2.7.3.4.2 Optimum sıcaklık taraması.....	24
2.2.7.3.4.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi.....	24
2.2.7.3.4.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif etkisi.....	25
2.2.7.3.4.5 Kinetik çalışma.....	25
2.2.7.3.5 SDS-PAGE ve zimogram.....	25
2.2.7.3.5.1 %8 ve %12'lik SDS-PAGE.....	25
2.2.7.3.5.2 %8'lik Nativ-PAGE ve zimogram.....	25
3. BULGULAR.....	27
3.1 Toprakтан Bakteri İzolasyonu.....	27
3.2 Pektinaz Üreten Bakterilerin Tanımlanması.....	27
3.3 Fenotipik Karakterizasyon.....	28
3.3.1 Gram boyama.....	28
3.3.2 Katalaz testi.....	28
3.3.3 Farklı NaCl konsantrasyonlarında üreme.....	28
3.3.4 Farklı sıcaklıklarda üreme.....	29
3.3.5 Farklı pH'larda üreme.....	29

3.4 Genotipik Karakterizasyon.....	30
3.4.1 Tür Tayini (Kütle spektrometresi, MALDI-TOF)	30
3.4.2 DNA izolasyonu ve 16SrDNA dizileme.....	30
3.5 Logaritmik Faz Üreme Takibi.....	31
3.6 Ekstraselüler Enzim Taraması.....	31
3.7 Enzim Aktivite Ölçümleri	32
3.7.1 Poligalakturonaz (PG)	32
3.7.1.1 Optimum sıcaklık ve pH taraması	32
3.7.1.1.1 Farklı etanol hacimlerinde çöktürmelerde optimum pH taraması	33
3.7.1.3 Farklı aseton hacimlerinde çöktürme	35
3.7.1.4 Aseton ve etanol ile çöktürme.....	36
3.7.1.5 İyonik kuvvet etkisi.....	36
3.7.1.6 Organik çözücü etkisi.....	37
3.7.1.7 Kimyasal reaktiflerin etkisi	38
3.7.2 Pektin liyaz (PL)	38
3.7.2.1 Optimum pH ve sıcaklık	38
3.7.2.2 İyonik kuvvet etkisi	40
3.7.2.3 Organik çözücü etkisi	40
3.7.2.4 Kimyasal reaktiflerin etkisi	41
3.7.3 Pektat liyaz (PGL)	42
3.7.3.1 Optimum sıcaklık ve pH	42
3.7.3.2 İyonik kuvvet etkisi	44
3.7.3.3 Organik çözücü etkisi	45
3.7.3.4 Kimyasal reaktif etkisi	46
3.7.4 Pektin metilesteraz (PME).....	47
3.7.4.1 Optimum pH ve sıcaklık	47
3.7.4.2 İyonik kuvvet etkisi	48
3.7.4.3 Organik çözücü etkisi.....	48
3.7.4.4 Kimyasal reaktif etkisi	49
3.7.4.5 Kinetik çalışmalar	50
3.8 Elektroferez ve Zimogram	51
3.8.1 SDS ve Nativ PAGE.....	51
3.8.2 Zimogram	53
3.8.2.1 Agaroz jelde enzim aktivitesi	53
3.8.2.2 Zimogram	53
4.TARTIŞMA ve SONUÇ	56
4.1 <i>Bacillus clausii</i> İzolasyonu ve Ekstraselüler Enzim Taraması	56
4.2 Pektinaz Aktivite Ölçümleri.....	56
KAYNAKÇA.....	63
EKLER	68
EK-1 Materyaller	68
EK-2 Kimyasallar.....	69
EK-3 Besiyerleri.....	70
EK-4 Çözeltiler	73
EK-5 Kalibrasyon Eğrileri	80
EK-6 Hesaplamalar	81
ÖZGEÇMİŞ	83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 D-galakturonik asit.....	2
Şekil 2 Pektik molekül: HG; homogalakturonan, RGI; ramnogalakturonan I, RGII; ramnogalakturonanII, XG; ksilogalakturonan, AG; apiogalakturonan (Pedrolli ve ark., 2009).	2
Şekil 3 Pektin (%75 metilester)	3
Şekil 4 Pektik asit (poligalakturonik asit).....	3
Şekil 5 Pektinik asit (%50 metilester).	4
Şekil 6 Endopoligalakturonaz reaksiyonu: pektat + H ₂ O → digalakturonat + pektat	5
Şekil 7 Ekzopoligalakturonaz reaksiyonu: Pektat + H ₂ O → Pektat + D-galakturonat	6
Şekil 8 Liyaz reaksiyonu (www.genome.jp).	7
Şekil 9 Pektin metilesteraz reaksiyonu: Pektin + nH ₂ O → n(Metanol) + pektat.....	8
Şekil 10 Seyreltilmiş örneklerin Horikoshi-I agar besiyerindeki görüntüsü.	27
Şekil 11 Enzim aktivitesinin pektin içeren besiyerinde saptanması.	27
Şekil 12 Enzim aktivitesinin PGA içeren besiyerinde saptanması.	27
Şekil 13 Işık mikroskobu altında (100X büyütme) Gram (+) izolatların görünümü. 28	
Şekil 14 Katalaz testi.	28
Şekil 15 E-14 kodlu izolatın zamana karşı üreme eğrisi.	31
Şekil 16 Ekstraselüler enzim taraması.	32
Şekil 17 PG için optimum sıcaklık ve pH'nin belirlenmesi.	33
Şekil 18 PG için 0,5 örnek hacmi etanol ile çöktürme sonucu elde edilen proteinlerle optimum pH (A) ve sıcaklık taraması (B).	33
Şekil 19 PG (A) 0,6 hacim (B) 0,75 hacim etanolle çöktürme sonucunda elde edilen toplam protein ile optimum pH'nin belirlenmesi.	34
Şekil 20 PG (A) 1 (B) 1,25 (C) 1,75 hacim etanolle çöktürme sonucunda optimum pH taraması.	34
Şekil 21 PG (A) 0,5 hacim aseton, (B) eşit hacim aseton, (C1) 1,25 hacim aseton pH ve (C2) sıcaklık, (D) 1,75 hacim aseton ile çöktürme sonucu optimum pH taraması.	35
Şekil 22 PG (A) 0,25 hacim etanol ve 0,25 hacim aseton, (B) 0,5 hacim etanol ve 0,5 hacim aseton, (C) 0,5 hacim etanol ve eşit hacim aseton ile çöktürme sonucu pH taraması.	36
Şekil 23 PG iyonik kuvvet etkisi.	37
Şekil 24 PG organik çözücü etkisi.	37
Şekil 25 PG kimyasal reaktif etkisi.	38
Şekil 26 PL iki hacim etanol ile çöktürme sonucu optimum koşulların taranması. ..	38
Şekil 27 PL 0,5 hacim etanol ile çöktürme sonucu optimum koşulların taranması. .	39
Şekil 28 PL 1,25 hacim aseton ile çöktürme sonucu optimum pH taraması.	39
Şekil 29 PL 1,25 hacim aseton ile çöktürme sonucu (A) pH 7'de ve (B) pH 10'da optimum .sıcaklık taraması.	39
Şekil 30 PL iyonik kuvvet etkisi.	40
Şekil 31 PL pH 7'de organik çözücü etkisi	40
Şekil 32 PL pH 10'da organik çözücü etkisi.	41
Şekil 33 PL pH 7'de kimyasal reaktif etkisi.	41

Şekil 34	PL pH 10'da kimyasal reaktif etkisi.....	42
Şekil 35	PGL ile iki hacim etanol ile çöktürme sonucu (A) optimum pH, (B) pH 5'te optimum sıcaklık, (C) pH 9'da optimum sıcaklık ve (D) pH 11'de optimum sıcaklık taraması.	43
Şekil 36	PGL 0,5 hacim etanol ile çöktürme sonucu optimum koşulların taranması.43	
Şekil 37	PGL ile 1,25 hacim asetonla çöktürme sonucunda (A) optimum pH, (B) pH 6'da optimum sıcaklık ve (C) pH 10'da optimum sıcaklık taraması.....	44
Şekil 38	PGL'a iyonik kuvvet etkisi.....	44
Şekil 39	PGL üzerine pH6'da organik çözücü etkisi.	45
Şekil 40	PGL üzerine pH10'da organik çözücü etkisi.	45
Şekil 41	PGL üzerine pH6'da kimyasal reaktif etkisi.	46
Şekil 42	PGL üzerine pH10'da kimyasal reaktif etkisi.	46
Şekil 43	PME ile iki hacim etanol ile çöktürme sonucu (A) optimum pH ve (B) optimum sıcaklık taraması.....	47
Şekil 44	PME için 0,5 hacim etanol ile çöktürme sonucu (A) optimum pH ve (B) optimum sıcaklık taraması.....	47
Şekil 45	PME için 1,25 hacim aseton ile çöktürme sonucu (A) optimum pH ve (B) optimum sıcaklık taraması.....	48
Şekil 46	PME üzerine iyonik kuvvet etkisi.	48
Şekil 47	PME organik çözücü etkisi.....	49
Şekil 48	PME üzerine kimyasal reaktif etkisi.	49
Şekil 49	PME Michaelis-Menten grafiği.....	50
Şekil 50	PME için Lineweaver-Burk grafiği.....	50
Şekil 51	SDS-PAGE %12'lik: Soldan birinci kuyucuğa 37°C'de büyütülen kültür süpernatana iki hacim etanol eklenerek çöktürülen örnek yüklendi. Devam eden kuyucuklara, sırasıyla, 37°C'de büyütülen bakteriden alınan süpernatana %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55 ve %60 derişimlerinde amonyum sülfat eklenerek çöktürülen örnekler yüklendi. ..	51
Şekil 52	SDS-PAGE %12'lik: Soldan birinci kuyucuğa %65 ve sırayla devam eden kuyucuklara %70, %75, %80, %85, %90, %95 ve %100 derişimlerinde amonyum sülfat eklenerek çöktürülen proteinler yüklendi.	51
Şekil 53	SDS-PAGE %8'lik: Birinci (mavi) kuyucukta ticari marker bulunmaktadır. İkinci kuyucuğa BSA, dördüncü kuyucuğa ticari pektinaz, altıncı kuyucuğa 45°C'de büyütülen kültür süpernatana iki hacim etanol eklenerek çöktürülen örnek, yedinci kuyucuğa ise 50°C'de büyütülen kültürden elde edilen örnek yüklendi (Şekil 53B). Ticari marker ve moleküler ağırlığı solda verildi (Şekil 53A).	52
Şekil 54	SDS-PAGE %8'lik: Solda birinci kuyucukta ticari marker bulunmaktadır. İkinci kuyucuğa 55°C'de büyütülen kültür süpernatana iki hacim etanol eklenerek çöktürülen örnek, dördüncü kuyucuğa ise 50°C'de büyütülen kültürden hazırlanan örnek yüklendi.....	52
Şekil 55	%1 PGA (A) ve %1 pektin (B)içeren agarozlarda enzim aktivitesinin belirlenmesi.	53
Şekil 56	Nativ-Jel %8: (A) %1 pektin (B) %1 PGA, pH9, 50°C; %1'lik pektin (pH 9) çözeltisine, (B)'deki jel %1'lik PGA (pH 9) çözeltisine koyularak 50°C'de bir gece inkübe edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra %1'lik CTAB çözeltisinde 5dk bekletildi.	53

- Şekil 57** Nativ jel %8'lik: (A) %1 PGA (B) %1 pektin, 37°C. (A)'daki jel %1 PGA (B)'deki jel %1 pektin içeren agaroz jel ile üst üste konularak 37°C'de bir gece inkübe edildi ardından iyodin çözeltisi ile boyandı ve su ile yıkandı. (A)'da ticari pektinaz 0,8 cm'de 2E kodlu enzim 2,6 cm'de zon oluşturdu. (B)'de ticari enzim 3,5 cm'de 2E kodlu enzim 1,9 cm'de zon oluşturdu.... 54
- Şekil 58** Nativ jel %8'lik, pH8, ticari enzim: %0,1 pektin içeren %8'lik nativ jeller hazırlandı. Her jele ticari enzim yüklendi ve yürütüldü. Elektroforezden sonra (A) jeli 1s pH 8 Tris-HCl tamponunda 55 °C'de, (B) jeli oda sıcaklığında (20°C) inkübe edildi. Ardından %0,05'lik rutenyum kırmızısıyla +4°C'de bir gece boyamaya bırakıldı. Distile su ile fazla boya uzaklaştırıldı. Şekil 58 (A)'daki jelde (55°) zon oluşumu gözlenirken (B)'de gözlenmedi..... 54
- Şekil 59** Nativ jel %8'lik, pH 8, 55°C. İki %8'lik nativ jel hazırlandı (A)'da %0,1 pektin, (B)'de %0,1 PGA içeren jeller gösterilmektedir. Birinci, üçüncü ve beşinci kuyucuklara 2E kodlu örnek, ikinci kuyucuğa ticari enzim yüklenerek yürütüldü. Elektroforezden sonra jeller pH8 Tris-HCl tamponunda 55°C'de 1s inkübe edildi. Ardından %0,05'lik rutenyum kırmızısıyla +4°C'de bir gece boyamaya bırakıldı. Distile su ile fazla boya uzaklaştırıldı. Ticari enzim 3,8 cm'de 2E kodlu örnekler 4,1 cm'de zon oluşturdu. 55

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1 Pektinaz aileleri ve isimlendirilmeleri (www.cazy.org)	5
Tablo 2 Farklı NaCl konsantrasyonlarında üreme takibi	29
Tablo 3 Farklı sıcaklıklarda üremenin takibi	29
Tablo 4 NCBI BLAST tarama sonuçları.....	31
Tablo 5 Enzimlerin farklı çöktürmeler sonucunda çalışma koşulları	57
Tablo 6 Farklı ortamların enzim aktivitesine göreceli olarak (%) etkisi	58



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
AG	: Apiogalakturonan
APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Sığır serum albumin
CTAB	: Setil trimetil amonyum bromit
Dha	: 3-deoksi-D-lyxo-heptulosarik asit
dH₂O	: Distile su
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DNS	: Dinitrosalisilik asit
DTT	: Ditiotreitol
EC	: Enzim komisyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
g	: Gram
HG	: Homogalakturonan
kDA	: Kilodalton
Kdo	: 3-deoksi-D-manno-2-oktulosonik asit
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normalite
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	: Pektin esteraz
PG	: Poligalakturonaz
PGA	: Poligalakturonik asit
PGL	: Pektat liyaz
PL	: Pektin liyaz
PME	: Pektin metilesteraz
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
PAGE	: Poli akrilamid jel elektroforezi
RG	: Ramnogalakturonan
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TE	: Tris EDTA
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametiletildiamin
T20	: Tween-20
T40	: Tween-40
T80	: Tween-80
TX100	: Triton-X100
U	: Ünite
v/v	: Hacim/hacim
XG	: Ksilogalakturonan

1. GİRİŞ

Büyüyen bitki hücrelerinin duvarlarına birincil hücre duvarı denir ve yaklaşık %90'ı polisakaritlerden oluşur (McNeil ve ark., 1984). Bitki hücre duvarı, bitkileri mikrobik enfeksiyonlara karşı koruyan bir bariyerdir. Bu bariyerde selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektin polisakaritleri bulunmaktadır. Pektin heterojen bir yapıya sahip ve polisakaritleri çapraz bağlayarak hücre duvarına sertlik kazandırır (Abbott ve Boraston, 2008). Aynı zamanda bu bağların hücre büyümesini sınırladığı ve biyobozunurluğu azalttığı düşünülmektedir (Vries ve Visser, 2001).

Hücre duvarındaki polisakaritlerin depolimerasyonu ve esterlenmesi ekstraselüler enzimlerle gerçekleştirilir. Pektin, pektinazlarla parçalandıktan sonra periplazmik boşluğa oradan da proteinler aracılığıyla sitoplazmaya geçer (Abbott ve Boraston, 2008). Pektik parçalanma ürünleri bitkilerin fizyolojik tepkilerini ve gen ifadesini düzenlemektedir (McNeil ve ark., 1984). *Erwinia* gibi fitopatojen türler, özellikle bitki köklerinde, yumuşamaya ve çürümeye neden olmaktadır (Abbott ve Boraston, 2008). Bu da pektinazların pektini parçalamasıyla salınan pektik parçaların ve dolayısıyla pektinaz enzimlerinin fitotoksinite mekanizmasını açıklamaktadır (McNeil ve ark., 1984).

Pektinaz üretiminde başlıca *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Erwinia* cinsleri kullanılmıştır. Ancak son on beş yılda en çok çalışılan cinsler *Erwinia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Rhizopus*'tur. Pektinaz üretiminde mikrobiyal kaynakların seçimi, genellikle kültür koşulları, üretilen pektinaz sayısı ve türü, enzimlerin pH ve termal stabilitesi ve suşun genotipik özelliği temelinde yapılır (Khairnar ve ark., 2009).

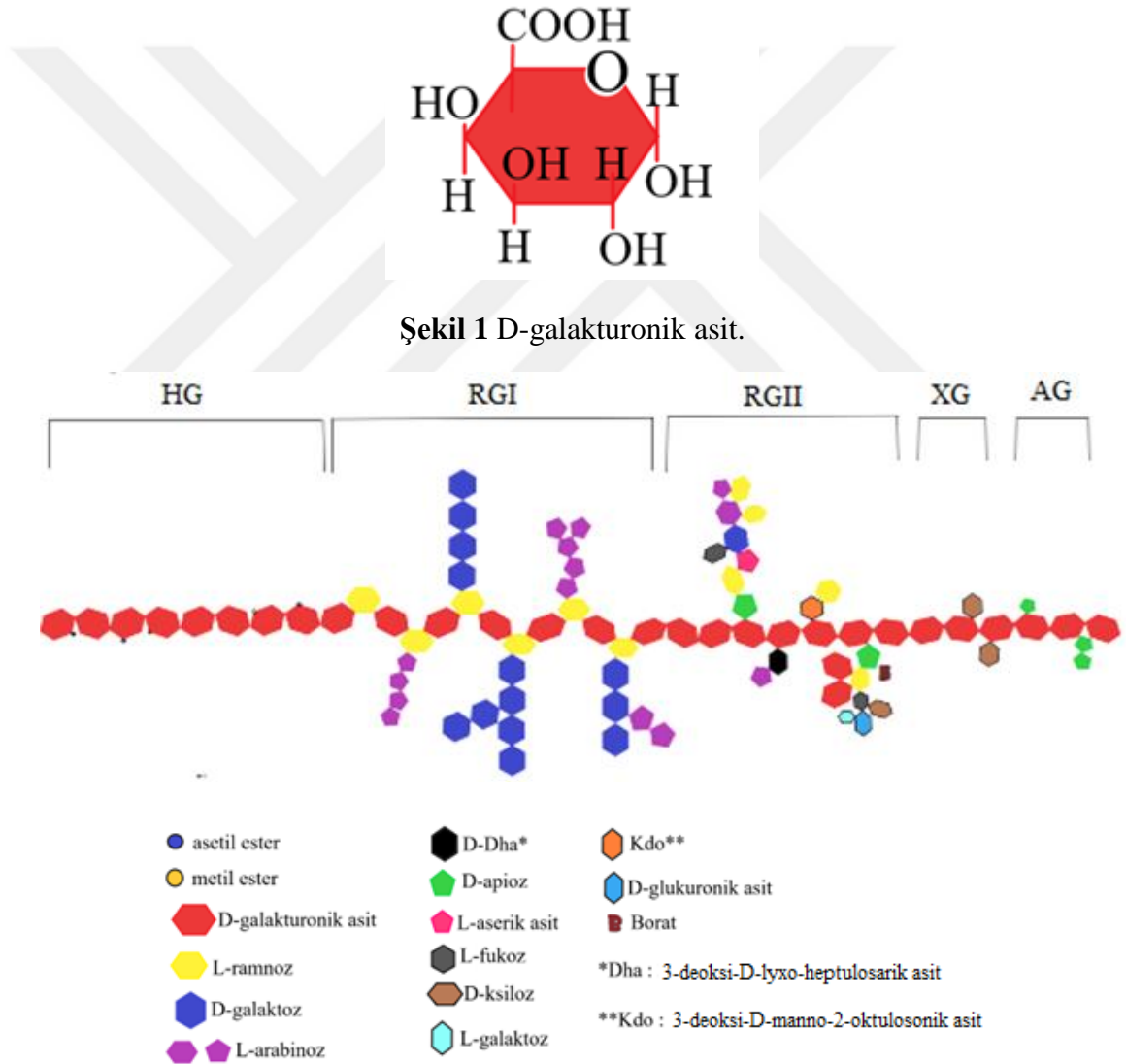
Dünya gıda enzimleri piyasasında mikrobiyal pektinazların %25'lik bir paya sahip olduğu tahmin edilmektedir (Sharma ve ark., 2012).

1.1 Pektik Maddeler

Pektinolitik mekanizmaların anlaşılabilmesi için öncelikle substratlardan yola çıkmak gerekmektedir. Pektik maddeler (pektik substratlar) heterojen bir substrat grubunu oluşturur. Pektik substratlara heterojen özelliği veren unsurlardan biri

boyutlarının değişken olmasıdır (Whitaker, 1990). Örneğin elma ve limon pektini 200-360 kDa, elma ve kuru erik 25-30 kDa, portakal 40-50 kDa ve şeker pancarı 40-50 kDa aralığında bir moleküler ağırlığa sahiptir (Jayani ve ark., 2005).

Pektik substratların omurgası α -(1,4) glikozidik bağlarla bağlanan D-galakturonik asit homopolimeridir (homogalakturonan) (Şekil 1). Dallonmuş yapıya sahip ramnogalakturonanlarda ana omurgaya %2 ila %4 oranında ve β -(1-2) ve β -(1,4) bağlarıyla bağlı L-ramnoz eklenmiştir (Gummadi ve ark., 2007). D-galakturonik asit birimleri yer yer metanol ve etanol ile metillenebilir ve asetillenebilir (Perez ve ark., 2000).



Şekil 2 Pektik molekül: HG; homogalakturonan, RGI; ramnogalakturonan I, RGII; ramnogalakturonanII, XG; ksilogalakturonan, AG; apiogalakturonan (Pedrolli ve ark., 2009).

Ramnogalakturonanın (RG), D-galaktoz ve L-arabinozdan oluşan kısmı RGI, D-Dha, L-aserik asit, D-galaktoz, L-arabinoz, D-apioz, borat, D-glukorinik asit, D-ksiloz, Kdo, L-fukozdan oluşan kısmı RGII olarak adlandırılır. Omurgaya sadece D-ksilozun katıldığı bölüm ksilogalakturonan ve D-apiozun katıldığı bölüm apiogalakturonan olarak adlandırılır (Şekil 2).

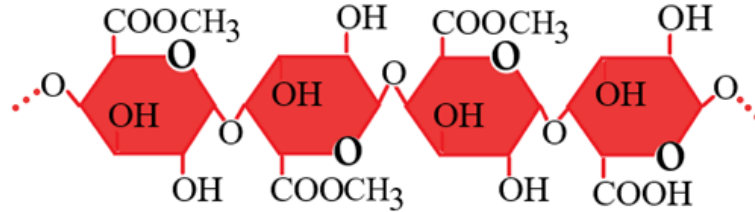
Başlıca pektik substrat sınıfları protopektin, pektinik asit, pektin ve poligalakturonik asittir ve bu sınıflama galakturonat esterifikasyonu derecesine bağlıdır (Gummadi ve ark., 2007).

1.1.1 Protopektin

Olgunlaşmamış dokularda orta lamelde yer alan hücrelerin ve hücre duvarlarının birlikte tutulmasını sağlayan bir maddedir. Diğer pektik maddelerden ayırt edici özelliği çözünmez bir yapıya sahip olmasıdır (Whitaker, 1990).

1.1.2 Pektin

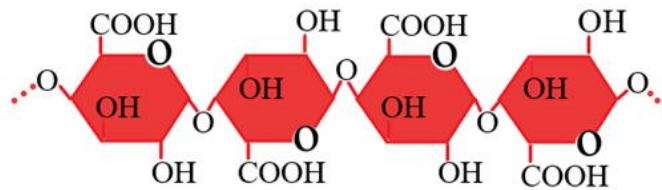
D-galakturonik asit birimleri O-2 veya O-3 konumunda asetillenebilir ya da O-6 konumunda metillenebilir (Vries ve Visser, 2001). Pektin, galakturonat birimlerinin karboksil gruplarının en az %75'inin metanol ile esterlendiği çözünür polimerdir (Whitaker, 1990).



Şekil 3 Pektin (%75 metilester)

1.1.3 Pektik asit

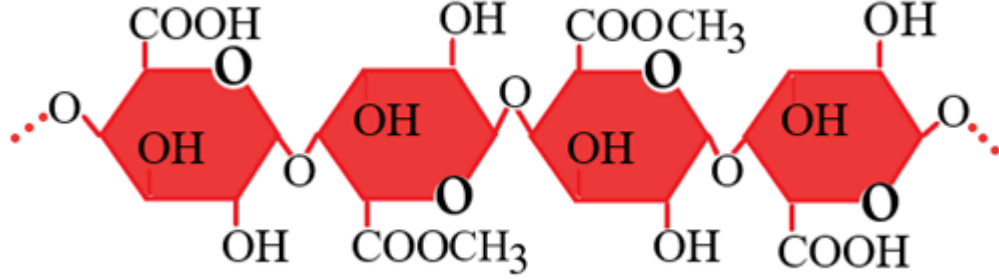
Metoksil gruplarından yoksun substratlardır (Whitaker, 1990). Asit tuzlarına pektat denir.



Şekil 4 Pektik asit (poligalakturonik asit).

1.1.4 Pektinik asit

Pektinik asitler yaklaşık %0 ila %75 metillenmiş galakturonat birimleri içerir (Whitaker, 1990).



Şekil 5 Pektinik asit (%50 metilester).

1.2 Pektinazlar

Pektinazlar, substratlarına ve katalizledikleri reaksiyon tipine göre poligalakturonaz, pektin esteraz, pektin liyaz ve pektat liyazlar halinde sınıflandırılırlar. Endüstriyel anlamda ise asidik ve alkali olarak ikiye ayrılırlar. Asidik pektinazlar meyve suyu üretim aşamalarında bitki maserasyonu ve berraklaştırma işlemlerinde; alkali pektinazlar kağıt hamuru yapımı ve beyazlatma aşamalarında, çay ve kahve fermantasyonunda, tekstil endüstrisinde pamuk liflerinin işlenmesinde kullanılmaktadır (Jayani ve ark., 2005).

Pektinazlar genellikle yüksek bitkilerde ve bazı protozoa, böcek ve nematotlarda bulunurlar. Yüksek bitkilerde büyüme, olgunlaşma ve bazı dokuların yumuşatılmasında görev alırlar. Mikrobiyal pektinazlar ise daha çok bitki patojenitesinde ve çürümeyi içeren süreçlerde görev almaktadır (Whitaker, 1990). Patojen mikroorganizmalar, hasat esnasında ya da böceklerin açtığı yaralardan bitkiye girerek hücre içi boşluklara pektinolitik enzimleri salarlar. Bitki hücre duvarında, yaprakta, yumru köklerde ve köklerin orta lamel kısımlarında doku hasarına ve tam maserasyona neden olurlar (Herron ve Jurnak, 2003).

Tablo 1 Pektinaz aileleri ve isimlendirilmeleri (www.cazy.org)

	Glikozit Hidrolaz Ailesi-28	Karbohidrat Esteraz Ailesi-8	Polisakkarit Liyaz Ailesi-1
İsimlendirme	Poligalakturonaz (EC 3.2.1.15) Ekzopoligalakturonaz (EC 3.2.1.67)	Pektin metilesteraz (EC 3.1.1.11)	Pektat liyaz (EC 4.2.2.2) Ekzo-pektat liyaz (EC 4.2.2.9) Pektin liyaz (EC 4.2.2.10)
Üç boyutlu yapı	β -heliks	β -heliks	Paralel β -heliks

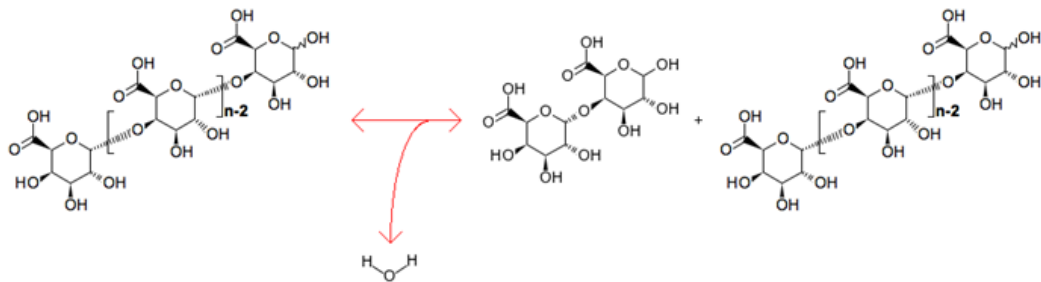
Pektinazlar pektik substratlara hidrolaz, liyaz ve esteraz aktiviteleri ile etki eden bir enzim grubudur. Üç ayrı aileye ait bu enzimlerin her biri β -heliks mimarisini paylaşmaktadır (Pickersgill ve Jenkins, 2003).

1.2.1 Protopektinaz

Protopektinaz, protopektinin çözünür pektine dönüşmesini sağlayan enzimdir. Aktivitesi, çözünen pektik madde miktarının ölçümüyle belirlenir. Bunun için karbazol sülfürik asit yöntemi kullanılır (Whitaker, J. R., 1990).

1.2.2 Poligalakturonaz (PG)

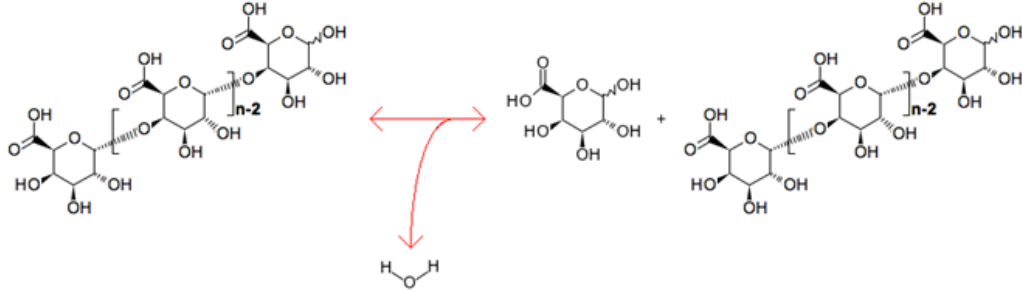
Poligalakturonazların substratı, metil ve asetil gruplarından arındırılmış pektin yani poligalakturonik asittir. Poligalakturonik asit yapısının sadeliğine rağmen *Aspergillus niger*'de 7 endo-PG belirlenmiştir (Benen ve ark., 2003). PG'ler hem ekzo hem de endo kesme mekanizmasına sahiptirler. Endo-PG'ler poligalakturonik asit (PGA) omurgasını oligogalakturonik asitlere ayırır. Ekzo-PG'ler ise poligalakturonik asitleri di- ve mono-galakturonik asitlere indirger (Gummadi ve ark., 2007).



Şekil 6 Endopoligalakturonaz reaksiyonu: pektat + H₂O → digalakturonat + pektat (www.genome.jp, EC 3.2.1.15)

Poligalakturonazların (Endo-PG; E.C. 3.2.1.15, Ekzo-PG; E.C. 3.2.1.67), pektin metilesterazın yokluğunda, yüksek derecede metillenmiş pektin üzerinde hiçbir

aktivitesi yoktur. Pektinik asitler ise belirsiz sonuçlar verir, çünkü bazı esterlenmiş galakturonat blokları, poligalakturonaz aktivitesine izin verecek kadar büyük olabilmektedir (Whitaker, 1990).



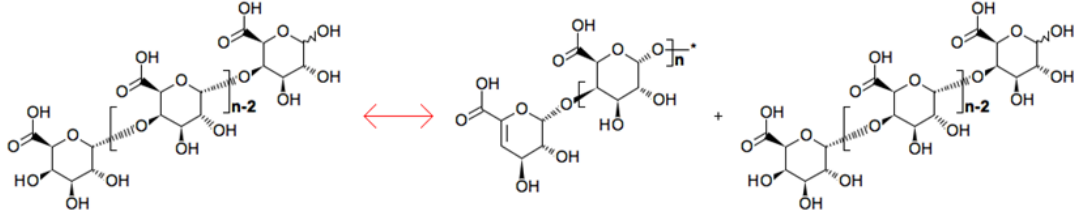
Şekil 7 Ekzopoligalakturonaz reaksiyonu: Pektat + H₂O → Pektat + D-galakturonat (www.genome.jp, EC 3.2.1.67).

PG aktivitesi, hidroliz veya viskozite azaltma yöntemiyle oluşan indirgeyici şekerlerin ölçülmesiyle belirlenebilir. Aktivite, indirgeyici grupların oluşma oranı 3,5-dinitrosalisilat (DNS) metodu veya arsenomolibdat-bakır reaktifi ile kolaylıkla takip edilebilir. Bununla birlikte, viskozite azaltma yöntemi, viskozitedeki düşüş nispeten düşük olduğundan sadece hidrolizin erken safhalarında hassastır (Whitaker, 1990).

Poligalakturonazların molekül ağırlığı genellikle 30 la 80 kDa'dur. Asidik pH (2,5-6,0) koşullarında (Sharma ve ark., 2012) ve genellikle 30 ila 50°C'de çalışırlar (Gummadi ve ark., 2007).

1.2.3 Liyazlar

Liyaz süper ailesi, pektat liyazlar, bitki polen/stil proteinleri ve pektin liyazları içerir (Herron ve Journak, 2003). Liyazlar substratlarına göre pektin ve pektat liyaz olarak ikiye ayrılırlar. Beta-eliminasyon mekanizmasıyla substratları parçalarlar. Reaksiyon sonucunda bir proton uzaklaştırarak doymamış bir bağ içeren ürün oluştururlar (Pickersgill ve Jenkins, 2003). Bu enzimlerin aktivitesi, en iyi şekilde, üründe yaklaşık 4:5 doymamış bir bağ oluşması nedeniyle 235 nm'de absorbans değişimi ile takip edilebilir (Whitaker, 1990). Ayrıca indirgeyici şeker veya tiyobarbitürik asit yöntemleri kullanılarak da enzim aktivitesi ölçülebilir (Nedjma ve ark., 2001).



Şekil 8 Liyaz reaksiyonu (www.genome.jp).

1.2.3.1 Pektat liyaz (PGL)

PGL'a ilişkin bilimsel çalışmaların çoğu *Erwinia spp.* gibi bitki patojeni mikroorganizmalarla yapılmıştır. Bu patojen organizmalar köklerde yumuşamaya ve çürümeye neden olmaktadır (Herron ve Journak, 2003).

Endo-PGL'ları (E.C. 4.2.2.2), sadece mikroorganizmalar üretir. Diğer pektinolitik enzimlere nazaran daha yüksek pH'larda (8-10) çalışırlar ve glikozidik bağı β-eliminasyon mekanizmasıyla parçalarlar. Ayrıca kalsiyum iyonları, *Erwinia spp.* hariç, bildirilen enzimler için mutlak bir gerekliliktir (Whitaker, 1990). *Bacillus subtilis* pektat liyazı aktif bölgesinde Ca⁺² bağlayıcı korunmuş bir karboksilat bölgesi ve korunmuş arjinin-279 bulundurur (Pickersgill ve Jenkins, 2003). Yapısal çalışmalar, aminoasit dizisi hizalamaları, bölgeye özgü mutajenez deneyleri, çeşitli pH'larda kinetik çalışmalar ve döteryum ölçümleri ile desteklenmiştir. Bunlarla birlikte veriler, pektatin β-eliminasyon ile parçalanmasında arjininin proton salınımını başlatan aminoasit olduğuna işaret etmektedir (Herron ve Journak, 2003).

PGL esas olarak *Erwinia*, *Bacillus* ve *Colletotrichum magna*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Amylocota sp.* gibi mikroorganizmalar tarafından üretilir (Gummadi ve ark., 2007). *Erwinia* ve *Bacillus licheniformis*'in PGL'ları, sırasıyla pH6.0 ve 11.0'da bile aktif olmasına rağmen, optimum pH8.0 ile 10.0 aralığındadır. Genel olarak, PGL aktivitesi için optimum sıcaklık 30 ila 40°C'dir. Bununla birlikte, termofil PGL'larının optimum sıcaklığı 50 ila 75°C'dir (Gummadi ve ark., 2007). PGL'ların moleküler ağırlığı 20 ila 50kDa'dur (Sharma ve ark., 2012).

1.2.3.2 Pektin Liyaz (PL)

Pektin liyazlar (Endo-PL; E.C. 4.2.2.10), PGL ile aynı mekanizmaya sahiptir. Ancak substrat olarak pektini kullanırlar (Gummadi ve ark., 2007). Bu enzimler 6.0-8.5 aralığında optimum pH'a sahiptirler ve aktivite için Ca⁺² iyonu gerektirmezler

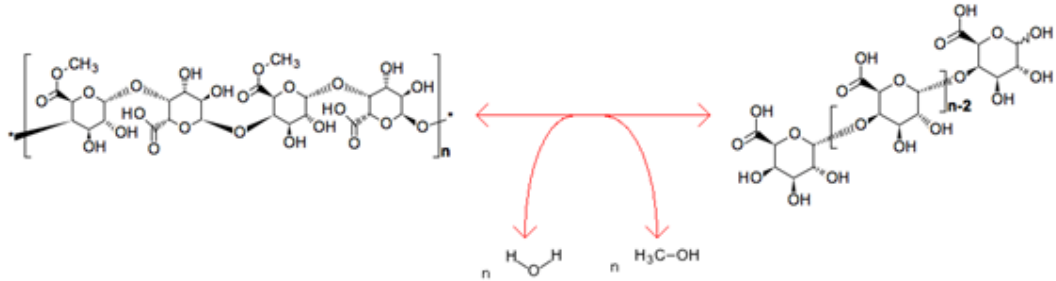
(Pickersgill ve Jenkins, 2003). PL'nin moleküler ağırlığı 30 ila 40kDa arasında değişmektedir (Sharma ve ark., 2012).

PL'nin katalitik etkisi, PGL'de olduğu gibi β -eliminasyon reaksiyonu yoluyla olmaktadır. Bununla birlikte, PGL'nin aksine, PL için yüksek oranda metillenmiş substrat formları spesifiktir ve aktivitesi Ca^{+2} gerektirmez. PGL ve PL, birçok yapı özelliğini paylaşmalarına rağmen, substrat bağlama yarıklarında ve katalitik mekanizmalarında farklılık gösterirler (Gummadi ve ark., 2007).

1.2.4 Pektinmetil esteraz (PME)

Pektin metilesteraz (pektin pektilhidrolaz, EC 3.1.1.11) pektinesteraz, pektaz, pektin metoksilaz, pektin demetoksilaz ve pektolipaz olarak da adlandırılan enzimlerin hidrolaz grubuna ait bir karboksilik asit esterazdır (Whitaker, 1990).

Pektin metilesteraz, galakturonat ünitesinin 6-karboksil grubundan metoksil grubunu hidroliz ile çıkarır. PE ile pektinin parçalanmasından oluşan ürünler: pektik asit, metanol ve yeni oluşan karboksil grubunun iyonizasyonundan bir protondur (Whitaker, 1990).



Şekil 9 Pektin metilesteraz reaksiyonu: $Pektin + nH_2O \rightarrow n(\text{Metanol}) + \text{pektat}$
(www.genome.jp, EC 3.1.1.11).

Pektin esteraz aktivitesi, bir pH-stat ile (Whitaker, 1990) ya da sabit bir pH'ı korumak için bir standart NaOH çözeltisi ile elle titre edilerek ya da sabit bir değerden pH'taki ilk azalma oranının gözlemlenmesiyle belirlenebilir. Pektinesteraz aktivitesini belirlemenin diğer yolları, kataliz sırasında açığa çıkan metanol miktarının gaz- veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ölçülmesidir (Nakagawa ve ark., 2008; Gummadi ve ark., 2007).

1.3 Pektinazların Ticari Uygulamaları

Pektinazlar yüksek bitki dokularının birincil hücre duvarı ve orta lamelinde bulunan kompleks bir polisakarit olan pektinin parçalanmasında rol oynayan bir enzim grubudur. Endüstride ilk olarak 1930'lu yıllarda meyve suyu üretiminde kullanılmıştır. Günümüz meyve suyu üretiminde hücre duvarlarının parçalanmasında, renk, aroma özleri ve berraklaştırmada anahtar rol oynamaktadırlar. Pektinazlar sayesinde yüksek kalitede konsantre ürün elde etmek mümkün hale gelmiştir. 1960'lerde bitki dokularının kimyasal yapısının anlaşılmasıyla pektinazların kullanım yelpazesi genişlemiştir. 1970'lerde şarap endüstrisinde de kullanılmaya başlanmıştır. Böylelikle şarap endüstrisinde üretim esnekliği sağlanmış ve kalite iyileştirilmiştir. 1987 itibariyle pektinazlar tekstil, elyaf işleme, kağıt yapımı, atık su arıtımı, hayvan yemi hazırlama, çay ve kahve üretimi, yağ özütleme gibi pek çok alanda etkili bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Kashyap ve ark., 2001; Hoondal ve ark., 2002).

Pektinazlar tekstil endüstrisinde enzimatik ovma (biyolojik yıkama) adı verilen bir basamakta kullanılırlar. Bu basamakta pektinaz, pektini parçalayarak pamuk kütikül yapısını yok eder ve böylece kütikül ve pamuk lifi arasındaki bağlantıyı kaldırır. Enzimatik ovma, kumaşın olumsuz çevre koşullarından etkilenmesini önler. Ayrıca kimyasal yerine biyolojik muamele ile sağlık sorunları azalmaktadır. Tekstilde enzimlerin kullanıldığı bir diğer basamak ise enzimatik ağartmadır. Pamuğun ağartılmasının amacı doğal pigmentleri renksizleştirmek ve liflere saf bir beyaz görünüm kazandırmaktır. En yaygın endüstriyel ağartma maddesi hidrojen peroksittir. Ancak bu uygulama yüksek miktarda kimyasal ve dolayısıyla da yıkama için çok daha yüksek miktarlarda su gerektirmektedir. Ayrıca ağartıcı maddenin elyaf ile radikal reaksiyonları, polimerizasyon derecesinde bir azalma dolayısıyla ciddi hasara neden olabilmektedir. Tüm bu sorunlar nedeniyle enzimatik ağartma sistemi kimyasal ağartma sisteminin yerini almıştır. Böylece daha az lif hasarı, daha iyi ürün ve yıkamada tasarruf sağlanmaktadır (Yadav ve ark., 2009).

Enzim esaslı deterjan formülasyonları yeşil kimyasal maddeler olarak bilinirler. Çamaşır yıkamadan, tekstil endüstrisi ve bulaşık yıkamaya kadar geniş bir uygulama yelpazesi bulmaktadır. En yaygın olarak kullanılan deterjan enzimleri proteinlerden, lipidlerden, polisakaritlerden oluşan ve toprakları uzaklaştıran hidrolazlardır. Ana sınıflar proteazlar, lipazlar, amilazlar, mannanazlar, selülazlar ve pektinazlardır.

Mannanazlar ve pektinazlar salata sosu, ketçap, mayonez, dondurma, dondurulmuş tatlılar, milkshake, vücut losyonları ve diş macununun yanı sıra muz, mandalina, domates ve marmelat gibi meyve içeren ürünlerin suları, içki sosu ve az yağlı süt lekelerinin çıkarılmasında etkilidirler (Kashyap ve ark., 2001; Hoondal ve ark., 2002).

Pektinazlarla yem viskozitesi düşürülerek geviş getiren hayvanlarda besin sindirimi ve emilimi artırılabilir. Enzimler yemlerde antimikrobiyal ajan gibi de işlev görebilmektedir (Kashyap ve ark., 2001; Hoondal ve ark., 2002).

1.4 Literatür Taraması

Reignault ve ark. (1994), *Botrytis cinerea*'dan 42 kDa, *Erwinia chrysanthemi*'den 36 kDa, *Vigna radiata*'dan 53 kDa olan PME elde etmişlerdir.

Al-Rajabi ve Mahasneh (1999) *Bacillus polymyxa* suşundan izole edilen pektin ve pektat liyaz aktiviteleri üzerine çalışma yapmıştır. Pektin liyaz için optimum pH 8,5 pektat liyaz için optimum pH 9,0 ve her iki enzim için de optimum sıcaklık 30°C olarak belirlenmiştir. Pektat liyaz aktivitesinde 1mM EDTA'nın %48, nitrilotriasetatın ise pektin ve pektat liyaz aktivitesinde sırasıyla %35 ve %53 oranında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir.

Soares ve ark. (1999) toprak ve sebze atıklarından *Bacillus sp.* suşlarını izole etmişlerdir. Elde edilen suşlar pektinaz üretimi açısından tarandığında beş suşun pozitif olduğunu belirlemişlerdir. Beş *Bacillus sp.* suşundan dördü pH 6, diğeri 6,5-7,0 arasında optimum pH vermiştir. Üç suş için optimum sıcaklık 40-50°C arasında diğeri iki suş için 50-55°C arasında bulunmuştur.

Kashyap ve ark. (2000) *Bacillus sp. DT7* suşundan jel filtrasyonu ve iyon değiştirme kromatografisini kullanarak pektinaz saflaştırmışlardır. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 106 kDa olarak bulunmuştur. Çalıştığı optimum koşullar 60°C ve pH 8 olarak belirlenmiş, 100mM CaCl₂ ve merkaptetanol varlığında aktivitenin arttığı kaydedilmiştir. EDTA'nın ise görece olarak aktiviteyi %17 düşürdüğü belirlenmiştir.

Teixeira ve ark. (2000) farklı karbon kaynağı içeren kültür ortamlarında *Aspergillus japonicus*'dan elde edilen endo- ve ekzopoligalakturonaz ile pektinesteraz aktivitelerini çalışmışlardır. Karbon kaynağı olarak sakaroz, pektin/sakaroz, glukoz, pektin/glukoz, pektin, gliserol, pektin/gliserol kültür ortamına farklı

konsantrasyonlarda eklenmiştir. Tüm enzimlerin aktivite ölçümünde substrat olarak pektin kullanılmıştır. Endopoligalakturonaz aktivitesi için DNS, ekzopoligalakturonaz aktivitesi için viskozite, pektinesteraz aktivitesi için titrasyon yöntemi kullanılmıştır. %0,5 pektin içeren kültür ortamından elde edilen pektinesteraz, %0,2 pektin ve %0,2 gliserol içeren kültür ortamından elde edilen endopoligalakturonaz ve %0,5 pektin ve %0,5 glukoz içeren kültür ortamından elde edilen ekzopoligalakturonaz en iyi enzimatik aktiviteleri vermiştir. Pektin, glukoz ve sakaroz yüksek konsantrasyonlarda ortama eklendiğinde ise enzimatik aktivitelerin baskılandığı gözlenmiştir.

Markovic ve ark. (2002) havuçtan pektin metilesteraz izole etmişlerdir. Elde edilen pektin metilesterazın ağırlığı 33 kDa, optimum çalıştığı pH 7,8 olarak bulunmuştur.

Joo ve ark. (2003) *Bacillus clausii* I-52 suşundan proteaz saflaştırarak enzimin optimum pH 11 ve 65°C'de aktivite gösterdiğini ayrıca Triton-X-100 ve Tween-20 gibi iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin değil, aynı zamanda SDS gibi güçlü anyonik yüzey aktif maddeyinin varlığında da kararlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Celestino ve ark. (2006) *Acrophialophora nainiana*'da pektinaz üretmişlerdir. Üretilen pektinazın molekül ağırlığı 35,5 kDa olarak bulunmuştur. Moleküler ağırlık olarak karşılaştırıldığında *Amycolata sp.* ve *Bacillus sp.*'den elde edilen poligalakturonazlar ile benzer olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 8'de ve 60°C daha aktif olduğu gözlenmiştir.

Khairnar ve ark. (2009) *Aspergillus niger*'den pektinaz üretimini çalışmışlardır. Enzim üretiminin araştırılması için pektinli agar mikroorganizma ekilerek zon oluşumu incelenmiştir. Elde edilen enzimin molekül ağırlığı 40 kDa olarak belirlenmiştir.

Jurick ve ark. (2009) *Penicillium solitum*'dan katyon değişim kromatografisiyle 50 kDa ağırlığında poligalakturonaz izole etmişlerdir. Enzim pH 4-5 aralığında ve 20°C ile 37°C en yüksek aktiviteye sahiptir.

FAO/WHO ortak gıda standartları programı kodeks komitesinin gıda katkı maddeleri üzerine raporlarında (2010) *Bacillus clausii* suşunun serin proteaz enzim karışımının oluşturulmasında kullanıldığı bildirilmiştir.

Okafor ve ark. (2010) pektinaz üretimi için *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sp.*, *Penicillium chrysogenum* ve *Trichoderma sp.*'leri kullanmıştır. Enzim aktivite yöntemi DNS, substrat %1 pektindir. Enzimin hangi pektinaz alt türüne ait olduğu ve molekül ağırlığı belirlenmemiştir.

Rangarajan ve ark. (2010) *Aspergillus niger*'den endopoligalakturonaz ve ekzopoligalakturonaz aktivitesi üzerine çalışmışlardır. Ekzopoligalakturonaz için yöntem DNS, substrat poligalakturonik asittir. Endopoligalakturonaz için viskozite ölçüm yöntemi ve pektin seçilmiştir. Farklı azot kaynaklarının aktivite üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunlar portakal kabuğu özütü, pepton, maya özütü, soya, amonyum klorit ve amonyum nitrattır. Test edilen çeşitli azot kaynakları arasında, katı hal fermantasyonunda portakal kabuğu özütü ve soyada, inorganik azot kaynakları arasında ise amonyum nitratta en iyi pektinaz aktivitesi gözlenmiştir.

Quattara ve ark. (2011) *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus fusiformis* olmak üzere altı türde pektat liyaz araştırması yapmışlardır. En iyi pektat liyaz üreticileri olarak *B.fusiformis*, *B.subtilis* ve *B.pumilus* olarak belirlenmiştir. Diğer türlerde aktivitelerin oldukça düşük olduğu görülmüştür. İzoelektrik fokuslama ile *B.subtilis* ve *B.fusiformis*'te 9,8 pI ve *B.pumilus*'ta 10,5 pI ile iki çeşit pektat liyaz olduğu belirlenmiştir. Kültür inkübasyon koşulları araştırıldığında ise geç durağan büyüme fazında maksimum enzim üretiminin olduğu saptanmıştır.

Gonzalez ve Rosso (2011), karışık pektinolitik enzimleri birlikte içeren ticari pektinazdaki (Pectinex 100L Plus) pektin metilesteraz aktivitesini çalışmıştır. Enzimin optimum pH 4'te ve 45°C'de çalıştığı belirlenmiştir.

Namasivayam ve ark. (2011), katı atıklardan izole ettikleri *Bacillus cereus*'dan pektinaz üretim koşullarının optimizasyonu üzerine çalışmış ve maksimum enzim üretiminin 37°C'de ve pH 8,5'da olduğunu bulmuşlardır. SDS-PAGE sonucunda birden fazla bant elde etmişlerdir.

Mukesh Kumar ve ark. (2012), topraktan izole ettikleri *Bacillus sp. MFW7* suşundan pektinaz üretimi ve karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. Enzimin optimum pH 6,5 ve 35°C aktif olduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE sonucu molekül ağırlığı 37 kDa olarak kaydedilmiştir.

Hema ve Shiny (2012), topraktan *Bacillus clausii* SM3 suşunu izole etmişlerdir. Bu suşun proteaz ürettiğini ve bu enzimin oldukça etkili olduğunu bulmuşlardır. Kan lekesi çıkarma deneylerinde bu proteazı kullanarak deterjan endüstrilerindeki potansiyelinin yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Li ve ark. (2012), topraktan *Bacillus clausii* S-4 izole ederek bu suştan pektin liyaz saflaştırmış ve karakterize etmiştir. Pektin liyaz aktivite tayininde kullanılan substrat pektin ve yöntem spektrofotometridir; 235 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Enzimin, optimum, pH 10 ve 60°C aktivite gösterdiği ve molekül ağırlığının SDS-PAGE ile 35 kDa olduğu belirlenmiştir.

Torimiro ve Okanji (2013), tarım atıklarından pektinaz üreten *Bacillus* suşlarını izole etmişlerdir. Elde edilen üç suşta *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis*, pektin kullanılarak poligalakturonaz aktivitesi belirlenmiştir. Optimum aktiviteler sırasıyla *Bacillus stearothermophilus* için 60°C ve 7,5 pH, *Bacillus cereus* için 50°C ve 8,0 pH, *Bacillus subtilis* için 50°C ve 9,0 pH olarak bulunmuştur.

Mei ve ark. (2013), *Bacillus halodurans* M29 suşundan pektinaz izole ederek *E.coli* JM109'da klonlamıştır. Elde edilen pektinazın 39 kDa olduğu ve optimum aktiviteyi 80°C pH 10'da verdiği görülmüştür. Ayrıca EDTA'nın aktiviteyi düşürdüğü belirlenmiştir.

Raju ve Divakar (2013), topraktan izole ettikleri *Bacillus circulans* suşundan pektinaz saflaştırmışlardır. Enzimin pH 7 ve 40°C'de optimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Tween-80 maksimum etki göstermekle birlikte, Tween-20 ve SDS'nin aktiviteyi arttırdığını bildirmişlerdir.

Bhardwaj ve Garg (2014) *Bacillus* sp. MBRL576 izolatından optimum kültür koşullarında poligalakturonaz üretimini araştırmıştır ve pektinaz üretilen ortamın pH'ı 4, sıcaklığı 45°C, karbon kaynağı sükroz olduğunda maksimum verimin elde edildiğini bulmuşlardır. SDS-PAGE sonucu enzimin 66 kDa ağırlığında olduğu bulunmuştur.

Jansirani ve ark. (2014) topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp.'den portakal kabuğu özütü, patates kabuğu özütü ve çay atığını besiyerinde kullanarak pektinaz üretimini

gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen pektinaz pH 7 ve 35°C'de maksimum aktivite göstermiştir.

AMFEB (2015) verilerine göre *Bacillus clausii* suşu gıda ve teknik uygulamalarda proteaz kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Sassi ve ark. (2016) daha önceki çalışmalarında izole ettikleri mutant *Penicillium okcitanis CT1* suşunu kullanarak bu suştan poligalakturonaz izole etmişlerdir. Anyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan enzimin dizi analizini yapılmış ve endopoligalakturonaz ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Enzimin çalıştığı optimum pH 6 ve sıcaklık 35°C'dir. SDS-PAGE ile büyüklüğünün 42 kDa olduğu ve zimogramda hem CTAB hem de rutenyum kırmızısıyla pozitif sonuç alınmıştır. Triton X-100, DTT, β -merkaptetanol, üre, iyodoasetamid ve iyodoasetik asitin göreceli olarak aktiviteyi düşürmediği, EDTA'nın ve SDS'nin %20 ve %10'luk bir düşüşe sebep olduğu bulunmuştur.

Haddar ve ark. (2016) ekstraselüler ksilanaz, mannaz, pektinaz ve α -amilaz üretebilen yeni mantar ve bakteri suşların tanımlanması ve karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Topraktan 10 mantar, 10 bakteri izole etmiş ve seçici agarda en büyük zonu veren 1 bakteri 2 mantar suşunu kullanmışlardır. Zimogramda *Aspergillus M1* ve *B.mojavensis I4* suşunun en az iki pektinaz salgıladığı ancak düşük molekül ağırlığa sahip bir pektinazın varlığını belirten *A.sydowii SE* suşunun jelde şeffaf bir pektik hidroliz bandı oluşturmadığını rapor etmişlerdir. *B.mojavensis I4* suşundan elde edilen pektinazın optimum pH'ı 8, sıcaklığı 60°C olarak belirlenmiştir.

Madu ve ark. (2016) *Bacillus licheniformis*'den 38 kDa ağırlığında bir pektinaz saflaştırmıştır. Optimum pH 9 ve sıcaklık 50°C'dir. Aktiviteye tuz ve kimyasal reaktiflerin etkisini araştırdıklarında NaCl için 1mM, 5mM ve 10mM konsantrasyonlarında göreceli aktivite %127, %117 ve %98, EDTA için 1mM ve 5mM konsantrasyonlarında göreceli aktivite %77 ve %59 bulunmuştur.

Mercimek Takcı ve Ucan Turkmen (2016) topraktan *Bacillus subtilis* izole etmişlerdir. Kültür süpernatantında, etanol ve amonyum sülfat ile çöktürme sonucunda 60 ve 64 kDa ağırlığında iki enzim bandı görüntülemişlerdir. Bunların

aktiviteleri DNS yöntemi ve pektin kullanarak ölçüldüğünde sırasıyla 95,15 U/ml, 73,92 U/ml ve 15,37 U/ml bulunmuştur.

Rukmini ve ark. (2016), *Bacillus pumilus*'tan pektinaz üreterek pH 7'de optimum aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Akinyemi ve ark. (2017), *Bacillus megaterium*, *Bacillus bataviensis* ve *Paenibacillus sp.* suşlarından pektinaz izole ederek çalışmışlardır. Optimum aktivite gösterdikleri koşulları *B.megaterium* ve *B.bataviensis* için pH 8 60°C, *Paenibacillus sp.* için pH 6,5 40°C olarak bulmuşlardır. Molekül ağırlıklarını ise *B.bataviensis*, *B.megaterium* ve *Paenibacillus sp.* için sırasıyla 32,357, 25,119 ve 38,304 da olarak belirlemişlerdir.

Khushk ve ark. (2017) *Bacillus clausii* MCC 233-50 suşundan α -amilaz üretim koşullarının optimizasyonu üzerine çalışmışlardır. Maksimum aktivite için fermantasyon koşulları farklı karbon kaynakları, nitrojen kaynakları, pH ve inkübasyon süresi gibi parametrelerce değerlendirilmiştir. Karbon kaynağı nişasta, nitrojen kaynağı üre olduğunda, optimum pH 8 ve inkübasyon süresi 36s olarak belirlenmiştir.

Zhou ve ark. (2017) pektat liyaz aktivitesi gösteren *Bacillus clausii* S10'dan pektat liyaz (BacPelA) genini *E.coli* BL21'e klonlamışlardır. Klonlanan enzimin aktivitesi optimum pH 10,5 ve 70°C'de görülmüştür. Ca^{+2} 'nin 1,5mM konsantrasyona kadar aktiviteyi arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca BacPelA'nın SDS'ye duyarlı olduğu ve EDTA varlığında inhibisyona uğradığı kaydedilmiştir. Enzimin 235 nm'de farklı substratlarla aktivitesi ölçülmüştür. Turunçgil kabuğu pektini, elma pektini ve farklı metil yüküne sahip pektinlerle aktivite karşılaştırılmış ve kontrol olarak PGA kullanılmıştır. En yüksek aktivite, ≥ 85 oranda, metillenmiş pektinde gözlenmiştir. BacPelA'nın tekstilde kullanımının araştırılması için lifleri enzimle muamele edilmiş ve liflerin yüzeylerinin enzimle muamele sonucunda daha yumuşak ve beyaz olduğu görülmüştür.

Poonam Sharma ve Nivedita Sharma (2018), *Stenotrophomonas maltophilia* P9 suşunun pektinaz üretimi için optimum koşullarını araştırmışlardır. En yüksek pektinaz üretiminin pH 5, 30°C'de ve 72s inkübasyon sonucunda olduğunu bildirmişlerdir.

Pili ve ark. (2018), *Aspergillus niger* ATCC 9642 suşunu iki farklı ortamda büyüterek pektinaz üretimini ve aktivitesini çalışmışlardır. Sentetik ortamdan (42g/L pektin, 1g/L magnezyum sülfat ve 10g/L potasyum fosfat) elde edilen PME'nin maksimum aktivitesi 9.4 U/mL ve agro-endüstriyel ortamda (120g/L portakal kabuğu, 301,2g/L mısır maserasyon sıvısı ve 600g/L kaynatılmış pirinç suyu) 130U/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen enzimin en iyi pH 11 ve 55°C'de çalıştığı kaydedilmiştir.

Mohandas ve ark (2018), meyve ve sebzelerden bakteri izole ederek tanımlamışlardır. *Bacillus sonorensis* MPTD1 suşunun pektinaz aktivitesi pektinli agarda taranmış ve pozitif sonuç alınmıştır. Daha sonra pektinaz üretimi için kültür koşulları optimizasyonu çalışılarak maya özütü, K₂HPO₄, inkübasyon süresi, NaNO₃ ve KCl gibi parametrelerin pektinaz üretimi üzerinde göreceli olarak az, ancak pH, MgSO₄ ve pektinin yüksek derecede etkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen enzimin aktivitesi substrat PGA ve DNS yöntemiyle, 2,43 (µM/mL)/dk bulunmuştur.

Thite ve Nerurkar (2018), üç *Bacillus* izolatından pektinaz saflaştırarak pektat liyaz, pektin liyaz ve poligalakturonaz aktiviteleri üzerine çalışmışlardır. Liyaz aktivitesi için TBA yöntemi kullanarak 550nm'de, poligalakturonaz için DNS yöntemi kullanarak 540 nm'de absorbans ölçümünü gerçekleştirmişlerdir. SDS-PAGE (%10) jeli ikiye keserek bir parçasını gümüş boyama ile boyamışlar diğerini renatüre ederek %0,1'lik toluidin mavisi-O ile boyamışlardır. Aktivite bantları *B.safensis* M35 için yaklaşık 33 kDa, *B.altitudinis* R31 ve *B.altitudinis* J208 için yaklaşık 35 kDa olarak belirlenmiştir. *B.safensis* M35, *B.altitudinis* R31 ve *B.altitudinis* J208 için maksimum pektin liyaz aktiviteleri 60°C'de pH 10,0'da sırasıyla 422, 377 ve 360 ünite şeklindedir.

2.MATERYAL-METOT

2.1 Materyaller

EK-1’de verilmiştir.

2.1.1 Kimyasallar

EK-2’de verilmiştir.

2.1.2 Besiyeleri

EK-3’te verilmiştir.

2.1.3 Kullanılan çözeltiler

EK-4’te verilmiştir.

2.1.4 Kalibrasyon eğrileri

EK-5’te verilmiştir.

2.2 Metot

2.2.1 Topraktan bakteri izolasyonu ve saklanması

2.2.1.1 Toprak örnekleri

Pektinaz üreten bakterilerin izolasyonu için Sivas ili Koyulhisar ilçesi elma bahçelerinden toprağın en üst kısmı ince bir tabaka halinde temizlenerek altındaki topraktan cam kavanoza alındı.

2.2.1.2 Topraktan bakteri izolasyonu

On gram toprak tartılarak 90ml %0.85’lik NaCl çözeltisine alındı. Süspansiyon oda sıcaklığında iki s çalkalandı. Ardından 80°C’de 10 dk inkübe edilerek vejetatif hücrelerin büyümesi engellendi. İnkübasyondan sonra 10⁶’ya kadar seyreltme yapılarak dilüsyonlar Horikoshi-I agar plakalarına yayıldı ve 37°C’de 72s inkübe edildi (Mora ve ark., 1998).

2.2.1.3 Bakterilerin saklanması

Horikoshi-I agarda büyüyen koloniler alınarak Horikoshi-I sıvı besiyerine ekildi. Bir gece 37°C’de inkübe edildi. Kültür besiyerinden ve %40 gliserol içeren Horikoshi-I sıvı besiyerinden bire bir hacimde (v/v) karıştırılarak krayo tüplere bölüştürüldü ve -80°C’de saklandı.

2.2.2 Bakterilerin fenotipik karakterizasyonu

2.2.2.1 İzolatların aktivasyonu

Gliserol stoktan Horikoshi-I agara çizme ekim yapıldı. 37°C'de 24s inkübe edildi.

2.2.2.2 Gram boyama

Katı besiyerinde büyüyen kolonilerden alınarak üzerine bir damla distile su damlatıldı ve lama yayıldı. Tamamen kuruduktan sonra lam altından üç kez ateşten geçirildi. Kristal viyoleto çözeltisi ile 1 dk boyandı ve birkaç sn su altında yıkandı. Gram iyodin çözeltisi ile 1 dk boyandı ve birkaç sn su altında yıkandı. %95'lik etanolden birkaç sn geçirildi ve tekrar su altında yıkandı. Son olarak safranin ile 30sn kadar boyandı ve sudan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra ışık mikroskopunda preparatlar incelendi (Akbalık, 2003).

2.2.2.3 Katalaz testi

Horikoshi-I agarda büyüyen koloni üzerine %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi damlatıldı. Kabarcık oluşumu incelendi (Yavuz, 2003).

2.2.2.4 Farklı NaCl konsantrasyonlarında üreme

%5, %7 ve %10 NaCl içeren Nutrient agar besiyerleri hazırlandı. Agarlara bakteri ekimi yapılarak 37°C inkübe edildi ve üreme takip edildi.

2.2.2.5 Farklı sıcaklıklarda üreme

Nutrient agar besiyerine ekim yapılarak 45°C, 50°C, 55°C'de üreme takip edildi.

2.2.2.6 Farklı pH'larda üreme

pH'ı 6, 7, 8, 9, 10 olan nutrient agar besiyerleri hazırlanarak 37°C'de inkübe edildi ve üreme takip edildi.

2.2.3 Ekstraselüler enzim tarama

2.2.3.1 Pektinaz üretimi

Poligalakturonik asit ve pektin içeren iki ayrı agar besiyeri hazırlandı. Üç gün 37°C'de inkübe edildi. Üzerine gram iyodin çözeltisi damlatılarak 5 dk beklendi. Zon oluşumu incelendi. Bir diğer yöntem olarak %1'lik CTAB çözeltisi damlatılarak zon oluşumu incelendi. Koloni etrafındaki zonlar pektinaz varlığını göstermektedir.

2.2.3.2 Proteaz üretimi

Süt içeren agar besiyeri hazırlandı. Üç gün 37°C'de inkübe edildi ve zon oluşumu incelendi. Koloni etrafındaki açık zonlar proteaz varlığını göstermektedir.

2.2.3.3 Lipaz üretimi

Tween-20, tween-40 ve tween-80 içeren agar besiyeri (Ek-3) hazırlandı. Üç gün 37°C'de inkübe edildi ve zon oluşumu incelendi (Altan, 2004).

2.2.3.4 Selülaz üretimi

Selüloz (%0,5) içeren agar besiyeri hazırlandı. Üç gün 37°C'de inkübe edildi. Kongo kırmızısı (%0,1) ile 15dk boyandı. NaCl (1M) ile yıkanarak zon oluşumu incelendi.

2.2.3.5 Ksilenz üretimi

Ksilan (%0,5) içeren agar besiyeri hazırlandı. Üç gün 37°C'de inkübe edildi. Kongo kırmızısı (%0,1) ile 15dk boyandı. NaCl (1M) ile yıkanarak zon oluşumu incelendi.

2.2.3.6 Amilaz üretimi

Çözünür nişasta (%0,5) içeren agar besiyeri hazırlandı. Üç gün 37°C'de inkübe edildi. İyodin çözeltisi damlatılarak 5dk beklendi. Zon oluşumu incelendi. Koloni etrafındaki zonlar amilaz varlığını göstermektedir.

2.2.4 Bakterilerin genotipik karakterizasyonu

2.2.4.1 Tür Tayini (Kütle spektrometresi, MALDI-TOF)

Horikoshi-I agarda 37°C'de 24s inkübasyon ile büyütülen koloniler analizde kullanıldı. Plakta üreyen koloniler MALDI-TOF cihazında kullanılan solüsyon ile muamele edilerek cihazın kütüphanesinde bulunan kısmi protein profilleri ile karşılaştırıldı ve özgün spektrum sonuçları kaydedildi.

2.2.4.2 Genomik DNA izolasyonu

Horikoshi-I sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C'de bir gece inkübe edildi. 5000 rpm'de +4°C'de 5dk santrifüjlenerek hücreler toplandı. Üzerlerine 200µl 1xTE (pH 8,0, %25 sükröz, 30mg/ml lizozim) eklendi ve lizis için 37°C'de bir s çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Lizis işleminin ardından üzerine 370µl 1xTE (1mg/ml Proteinaz K) ve 30 µl %10 SDS eklendi. Deproteinizasyon için 37°C' de 1 s inkübe edildi. Daha sonra üzerine 100µl 5M NaCl ve 80µl CTAB/NaCl eklenerek 65°C'de 10dk inkübe edildi. Örnekler ependorf tüplere paylaştırıldı. Üzerlerine 1 hacim fenol

1 hacim kloroform eklenerek 10.000 rpm'de 3 dk santrifüjlendi. Üst faz yeni bir ependorfa alınarak üzerine 1 hacim %99'luk izopropanol eklendi ve hafifçe alt üst edilerek DNA yumağı gözlendi. DNA yumağı başka bir ependorfa alınarak %70'lik etanol ile yıkandı. Sıvı atılarak pelet 37 °C'de 10dk kurutuldu. Örnekler -20°C'de saklandı (Akbalık, 2003).

2.2.4.3 16SrDNA dizileme

İzolasyon sonrası PCR ve DNA dizileme hizmet alımı aracılığıyla gerçekleştirildi.

2.2.5 Logaritmik Faz Üreme Takibi

Horikoshi-I sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C'de inkübe edildi. Zamana bağlı ölçümleri 600nm'de köre karşı okunarak kaydedildi ve üremenin zamana bağlı logaritmik grafiği oluşturuldu.

2.2.6 Protein Miktar Tayini

Protein miktarının belirlenmesinde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart olarak BSA kullanıldı. İstenilen derişim aralığında 100µl hacimde standartlar hazırlandı. Aynı şekilde protein miktarı bilinmeyen örnek de 100µl hazırlandı. Üzerlerine 3ml Bradford belirteci eklenerek oda sıcaklığında 40 dk bekletildi. Örnek absorbansları köre karşı 595 nm'de okunarak kaydedildi.

2.2.7 Pektinaz Aktivite Çalışmaları

2.2.7.1 Enzim üretimi

Horikoshi-I sıvı besiyerine ekim yapılarak 37°C'de bir gece inkübe edildi.

2.2.7.2 Enzimlerin kısmi saflaştırılması

2.2.7.2.1 Etanol ile çöktürme

İnkübasyon sonrasında hücreler 5000 rpm'de +4°C'de 10dk santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Süpernatana %95'lik soğuk etanolden 0,5 kat, 0,6 kat, 0,75 kat, 1 kat, 1,25 kat, 1,75 kat ve 2 kat soğuk etanol eklenerek -20°C'de bir gece bekletildi. Ardından 5000 rpm'de +4°C'de 15dk santrifüjlenerek proteinler toplandı. Oda sıcaklığında etanol uzaklaştırıldı.

2.2.7.2.2 Aseton ile çöktürme

İnkübasyon sonrasında hücreler 5000 rpm'de +4°C'de 10dk santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Süpernatana %80'lik soğuk asetondan 0,5 kat, 0,75 kat, 1 kat, 1,25 kat, 1,75 kat ve iki kat aseton eklenerek -20°C'de bir gece bekletildi. Ardından 5000

rpm'de +4°C'de 15dk santrifüjlenerek proteinler toplandı. Oda sıcaklığında aseton uzaklaştırıldı.

2.2.7.2.3 Amonyum sülfat ile çöktürme

Amonyum sülfat (%20-%100) ile çöktürme için Ek-4'de verilen tablodaki miktarlar tartıldı (Doung-Ly ve Gabelli, 2014). Soğuk ortamda süpernatanlara azar azar eklenerek ve en düşük rpm'de karıştırılarak çözüldü. Çözünmenin ardından örnekler +4°C'de bir gece bekletildi. 5000 rpm'de +4°C'de 15dk santrifüjlenerek proteinler toplandı. Pelet su ile yıkanarak iki hacim etanol ile tekrar çöktürüldü. Ardından 5000 rpm'de +4°C'de 15dk santrifüjlenerek proteinler toplandı. Oda sıcaklığında etanol uzaklaştırıldı.

2.2.7.2.4 Farklı sıcaklıklarda üreme ile

Bacillus clausii izolatları 37°C, 45°C, 50°C ve 55°C'de bir gün inkübe edildi. Hücreler 5000 rpm'de +4°C'de 10dk santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Süpernatana iki hacim etanol eklendi. Bir gece -20°C'de bekletildi. Ardından 5000 rpm'de +4°C'de 15dk santrifüjlenerek proteinler toplandı. Oda sıcaklığında etanol uzaklaştırıldı.

2.2.7.3 Enzim karakterizasyonu

2.2.7.3.1 Poligalakturonaz (PG) aktivitesi

PG aktivite ölçümünde DNS yöntemi kullanıldı. (Kocabay, 2015). Enzim aktivitesi dakikada salınan µmol galakturonik asit olarak hesaplandı.

2.2.7.3.1.1 Optimum pH taraması

Poligalakturonik asit (%1'lik 200µl) ve enzim çözeltisi (200µl) farklı pH'larda hazırlanarak (pH 3,6-5,6 asetat tamponu, pH 6,0-7,6 fosfat tamponu, pH 8,0-9,0 Tris-HCl tamponu, pH 10,0-11,0 karbonat tamponu, ve pH 12,0-13,0 KCl-NaOH tamponu) 50°C 'de 10dk inkübe edildi. Reaksiyon 400µl DNS eklenip 95°C' de 5 dk bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Köre karşı 540 nm'de okunan değerler kaydedildi.

2.2.7.3.1.2 Optimum sıcaklık taraması

Optimum pH'da %1'lik poligalakturonik substrat (200µl) ve enzim çözeltisi (200µl) ile örnekler hazırlandı ve farklı sıcaklıklarda (4°C, 20°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C) 10dk inkübe edildi. Reaksiyon 400µl DNS eklenip 95°C' de 5dk

bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Köre karşı 540nm’de okunan değerler kaydedildi.

2.2.7.3.1.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi

Optimum pH’da %1 poligalakturonik asit çözeltileri %1, %5 ve %10 NaCl içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 200µl substrat ile 200µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta 10dk inkübe edildi. Reaksiyon 400µl DNS eklenip 95°C’ de 5dk bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 540 nm’de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.1.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif etkisi

Optimum pH’da %1 poligalakturonik asit çözeltileri %1, %5 ve %10 metanol, %1, %5 ve %10 etanol, %1, %5 ve %10 aseton, %1, %5 ve %10 DMSO, %1, %5 ve %10 SDS, %1, %5 ve %10 EDTA, %1, %5 ve %10 Tween-80, %1, %5 ve %10 TritonX-100 içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 200µl substrat ile 200µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta 10dk inkübe edildi. Reaksiyon 400µl DNS eklenip 95°C’ de 5dk bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 540 nm’de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.2 Pektin liyaz (PL) aktivitesi

Pektin liyaz aktivitesi pektinde oluşan çift bağların 235 nm’de verdiği absorbansa bağlı olarak belirlendi. Aktivite 235 nm’de ölçülen absorbansın dakikadaki değişimi şeklinde hesaplandı.

2.2.7.3.2.1 Optimum pH taraması

Pektin liyaz aktivitesi için 200µl %1 pektin çözeltisi ve 200µl enzim farklı pH’larda 37°C’de 10dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerlerine 400µl 0,01M HCl eklenerek 5dk kaynar suda aktivite durduruldu ve örnekler buz üzerinde 5 dk soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 235nm’de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.2.2 Optimum sıcaklık taraması

Pektin liyaz aktivitesi için 200µl %1 pektin çözeltisi ve 200µl enzim optimum pH’da hazırlandı. Farklı sıcaklıklarda (4°C, 20°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, ve 70°C) 10 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerlerine 400µl 0,01M HCl eklenerek 5dk kaynar suda aktivite durduruldu ve örnekler buz üzerinde 5dk soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 235nm’de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.2.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi

Optimum pH'da %1 pektin çözeltileri %1, %5 ve %10 NaCl içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 200µl substrat ile 200µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta 10dk inkübe edildi. Reaksiyon 400µl 0,01N HCl eklenip 95°C'de 5dk bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 235nm'de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.2.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif etkisi

Optimum pH'da %1 pektin çözeltileri %1, %5 ve %10 metanol, %1, %5 ve %10 etanol, %1, %5 ve %10 aseton, %1, %5 ve %10 DMSO, %1, %5 ve %10 SDS, %1, %5 ve %10 EDTA, %1, %5 ve %10 Tween-80, %1, %5 ve %10 TritonX-100 içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 200 µl substrat ile 200 µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta 10 dk inkübe edildi. Reaksiyon 400 µl 0.01 N HCl eklenip 95°C 'de 5 dk bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 235 nm'de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.3 Pektat liyaz (PGL) aktivitesi

Pektat liyaz aktivitesi poligalakturonik asitte oluşan çift bağların 235 nm'de verdiği absorbansa bağlı olarak belirlenmiştir.

2.2.7.3.3.1 Optimum pH taraması

Pektat liyaz aktivitesi için 200µl %1 poligalakturonik asit çözeltisi ve 200µl enzim farklı pH'larda (pH 3,6-5,6 asetat tamponu, pH 6,0-7,6 fosfat tamponu, pH 8,0-9,0 Tris-HCl tamponu, pH 10,0-11,0 karbonat tamponu, pH 12,0-13,0 KCl-NaOH tamponu) 50°C'de 10dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerlerine 400µl 0,01M HCl eklenerek 5dk kaynar suda aktivite durduruldu ve örnekler buz üzerinde 5dk soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 540 nm'de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.3.2 Optimum sıcaklık taraması

Pektat liyaz aktivitesi için 200µl %1 poligalakturonik asit çözeltisi ve 200µl enzim farklı sıcaklıklarda (4°C, 20°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, ve 70°C) 10dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerlerine 400µl 0,01M HCl eklenerek 5dk kaynar suda aktivite durduruldu ve örnekler buz üzerinde 5dk soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 540 nm'de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.3.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi

Optimum pH'da %1 poligalakturonik asit çözeltileri %1, %5 ve %10 NaCl içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 200µl substrat ile 200µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta 10dk inkübe edildi. Reaksiyon 400µl 0,01N HCl eklenip 95°C'de 5dk bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 540 nm'de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.3.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif

Optimum pH'da %1 poligalakturonik asit çözeltileri %1, %5 ve %10 metanol, %1, %5 ve %10 etanol, %1, %5 ve %10 aseton, %1, %5 ve %10 DMSO, %1, %5 ve %10 SDS, %1, %5 ve %10 EDTA, %1, %5 ve %10 Tween-80, %1, %5 ve %10 TritonX-100 içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 200µl substrat ile 200µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta 10dk inkübe edildi. Reaksiyon 400µl 0,01 N HCl eklenip 95°C 'de 5dk bekletilerek durduruldu. Ardından buz üzerine alınarak soğutuldu. Örnek absorbans değerleri 540 nm'de köre karşı okunarak kaydedildi.

2.2.7.3.4 Pektin metilesteraz (PME) aktivitesi

PME aktivitesinin belirlenmesinde pH değişimi temel alındı. pH'ı sabit tutmak için gereken NaOH miktarı ölçülerek aktivite hesaplandı.

2.2.7.3.4.1 Optimum pH taraması

Pektin çözeltisi (5 ml %1) ve 100µl enzim çözeltisi farklı pH'larda (pH 3-13 aralığında) hazırlanarak 50°C'de 10dk inkübe edildi. On dakikada pH'ın sabit kalması için gereken 0,1N NaOH miktarı belirlendi. Kullanılan NaOH miktarına göre aktivite hesabı yapıldı.

2.2.7.3.4.2 Optimum sıcaklık taraması

Optimum pH belirlendikten sonra o pH'da substrat ve enzim çözeltileri hazırlandı Pektin çözeltisi (5 ml %1) ile 100µl enzim çözeltisi farklı sıcaklıklarda (20°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) 10 dk inkübe edilerek optimum pH'da sabit kalması için gerekli 0,1N NaOH miktarı hesaplandı.

2.2.7.3.4.3 Aktiviteye iyonik kuvvet etkisi

Optimum pH'da %1 pektin çözeltileri %1, %5 ve %10 NaCl içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 5 ml %1 pektin ile 100 µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta

10dk inkübe edilerek optimum pH'da sabit kalması için gerekli 0.1 N NaOH miktarı hesaplandı.

2.2.7.3.4.4 Aktiviteye organik çözücü ve kimyasal reaktif etkisi

Optimum pH'da %1 pektin çözeltileri %1, %5 ve %10 metanol, %1, %5 ve %10 etanol, %1, %5 ve %10 aseton, %1, %5 ve %10 DMSO, %1, %5 ve %10 SDS, %1, %5 ve %10 EDTA, %1, %5 ve %10 Tween-80, %1, %5 ve %10 TritonX-100 içerecek şekilde hazırlandı. Ardından 5 ml %1 pektin ile 100µl enzim çözeltisi optimum sıcaklıkta 10dk inkübe edilerek optimum pH'da sabit kalması için gereken 0,1N NaOH miktarı hesaplandı.

2.2.7.3.4.5 Kinetik çalışma

Pektin çözeltileri (%0.25, %0.5, %1, %2, %4, %4,5) optimum pH'da hazırlandı. Optimum sıcaklıkta 10dk inkübe edildi. Optimum pH'ın sabit kalması için gerekli 0,1N NaOH miktarı hesaplandı.

2.2.7.3.5 SDS-PAGE ve zimogram

2.2.7.3.5.1 %8 ve %12'lik SDS-PAGE

TEMED ve APS hariç (Ek-4)'te verilen tüm kimyasallar istenilen hacimde bir behere alındı. Elektroforez için cam plakalar hazırlanarak sıkıştırıldı. Daha sonra TEMED ve APS aynı anda eklenerek hafifçe köpürtmeden karıştırıldı. Pastör pipet yardımıyla ayırıcı jel cam plakalar arasında döküldü. Jelde kabarcıklar olmaması ve düz olması için üzerine n-bütanol eklendi. Jel 10dk katılaşmaya bırakıldı. Ardından alkol uzaklaştırılarak distile su ile yıkandı ve kurutma kağıdı yardımıyla kalan sular uzaklaştırıldı. (Ek-4)'te verilen yükleme jeli aynı şekilde hazırlandı. Pastör pipet yardımıyla dökülerek taraklar yerleştirildi. Jelin katılaşması için 10dk beklendikten sonra taraklar çıkarılarak örnekler yüklendi. Örnekler 80V akımda 90dk yürütüldü. Protein bantları Coomassie brillant blue R-250 ile bir gece boyandı ve ardından bir gün fazla boya uzaklaştırıldı.

2.2.7.3.5.2 %8'lik Nativ-PAGE ve zimogram

TEMED ve APS hariç (Ek-4)'te verilen kimyasallar bir beher içerisinde karıştırıldı. Elektroforez için cam plakalar hazırlandı. Daha sonra TEMED ve APS aynı anda eklenerek hafifçe karıştırıldı. Pastör pipet yardımıyla jel plakalar arasında döküldü ve tarak yerleştirildi. Jel katılaşması için 10dk beklendi. Ardından taraklar çıkarılarak örnekler kuyucuklara yüklendi. 80V akımda 90dk yürütüldü.

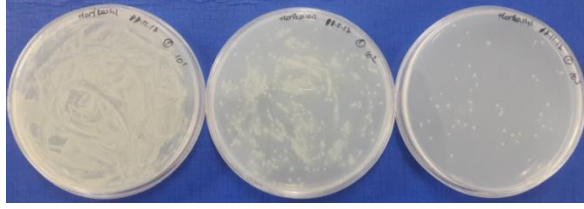
Zimogram için jellere %0,1 pektin ve pga eklendi. Elektroforezden sonra jeller optimum pH tamponunda optimum sıcaklıkta bir saat inkübe edildi. Rutenyum kırmızısıyla (%0,05) +4°C'de bir gece boyamaya bırakıldı. Distile su yardımıyla fazla boya uzaklaştırılarak zonlar incelendi.



3. BULGULAR

3.1 Toprakta Bakteri İzolasyonu

Bin kata kadar seyreltilmiş örnekler Horikoshi-I agar besiyerine yayma yöntemiyle ekildi.

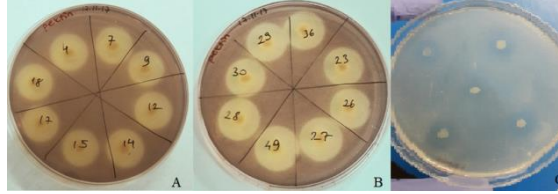


Şekil 10 Seyreltilmiş örneklerin Horikoshi-I agar besiyerindeki görüntüsü.

Soldan sağa 10, 100 ve 1000 kat seyreltilmiş örneklerin 37°C’de 3 gün inkübasyon sonucunda üremeleri görülmektedir. Bin kat seyreltmeden 50 koloni alınarak her biri üç tekrarlı ekimle saflaştırıldı.

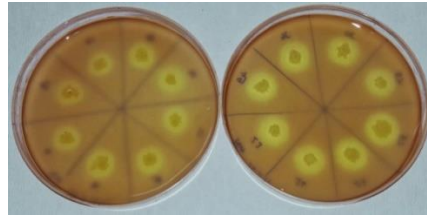
3.2 Pektinaz Üreten Bakterilerin Tanımlanması

Toprakta izole edilen 50 koloni, pektin ve poligalakturonik asit içeren seçici besiyerine ekildi.



Şekil 11 Enzim aktivitesinin pektin içeren besiyerinde saptanması.

İnkübasyondan sonra (37°C’de 3gün) petrilere kolonilerin üzerine %1’lik CTAB ve iyodin çözeltisi damlatıldı. Kolonilerin yaklaşık üçte biri (16:50) her iki besiyerinde de zon oluşturdu (Şekil 11-12). A ve B, iyodin çözeltisi damlatıldıktan sonra; C ise %1’lik CTAB çözeltisi damlatıldıktan sonraki görüntüdür.



Şekil 12 Enzim aktivitesinin PGA içeren besiyerinde saptanması.

PGA içeren besiyerindeki zonların iyodin çözeltisi ile görselleştirilmiş halidir. 16 koloninin hepsinde zon oluşumu gözlemlendi.

3.3 Fenotipik Karakterizasyon

İzole edilen 16 koloninin fenotipik karakterizasyonu yapıldı.

3.3.1 Gram boyama

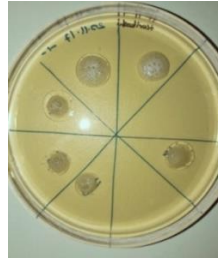
Gram boyama yapılarak izolatlar mikroskopta 100x objektifte incelendi. İzolatlar mor renkte (Gram pozitif) ve çubuk formda idi (Şekil 13).



Şekil 13 Işık mikroskobu altında (100X büyütme) Gram (+) izolatların görünümü.

3.3.2 Katalaz testi

Horikoshi-I agar besiyerinde oluşan koloniler üzerine %3'lük hidrojen peroksit çözeltisi damlatıldı. İzolatların tümü için katalaz varlığına işaret eden hava kabarcıkları gözlemlendi (Şekil 14).



Şekil 14 Katalaz testi.

3.3.3 Farklı NaCl konsantrasyonlarında üreme

Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren nutrient agar besiyerleri hazırlandı. İzolatların bu besiyerlerinde 37°C'de 4 gün üremesi takip edildi. NaCl (%5) içeren ortamda her bir izolat birinci günden itibaren üredi. NaCl (%7) içeren ortamda E-9, E-15, E-18 kodlu izolatlar birinci günden itibaren, E-12 hariç tüm izolatlar ise ikinci günden itibaren üredi. NaCl (%10) içeren ortamda E-12 ve E-27 kodlu izolatlarda üçüncü gün üreme gözlenirken kalan izolatlarda ikinci gün üreme gözlemlendi (Tablo 2).

Tablo 2 Farklı NaCl konsantrasyonlarında üreme takibi

%	5				7				10				
	gün	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E-4	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-7	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-12	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
E-14	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-17	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-23	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-26	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-27	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
E-28	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-29	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-30	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-36	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
E-49	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+

3.3.4 Farklı sıcaklıklarda üreme

Nutrient agar hazırlanarak izolatların 45°C, 50°C ve 55°C’de üremeleri takip edildi. Tüm izolatlar 45°C ve 50°C’de üredi. E-4, E-9, E-15, E-29 kodlu izolatlar hiç üremedi. E-30 ve E-36 kodlu izolatlar 55°C’de üçüncü günden itibaren geriye kalanlar ise ikinci günden itibaren üredi (Tablo 3).

Tablo 3 Farklı sıcaklıklarda üremenin takibi

°C	45				50				55				
	gün	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E-4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E-7	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E-12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-14	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E-17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-18	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-23	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-26	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-27	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-28	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
E-29	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E-30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
E-36	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
E-49	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

3.3.5 Farklı pH’larda üreme

pH 6, 7, 8, 9 ve 10’da nutrient agar hazırlanarak izolatlar 37°C’de 3 gün inkübe edildi. Her pH’da her izolat için üremenin pozitif olduğu belirlendi.

3.4 Genotipik Karakterizasyon

3.4.1 Tür Tayini (Kütle spektrometresi, MALDI-TOF)

Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile kısmi protein analizi yapılarak E kodlu tüm izolatların *Bacillus clausii* olduğu saptandı.

3.4.2 DNA izolasyonu ve 16SrDNA dizileme

16 izolatta da genel olarak aynı sonuçlar elde edildiği için aralarından biri seçildi. Çalışmalara E-14 kodlu bakteri ile devam edildi. E-14 kodlu örnekten genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilerek dizileme için hizmet alımı yapıldı. 16S rRNA ileri (F) primer sonucu aşağıdaki gibidir:

```
5'CGTGGCGTCTATCTGCAGTCGAGCGGACAGATAGGAGCTTGCTCCTTTG
ACTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCTTAGAC
TGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCTCCA
CCTGGAGAGAGGGTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTAAGGGATGGGCC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGG
CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA
AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTCGGGTCGTA
AAGCTCTGTTGTGAGGGAAGAAGCGGTACCGTTCGAATAGGGCGGTGCC
TTGACGGTACCTCACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTATGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCG
CGCGCACGCGGCTTCTTAAGTCTGATGTGAAATCTCGGGGCTCAACCCCG
AGCGGCCATTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG
GCGAACGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GGGAGCAAACAAGATTAGATACCCTGATAGTCCACGCCGTAACGATGA
GTGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATGCCCGTAGTGCCGATTTAACACAT
TAACGCACTCCCGCCCTGGGGAGAAGTACGGCCGCAAGGGCTGAAAAC
CAAAGGAAATTGGACGGGGGGCACCCCGCACAAAGCAGTGAAAGCATGT
GTTTAATTTCCGAAAGGCAACCGCCGAAAGAACCTTAACCCAGGGCTTCT
CTGTTGGTGGCGG-3'
```

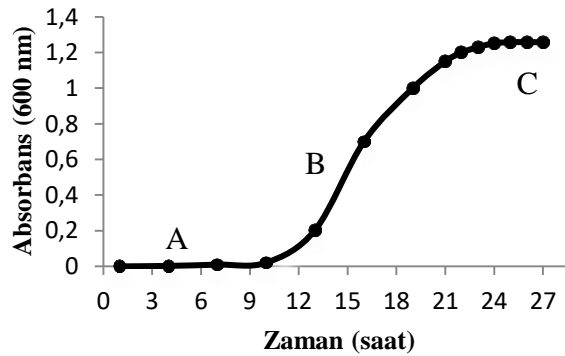
Tablo 4 NCBI BLAST tarama sonuçları

Tanım	Maksimum Skor	Toplam Skor	Sorgu Kapsamı	E Değeri	Eşleşme	AC Numarası
Bacillus clausii strain 210.1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1520	1520	%99	0	%98	KX453981.1
Bacillus clausii gene for 16SrRNA, partial sequence, clone:Y-76-C	1519	1519	%99	0	%98	AB201798.1
Bacillus clausii strain DSM 8716, complete genome	1517	10424	%99	0	%98	CP019985.1

NCBI BLAST ile nükleotit dizilerinin karşılaştırılması sonucu E-14 kodlu örneğin *Bacillus clausii* olduğu saptandı. İlk üç eşleşmenin sonuçları Tablo 4'deki gibidir.

3.5 Logaritmik Faz Üreme Takibi

E-14, Horikoski-I sıvı besiyerine ekildi ve 37°C'de inkübe edildi. Ekimden bir saat sonra 600nm'de köre (taze besiyerine) karşı absorbans değerleri okundu.

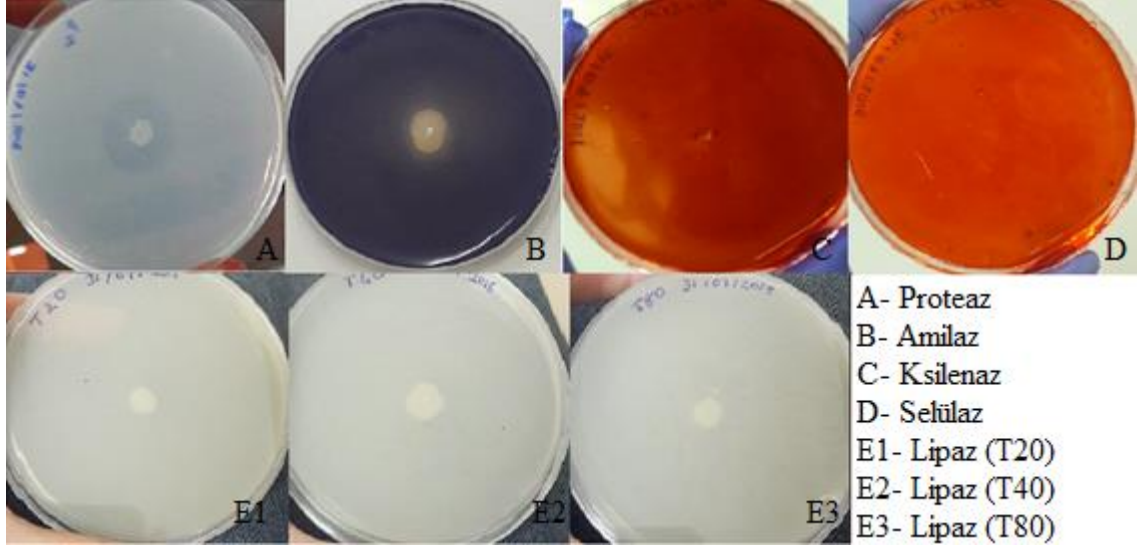


Şekil 15 E-14 kodlu izolatın zamana karşı üreme eğrisi.

A ile gösterilen bölge ilk 10 sa lag fazı, B ile gösterilen bölge sonraki 13 saatlik kısmı gösteren logaritmik faz ve C ile gösterilen bölge durağan fazdır (Şekil 15).

3.6 Ekstraselüler Enzim Taraması

Her enzim için özel substratlı besiyerinde koloniler 3 gün 37°C'de inkübe edildikten sonra zonlar incelendi.



Şekil 16 Ekstraselüler enzim taraması.

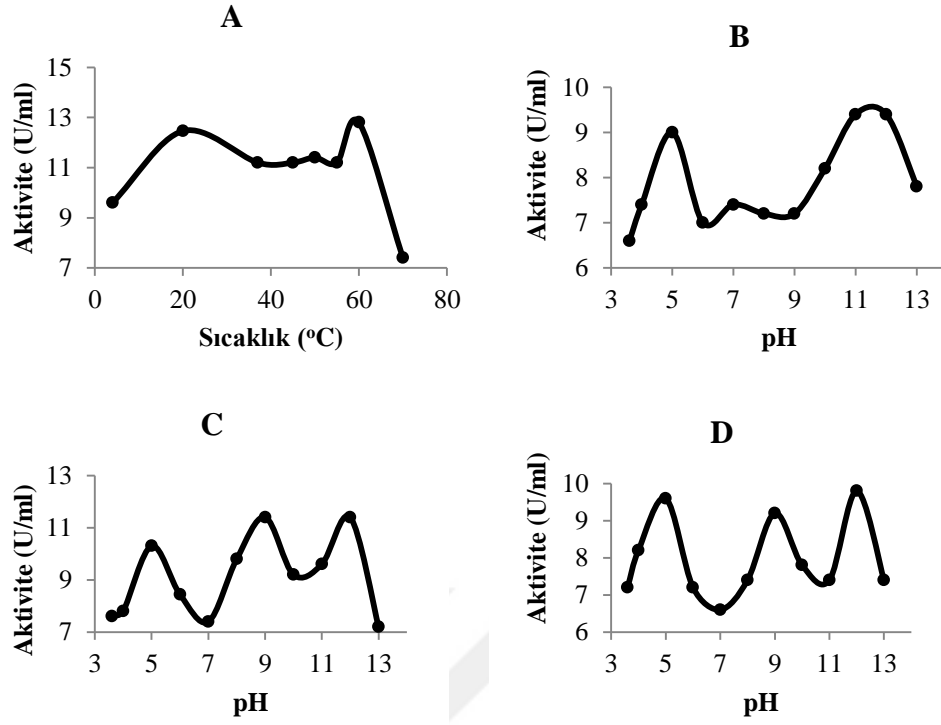
Proteaz varlığı (Şekil 16A) koloni etrafında saydam bir zon oluşturdu. Bu süt proteini kazeinin parçalandığını işaret etmektedir. Nişastanın parçalanması iyodin çözeltisi damlatılarak görselleştirildi (Şekil 16B). Koloni etrafındaki boyanmayan kısım amilaz varlığını göstermektedir. Ksilenz (C) ve selülaz aktiviteleri (D) bulunamadı. Lipaz aktivitesi de gözlenmedi (Şekil 16E1-E3).

3.7 Enzim Aktivite Ölçümleri

3.7.1 Poligalakturonaz (PG)

3.7.1.1 Optimum sıcaklık ve pH taraması

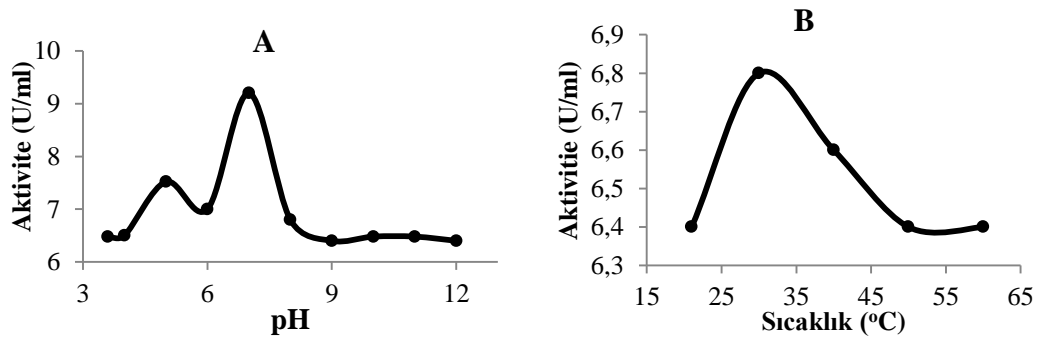
Poligalakturonaz aktivitesi DNS yöntemi kullanılarak belirlendi. Bunun için öncelikle kültür süpernatanı iki hacim etanol ile çöktürüldü. Optimum sıcaklığın belirlenebilmesi için %1PGA ve enzim distile suda hazırlandı. Farklı sıcaklıklarda 10dk inkübe edildi ve DNS eklenerek köre karşı 540nm'de ölçümler kaydedildi. Aktiviteler hesaplanarak grafikler oluşturuldu (Şekil 17A). Enzimin 20°C, 50°C ve 60°C'de daha aktif olduğu belirlendi. Bu nedenle bu üç sıcaklıkta optimum pH taraması gerçekleştirildi. En yüksek enzim aktiviteleri 20°C'de sırasıyla pH 11,5, pH 5 ve pH 7'de alındı (Şekil 17B). Elli santigrat derecede pH9 ve pH12'de aynı ve pH5'e göre daha yüksek enzim aktivitesi olduğu belirlendi (Şekil 17C). Altmış santigrat derecede sırasıyla pH 12, pH 5 ve pH 9'da en yüksek enzim aktivitelerinin olduğu saptandı (Şekil 17D).



Şekil 17 PG için optimum sıcaklık ve pH'ın belirlenmesi.

3.7.1.1.1 Farklı etanol hacimlerinde çöktürmelerde optimum pH taraması

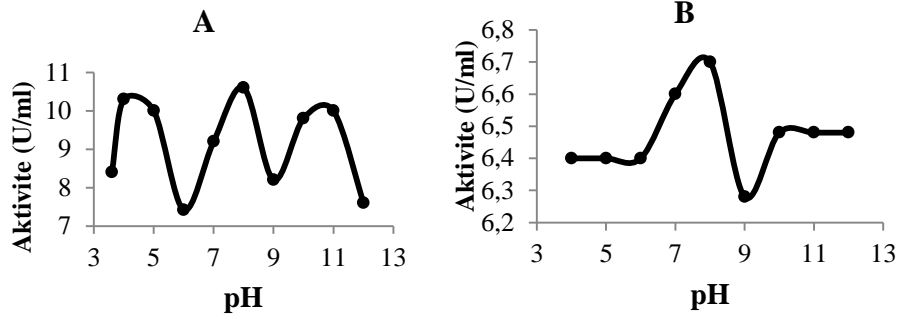
İki örnek hacmi etanol ile total protein çöktürme işlemi sonucunda her bir grafikte birden fazla aktivite pikinin görülmesi sebebiyle farklı hacimlerde etanol ve aseton ile diferansiyel çöktürme denendi ve sonra optimum pH ve sıcaklık taraması gerçekleştirildi.



Şekil 18 PG için 0,5 örnek hacmi etanol ile çöktürme sonucu elde edilen proteinlerle optimum pH (A) ve sıcaklık taraması (B).

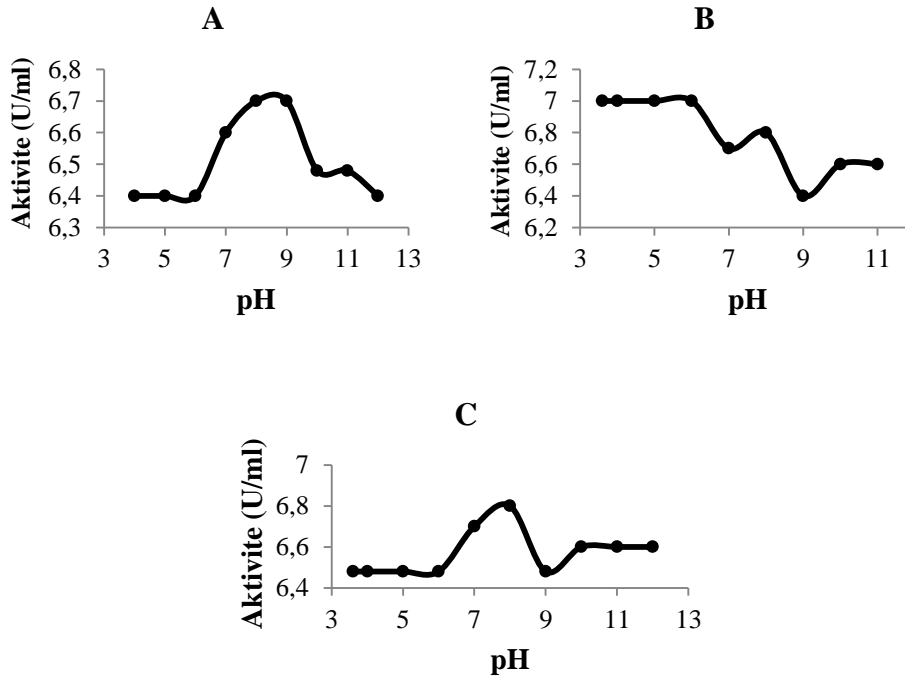
Süpernatana 0,5 hacim etanol eklenerek protein çöktürüldü. Reaksiyon karışımı farklı sıcaklıklarda inkübe edilerek DNS yöntemiyle 540nm'de absorbanslar ölçüldü aktivite hesabı yapıldı (Şekil 18). PG'ın 30°C'de optimum aktivite gösterdiği

belirlendi (Şekil 18B). Ardından enzim ve substrat farklı pH'larda hazırlanarak 30°C'de inkübe edildi. Sonrasında pH5 ve pH7'de iki, aktivite piki elde edildi (Şekil 18A).



Şekil 19 PG (A) 0,6 hacim (B) 0,75 hacim etanolle çöktürme sonucunda elde edilen toplam protein ile optimum pH'nın belirlenmesi.

Süpernatana 0,6 hacim etanol eklenerek protein çöktürüldü ve farklı pH'larda aktivite ölçümü gerçekleştirildi. PG için pH5, pH8 ve pH11'de olmak üzere üç farklı pik belirlendi (Şekil 19A). Süpernatana 0,75 hacim etanol eklenerek protein çöktürüldü. Farklı pH'larda aktivite ölçümleri gerçekleştirildi ve pH8'de bir pik elde edildi (Şekil 19B).

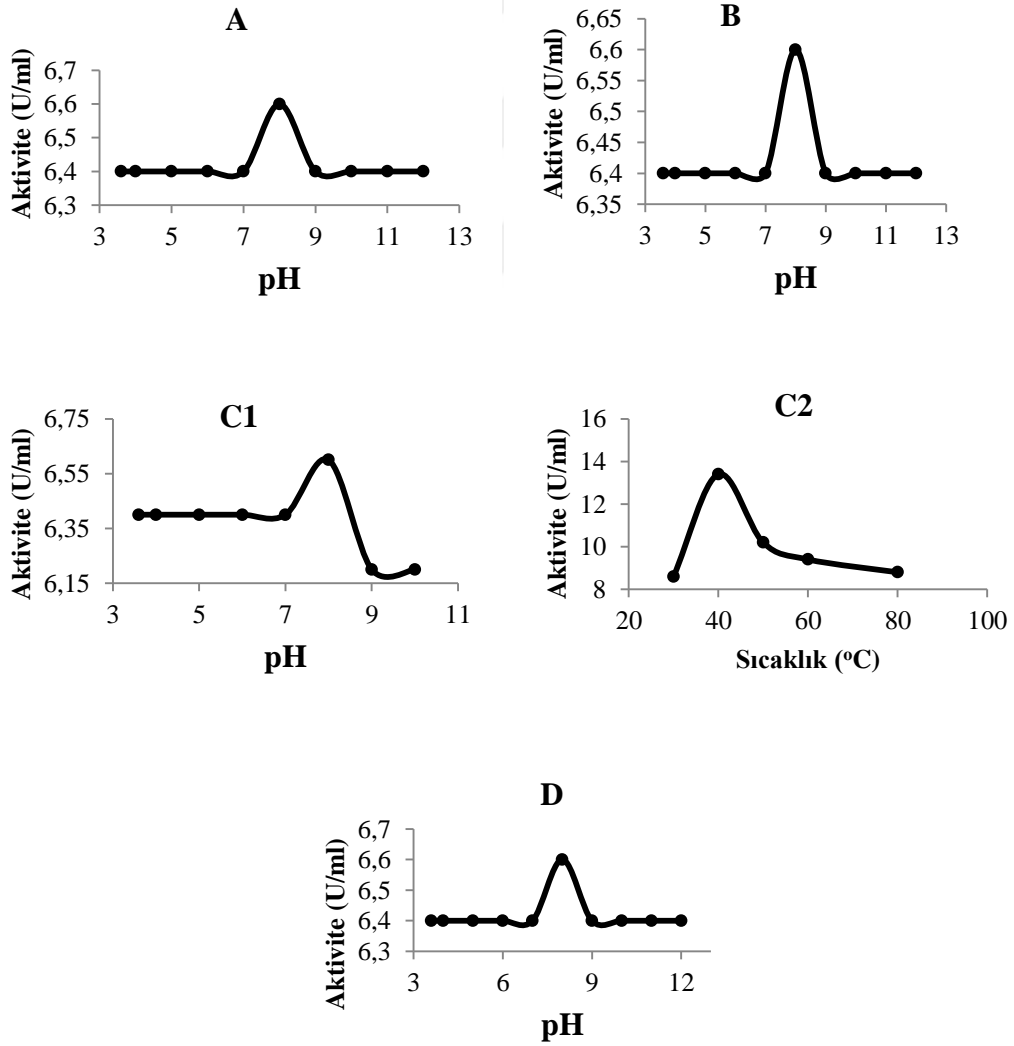


Şekil 20 PG (A) 1 (B) 1,25 (C) 1,75 hacim etanolle çöktürme sonucunda optimum pH taraması.

Süpernatana eşit hacimde etanol eklenerek toplam protein çöktürüldü. Farklı pH'larda aktivite hesabı yapıldı. Enzimin eşit hacimde etanolle çöktürülmesi sonucunda pH 8,5'da bir pik elde edildi (Şekil 20A). PG, 1,25 hacim etanolle çöktürme sonucunda anlamlı bir aktivite eğrisi izleyemezken (Şekil 20B), 1,75 hacim etanolle çöktürme sonucunda ilkinde (A) benzeyen bir aktivite sergiledi (Şekil 20C).

3.7.1.3 Farklı aseton hacimlerinde çöktürme

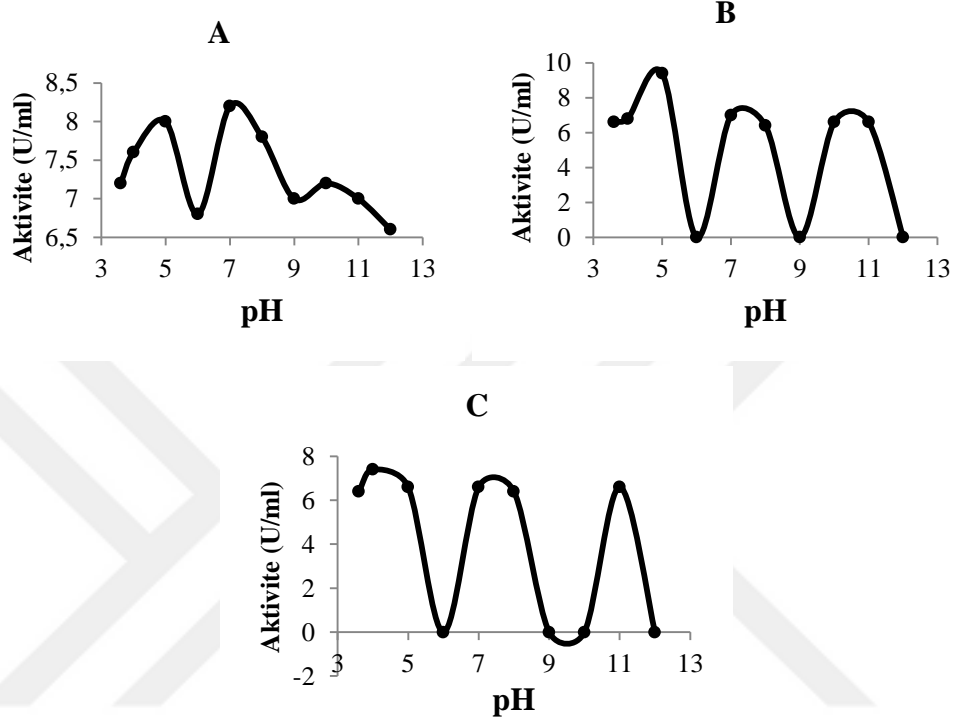
Süpernatana farklı hacimlerde aseton eklenerek protein çöktürüldü. Farklı pH'larda aktiviteler ölçüldü (Şekil 21). Dört farklı hacimde çöktürme işleminde elde edilen toplam protein örneğinde de PG tek pik (pH8) verdi ve bu piklerde aktivite değeri yaklaşık aynı idi (6,6 U/ml). Ayrıca pH8'de optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi.



Şekil 21 PG (A) 0,5 hacim aseton, (B) eşit hacim aseton, (C1) 1,25 hacim aseton pH ve (C2) sıcaklık, (D) 1,75 hacim aseton ile çöktürme sonucu optimum pH taraması.

3.7.1.4 Aseton ve etanol ile çöktürme

Süpernatana 0,25 hacim aseton ve 0,25 hacim etanol eklenerek protein çöktürüldü ve farklı pH'larda aktivite ölçüldü (Şekil 22A). Üç farklı pik, pH 5, pH 7 ve pH 10'da, belirlendi.



Şekil 22 PG (A) 0,25 hacim etanol ve 0,25 hacim aseton, (B) 0,5 hacim etanol ve 0,5 hacim aseton, (C) 0,5 hacim etanol ve eşit hacim aseton ile çöktürme sonucu pH taraması.

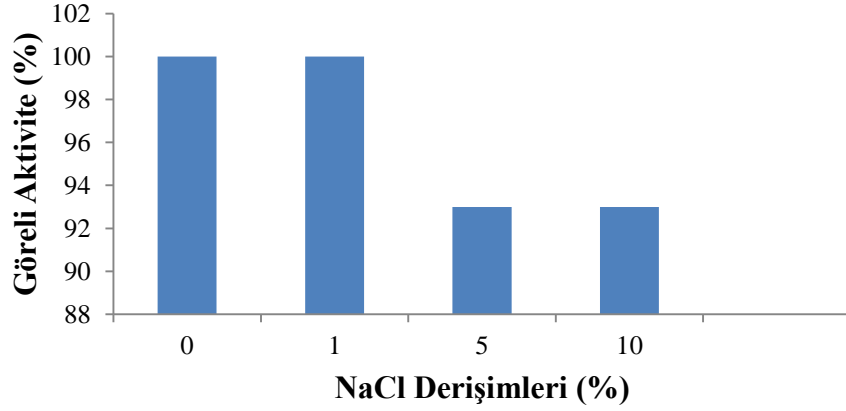
Süpernatana 0,5 hacim aseton ve 0,5 hacim etanol eklenerek protein çöktürüldü ve farklı pH'larda aktivite ölçüldü (Şekil 22B). Aktivite pikleri pH5, yaklaşık pH7,3 ve yaklaşık pH10,5'da görüldü.

Süpernatana eşit hacim aseton ve 0,5 hacim etanol eklenerek protein çöktürüldü ve farklı pH'larda aktivite ölçüldü (Şekil 22C). Aktivite pikleri yaklaşık pH4, pH7,5 ve pH11'de belirlendi.

3.7.1.5 İyonik kuvvet etkisi

Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren %1 PGA ve enzim çözeltileri hazırlandı. Optimum koşullarda aktivite ölçümü gerçekleştirildi. NaCl içermeyen ortam kontrol grubu olarak kullanıldı. NaCl (%1) içeren ortamdaki aktivite kontrol grubuyla aynı

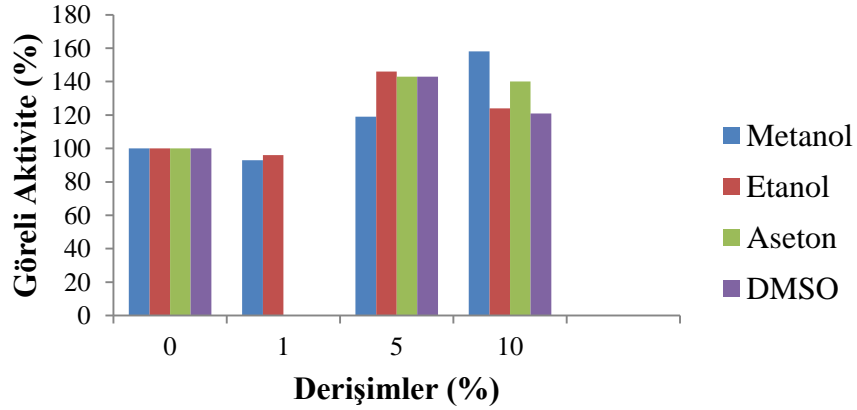
olduğu belirlendi. NaCl (%5 ve %10) içeren ortamlarda ise sadece %7'lik bir aktivite kaybı görüldü (Şekil 23).



Şekil 23 PG iyonik kuvvet etkisi.

3.7.1.6 Organik çözücü etkisi

Reaksiyon ortamına %1, %5 ve %10 (v/v) metanol, etanol, aseton ve DMSO eklenerek optimum koşullarda aktivite ölçümü gerçekleştirildi. Organik çözücü içermeyen grup kontrol olarak kullanıldı. Yüzde bir derişimde, metanol ve etanol içeren ortamlarda kaydadeğer bir aktivite kaybı görülmezken aseton ve DMSO içeren ortamlarda aktivite görülmedi.

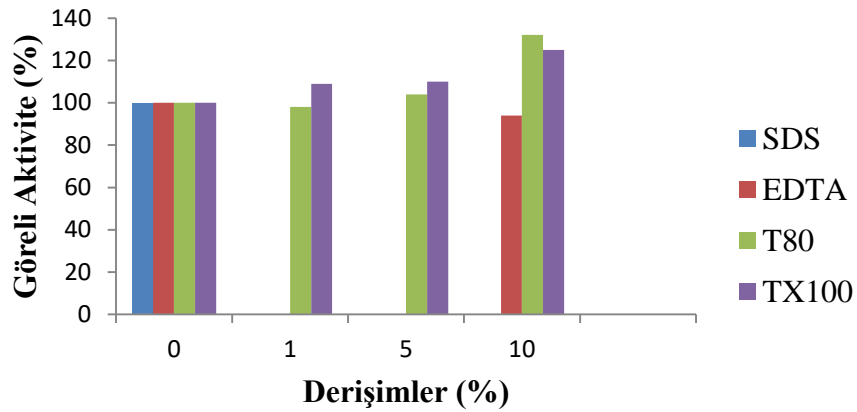


Şekil 24 PG organik çözücü etkisi.

Yüzde beş ve yüzde on organik çözücü içeren ortamda kontrol grubuna göre tüm çözücülerde aktivite artışı görüldü (Şekil 24).

3.7.1.7 Kimyasal reaktiflerin etkisi

Reaksiyon ortamına %1, %5 ve %10 derişimlerinde SDS, EDTA, Tween-80 ve Triton-X100 eklenerek optimum koşullarda aktivite ölçüldü. SDS (%1) ve EDTA (%5) içeren örneklerde aktivite görülmeydi; ancak, Tween-80 ve triton-X100 içeren ortamlarda aktivite artışı belirlendi. Yüzde on kimyasal reaktif içeren örneklerde ise Tween-80 ve Triton-X100'de, %5'e oranla, artış görüldü. EDTA %1 ve %5 derişimlerinde enzimi inhibe ederken %10 derişiminde aktivite görüldü (Şekil 25).

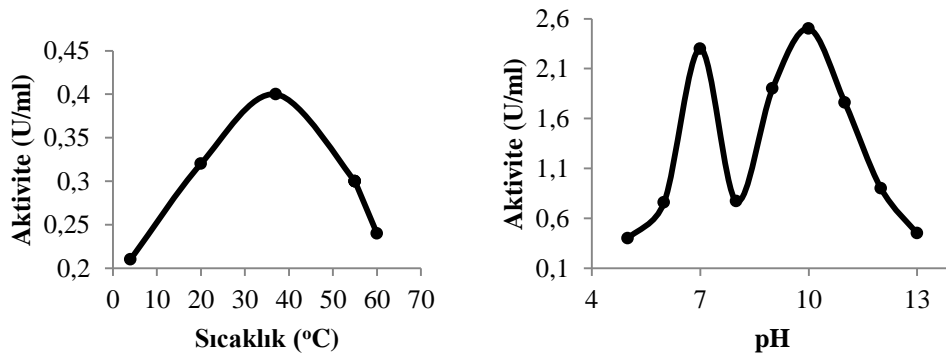


Şekil 25 PG kimyasal reaktif etkisi.

3.7.2 Pektin liyaz (PL)

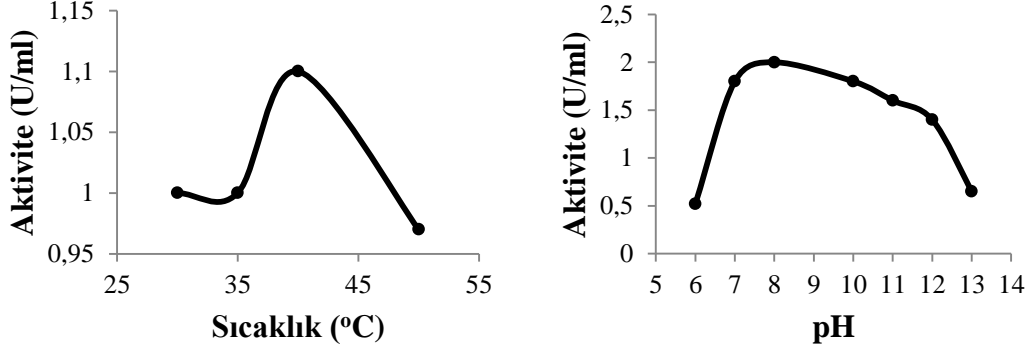
Pektin liyaz aktivitesi 235 nm'de absorbans ölçümüne dayalı olarak hesaplandı.

3.7.2.1 Optimum pH ve sıcaklık



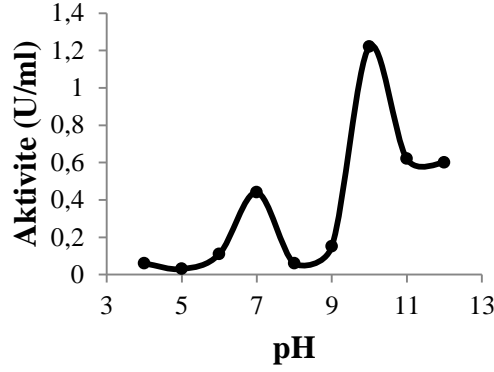
Şekil 26 PL iki hacim etanol ile çöktürme sonucu optimum koşulların taranması.

Süpernatana iki hacim etanol eklenerek proteinler çöktürüldü. Reaksiyon karışımı farklı sıcaklıklarda inkübe edilerek aktivite ölçüldü ve 37°C optimum sıcaklık olarak belirlendi. Optimum sıcaklıkta farklı pH'larda aktivite ölçülerek pH optimumu 7 ve 10 olarak belirlendi (Şekil 26).



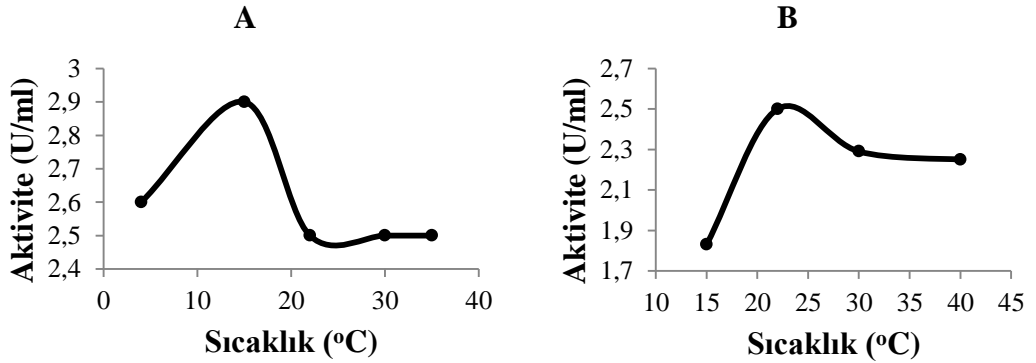
Şekil 27 PL 0,5 hacim etanol ile çöktürme sonucu optimum koşulların taraması.

Süpernatana 0,5 hacim etanol eklenerek proteinler çöktürüldü ve farklı sıcaklıklarda aktivite ölçüldü. Optimum sıcaklık 40°C olarak belirlendi. Ardından optimum sıcaklıkta farklı pH'larda aktivite ölçüldü. Aktivite piki pH8'de kaydedildi.



Şekil 28 PL 1,25 hacim aseton ile çöktürme sonucu optimum pH taraması.

Süpernatana 1,25 hacim aseton eklenerek proteinler çöktürüldü ve farklı pH'larda aktivite ölçüldü (Şekil 28). Aktivite pikleri pH 7 ve pH 10'da görüldü.

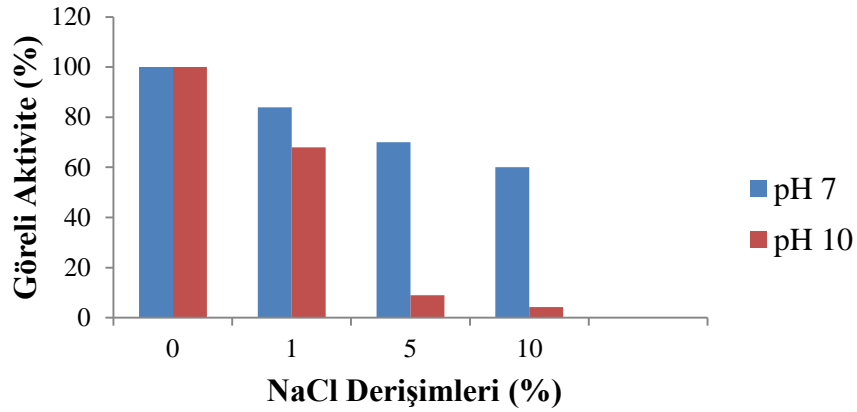


Şekil 29 PL 1,25 hacim aseton ile çöktürme sonucu (A) pH 7'de ve (B) pH 10'da optimum sıcaklık taraması.

Aseton (1,25 hacim) ile çöktürme sonucunda optimum pH7 ve pH 10'da aktiviteler belirlendiği için bu iki pH'da sıcaklık taraması gerçekleştirildi. Aktivite pikleri 15°C'de pH7'de ve 22°C'de pH 10'da görüldü (Şekil 29).

3.7.2.2 İyonik kuvvet etkisi

Farklı NaCl içeren ortamlarda ve optimum koşullarda aktiviteler ölçüldü.

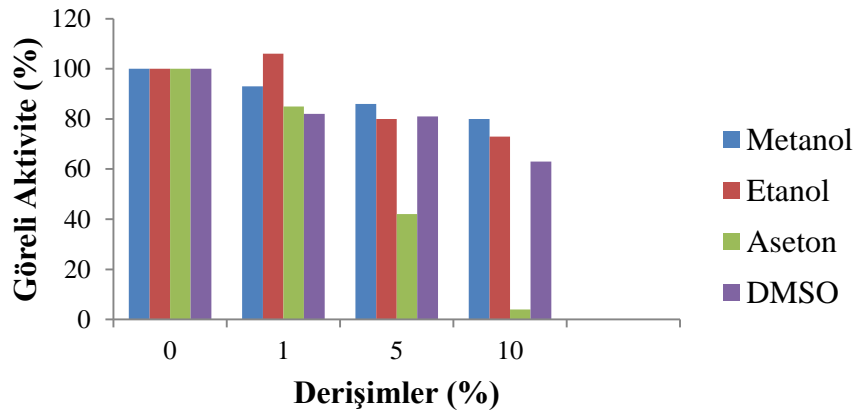


Şekil 30 PL iyonik kuvvet etkisi.

pH7'de %1 NaCl içeren ortamda %84 aktivite, %5 NaCl içeren ortamda %70 aktivite, %10 NaCl içeren ortamda %60 aktivite olduğu görüldü. pH10'da ise %1 NaCl içeren ortamda %68 aktivite görülürken %5 ve %10 NaCl içeren ortamlarda aktivite hemen hemen kayboldu.

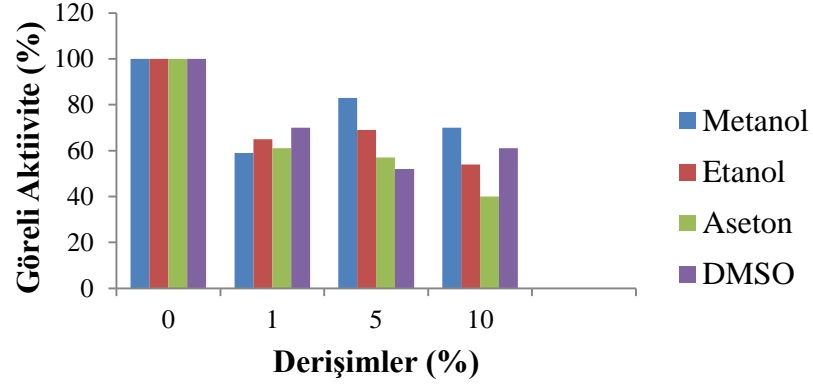
3.7.2.3 Organik çözücü etkisi

PL için iki farklı optimum pH olduğu için bu iki pH'da da organik çözücülerin etkisi araştırıldı.



Şekil 31 PL pH 7'de organik çözücü etkisi

pH 7’de %1 etanol içeren ortamda aktivitenin görel olarak %6 arttığı belirlenmiştir. Diğer tüm organik çözücülerde artan derişime bağı olarak aktivite kaybı görülmüştür. Ancak asetonun %10 derişiminde enzimin neredeyse tamamen inhibe olduğı belirlenmiştir (Şekil 31).

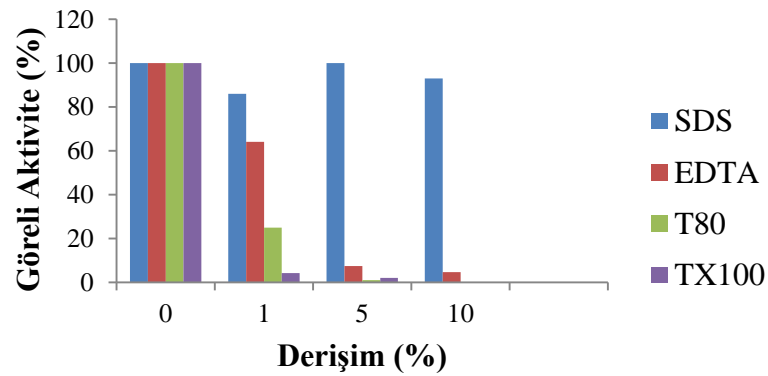


Şekil 32 PL pH 10’da organik çözücü etkisi.

pH10’da %1 ve % 10 metanol içeren ortamlarda sırasıyla %35 ve %30 aktivite kaybı görülürken, %5 metanol içeren ortamda %17 aktivite kaybı olduğı görüldü. Diğer organik çözücülerde ise artan derişime bağı olarak aktivitelerin düştüğü belirlendi (Şekil 32).

3.7.2.4 Kimyasal reaktiflerin etkisi

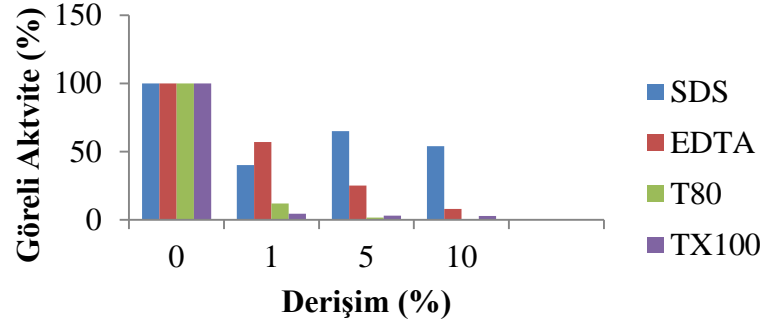
PL için iki farklı optimum pH olduğı için bu iki pH’da da kimyasal reaktiflerin etkisi araştırıldı.



Şekil 33 PL pH 7’de kimyasal reaktif etkisi.

pH7’de %1 ve %10 SDS içeren ortamlarda sırasıyla %14 ve %7 aktivite kaybı görülürken, %5 SDS içeren ortamda herhangi bir aktivite kaybı görülmedi. Diğer

kimyasalların ortamdaki artan derişimlerine baęlı olarak aktiviteyi dūřurdūęu belirlendi.



Şekil 34 PL pH 10'da kimyasal reaktif etkisi.

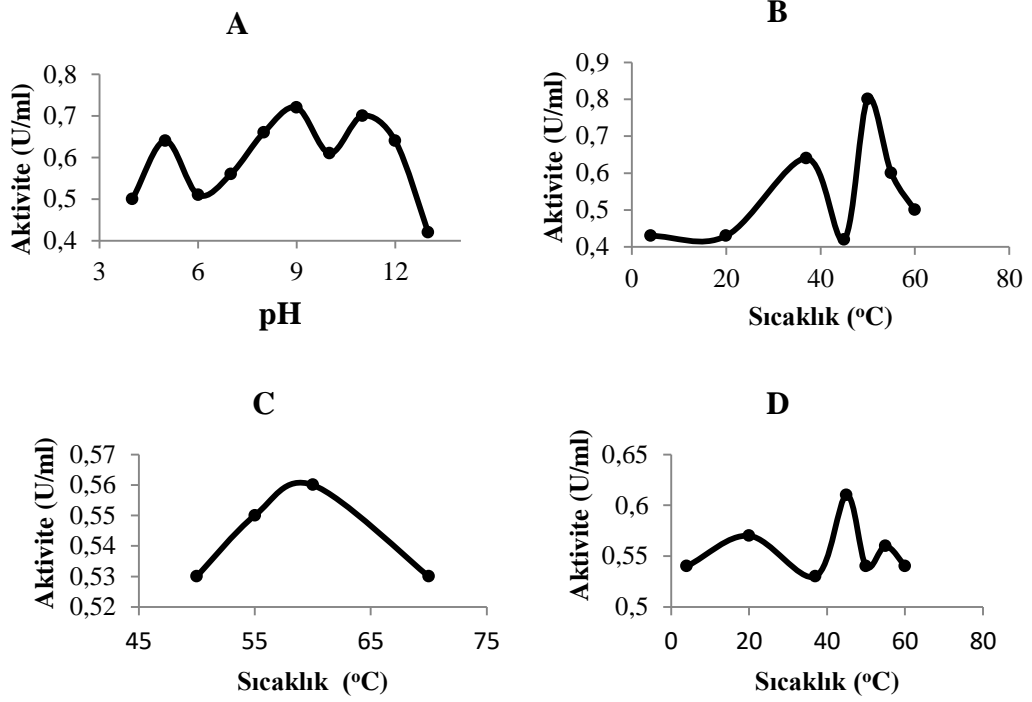
Triton X100 pH10'da PL'ı neredeyse tamamen ederken %5 SDS %35'lik bir aktivite kaybına neden oldu (Şekil 34).

3.7.3 Pektat liyaz (PGL)

Pektat liyaz aktivitesi tıpkı PL'de olduğu gibi 235nm'de absorbands ölçümüne dayalı olarak hesaplandı.

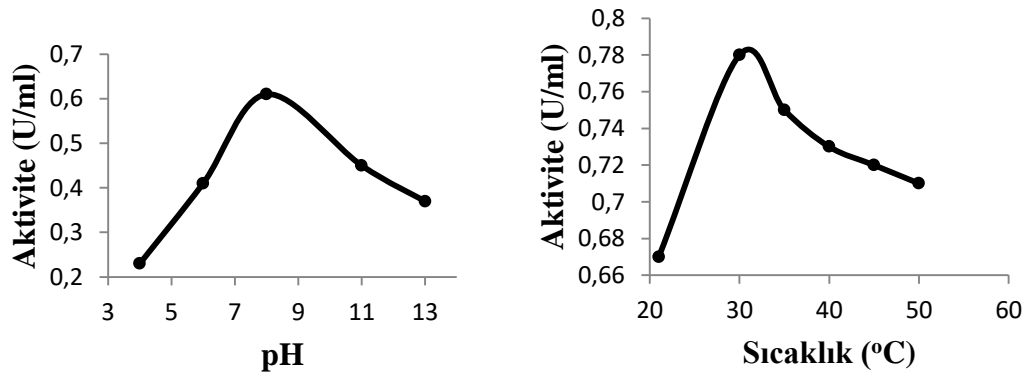
3.7.3.1 Optimum sıcaklık ve pH

Süpernatana iki hacim etanol eklenerek proteinler çöktürüldü. Farklı pH ve sıcaklıklarda aktiviteler ölçülerek kaydedildi.



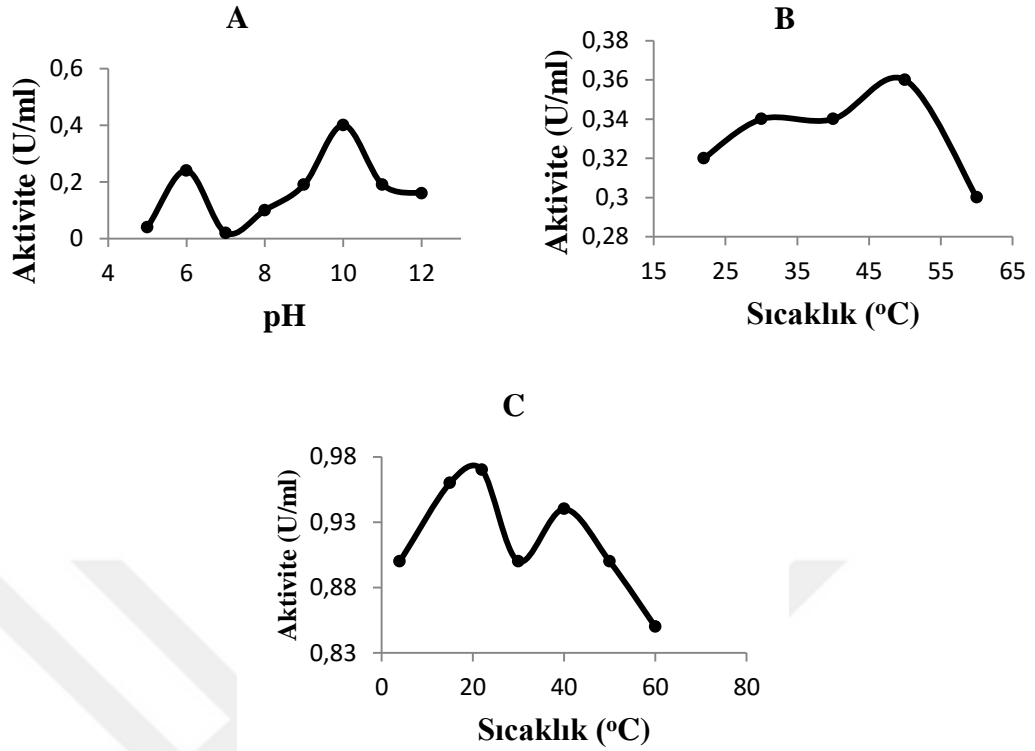
Şekil 35 PGL ile iki hacim etanol ile çöktürme sonucu (A) optimum pH, (B) pH 5'te optimum sıcaklık, (C) pH 9'da optimum sıcaklık ve (D) pH 11'de optimum sıcaklık taraması.

Farklı pH'larda (5, 9 ve 11) aktivite pikleri saptandı. Bu üç pH için de ayrı ayrı farklı sıcaklıklarda aktivite ölçüldü: pH 5'te 37°C ve 50°C, pH 9'da 60°C ve pH 11'de 20°C, 45°C ve 55°C optimum sıcaklıklar olarak belirlendi (Şekil 35).



Şekil 36 PGL 0,5 hacim etanol ile çöktürme sonucu optimum koşulların taraması.

Süpernatana 0,5 hacim etanol eklenerek proteinler çöktürüldü. Farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite ölçüldü ve PGL'nin pH8, 30°C'de optimum aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 36).

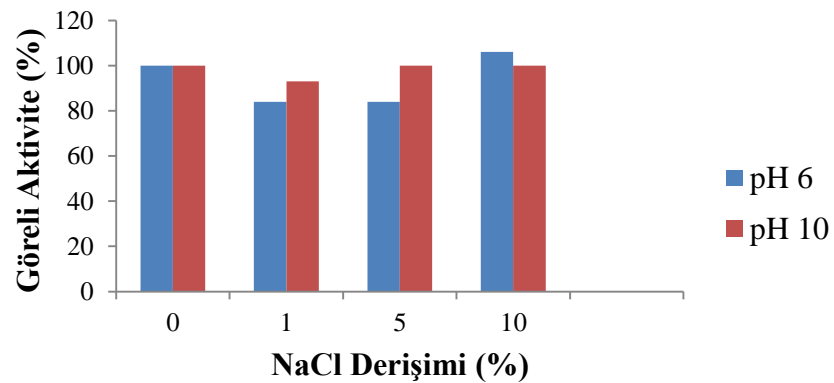


Şekil 37 PGL ile 1,25 hacim asetonla çöktürme sonucunda (A) optimum pH, (B) pH 6'da optimum sıcaklık ve (C) pH 10'da optimum sıcaklık taraması.

Süpernatana 1,25 hacim aseton eklenerek proteinler çöktürüldü. Farklı pH'larda aktiviteler ölçülerek aktivite pikleri pH6 ve pH10'da belirlendi. Bu nedenle her iki pH'da da optimum sıcaklık taraması gerçekleştirildi. pH6'da 30°C ve 50°C, pH10'da 22°C ve 40°C optimum sıcaklık olarak belirlendi (Şekil 37).

3.7.3.2 İyonik kuvvet etkisi

Farklı derişimlerde NaCl içeren ortamlarda pH6 ve pH10'da PGL aktivitesi ölçüldü.

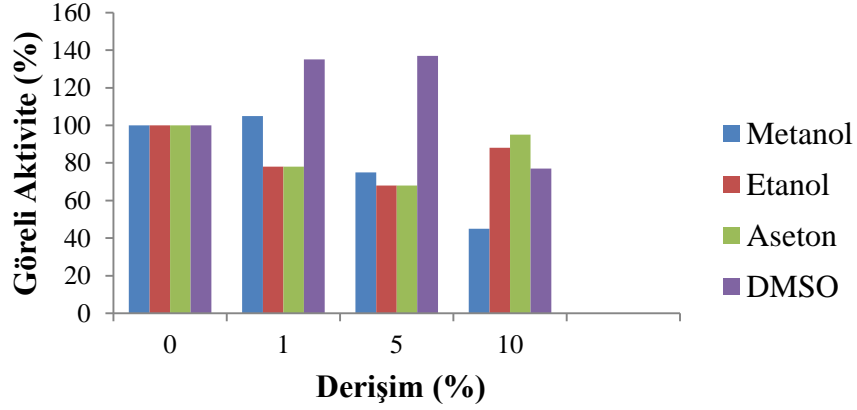


Şekil 38 PGL'a iyonik kuvvet etkisi.

Her iki pH'da da %1 NaCl içeren ortamda aktivite bir miktar azalsa da artan NaCl derişimlerinde optimum aktiviteye yaklaşan değerler kaydedildi (Şekil 38).

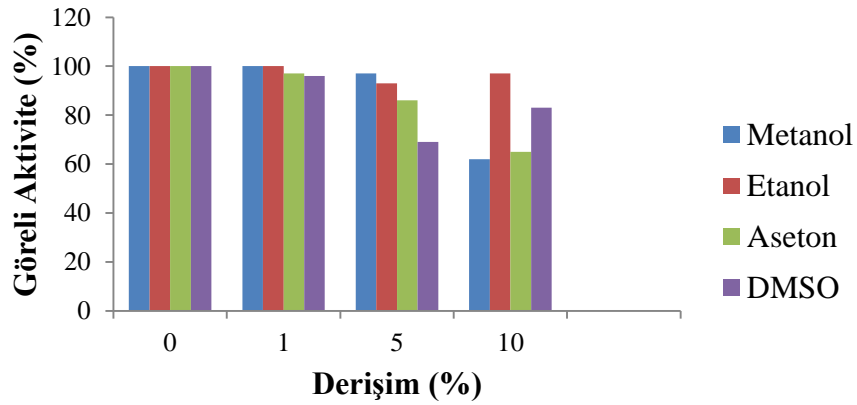
3.7.3.3 Organik çözücü etkisi

PGL aktivitesine organik çözücülerin etkisi pH6 ve pH10'da araştırıldı.



Şekil 39 PGL üzerine pH6'da organik çözücü etkisi.

Metanolün artan derişimine bağılı olarak pH6'da aktivitenin azaldığı görüldü. DMSO %1 ve %5 derişimlerinde aktiviteyi artırırken %10 derişiminde düşürmeye başladı. Metanol de artan derişime bağılı olarak aktiviteyi düşürdü. Etanol ve aseton %1 ve %5 derişimde aktiviteyi düşürse de %10 derişimde daha yüksek aktiviteye yol açtı. (Şekil 39).

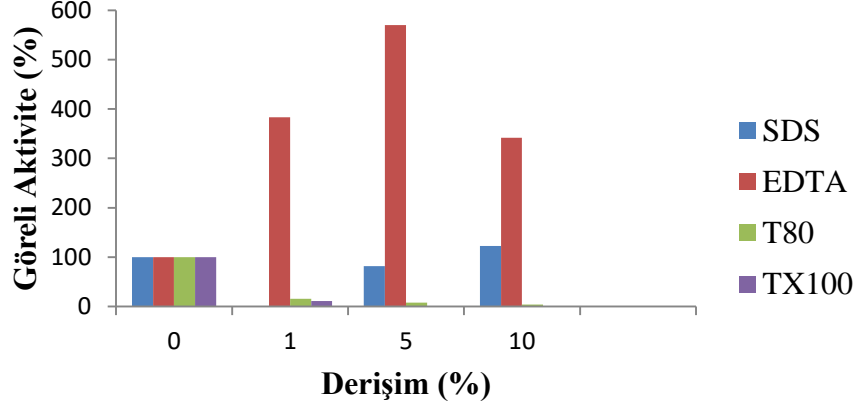


Şekil 40 PGL üzerine pH10'da organik çözücü etkisi.

Organik çözücüler pH10'da %1 derişimde aktiviteyi çok fazla etkilemedi. Etanol ve DMSO %5 derişimde aktiviteyi bir miktar düşürürken, %10 derişimde düşürmedi (Şekil 40).

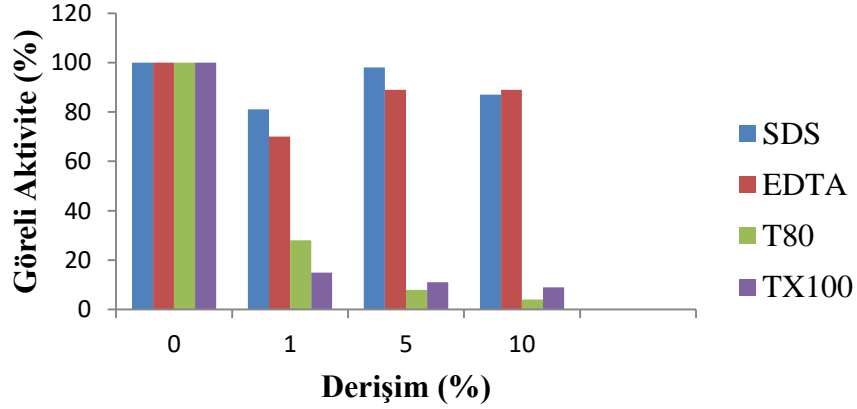
3.7.3.4 Kimyasal reaktif etkisi

PGL aktivitesi, pH6 ve pH10'da, farklı derişimlerde kimyasal reaktif içeren ortamlarda ölçüldü.



Şekil 41 PGL üzerine pH6'da kimyasal reaktif etkisi.

EDTA ve %10 SDS'nin pH6'da aktiviteyi arttırdı (Şekil 41) ve pH10'da sadece %10'luk bir aktivite düşüşüne sebep oldu (Şekil 42). Diğer kimyasal reaktiflerin ise PGL'ı her iki pH noktasında da neredeyse inhibe ettiği görüldü.



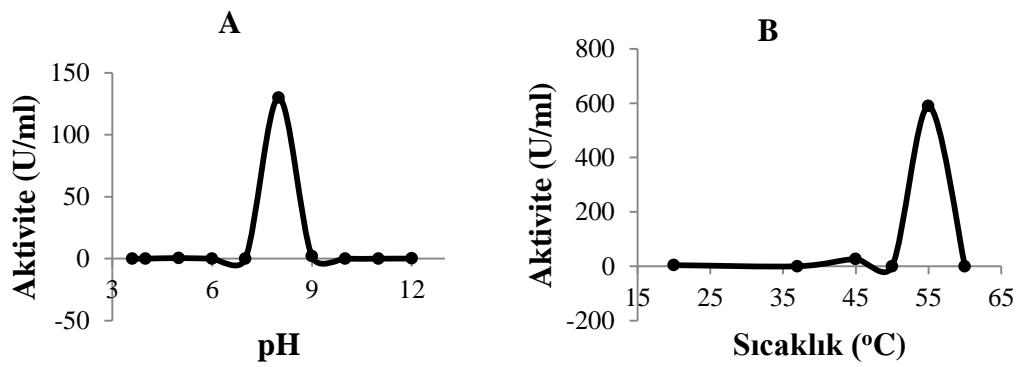
Şekil 42 PGL üzerine pH10'da kimyasal reaktif etkisi.

3.7.4 Pektin metilesteraz (PME)

Pektin metilesteraz aktivitesi, titrasyon yöntemi ile ölçüldü. Bunun için 0,01M NaOH kullanıldı. pH'ı sabit tutmak için gerekli NaOH miktarı belirlenerek aktiviteler hesaplandı

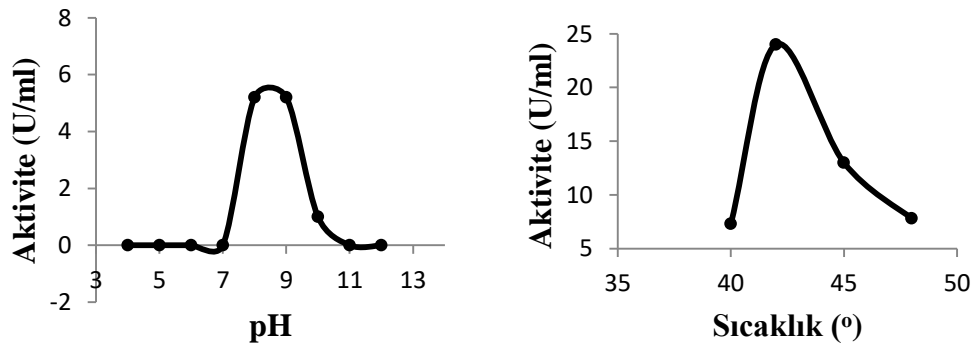
3.7.4.1 Optimum pH ve sıcaklık

Süpernatana iki hacim etanol eklenerek proteinler çöktürüldü. Farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite ölçüldü ve pH8, 55°C optimum olarak belirlendi (Şekil 43).

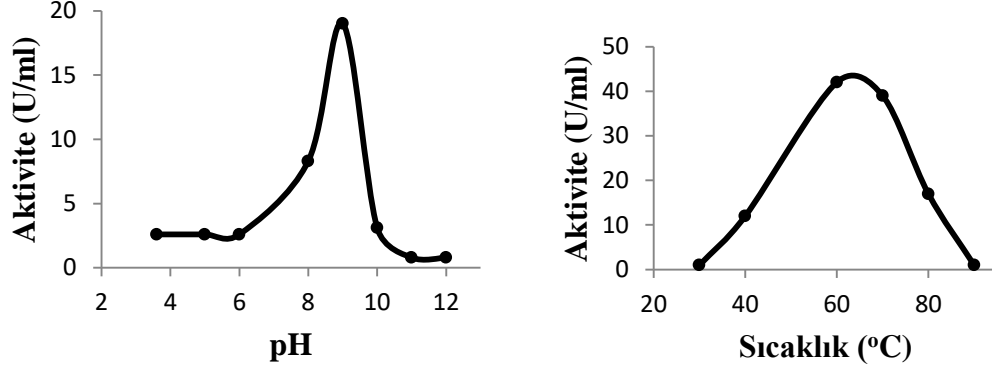


Şekil 43 PME ile iki hacim etanol ile çöktürme sonucu (A) optimum pH ve (B) optimum sıcaklık taraması.

Süpernatana 0,5 hacim etanol eklenerek proteinler çöktürüldü. Farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite ölçüldü. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8,5 ve 42°C olarak belirlendi (Şekil 44).



Şekil 44 PME için 0,5 hacim etanol ile çöktürme sonucu (A) optimum pH ve (B) optimum sıcaklık taraması.

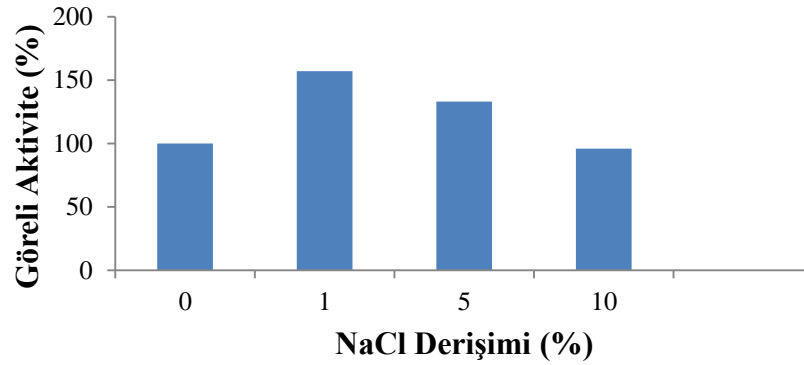


Şekil 45 PME için 1,25 hacim aseton ile çöktürme sonucu (A) optimum pH ve (B) optimum sıcaklık taraması.

Süpernatana 1,25 hacim aseton eklenerek proteinler çöktürüldü. Farklı pH ve sıcaklıklarda aktivite ölçüldü. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla pH9 ve 60°C olarak belirlendi (Şekil 45).

3.7.4.2 İyonik kuvvet etkisi

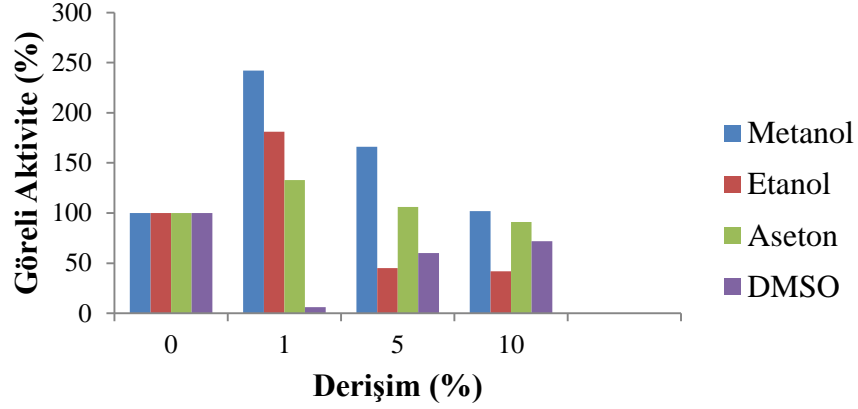
Farklı NaCl içeren ortamlarda, optimum koşullarda PME aktivitesi ölçüldü. Aktivitenin %1 NaCl'de %157, %5 NaCl'de %133 ve %10 NaCl'de %96 olduğu belirlendi (Şekil 46).



Şekil 46 PME üzerine iyonik kuvvet etkisi.

3.7.4.3 Organik çözücü etkisi

Optimum koşullarda, farklı derişimlerde organik çözücülerin PME aktivitesine etkisi araştırıldı.

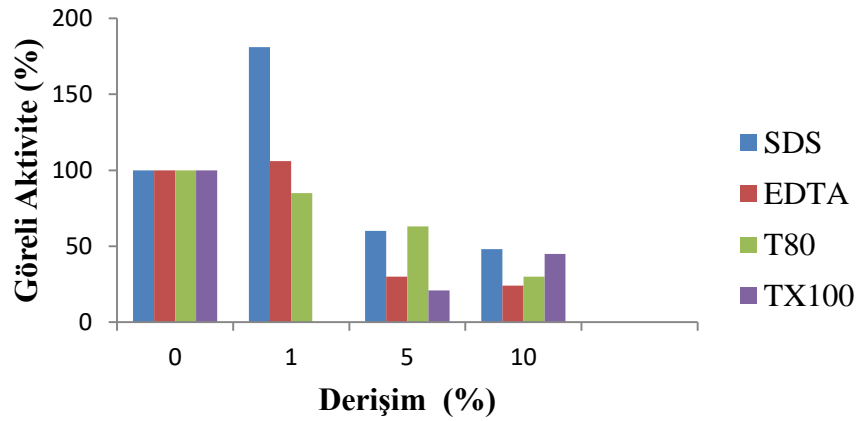


Şekil 47 PME organik çözücü etkisi.

Metanol, etanol ve asetonun %1'lik derişimleri aktiviteyi artırırken, artan derişimlere paralel olarak aktiviteyi düşürdüğü görüldü. Bunun aksine, DMSO %1 derişimde enzimi inhibe ederken, artan derişimlerde aktiviteyi arttırdı (Şekil 47).

3.7.4.4 Kimyasal reaktif etkisi

Optimum koşullarda, farklı derişimlerde kimyasal reaktiflerin PME aktivitesine etkisi araştırıldı.

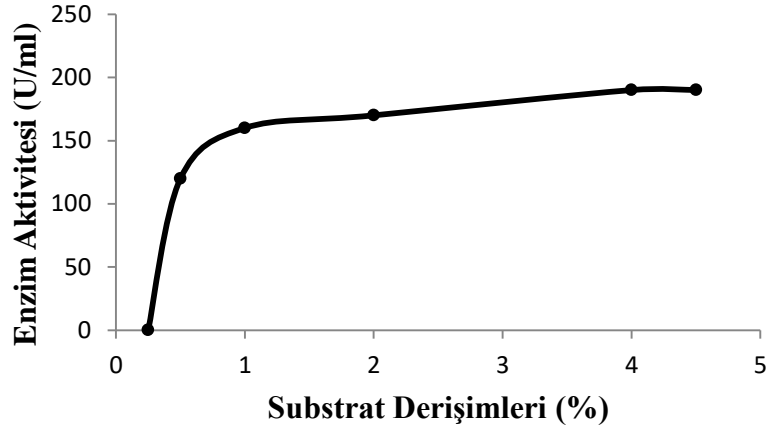


Şekil 48 PME üzerine kimyasal reaktif etkisi.

SDS ve EDTA'nın %1'lik derişimlerinde aktivitenin arttığı ancak artan derişimlerinde azaldığı belirlendi. Tween-80'in artan derişimlerine bağlı olarak aktivitenin azaldığı ancak triton-X100'de artan derişimlerinde aktivitenin arttığı ve %10'luk derişiminde %45 aktivite olduğu görüldü (Şekil 48).

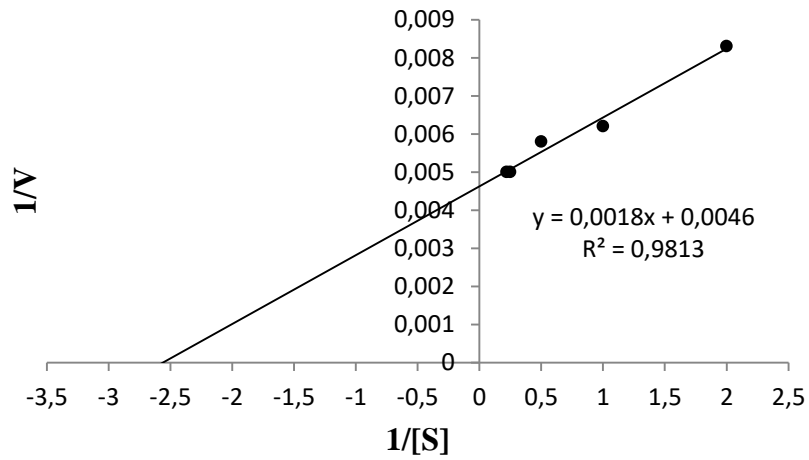
3.7.4.5 Kinetik çalışmalar

Optimum koşullarda, farklı substrat derişimlerinde aktivite ölçülerek Michaelis-Menten grafiği oluşturuldu (Şekil 49).



Şekil 49 PME Michaelis-Menten grafiği.

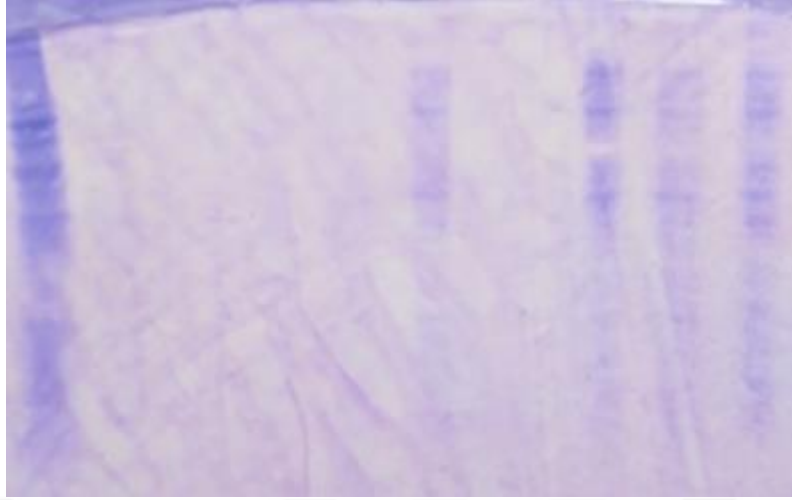
$1/V$ ve $1/[S]$ değerleri hesaplanarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturuldu. (Şekil 50). K_m 0,4 ve V_{max} 217 olarak bulundu.



Şekil 50 PME için Lineweaver-Burk grafiği.

3.8 Elektroforez ve Zimogram

3.8.1 SDS ve Nativ PAGE

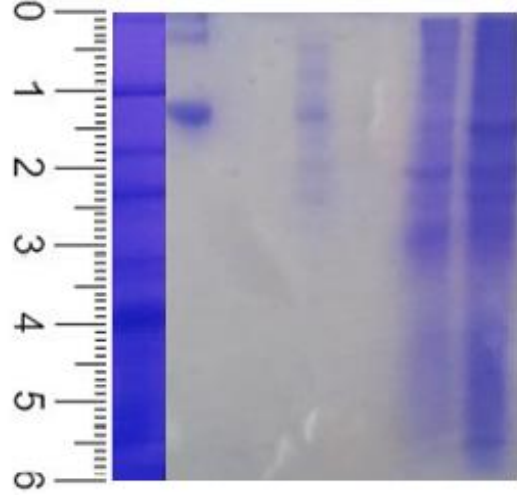


Şekil 51 SDS-PAGE %12'lik: Soldan birinci kuyucuğa 37°C'de büyütülen kültür süpernatanına iki hacim etanol eklenerek çöktürülen örnek yüklendi. Devam eden kuyucuklara, sırasıyla, 37°C'de büyütülen bakteriden alınan süpernatana %20, %25, %30, %35, %40, %45, %50, %55 ve %60 derişimlerinde amonyum sülfat eklenerek çöktürülen örnekler yüklendi.



Şekil 52 SDS-PAGE %12'lik: Soldan birinci kuyucuğa %65 ve sırayla devam eden kuyucuklara %70, %75, %80, %85, %90, %95 ve %100 derişimlerinde amonyum sülfat eklenerek çöktürülen proteinler yüklendi.

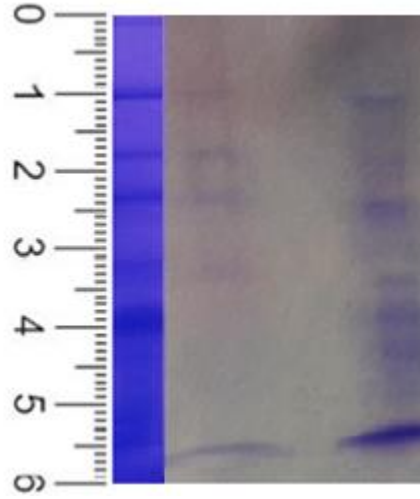
175 kDA
80 kDA
58 kDA
46 kDA
30 kDA
25 kDA
17 kDA
7 kDA



(A)

(B)

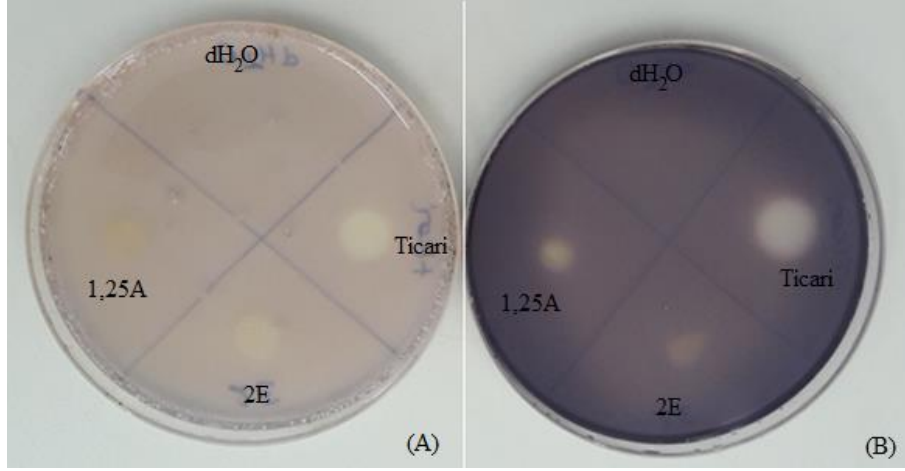
Şekil 53 SDS-PAGE %8'lik: Birinci (mavi) kuyucukta ticari marker bulunmaktadır. İkinci kuyucuğa BSA, dördüncü kuyucuğa ticari pektinaz, altıncı kuyucuğa 45°C'de büyütülen kültür süpernatantına iki hacim etanol eklenerek çöktürülen örnek, yedinci kuyucuğa ise 50°C'de büyütülen kültürden elde edilen örnek yüklendi (Şekil 53B). Ticari marker ve moleküler ağırlığı solda verildi (Şekil 53A).



Şekil 54 SDS-PAGE %8'lik: Solda birinci kuyucukta ticari marker bulunmaktadır. İkinci kuyucuğa 55°C'de büyütülen kültür süpernatantına iki hacim etanol eklenerek çöktürülen örnek, dördüncü kuyucuğa ise 50°C'de büyütülen kültürden hazırlanan örnek yüklendi.

3.8.2 Zimogram

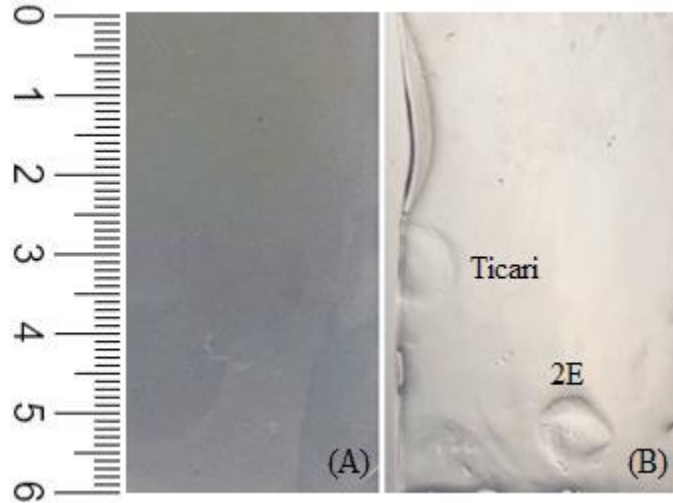
3.8.2.1 Agaroz jelde enzim aktivitesi



Şekil 55 %1 PGA (A) ve %1 pektin (B) içeren agarozlarda enzim aktivitesinin belirlenmesi.

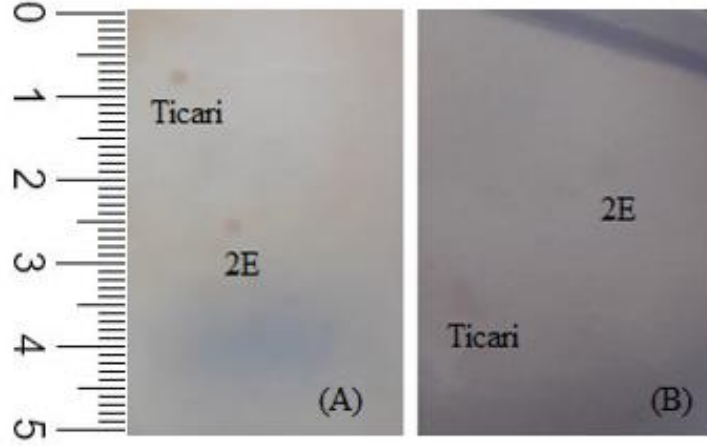
Distile suda 10mg/ml derişiminde ticari pektinaz solüsyonu ile 2 hacim etanol ve 1,25 hacim aseton ile çöktürülen proteinlerin solüsyonları hazırlandı. Her bir örnekten 20µl ve kontrol olarak dH₂O damlatıldı. Bir gece 37°C’de inkübe edilerek iyodin çözeltisi ile boyandı. Su damlatılan bölgede bir değişim gözlenmez iken örnekler zon oluşturdu.

3.8.2.2 Zimogram

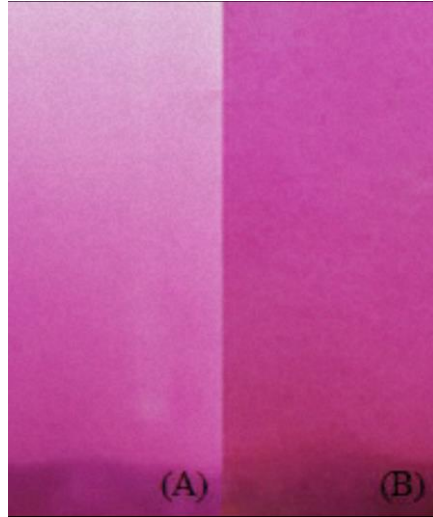


Şekil 56 Nativ-Jel %8: (A) %1 pektin (B) %1 PGA, pH9, 50°C; %1’lik pektin (pH 9) çözeltisine, (B)’deki jel %1’lik PGA (pH 9) çözeltisine koyularak 50°C’de bir gece inkübe edildi. Distile su ile yıkandıktan sonra %1’lik CTAB çözeltisinde 5dk bekletildi.

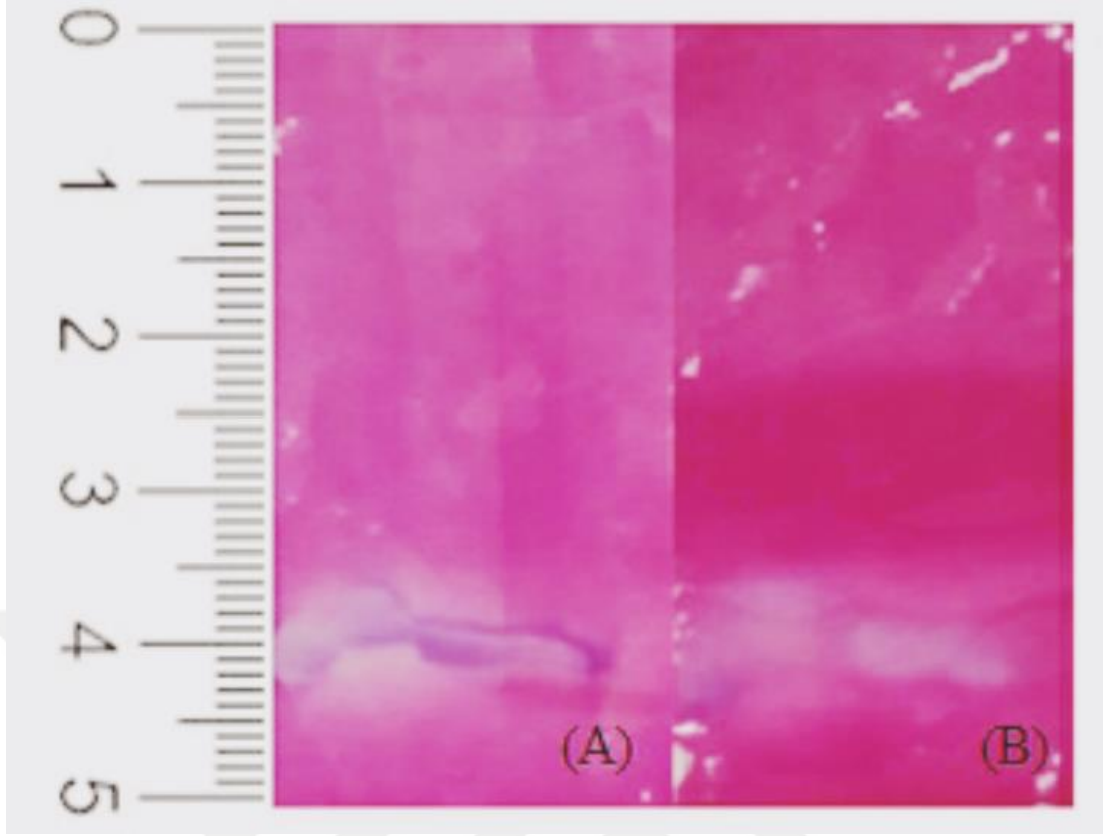
(A)'da herhangi bir zon gözlenmez iken (B)'de birinci kuyucukta ticari enzim 2,6-3,6 cm'ler arasında üçüncü kuyucukta 2 hacim etanol ile çöktürülen örnek (2E) 4,8 ile 5,7 cm'ler arasında zon oluşturdu.



Şekil 57 Nativ jel %8'lik: (A) %1 PGA (B) %1 pektin, 37°C. (A)'daki jel %1 PGA (B)'deki jel %1 pektin içeren agaroz jel ile üst üste konularak 37°C'de bir gece inkübe edildi ardından iyodin çözeltisi ile boyandı ve su ile yıkandı. (A)'da ticari pektinaz 0,8 cm'de 2E kodlu enzim 2,6 cm'de zon oluşturdu. (B)'de ticari enzim 3,5 cm'de 2E kodlu enzim 1,9 cm'de zon oluşturdu.



Şekil 58 Nativ jel %8'lik, pH8, ticari enzim: %0,1 pektin içeren %8'lik nativ jeller hazırlandı. Her jele ticari enzim yüklendi ve yürütüldü. Elektroforeden sonra (A) jeli 1s pH 8 Tris-HCl tamponunda 55 °C'de, (B) jeli oda sıcaklığında (20°C) inkübe edildi. Ardından %0,05'lik rutenyum kırmızısıyla +4°C'de bir gece boyamaya bırakıldı. Distile su ile fazla boya uzaklaştırıldı. Şekil 58 (A)'daki jelde (55°) zon oluşumu gözlenirken (B)'de gözlenmedi.



Şekil 59 Nativ jel %8'lik, pH 8, 55°C. İki %8'lik nativ jel hazırlandı (A)'da %0,1 pektin, (B)'de %0,1 PGA içeren jeller gösterilmektedir. Birinci, üçüncü ve beşinci kuyucuklara 2E kodlu örnek, ikinci kuyucuğa ticari enzim yüklenerek yürütüldü. Elektroforezden sonra jeller pH8 Tris-HCl tamponunda 55°C'de 1s inkübe edildi. Ardından %0,05'lik rutenyum kırmızısıyla +4°C'de bir gece boyamaya bırakıldı. Distile su ile fazla boya uzaklaştırıldı. Ticari enzim 3,8 cm'de 2E kodlu örnekler 4,1 cm'de zon oluşturdu.

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

4.1 *Bacillus clausii* İzolasyonu ve Ekstraselüler Enzim Taraması

Pektinazlar, bitkilerde bulunan pektini parçalayan enzim grubudur. Farklı meyvelerin içerdiği pektik madde yüzdeleri elma için %0,5-1,6 ,muz için %0,7-1,2, şeftali için %0,1-0,9, çilek için %0,6-0,7, kiraz için %0,2-0,5'tir (Jayani ve ark., 2005). Sivas'ta yetiştirme durumu ve içerdiği pektin miktarı göz önüne alınarak elma ile muamele olmuş toprakta pektinaz üreten bakterilerin olabileceği düşünüldü. Bu amaçla yaklaşık 50 yıllık elma bahçesinden toprak alınarak bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen 50 koloninin substratlı agarda pektinaz taraması yapılarak 16 izolatın pektinaz üreticisi olduğu belirlendi (Şekil 11,12). İzolatların fenotipik karakterizasyonu yapıldığında 55 °C'de üreme dışında her izolatın her testte aynı sonucu verdiği görüldü. E-4, E-9, E-15, E-29 kodlu izolatlar 55°C'de üreme göstermedi. MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile tür taraması yapıldığında 16 izolatın hepsinin *Bacillus clausii* olduğu görüldü. Materyal ve kimyasal olanaklarına göre 16 izolattan biri (E-14) seçilerek analizlere devam edildi. E-14'ten DNA izolasyonu yapılarak 16S rDNA dizilemesi yaptırıldı. Nükleotit dizisi BLAST'ta taratılarak eşleşmeler incelendi ve izolatın *Bacillus clausii* olduğu doğrulandı. *Bacillus clausii*'nin ekstraselüler enzimleri taranarak pektinaz, proteaz ve amilaz da ürettiği belirlendi.

4.2 Pektinaz Aktivite Ölçümleri

Pektinazlar hidrolaz, liyaz ve esteraz aktivitesine sahip enzimlerdir. Her biri farklı şekilde substratlarına etki etmektedir. İzole edilen *Bacillus clausii*'nin hangi pektinazı ürettiği bilinmediği için tüm enzimler için aktivite ölçüm yöntemleri denendi.

Tablo 5 Enzimlerin farklı çöktürmeler sonucunda çalışma koşulları

	PG		PL		PGL		PME	
	pH	Sıcaklık (°C)	pH	Sıcaklık (°C)	pH	Sıcaklık (°C)	pH	Sıcaklık (°C)
2V Etanol	5, 7, 11,5 5, 9, 12 5, 9, 12	20 50 60	7, 10	37	5 9 11	37, 50 60 20, 45, 55	8	55
0,5V Etanol	5, 7	30	8	40	8	30	8,5	42
0,6V Etanol	5, 8, 11							
0,75V Etanol	8							
V Etanol	8,5							
1,75V Etanol	8							
0,5V Aseton	8							
V Aseton	8							
1,25V Aseton	8	40	7 10	15 22	6 10	30, 50 22, 40	9	60
1,75V Aseton	8							
0,25V Etanol + 0,25V Aseton	5, 7, 10							
0,5V Etanol + 0,5V Aseton	5, 7,3 , 10,5							
0,5V Etanol + V Aseton	4, 7,5 , 11							

Tablo 6 Farklı ortamların enzim aktivitesine göreceli olarak (%) etkisi

	İyonik Kuvvet			Organik Çözücüler									Kimyasal Reaktifler														
	NaCl			Metanol			Etanol			Aseton			DMSO			SDS			EDTA			Tween80			TritonX100		
Derişim (%)	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10	1	5	10
Enzim																											
PG pH8	100	93	93	93	119	158	96	146	124	0	143	140	0	143	121	0	0	0	0	0	94	98	104	132	109	110	125
PGL pH6 pH10	84 93	84 100	106 100	105 100	68 97	45 62	78 100	68 93	88 97	78 97	68 86	95 65	135 96	137 69	77 83	0 81	82 98	123 87	383 70	570 89	342 89	16 28	8 8	4 4	11 15	0 11	0 9
PL pH7 pH10	84 68	70 9	60 4,2	93 59	86 83	80 70	106 65	80 69	73 54	85 61	42 52	4 40	82 70	81 52	63 61	86 40	100 65	93 54	64 57	7,5 25	4,7 8	25 12	1,1 1,5	0 0	4,3 4,3	2 3	0 2,7
PME pH9	157	133	96	242	166	42	181	45	42	133	106	91	6	60	72	181	60	48	106	30	30	85	63	45	0	21	45

Taze kültürün 37°C’de inkübe edilmesinin ardından hücreler uzaklaştırılarak süpernatant alındı ve farklı organik solventler ile protein içeriği çöktürüldü. Farklı sıcaklıklarda ve farklı pH’larda aktiviteler ölçüldü. Etanolün ≤0,75 hacimleri ve aseton ile çöktürme sonucunda PG’nin pH8’de optimum aktivite verdiği belirlendi. Ancak etanolün diğer hacimleri ve aseton ile birlikte kullanımında birden fazla optimum pH ve sıcaklık görüldü. PGL’de de PG’ye benzer biçimde iki hacim etanolde, birden fazla optimum sıcaklık ve pH piki elde edildi. PME üç farklı çöktürmede de tek pik verdi. Diğer enzimlere göre daha yüksek sıcaklıklarda optimum vermesi ve tek bir pH’da aktivite göstermesi enzim solüsyonundaki proteaz aktivitesini yok edildiğine ilişkin bir ipucu kabul edildi (Tablo 5). Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda inkübasyon ve aktivite ölçümünde 55°C sıcaklık öngörüldü.

Taze kültürün 37°C’de inkübe edilmesinin ardından hücreler uzaklaştırılarak süpernatant alındı ve 1,25 hacim aseton ile protein içeriği çöktürüldü. Enzim aktivitesine ortamın etkisi araştırıldı.

Poligalakturonaz aktivitesine sodyum klorür etki etmemektedir. Sodyum klorür varlığında enzim aktivitesi devam etmektedir. Ancak %5 ve %10 sodyum klorür içeren ortamda aktivitenin aynı olması daha geniş aralıklarda (farklı derişimlerde NaCl içeren ortamlarda) aktivitenin çalışılması gerektiğine işaret etmektedir. Metanolün artan derişimlerinde aktiviteyi arttırdığı görülmektedir. Bu nedenle farklı konsantrasyonlarda ortama metanol eklenerek aktivite profili genişletilmelidir. pH8’de %5 etanol, aseton ve DMSO’da aktivitenin benzer biçimde arttığı görülmektedir. Etki aralıkları genişletilerek yeniden çalışılabilir (Tablo 6). SDS varlığında aktivite görülmez iken Tween-80 ve Triton-X100 benzer ve pozitif bir etki görüldü. Bu da anyonik deterjanlara göre noniyonik deterjanların yüksek konsantrasyonlarında PG aktivitesini artırdığını işaret etmektedir. EDTA için üç derişim ile çalışma yeterli bulunmadı. Daha geniş bir derişim aralığında bu çalışma tekrarlanmalıdır (Tablo 6).

PGL’ de, düşük pH’ da, artan NaCl derişiminin aktiviteyi yükselttiği görülmektedir. Metanolün artan derişimlerine paralel aktivitede düşüş görülmektedir. Ancak etanol, aseton ve DMSO için daha geniş derişim aralıklarında aktivitenin çalışılması gerekmektedir. SDS’ nin artan derişimlerinde aktivitede bir artış görülmektedir. SDS’ nin bu davranışı ortamı düşük pH’ da suya benzetiyor olabildiğini

düşündürmektedir. Bu da SDS'in farklı konsantrasyonlarını nötralize edecek asit hacmini ölçerek anlaşılabilir. SDS' nin aksine Tween-80 ve Triton-X100'ün aktiviteyi düşürdüğü görüldü. Bu sonuçlar PG ile karşılaştırıldığında zıttır. Alkol, aseton ve bazı deterjanlar düşük pH' da ve yüksek pH' da pektinazlar üzerinde anlamlı negatif ve pozitif etkiler yapmaktadır. Bu sonuçlar organik ortamların pH ile modüle edilebilirliğinin mümkün olduğuna işaret etmektedir. EDTA' nın %1 ve %10 konsantrasyonları aktivitede ciddi bir artışa neden oldu. Bu da PGL' nin, pH6' da, +2 yüklü iyonlardan tamamen arındırılmış bir ortamı tercih ettiğine işaret edebilir (Tablo 6).

PGL'ye bazik ortamda tuzun etkisi nötrdür. Metanol pH6' daki gibi aktiviteyi düşürmektedir. Bu da metanolün pH' dan bağımsız davrandığına işaret etmektedir. Asetonun da aktiviteye metanol ile benzer etki ettiği görülmektedir. Bu da bazik ortamda asetonun metanol gibi davrandığını düşündürmektedir. Etanol ve DMSO benzer etkiler yapmaktadır (Tablo 6). Bu sonuçları doğrulamak için daha geniş aralıkta organik solventlerle aktivite çalışmaları yapmak gerekir. SDS, Tween-80 ve Triton-X100'ü karşılaştırdığımızda, anyonik deterjan varlığında aktivitenin korunurken noniyonik deterjan varlığında aktivitenin net bir şekilde düştüğü görülmektedir. Ancak SDS' deki dalgalı sonuçların konsantrasyon aralığının genişletilmesi gerektiğini göstermektedir. EDTA' lı ortamda aktivitenin korunduğu görülmektedir ancak etkisini daha bütün görebilmek için geniş konsantrasyon aralığında deneyi tekrarlamak gereklidir (Tablo 6).

PL'nin sodyum klorür içeren ortamda aktivitesinin düştüğü görülmektedir. Metanol, etanol, aseton ve DMSO benzer davranışlar sergileyerek aktiviteyi düşürmektedir. Bu da organik solventlerin enzim yerine substrat ile etkileştiğini düşündürmektedir. SDS' nin aktiviteye etkisi, PGL (pH10)' da olduğu gibi PL (pH7 ve pH10)'de de bir yayvan piramit görüntüsü oluşturmaktadır. Bu nedenle aynı konsantrasyon aralığında daha yakın adımlarla bu deneyi tekrarlamak gerekir. Anyonik deterjanın aksine noniyonik deterjanlarda ise aktivitenin tamamen kaybolduğu görülmektedir. EDTA' nın varlığında aktivite düşmektedir. Bu sonuç, PL' nin iki değerlikli iyon gerektirdiğine işaret eder (Tablo 6).

PL'nin bazik ortamda tuza karşı toleransı düşüktür, PGL ile karşılaştırdığımızda bu sonuç zıttır. Metanol, etanol ve SDS'nin etkisi birbirine benzerdir, %5

konsantrasyonundaki aktivite %1 ve %10 konsantrasyonlarındaki aktiviteden göreceli olarak yüksektir. Asetonun aktiviteyi düşürdüğü görülmüştür; ancak, test edilen konsantrasyon aralığının genişletilerek yeniden çalışılması gerekmektedir. DMSO' nun etkisini tam olarak anlayabilmek için konsantrasyon aralığının genişletilmesi gerekmektedir. EDTA varlığında aktivitenin düşüşü pH7' de olduğu gibi PL' nin bazik ortamda da iyon bağımlı olduğunu göstermektedir. Bazik ortamda Tween-80 tıpkı pH7' deki gibi aktiviteyi tamamen yok etmektedir. Triton-X100 ise aktiviteyi anlamsızca düşürmekte fakat sıfırlayamamaktadır (Tablo 6).

PME aktivitesine sodyum klorür, metanol, etanol, aseton, SDS ve EDTA etkisi benzerdir. Her bileşenin düşük konsantrasyonlarda aktiviteyi arttırması, konsantrasyon aralığını düşük noktalarda tutarak aktiviteye etkisinin araştırılması gerektiğini göstermektedir. Tween-80 varlığında aktivitede anlamlı bir düşüş görülmektedir. Triton-X100 ve DMSO davranışı birbirine benzerdir. Düşük konsantrasyonlara nazaran yüksek konsantrasyonlarda aktivitenin görülmesi daha yüksek derişimlerde etkinin araştırılması gerektiğine işaret etmektedir (Tablo 6).

PME' nin farklı substrat derişimlerinde aktivitesi ölçülerek Michaelis-Menten(MM) ve Lineweaver-Burk(LB) grafiğı çizildi. LB grafiğinden K_m 0,4 ve V_{max} 217 U olarak bulundu. Düşük K_m değeri enzimin substrat için yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermektedir. Çünkü enzim düşük substrat konsantrasyonunda maksimum hıza ulaşmış yani doymuştur.

İnkübasyon sıcaklığı 37°C olan kültür süpernatantına iki hacim etanol eklenerek çöktürülen proteinler ve farklı amonyum sülfat çöktürmeleri ile elde edilen proteinler sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jele yüklendi. Her birinde birden fazla protein bandı ve sürüntüler elde edildi. Bu durum ortamda mevcut bir proteazın diğer proteinleri sindirdiğini göstermektedir. Proteolitik aktivitenin elimine edilmesi için kültür 45°C, 50°C ve 55°C'de inkübe edilerek hücreler uzaklaştırıldı ve iki hacim etanol ile proteinler çöktürülerek jele yüklendi. 55°C'deki kültürden 4 protein bandı elde edildi. Bunlar 80 kDa, 58 kDa, 46 kDa ve yaklaşık 28 kDa olarak belirlendi. Literatürde daha çok kültür koşullarının optimizasyonu ve enzim aktivitesine etkisi hakkında çalışmalar yer almaktadır. Bu da farklı sıcaklıklarda inkübasyon sonucunda farklı protein bantlarının elde edilmesini destekler görünmektedir.

50°C’de, pH 8’de PGA ile zimogramdan pozitif, pektinle negatif sonuç alınması; 37°C’de pektin ve PGA içeren jellerde farklı yerlerde zon oluşması ve 55°C’de PGA’ya nazaran pektin içeren jelde daha belirgin bir zon görülmesi farklı sıcaklıklarda yapılan aktivite ölçümleri ile paraleldir. Sonuçlar karşılaştırıldığında (Şekil 56) poligalakturonaz, pektat ve pektin liyaz (Şekil 57), pektin metilesterazın (Şekil 59) aktivite zonu oluşturduğu düşünülmektedir. SDS-PAGE’de elde edilen protein profili ile birlikte değerlendirildiğine pektin metilesterazın 28 kDa olduğu ve pektin liyaz, pektat liyaz 80 kDa, 58 kDa ve poligalakturonazın 46 kDa olduğu söylenebilir. Böylelikle farklı organik solvent ile çöktürme ve farklı sıcaklıklarda kültür inkübasyonu ve zimogramlar yardımıyla enzim aktivitelerinin neredeyse tamamen saflaştırılabileceği gösterilmiştir.

Literatürde her ne kadar *Bacillus* cinsine ait diğer türleri ile yapılan çalışmalara sıklıkla rastlansa da *Bacillus clausii* ile ilgili çok az bilgi mevcuttur ve bu daha çok pektin, pektat liyaz üzerinedir. Ayrıca *Bacillus clausii* ’nin probiyotik olması (Urdaci ve ark., 2004), ekstraselüler enzim içeriğinin anlaşılmasını daha ilginç kılmaktadır.

Ticari pektinazlar genellikle pektinaz karışımlarından oluşmaktadır. Örneğin Gonzalez ve Rosso (2011), karışık pektinolitik enzimleri birlikte içeren ticari pektinazdaki (Pectinex 100L Plus) pektin metilesteraz aktivitesini çalışmıştır. Çalışma sonucunda enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 4 ve 45°C bulunmuştur. Bundan sonraki çalışmalarda her bir enzimin saflaştırılması ve yeniden karakterize edilmesi amaçlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abbott, D.W. ve Boraston, A.B.** (2008). Structural Biology of Pectin Degradation by *Enretobacteriaceae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72, 301-316.
- Akbalık, G.** (2003). Screening for Industrially Important Extracellular Enzymes from Alkalophilic *Bacillus* Genus. *İzmir Institute of Technology* (Master of Science Thesis), 99p, İzmir.
- Akinoyemi, B.T., Buraimoh, O.M., Ogunrinde, O.O. ve Amund, O.O.** (2017). Pectinase Production by *Bacillus megaterium*, *Bacillus bataviensis* and *Paenibacillus sp.* Isolated from Decomposing Wood Residues in the Lago Lagoon. *The Journal of Tropical Life Science*. Vol. 7, 204-207.
- Al-Rajabi, I.I., Mahasneh, A.M.** (1999). Partial Characterization of an Alkalophilic Extracellular Crude Pectinases From a *Bacillus polymyxa* Strain. *Qatar Univ. Sci. J.* Vol. 18, 67-80.
- Altan, A.** (2004). Isolation and Molecular Characterization of Extracellular Lipase and Pectinase Producing Bacteria from Olive Oil Mills. *İzmir Institute of Technology* (Master of Science Thesis), 100p, İzmir.
- AMFEB** (2015). <https://amfep.org>
- Benen, J.A.E., Alebeek, G.J.W.M., Voragen, A.G.J. ve Visser J.** (2003). Mode of Action Analysis and Structure-Function Relationships of *Aspergillus niger* Pectinolytic Enzymes. *Advances in Pectin and Pectinase Research*, Voragen, F., Schols, H. ve Visse, R. (Ed.), Wageningen University, 235-237, Netherlands.
- Bhardwaj, V. ve Garg, N.** (2014). Production, Purification of Pectinase from *Bacillus sp.* MBRL576 Isolate and Its Application in Extraction of Juice. *International Journal of Science and Research*. Vol. 3, 2319-7064.
- Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., Nampoothiri, K.M., Duggal, A., Dey, K. ve Pandey, A.** (2013). Industrial Enzymes- Present Status and Future Perspectives for India. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 72, 271-286.
- Bradford, M.M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Celestino, S.M.C., Freitas, S.M., Medrano, F.J., Sousa, M.V., Filho, E.X.F.** (2006). Purification and Characterization of Novel Pectinase from *Acrophialophora nainiana* with Emphasis on Its Physicochemical Properties. *Journal of Biotechnology*. 123, 33-42.
- Codex Alimentarius Commission** (2010). Web: <http://www.fao.org>
- Ghazala, I., Haddar, A., Romdhane, M.B. ve Ellouz-Chaanouni, S.** (2016). Screening and Molecular Identification of New Microbial Strains for Production of Enzymes of Biotechnological Interest. *Braz. Arch. Biol. Technol.* Vol. 59, 1-12.
- Doung-Ly, K.C. ve Gabelli, S.B.** (2014). Salting Out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. *Methods in Enzymology*. 541, 85-94.
- Gonzalez, S.L. ve Rosso, N.D.** (2011). Determination of Pectin Methylsterase Activity in Commercial Pectinases and Study of the Inactivation Kinetics Through Two Potentiometric Procedures. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 31(2), 412-417.

- Gummadi, S.N., Monaj, N. ve Kumar, S.** (2007). Structural and Biochemical Properties of Pectinases. *Industrial Enzymes Structure, Function and Application*, Polaina, J., MacCabe, A. P. (Ed.), *Instituto de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos*, 99-117, Valencia.
- Heikinheimo, R., Hemila, H., Pakkanen, R. ve Palva, I.** (1991). Production of Pectin Methyl-esterase from *Erwinia chrysanthemi* B374 in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 35, 51-55.
- Hema, T.A. ve Shiny, M.** (2012). Production of Protease Enzyme from *Bacillus clausii* SM3. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* Vol. 1, 37-40.
- Herron, S.R. ve Jurnak, F.** (2003). Mechanistic Lessons From Structural Studies of The Pectate Lyases. *Advances in Pectin and Pectinase Research*, Voragen, F., Schols, H. ve Visse, R. (Ed.), Wageningen University, 221-235, Netherlands.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. ve Beg, Q.K.** (2002). Microbial Alkaline Pectinases and Their Industrial Applications: A Review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59, 409-418.
- Jansirani, D., Saradha, R., Selvapriyadharshini, J., Salomidebprani, N., Halimuthul, M.R., Nivetha, J., Ranjana, D.B.** (2014). Production of Pectinase by *Bacillus sp.* Isolated From Soil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences.* Vol. 4, 277-279.
- Jayani, M.S., Saxena, S. ve Gupta, R.** (2005). Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review. *Process Biochemistry.* 40, 2931-2944.
- Jayani, R.S., Shukla, S.K. ve Gupta, R.** (2010). Screening of Bacterial Strains for Polygalacturonase Activity: Its Production by *Bacillus sphaericus* (MTCC 7542). *Enzyme Research.* 1-5.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Paik, S.R. ve Chang, C.S.** (2003). Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: Production and Some Properties. *Journal of Applied Microbiology.* 95, 267-272.
- Jurick, W.M., Vico, I., McEvoy, J. L., Whitaker, B. D., Janisiewicz, W. ve Conway, W. S.** (2009). Isolation, Purification and Characterization of a Polygalacturonase Produces in *Penicillium solitum*-Decayed Golden Delicious Apple Fruit. *Phytopathology.* Vol. 99, 636-641.
- Kashyap, D.R., Chandra, S., Kaul, A. ve Tewari, R.** (2000). Production, Purification and Characterization of Pectinase from a *Bacillus sp.* DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* Vol. 16, 277-282.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K. Chopra, S. ve Tewari, R.** (2001). Applications of Pectinases in the Commercial Sector: A Review. *Bioresource Technology.* 77, 215-227.
- Kavuthodi, B. ve Sebastian, D.** (2018). Review on Bacterial Production of Alkaline Pectinase with Special Emphasis on *Bacillus* Species. *Biosci. Biotech. Res. Comm.* 11, 18-30.
- Khairnar, Y., Krishna, V.K., Boraste, A., Gupta, N., Trivedi, S., Patli, P., Gupta, G., Gupta, M., Jhadav, A., Mujapara, A., Joshi, B., Mishra, D.** (2009). Study of Pectinase Production in Submerged Fermentation Using Different Strains of *Aspergillus niger*. *International Journal of Microbiology Research.* Vol 1, 13-17.
- Kocabay, S.** (2015). Gaita Bakterilerinden Ekstraselüler Amilaz Üretimi, İzolasyonu ve Karakterizasyonu. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* (Yüksek Lisans Tezi), 96s.

- Khushk, I., Lashari, S., Bhutto, M.A., Jatt, A.N. ve Qureshi, A.S.** (2017). Optimization of Cultural Conditions for α -Amylases Production From *Bacillus Clausii* MCC 233-50. *International Journal of Current Research*. Vol. 9, 50997-51000.
- Kusuma, M.P. ve Reddy, D.S.R.** (2014). Optimization of Polygalacturonase Using Isolated *Bacillus subtilis* C4 by Submerged Fermentation. *Journal of Pharmacy Research*. 8, 106-112
- Li, Z., Bai, Z., Zhang, B., Li, B., Jin, B., Zhang, Ö., Lin, F. ve Zhang, H.** (2012). Purification and Characterization of Alkaline Pectin Lyase from a Newly Isolated *Bacillus clausii* and Its Application in Elicitation of Plant Disease Resistance. *Appl Biochem Biotechnol*. 167, 2241-2256.
- Madu, O.J., Okonji, R.E., Torimiro, N. ve Agboola, F.K.** (2016). Purification and Characterization of Pectinase from *Bacillus licheniformis* obtained from a Cassava Waste Dump. *Journal of Advances in Biology*. Vol. 8, 1685-1695.
- Markovic, O., Cederlund, E., Griffiths, W.J., Lipka, T. ve Jörnvall, H.** (2002). Characterization of Carrot Pectin Methylesterase. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 59, 513-518.
- McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. ve Albersheim, P.** (1984). Structure and Function of The Primary Cell Walls of Plants. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 625-663.
- Mei, Y., Chen, Y., Zhai, R. ve 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.
- Mercimek Takcı, H.A. ve Ucan Turkmen, F.** (2016). Extracellular Pectinase Production and Purification from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain. *International Journal of Food Properties*. 19, 2443-2450.
- Minh, N.P.** (2014). Enzymatic Pectinase Application in Extraction and Purification of Juice Turbidity From Red Rose Apple Pulp (*Syzgium malaccensis*). *IJMRD*. 4, 45-51.
- Mohandas, A., Raveendran, S., Parameswaran, B., Abraham, A., Athira, R.S.R., Mathew, A.K. ve Pandey, A.** (2018). Production of Pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. *Food Technology and Biotechnology*. Vol. 56, 110-116.
- Mukesh Kumar, D.J., Saranya, G.M., Suresh, K., Priyadharshini, A.D., Rajakumar, R. ve Kalaichelvan, P.T.** (2012). Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus sp.* MFW7 using Cassava Waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*. 2, 369-375.
- Mora, D., Fortina, M.G., Nicastro, G., Parini, C., ve Manachini, P.L.** (1998). Genotypic characterization of thermophilic bacilli: A study on new soil isolates and several reference strains. *Research in Microbiology*, 149, 711-722.
- Nakagawa, T., Yamada, K., Fujimura, S., Ito, T., Miyaji, T. ve Tomizuka, N.** (2005). Pectin Utilization by the Methylophilic Yeast *Pichia methanolica*. *Microbiology*. 151, 2047-2052.
- Namasivayam, E., Ravindar, J., Mariappan, K., Jiji, A., Kumar M. ve Jayaraj, R.L.** (2011). Production of Extracellular Pectinase by *Bacillus cereus* Isolated From Marked Solid Waste. *J Bioanal Biomed*. 3, 70-75.
- Okafor, U.A., Okochi, V.I., Chinedu, S.N., Ebeuhi, O.A.T., Okerenta, B.M.** (2010). Pectinolytic Activity of Wild-Type Filamentous Fungi Fermented on Agro-Wastes. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 4(24), 2729-2734.

- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E. ve Carmona, E.C.** (2009). Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*. 3, 9-18.
- Perez, S., Mazeau, K. ve Penhoat, H.C.** (2000). The Three-Dimensional Structures of The Pectic Polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 37-55.
- Pickersgill, R.W. ve Jenkins, J.A.** (2003). The Structures and Active Sites of Pectinases. *Advances in Pectin and Pectinase Research*, Voragen, F., Schols, H. ve Visse, R. (Ed.), Wageningen University, 267-277, Netherlands.
- Pili, J., Vargas, C.E.B., Oro, C.E.D., Backes, G.T., Valduga, E. ve Zeni, J.** (2018). Synthesis of Pectin Methyltransferase from *Aspergillus niger* in Submerged Fermentation Using as Citrus Pectin and Orange Peel as Inducers. *Industrial Biotechnology*. Vol. 14, 212-221.
- Poonam Sharma ve Nivedita Sharma.** (2018). Molecular Identification, Production and Optimization of Pectinase by using *Stenotrophomonas maltophilia* P9 Isolated from Algal Biomass of Himachal Pradesh, India. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 7,670-680.
- Raju, E.V.N. ve Divakar, G.** (2013). Production of Pectinase by Using *Bacillus circulans* Isolated From Dump Yards of Vegetable Wastes. *IJPSR*. 4, 2615-2622.
- Rangarajan, V., Rajasekharan, M., Ravichandran, R., Sriganesh, K., Vaitheeswaran, V.** (2010). Pectinase Production from Orange Peel Extract and Dried Orange Peel Solid as Substrates Using *Aspergillus niger*. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. Vol. 6, 445-453.
- Reignault, P., Mercier, M., Bompeix, G., Boccara, M.** (1994). Pectin methyltransferase from *Botrytis cinerea*: Physiological, Biochemical and Immunochemical Studies. *Microbiology*. Vol. 140, 3249-3255.
- Remoroza, C., Wagenknecht, M., Buchholt, H.C., Moerschbacher, B.M., Gruppen, H. ve Schols, H.A.** (2015). Mode Action of *Bacillus licheniformis* Pectin Methyltransferase on Highly Methylated and Acetylated Pectins. *Carbohydrate Polymers*. 115, 540-550.
- Ruiz, H.A., Rodriguez-Jasso, R.M., Hernandez-Almanza, A., Contreras-Esquivel, J.C. ve Aguilar, C.N.** (2017). Pectinolytic Enzymes. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. 47-71.
- Rukmini, K., Korivi, M. ve Devi, P.S.** (2016). Biochemical Characterization of Pectinase in *Bacillus pumilus* Isolated From Fruit Waste. *Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci.* 3, 25-29.
- Sassi, A.H., Tounsi, H., Trigui-Lahiani, H., Bouzouita, R., Romdhane, Z.B. ve Gargouri, A.** (2016). A Low-Temperature Polygalacturonase from *P.occitanis*: Characterization and Application in Juice Clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*. 91, 158-164.
- Sanchez, S. ve Demain, A.L.** (2017). Useful Microbial Enzymes-An Introduction. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. 1-11.
- Sharma, N., Rathore, M. ve Sharma, M.** (2012). Microbial Pectinase: Sources, Characterization and Applications. *Rev Environ Sci Biotechnol*.
- Soares, M.M.C.N., Silva, R. ve Gomes,E.** (1999). Screening of Bacterial Strains for Pectinolytic Activity: Characterization of The Polygalacturonase Produced by *Bacillus sp.* *Revista de Microbiologia*. 30, 299-303.

- Sieiro, C., Garcia-Fraga, B., Lopez-Seijas, J., Silva, A.F. ve Villa, T.G.** (2012). Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry. *Food Industrial Processes –Methods and Equipment*. Valdez, B. (Ed.), 201-218.
- Swain, M.R. ve Ray, R.C.** (2010). Production, Characterization and Application of a Thermostable Exopolysaccharuronase by *Bacillus subtilis* CM5. *Food Biotechnology*. 24, 37-50.
- Tapre, A.R. ve Jain, R.K.** (2014). Pectinases: Enzymes for Fruit Processing Industry. *International Food Research Journal*. 21, 447-453.
- Teixeira, M.F.S., Filho, J.L.L., Duran, N.** (2000). Carbon Sources Effect on Pectinase Production From *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 31, 286-290.
- Thite, V.S. ve Nerurkar, A.S.** (2018). Physicochemical Characterization of Pectinase Activity From *Bacillus spp.* and Their Accessory Role in Synergism with Crude Xylanase and Commercial Cellulase Enzyme Cocktail Mediated Saccharification of Agrowaste Biomass. *Journal of Applied Microbiology*. 124, 1147-1163.
- Torimiro, N. ve Okonji, R.E.** (2013). A Comparative Study of Pectinolytic Enzyme Production by *Bacillus Species*. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 6498-6503.
- Vries, R.P. ve Visser, J.** (2001). Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65, 497-522.
- Urdaci, M., Bressollier, P. ve Pinchuk, I.** (2004). *Bacillus clausii* Probiotic Strains Antimicrobial and Immunodulatory Activities. *J Clin Gastroenterol*. 38, 86-90.
- Yadav, S., Yadav, K.P., Yadav, D. ve Yadav, K.D.S.** (2009). Purification and Characterization of Pectin Lyase Produced by *Aspergillus terricola* and its Application in Retting of Natural Fibers. *Appl Biochem Biotechnol*. 159, 270-283.
- Yavuz, E.** (2003). Genotypic Characterization of Extracellular Enzyme Producing Thermophilic Bacteria in Balçova Geothermal Region. *İzmir Institute of Technology* (Master of Science Thesis), 112p, İzmir.
- Zhou, C., Xue, Y. ve Ma, Y.** (2017). Cloning, Evaluation, and High-Level Expression of a Thermo-Alkaline Pectate Lyase from Alkaliphilic *Bacillus clausii* with Potential in Ramie Degumming. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Whitaker, J.R.** (1990). Microbial Pectolytic Enzymes. Microbial Enzymes and Biotechnology, Fogarty, W. M. ve Kelly, C. T. (Ed.), *Department of Industrial Microbiology, University College*, 133-177, Dublin.
- Quattara, H.G., Reverchon, S., Niamke, S.L. ve Nasser, W.** (2011). Molecular Identification and Pectate Lyase Production by *Bacillus* Strains Involved in Cocoa Fermentation. *Food Microbiology*. Vol. 28, 1-8.

EKLER

EK-1 Materyaller

Cihaz	Marka/Model
Hassas terazi	PRESICA XB220A (0.01G-220g)
Kaba terazi	DENVER INSTRUMENT APX-3202 (Max. 3200g)
Manyetik karıştırıcı (Çoklu)	MULTIMATIC-9N
Manyetik karıştırıcı (Tekli)	IKA RH B2
Vorteks	IKA VORTEX GENIUS 3
Biyogüvenlik kabini	BİLSER Elit BSC II-A2
pH metre	
Otoklav	Hiclave HG-80
Etüv	Ecocell 55 Nüve EN120
Etüv (çalkalamalı)	SHELLAB SI6-2
Etüv (CO ₂)	N-BIOTEK NB203XL
Su banyosu	Wisebath WB22 Bandalin DT103H
Su banyosu (çalkalamalı)	Nüve ST 402 (Y)
Buzdolabı (+4°C)	ARÇELİK 4243TMB
Derin dondurucu (-20°C)	Uğur UED 5170 DTK A++
Ultra Düşük Sıcaklıklı Dondurucu (-80°C)	SANYO MDF-44086S
Santrifüj (ependorf)	Hettich Micro22
Santrifüj (falkon)	Sigma 6K15
Mikroskop	MicrosAustria MC300
Spektrofotometre	AOE UV-1800
Distile su cihazı	MES Mp Minipure
Jel elektroforez sistemi	Consort EVS1100
Elektroforez güç kaynağı	Cleaver Scientific CS300V

EK-2 Kimyasallar

Kimyasallar

Agar	KI
Akrilamit	Kloroform
Amonyum okzalat	Kristal viyolet
Amonyum sülfat	Lizozim
APS	Metanol
Asetik asit	MgSO ₄ .7H ₂ O
Aseton	Mono galakturonik asit
Bisakrilamit	NaCl
BSA	Na ₂ CO ₃
Coomassie Brilliant Blue G-250	Na ₂ HPO ₄
Coomassie Brilliant Blue R-250	NaOH
CTAB	Nutrietn broth
D-Glukoz	Pepton
DMSO	Proteinaz K
DNS	Poligalakturonikasit
EDTA	Rutenyum kırmızısı
Elma pektini	Safranin
Etanol	SDS
Fenol	Sodyum asetat
Fosforik asit	Sodyum bikarbonat
Gliserol	Sükroz
Glisin	TEMED
HCl	Tripton
Hidrojen peroksit	Tris
I ₂	TritonX100
İzopropanol	Tween80
K ₂ HPO ₄	Yeast extract
KCl	

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analizler için uygun analitik saflıktadır.

EK-3 Besiyerleri

3.1 Horikoshi-I Broth

	g/L
Glukoz	10,0
Pepton	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Na ₂ CO ₃	10,0

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃ ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir.

3.2. Horikoshi-I Agar (pH 10.2)

	g/L
Glukoz	10,0
Pepton	5,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Na ₂ CO ₃	10,0
Agar	15,0

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃ ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir.

3.3 LB Broth

	g/L
Tripton	10,0
Yeast extract	5,0
NaCl	10,0

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir.

3.4 Nutrient Broth

	g/L
Nutrient broth	8,0
Na ₂ CO ₃	10,0

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃ ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir.

3.5 Nutrient Agar

	g/L
Nutrient broth	8,0
Agar	13,0
Na ₂ CO ₃	10,0

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃ ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir.

3.6 Pektinaz Seçici Besiyeri

3.6.1 Broth

	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	3,0
Na ₂ HPO ₄	6,0
Yeast extract	1,0
PGA/Pektin	5,0
Na ₂ CO ₃	10,0

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃ ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir.

3.6.2 Agar

	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
KH ₂ PO ₄	3,0
Na ₂ HPO ₄	6,0
Yeast extract	1,0
PGA/Pektin	5,0
Agar	13,0
Na ₂ CO ₃	10,0

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃ ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir. (Pektin içeren besiyerinin pH'ı 9,5; PGA içeren besiyerinin pH'ı 9,1'dir).

3.7 Selüloz, Ksilenz ve Amilaz için Seçici Besiyeri

	g/L
Selüloz / Ksilanz / Nişasta	5
K ₂ HPO ₄	7
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
NaCl	5
Agar	13
Na ₂ CO ₃	10

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃ ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir. (pH 10).

3.8 Lipaz İçin Seçici Besiyeri

	g/L
Nutrient broth	8
CaCl ₂ .H ₂ O	0,1
Agar	13
Tween20,Tween40,Tween80	10 ml
Na ₂ CO ₃	10

Tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Na₂CO₃,Tween20,Tween40 ve Tween80 ayrı otoklavlanır ve besiyerine eklenir.

3.9 Proteaz İçin Seçici Besiyeri

	g/L
Nutrient broth	8
Süt	10 ml
Agar	15

Süt hariç tüm bileşenler dH₂O içerisinde çözündürülür. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilir. Sterilize süt sonradan besiyerine eklenir.

EK-4 Çözeltiler

4.1 Gram Boyamada Kullanılan Çözeltiler

4.1.1 Gram İyodin

	300 ml
I ₂	1 g
KI	2 g

I₂ ve KI karıştırılarak bir miktar suda çözündürülür. Ardından son hacim 300 ml'ye distile su ile tamamlanır.

4.1.2 Kristal Viyolet

Solüsyon A	
Kristal viyolet	2 g
Etanol (%95)	20 ml
Solüsyon B	
Amonyum okzalat	0.8 g
Distile su	80 ml

2 g kristal viyolet 20 ml %95'lik etanol içinde, 0.8 g amonyum okzalat 80 ml distile su içinde çözündürülür. Ardından A ve B solüsyonları karıştırılarak kristal viyolet boyası elde edilir.

4.1.3 Safranin

Stok safranin çözeltisi için 2.5 g safranin tartılarak bir miktar % 95'lik etanolde çözündürülür, son hacim % 95'lik etanol ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu stok çözeltiden 10 ml alınarak son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak safranin çözeltisi elde edilir.

4.2 DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

4.2.1 TE (1X)

1,21 g Tris ve 0,3 g EDTA tartılarak bir miktar distile suda çözündürülür. pH8 'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1 litreye ye tamamlanır.

4.2.2 TE (1X, %25 sükröz, pH 8,0)

25 g sükröz bir miktar 1xTE tamponunda çözündürülür. Son hacim tampon ile 100 ml'ye tamamlanır.

4.2.3 NaCl (5M)

29,2 g NaCl bir miktar distile suda çözündürülür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

4.2.4 CTAB/NaCl (%10 CTAB, 0,7M NaCl)

4,1 g NaCl 80 ml distile suda çözdürülür. 10 g CTAB yavaşça eklenir ve ısı ile karıştırılarak çözdürülür. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4.2.5 Fenol

Fenol 68°C'de eritilir. Eriyen fenolün hacmi kadar Tris-HCl (0,5M ,pH 8,0) tamponu eklenir. Karışım 15 dakika karıştırılır. İki faz ayrıldığında üst faz ayırma hunisi ile ayrılır. Fenolün eşit hacmi kadar Tris-HCl (0,1M ,pH 8,0) tamponu eklenir. Karışım tekrar 15 dakika karıştırılır. Üst faz tekrar ayrılır. Fenolik faz dengeye gelene kadar (pH> 7,8 olana kadar) işleme devam edilir. pH, pH metre kağıdı ile ölçülür. Fenol dengelendikten sonra alikotlara ayrılarak -20 °C' de saklanır. Kullanılmadan önce fenol oda sıcaklığında eritilir. 8-Hidroksikinolin ve β-merkaptoetanol sırasıyla %0,1 ve %0,2'lik konsantrasyonda eklenir. Fenol çözeltisinin bu formu 4°C'de saklanabilir.

4.3 Jel Elektrofrezinde ve Zimogramda Kullanılan Çözeltiler

4.3.1 %12'lik SDS ayırıcı jel

%12	10 ml
H ₂ O	3,3
%30 akrilamit-bisakrilamit	4
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5
% 10 SDS	0,1
% 10 APS	0,1
TEMED	0,004

4.3.2 %8'lik SDS ayırıcı jeli

%8	10 ml
H ₂ O	4,6
%30 akrilamit-bisakrilamit	2,7
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5
% 10 SDS	0,1
% 10 APS	0,1
TEMED	0,006

4.3.3 %5'lik SDS yükleme jeli

%5	5 ml
H ₂ O	3,4
%30 akrilamit-bisakrilamit	0,83
1,5M Tris (pH 8.8)	0,63
% 10 SDS	0,05
% 10 APS	0,05
TEMED	0,005

4.3.4 %8'lik Nativ jel

%8	15 ml
H ₂ O	6,9
%30 akrilamit-bisakrilamit	4
0,5M Tris (pH 6,8)	3,8
%10 APS	0,15
TEMED	0,009

4.3.5 Örnek yükleme tamponu

	5x
H ₂ O	7 ml
1M Tris-HCl (pH 6,8)	15,5 ml
%1 Bromfenol mavisi	2,5 ml
Gliserol	25 ml

Yüklenecek protein solüsyonları, örnek yükleme tamponunun son derişimi 1x olacak şekilde hazırlanır.

4.3.6 SDS-PAGE yürütme tamponu

	g/L
Tris	6
Glisin	28,8
SDS	1

Tüm bileşenler bir miktar distile suda çözdürülür. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır.

4.3.7 Nativ-PAGE yürütme tamponu

	g/L
Tris	3
Glisin	14,4

Tüm bileşenler bir miktar distile suda çözdürülür. pH 8.8'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

4.3.8 Tris-HCl (1,5 M pH 8,0)

45,43 g Tris tartılarak bir miktar distile suda çözdürülür. pH'ı HCl ile 8,0'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

4.3.9 Tris-HCl (0,5 M, pH 8,0)

15,14 g Tris tartılarak bir miktar distile suda çözdürülür. pH'ı HCl ile 6,8'e ayarlanır. Son hacim distile su ile 250 ml'ye tamamlanır.

4.3.10 Akrilamit-Bisakrilamit (%30)

29 g akrilamit, 1 g bisakrilamit karıştırılarak bir miktar distile suda ısı yardımıyla çözdürülür. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4.3.11 APS (%10)

10 g APS bir miktar distile suda çözdürülür. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4.3.12 SDS (%10)

10 g SDS tartılarak 80 ml distile suda 65 °C'ye kadar ısıtılarak çözdürülür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanarak oda sıcaklığında saklanır.

4.3.13 Bromfenol mavisi (%1)

100 mg bromfenol mavisi bir miktar distile suda çözdürülüp son hacim 10 ml'ye tamamlanır.

4.3.14 Jeli boyama çözeltisi

	1 L
Coomassie Brilliant Blue R250	1 g
Metanol	500 ml
Asetik asit	100 ml

Öncelikle Coomassie brilliant blue R250 tartılıp metanol içinde çözdürülür. Ardından asetik asit eklenir ve karıştırılır. Son hacim hacim distile su ile 1L'ye tamamlanır.

4.3.15 Jeli yıkama çözeltisi

	1 L
Metanol	100 ml
Asetik asit	70 ml

100 ml metanol 70 ml asetik asit karıştırılarak son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır.

4.3.16 Rutenyum kırmızısı (%0.05)

50 mg rutenyum kırmızısı tartılır bir miktar distile suda çözdürülür. Son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Solüsyon 4°C'de saklanır.

4.4 Belirteçler

4.4.1 Bradford belirteci

	1 L
Coomassie brilliant blue G-250	0.1 g
% 95'lik etanol	50 ml
%85'lik fosforik asit	100 ml

0.1 g Coomassie Brilliant Blue G-250 50 ml %95'lik etanolde iyice çözdürülür, 100 ml %85'lik fosforik asit eklenir. Boya çözüldükten sonra son hacim distile su ile 1 litreye tamamlanır. Belirteç kullanılmadan önce filtre kağıdından geçirilir.

4.4.2. DNS belirteci

	g/L
DNS	10
Fenol	2
Sodyum sülfid	0,5
NaOH	10
Na-K Tartarat	400

Tüm bileşenler bir miktar distile suda ısıyla ve karıştırılarak çözdürülür. Son hacim distile su ile 1L'ye tamamlanır.

4.5 Protein Çöktürmede Kullanılan Çözeltiler

4.5.1 Etanol (%95)

95 ml stok etanol mezürde ölçülür son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4.5.2 Aseton (%80)

80 ml stok aseton mezürde ölçülür son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

4.5.3 Amonyum sülfat

İstenilen yüzdeliğe karşılık gelen amonyum sülfat tablodan belirlenerek protein solüsyonuna yavaşça eklenir.

4.6. Enzim Aktivitesinde Kullanılan Çözelti ve Tamponlar

4.6.1 Tamponlar

pH	Tamponlar
pH 3.6	Sodyum asetat/asetik asit
pH 4.0	Sodyum asetat/asetik asit
pH 5.0	Sodyum asetat/asetik asit
pH 6.0	KH ₂ PO ₄ /NaOH
pH 7.0	KH ₂ PO ₄ /NaOH
pH 8.0	Tris/HCl
pH 9.0	Tris/HCl
pH 10.0	Sodyum bikarbonat/NaOH
pH 11.0	Sodyum bikarbonat/NaOH
pH 12.0	KCl/NaOH
pH 13.0	KCl/NaOH

4.6.2 HCl (0,01M)

1 M HCl için, 8,2 ml stok HCl'den bir miktar distile su içerisine eklenir ardından son hacim 100 ml'ye tamamlanır. 0,01 M HCl için, 1M HCl'den 10 ml alınarak son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

4.6.3 NaOH (0,1M)

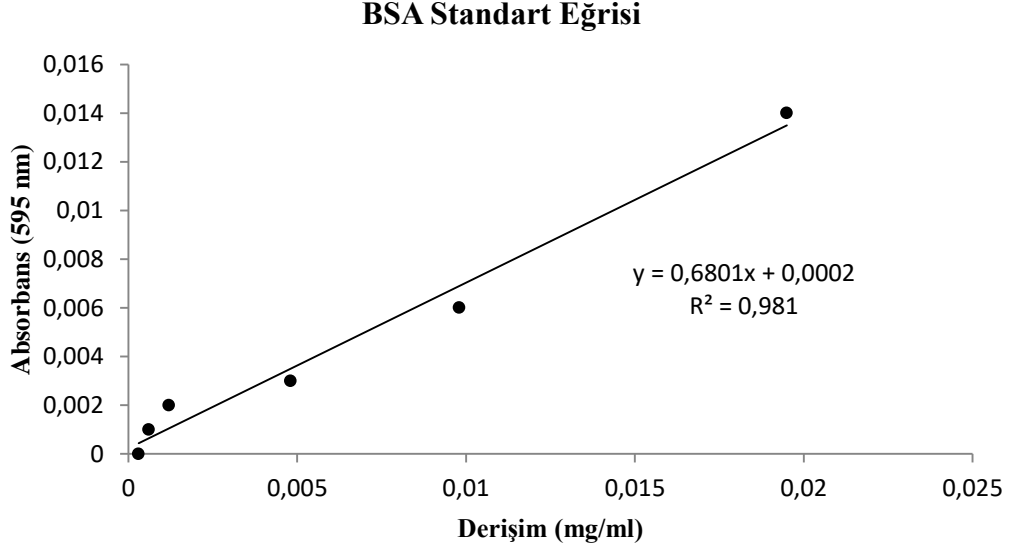
0,4 gram sodyum hidroksit tartılarak bir miktar distile suda çözdürülür ardından son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Amonyum Sülfat Miktarları (Doung-Ly ve Gabelli, 2014)

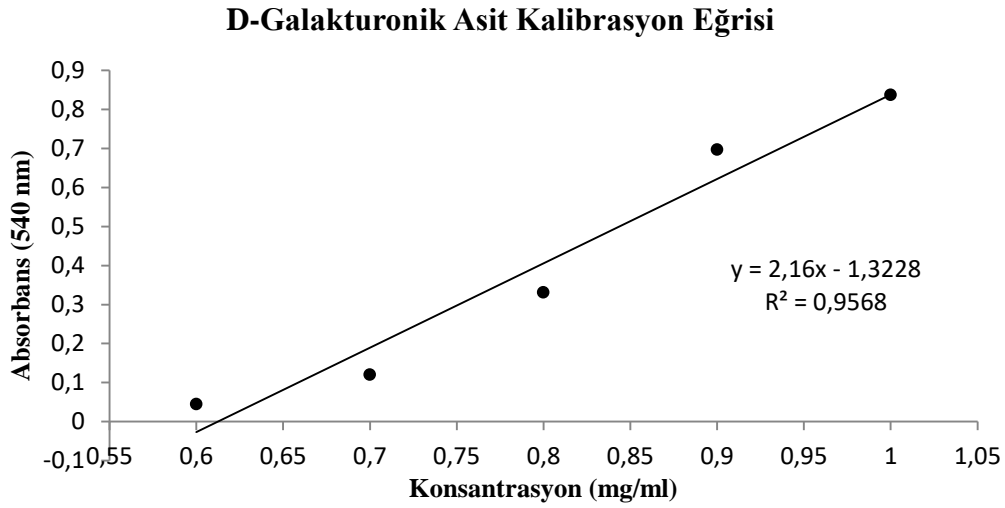
g/L																	
Hedef Derişimi (%)																	
Başlangıç Derişimi (%)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	519	559	603	650	607
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139
85															34	68	105
90																34	70
95																	35

EK-5 Kalibrasyon Eğrileri

5.1 BSA Kalibrasyon Eğrisi



5.2 Mono-galakturonik asit Kalibrasyon Eğrisi



EK-6 Hesaplamalar

6.1 PG Aktivite Hesabı

PG aktitesinin hesabında aşağıdaki denklem kullanılır. Dakikada salınan μmol D-galakturonik asit, dilüsyon faktörü (df) ile çarpılır ve reaksiyonda kullanılan ml enzim çözeltisine bölünür. Dilüsyon faktörü reaksiyonda kullanılan toplam hacmin enzim solüsyonu hacmine bölünmesi ile bulunur. Reaksiyon zamanı dakika cinsinden yazılır.

$$U/\text{ml} = \frac{(\mu\text{mol galakturonik asit}) \cdot \text{df}}{(\text{dk}) \cdot (\text{ml enzim solüsyonu})}$$

Aktivite sonucunda salınan μmol D-galakturonik asit miktarı ek-5'deki kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanır. 540 nm'de ölçülen absorbans $y = 2,16x - 1,3228$ denkleminde y ile gösterilen yere yazılarak x değeri bulunur. Buradaki x değeri mg/ml derişimindeki D-galakturonik asit konsantrasyonunu vermektedir. Elde edilen değer 1000'e bölünerek $\mu\text{g/ml}$ cinsine çevrilir. D-galakturonik asidin moleküler ağırlığı 194,14'tür. 1 molar D-galakturonik asit 194,14 g/L' dir. 1 μmol D-galakturonik asit 0,194 $\mu\text{g/ml}$ ' dir. Salınan $\mu\text{g/ml}$ D-galakturonik asit 0,194' e bölünerek μmol cinsinden elde edilir. Denklemden yerine yazılarak ünite aktivite hesaplanır.

6.2 Liyaz Aktivite Hesabı

Liyaz aktivitesinin hesabında aşağıdaki denklem kullanılır. 235nm' de köre karşı okunan absorbans, toplam reaksiyon hacmi ve dilüsyon faktörü ile çarpılır. Reaksiyon zamanı (dakika) ve kullanılan enzim çözeltisinin hacmine (ml) bölünür, ünite aktivite hesaplanır.

$$U/\text{ml} = \frac{(\Delta A_{235} - \Delta A_{235\text{kör}}) \cdot (\text{ml toplam hacim}) \cdot \text{df}}{(\text{dk}) \cdot (\text{ml enzim solüsyonu})}$$

6.3 Pektin metilesteraz Aktivite Hesabı

PME aktivitesinin hesabında aşağıdaki denklem kullanılır. Aktivite ölçümünde kullanılan sodyum hidroksit hacmi ve molaritesi çarpılarak, reaksiyon zamanına ve enzim solüsyonunun hacmine (ml) bölünür böylece ünite aktivite hesaplanır.

$$U/\text{ml} = \frac{(\text{ml NaOH}) \cdot (\text{M NaOH}) \cdot 1000}{(\text{dk}) \cdot (\text{ml enzim solüsyonu})}$$

6.4 Maksimum hız ve K_m Hesabı

Substrat derişimlerine karşı aktivite grafiği çizilerek Michaelis-Menten grafiği elde edilir. M-M grafiğindeki değerler $1/V$ ve $1/[S]$ şeklinde yazılarak Lineweaver-Burk grafiği oluşturulur. LB grafiğinde x eksenini kesen nokta $-1/K_m$ ve y eksenini kesen nokta $1/V_{max}$ değeridir.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sevinç BERBER
Yabancı Dil : İngilizce
E-posta Adresi : sevincberber@gmail.com



Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : Cemile Yeşil Anadolu Lisesi, 2012.
Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2016.
Yüksek Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik A.B.D., 2018.

Araştırma Projeleri

Toprak Örneklerinden *Bacillus clausii* Suşlarının İzolasyonu, Genotipik ve Fenotipik Karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, (devam ediyor).

Toprak Bakterilerinden Ekstraselüler Pektinaz Üretimi, İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, 2018 (Ulusal).

Lactobacillus Fermentum'un Probiyotik Özelliklerinin Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, Temmuz 2018 (Ulusal).

β -Amilazın Ekmek Kalitesine Etkisinin Araştırılması, TÜBİTAK Projesi, Yürütücü, Haziran, 2016.