

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TERMOFİLİK *ASPERGİLLUS NİGER*'DEN PEKTİN LİYAZ  
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Kader POTURCU**

**Danışman  
Prof. Dr. İsmail ÖZMEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2012**

© 2012 [Kader POTURCU]

## TEZ ONAYI

**Kader POTURCU** tarafından hazırlanan " **Termofilik *Aspergillus Niger*'den Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu** " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

<b>Danışman</b>	<b>Prof. Dr. İsmail ÖZMEN</b> Süleyman Demirel Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER</b> Süleyman Demirel Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU</b> Süleyman Demirel Üniversitesi	.....

**Enstitü Müdürü**      **Prof. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN** .....

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Kader POTURCU**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Endüstriyel Enzimler.....	2
1.2. Pektik Maddeler.....	6
1.3. Pektinolitik Enzimler.....	9
1.4. Pektinazların Endüstriyel Uygulamaları.....	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	34
3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	34
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	35
3.2. Yöntemler.....	37
3.2.1. Bradford yöntemi ile protein tayini.....	37
3.2.2. Pektin liyaz aktivite tayini.....	37
3.2.3. Mikroorganizmaların büyütülmesi.....	38
3.2.4. Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırma.....	38
3.2.5. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması.....	39
3.2.6. Homojenatların jel filtrasyon kolonuna yüklenmesi ve enzim elüsyonu.....	39
3.2.7. İyon değişim kolonunun hazırlanması.....	39
3.2.8. Homojenatların iyon değişim kolonuna yüklenmesi ve enzim elüsyonu.....	40
3.2.9. SDS-PAGE jel elektroforezi çalışmaları.....	40
3.2.10. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	41
3.2.11. Optimum pH'ın belirlenmesi.....	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	43
4.1. Kantitatif Protein Tayini için Hazırlanan Standart Grafik.....	43
4.2. <i>Asp. niger</i> Ocak 4 Fungusunun Pektin Liyaz Üretme Kapasitesi.....	43
4.3. <i>Asp. niger</i> Ocak 4 Fungusundan Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırma Kademeleri.....	44
4.4. <i>Asp. niger</i> Ocak 4 Fungusundan Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Optimum Sıcaklık Çalışmaları.....	46
4.5. <i>Asp. niger</i> Ocak 4 Fungusundan Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Optimum pH Çalışmaları.....	49
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	51
KAYNAKLAR .....	54
ÖZGEÇMİŞ .....	61

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TERMOFİLİK *ASPERGILLUS NIGER*'DEN PEKTİN LİYAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Kader POTURCU

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

Bu tez çalışmasında amaç yeni termofilik mikroorganizmalardan pektin liyaz enzimini üretmek ve üretilen bu enzimi saflaştırıp karakterize etmektir.

Bu amaçla termofilik *Aspergillus niger* Ocak 4 fungusu farklı besi ortamlarında yetiştirilmiştir. En yüksek enzim elde edilen besi ortamı belirlenmiştir. Termofilik fungustan pektin liyaz enzimi üretimi için, amonyum sülfat ile kısmi saflaştırılma yapılmış ve jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile de saflaştırma işlemlerine kademeli olarak devam edilmiştir.

Saflaştırılan enzimin optimum pH ve sıcaklık çalışmaları yapılmıştır. Böylece saflaştırılan enzim için en uygun pH ve sıcaklık değerleri elde edilmiştir. SDS-PAGE yöntemi ile de enzimin molekül ağırlığı tayini yapılmıştır.

Saflaştırılan pektin liyaz enzimi için optimum pH 8.0; optimum sıcaklık ve süre sırasıyla 40 °C, 60 dk olarak belirlenmiştir. Bu enzim için jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi ile sırasıyla 4,2 kat ve 76,5 kat saflaştırma katsayısı elde edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Pektin liyaz, Termofilik *Aspergillus niger*, Saflaştırma, Karakterizasyon.

2012, 61 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PECTIN LYASE FROM THERMOPHILIC *ASPERGILLUS NIGER*

Kader POTURCU

Süleyman Demirel University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İsmail ÖZMEN

The aim of this study is produce pectin lyase enzyme from thermophilic microorganisms and purify and characterize this enzyme.

For this purpose thermophilic *Aspergillus niger* Ocak 4 fungi was growth different submerged conditions. Submerged conditions obtaining maximum enzyme was determined. Pectin lyase enzyme was produced from thermophilic microorganisms, partial purification with ammonia sulphate was done. Purification studies were also resumed with gel filtration and ion-exchange chromatography.

Optimum pH and temperature studies of purified enzyme was done. Thereby optimum pH and temperature values were obtained for purified enzyme. Molecular weight determination of purified enzyme was done with SDS-PAGE.

For purified pectin lyase enzyme, optimum pH 8.0; optimum temperature and time 40 °C, 60 min were determined. For this enzyme 4,2 and 76,5 purification fold were obtained with ion-exchange chromatography and gel filtration chromatography respectively.

**Keywords:** Pectin lyase, Thermophilic *Aspergillus niger*, Purification, Characterization.

**2012, 61 pages**

## TEŞEKKÜR

Tez konum için beni yönlendiren, her aşamasında engin bilgi ve tecrübesiyle desteğini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. İsmail Özmen'e teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili arkadaşlarım doktora öğrencisi Emine Akar ve yüksek lisans öğrencisi Hacer Cesur'a her zaman yanımda oldukları için teşekkürü borç biliyorum.

Tezimin gerçekleşmesinde ÖYP-05234-YL-2012 numaralı proje ile maddi destek sağlayan SDÜ ÖYP Birimi'ne teşekkür ederim.

Bugünlere ulaşmama sebep olan, yapabileceğime dair inancımı diri tutmama her daim yardımcı olan babam Mehmet Poturcu ve annem Fadime Poturcuya sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Kader Poturcu

Isparta, 2012



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. Bitkinin orta lamelindeki ve primer hücre duvarındaki pektin.....	6
Şekil 1.2. Bitki hücre duvarının yapısı.....	7
Şekil 1.3. Pektinin yapısı.....	8
Şekil 1.4. Pektinazların etki mekanizması .....	13
Şekil 3.1. Pektin liyaz enziminin katalizlediği reaksiyon .....	21
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile elde edilen protein standart grafiği.....	43
Şekil 4.2. İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan PL enziminin elüsyon grafiği .....	45
Şekil 4.3. 40 °C’de zamana bağlı çalışma .....	46
Şekil 4.4. 50 °C’de zamana bağlı çalışma .....	47
Şekil 4.5. 60 °C’de zamana bağlı çalışma .....	47
Şekil 4.6. 70 °C’de zamana bağlı çalışma.....	48
Şekil 4.7. 80 °C’de zamana bağlı çalışma.....	48
Şekil 4.8. Toplu sıcaklık çalışmaları.....	49
Şekil 4.9. Optimum pH çalışması.....	50

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. Endüstriyel enzimlerin uygulamaları .....	4
Çizelge 1.2. Pektinolitik enzimlerin sınıflandırılması.....	13
Çizelge 4.1. Asp. niger Ocak 4 fungusundan pektin liyaz enziminin saflaştırma kademeleri .....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Amonyum sülfat
<i>Asp. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
DEAE-selüloz	Dietyl aminoetil selüloz
EU	Enzim ünitesi
PAE	Pektin asetil esteraz
PG	Poligalakturonaz
PGL	Pektat liyaz
PL	Pektin liyaz
PME	Pektin metil esteraz
PMG	Polimetilgalakturonaz
RG asetilesteraz	Ramnogalakturonan asetilesteraz
RG galakturonahidrolaz	Ramnogalakturonan galakturonahidrolaz
RG hidrolaz	Ramnogalakturonan hidrolaz
RG liyaz	Ramnogalakturonan liyaz
RG ramnohidrolaz	Ramnogalakturonan ramnohidrolaz
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
U	Unit
XGA hidrolaz	Ksilogalakturonan hidrolaz
ε	Molar ekstinksiyon katsayısı
μ	Mikro

## 1. GİRİŞ

Enzimler, şaşırtıcı biyokatalizörlerdir. Reaksiyon hızını 1.000.000. 000. 000. 000. 000! değerinde arttırlar. Metabolik faaliyetler enzimler olmadan inanılmaz derecede yavaştır ve enzimler olmadan hayat devam ettirilemez (Purich, D.L., 2010).

Enzimlerin tarihçesine bakıldığında enzim biliminin temeli İtalyan bir papaz olan Spallanzi'ye dayanmaktadır. 1783'de Spallanzi mide öz sularının, eti parçaladığını bulmuştur (Uhlig 1998).

1810'da Gay-Lussac anaerobik ortamda yetişen mayaların şekeri, etanol ve CO<sub>2</sub>'ye fermente ettiğini rapor etmiştir.

Enzimlerin ilk keşfi 1833'de Anselme Payen ve Jean Persoz tarafından malt ekstraktın alkol çökeleğinin, ısıl kararsız madde olan diastaz (amilaz, nişastayı şekere dönüştüren madde) içerdiğini bulmasıyla başlamıştır (Uhlig 1998).

Justus Von Liebig fermentasyon ve sindirim olaylarının kimyasal etki sonucunda oluştuğuna karar vermiştir.

Fransız kimyacı Louis Pasteur, fermentasyonun canlı maya hücreleri tarafından eşsiz bir biçimde gerçekleştiğini bulmuştur.

1878'de Alman fizyolog William Kühne yaşayan organizmalar kaçınılmaz olarak kimya ve fiziğin kurallarına uymak zorundadır fikrini belirtmiş ve enzim (enzyme Yunanca en ve zyme; İngilizce in ve yeast; Türkçe mayanın içinde) kelimesini ortaya atmıştır (Purich, D.L., 2010).

1893 yılında Wilhelm Ostwald enzimleri katalizörler olarak sınıflandırmıştır.

1894'te Emil Fischer glikolizin spesifik etkisini belirtmek için anahtar-kilit hipotezini ortaya koymuştur. Substratları katı şablonlar olarak tanımlamış ve

substratın bir anahtar gibi kendisine uygun olan kilitin içine, yüksek hassasiyetle girmek zorunda olduğunu belirtmiştir.

1897 yılında diğeri bir Alman kimyacı Eduard Büchner, metabolizmanın tüm canlı hücreler dışında da meydana geldiğini kanıtlamıştır. Büchner kum içinde öğütölmüş mayayı, filtre kâğıdından geçirerek hücreden bağımsız filtrat elde etmiştir. Elde ettiği ekstraktı, sukroz çözeltisine eklediğinde CO<sub>2</sub> kabarcığının çıktığını fark etmiştir; böylece Büchner ekstraktın kendisinin katalizör olarak görev yaptığını ortaya çıkarmıştır. Bu başarı ile Büchner 1907’de Nobel Kimya Ödülü’nü almıştır (Purich, D.L., 2010).

1898’de Duclaux enzimleri, katalitik aktiviteden yoksun biyolojik moleküllerden ayırmak için –az ekinin kullanılmasını önermiştir.

Fischer canlı hücrelerde proteinlerin çok önemli olduğunu 1894’te yaptığı çalışmada rapor etmiş; ama enzimlerin protein yapıda olduklarını Richard Willstätter bulmuştur.

1926’da Amerikan bilim adamı James B. Sumner kristalleştirilmiş üreazın katalitik gücünün kendi protein yapısında saklı olduğunu bulmuştur.

Bu çalışmanın hemen ardından John H. Northrop tarafından yapılan çalışmada benzer şekilde proteaz kristalize edilmiş ve katalizden sorumlu tek bileşenin protein yapısı olduğunu belirtmiştir (Purich, D.L., 2010).

### **1.1.Endüstriyel Enzimler**

Üretimde enzimlerin biyokatalizör olarak kullanılması; bira yapımı için arpanın hazırlanmasında, ekmeğin mayalanmasında kullanılması gibi örnekleriyle binlerce yıl öncesinde başlamıştır.

İzole enzimlerin endüstride kullanılması 1914 yılları civarında deterjan sektöründe başlamıştır. 1960'larda ise geniş skalada mikrobiyal enzim üretimi başlamıştır (Eggleston, 2007). Günümüzde endüstriyel anlamda kullanılan enzim uygulamaları çizelge 1.1'de listelenmiştir (Eggleston, 2007).

Enzim biyokatalizörler, en önemli endüstriyel biyoteknolojilerden biri olarak devam etmekte ve bunlar endüstriyel enzimler içinde yeni bir alan oluşturmaktadır. Çünkü bu biyokatalizörler biyoteknolojinin hızlı gelişimine paralellik göstermektedir.

Buna ek olarak, endüstriyel enzimlerin beyaz teknolojinin (endüstriyel ve çevresel biyoteknoloji) genişleyen bir parçası haline geleceği ümit edilmektedir.

Beyaz teknoloji, biyoplastikler ve biyoyakıtların üretimi için endüstriyel enzimlerin kullanımını ve çevresel kirliliğin azaltılmasını kapsamaktadır (Sasson, 2005). Beyaz biyoteknoloji ve bununla ilgili olan endüstriyel enzimlerin kullanımının çevreye faydalarından ötürü, bugünkü kimya endüstrisinde yaygın hale geleceği belirtilmektedir.

Özellikle karbonhidrat temelli olan endüstriyel enzimlerin avantajlarına bakıldığında;

1. Binlerce enzime ulaşılabilirlik
  - Bilinen enzimlerin sayısı yaklaşık olarak 3000 civarında ama ticari enzimlerin sayısı 100'den biraz fazladır.
2. Endüstriyel proseslerin katalizlenmesinde enzimlerin yüksek spesifiklik göstermesi
3. Protein mühendisliklerinin ve genetik olarak modifiye edilmiş organizmaların hızlı gelişimiyle yeni enzimlerin üretim süresinin kısalması, verimin arttırması ve üretim fiyatının düşmesi
4. Geleneksel kimyasallarla karşılaştırıldığında endüstriyel enzimlerin çevre dostu olması
  - Daha az ve daha düşük sera gazı emisyonu ve daha az endüstriyel kimyasal atık
5. Hammadde olarak karbonhidratların kullanımının artması

- Karbonhidratlar doğada en çok bulunan yenilenebilen organik materyallerdir. Günümüzde petrol ve doğalgaz hammaddelerinin kimya endüstrisindeki fiyatlarının çarpıcı şekilde artması da karbonhidrat kullanımına olan ilgiyi arttırmaktadır.
6. Hammaddelerin daha etkili dönüşümü ve prosesin standardizasyonu
  7. Biyorafineri gibi yeni uygulamalar ile endüstriyel enzimlerin daha faydalı hale gelmesi ve bu enzimlerin petrol rafinerileri ile yer değiştirebilmesi (Eggleston, 2007).

Çizelge 1.1. Endüstriyel enzimlerin uygulamaları

Uygulama alanları	Enzim adı	Substrat	Endüstriyel etki
<b>Deterjan</b>	Selülaz	Selüloz	Rengin parlaklaştırılması
<b>Tekstil</b>	Selülaz	Selüloz	Mikrofiberlerin uzaklaştırılması
<b>Hayvan yemi</b>	Ksilanaz	Ksilan	Fiberlerin çözünürlüğü
<b>Pulp ve kâğıt</b>	Ksilanaz	Ksilan	Pulpun ağartılması
<b>Nişasta</b>	Amilaz	Nişasta	Glikoz oluşumu
	Glikoz izomeraz	Glikoz	Fruktoz oluşumu (yüksek fruktoz içerikli şuruplar)
<b>Meyve suyu</b>	Pektinaz	Pektin	Meyvesuyunun berraklaştırılması
	Selülaz	Selüloz	Meyve suyu ekstraksiyonu
	Ksilanaz	Ksilan	Meyve suyu ekstraksiyonu
<b>Pişirme</b>	Ksilanaz	Ksilan	Hamurun iyileştirilmesi
	$\alpha$ -amilaz	Nişasta	Raf ömrünün uzatılması
	Glikoz oksidaz	Glikoz	Hamur kalitesi
<b>Mandıra</b>	Laktaz	Laktoz	Laktoz hidrolizi
<b>Mayalama</b>	Glukanaz	Glukan	Süzmeye yardımcı olmak

2002'de endüstriyel karbonhidrazların Dünya çapındaki satışları 596 milyon dolar ve bu satışların yaklaşık olarak %24'ü çamaşır deterjanlarında, %15'i nişastalı şuruplarda, %14'ü hayvan yemlerinde, %10'u tekstilde, %12'si kâğıt ve pulpta, %26'sı diğer enzimlerde bulunmaktadır (Kashyap vd.,2001).

### **Endüstriyel enzimlerin üretimdeki avantajları**

Proteinazlar gibi bazı endüstriyel enzimler hala hayvan ve bitki dokularından ekstrakte edilmektedir. Karbonhidrat temelli materyallere etki eden endüstriyel enzimlerin çoğu günümüzde fermentörlerde, sıvı besi ortamında mikroorganizmalardan üretilmektedir.

Birinci aşama endüstriyel enzimin seçimidir. En önemli kısım seçim kısmıdır çünkü birçok enzim ekstrem endüstriyel proses koşullarında kullanılmaktadır. Dikkat edilen kriterler spesifiklik, reaksiyon kinetiği, optimum ve stabil pH ve sıcaklık, inhibitörlerin etkisi, substrata olan ilgiden oluşur. Tercihen substratın tipik endüstriyel derişimlerinde, yüksek derecede aktif olan enzim seçilmek zorundadır; çünkü ancak bu şekilde reaksiyon prosesi gerçekçi bir zaman çerçevesinde tamamlanabilir. Bunun yanı sıra enzim çeşitli ağır metallere karşı toleranslı olmalıdır ve kofaktöre ihtiyaç duymamalıdır (Eggleston, 2007).

Birçok durumda endüstriyel uygulamalar için seçilen doğal enzimler, bu koşullardaki uygulamalar için optimum özelliklere sahip değildir. Çünkü doğal enzimlerin geliştiği in vivo koşullar, sert endüstriyel koşullarla karşılaştırıldığında çok daha ılımlıdır. Son 20 yıldır, bu problemin üstesinden gelmek için 2 yaklaşım sunulmaktadır:

- 1) Doğadaki daha iyi enzimleri keşfetmek (biyoseçimlilik)
- 2) Genetik ve protein mühendislikleri ile ticari enzimleri geliştirmek

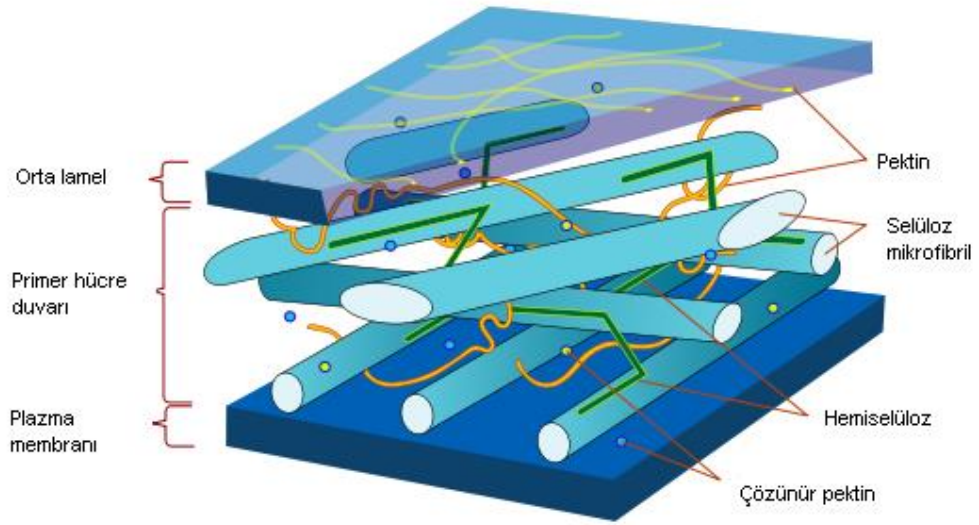
En iyi ticari enzimler konakçı organizmalardan çoğaltılsa ve biyoseçimli olsa da; biyoseçimlilik genellikle zaman ve kaynak kaybıdır. Enzim mühendisliği son yıllarda



hızlı şekilde gelişse de, biyoseçimlilik gibi olaylar zaman kaybıdır. Mühendislik çalışmaları enzimin verimini ve kinetik özelliklerini geliştirmek üzerine yoğunlaşmaktadır ve güvenlik açısından tehlikeli ve onaylanmayan mikroorganizmalardan, yüksek derecede üretici mikroorganizmalara klonlama yapmaya çalışmaktadırlar. Birçok anahtar endüstriyel enzim şu an genetiği değiştirilmiş organizmalardan (GDO) üretilmektedir (Eggleston, 2007).

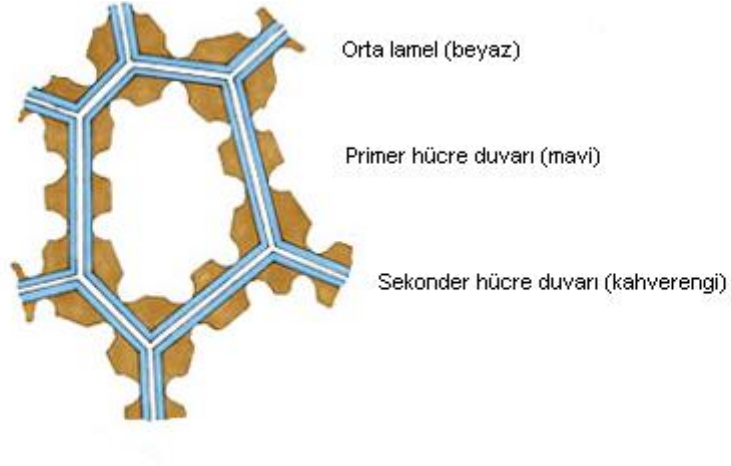
## 1.2. Pektik Maddeler

Pektin bitkilerin primer hücre duvarında bulunan yapısal bir heteropolisakkarittir. Bitkilerin primer hücre duvarının en büyük bileşenlerinden birisi pektindir; pektin orta lamelin temel bileşenidir (Şekil 1.1) (Marquez vd., 2011).



Şekil 1.1. Bitkinin orta lamelindeki ve primer hücre duvarındaki pektin (Private Üniversitesi Council)

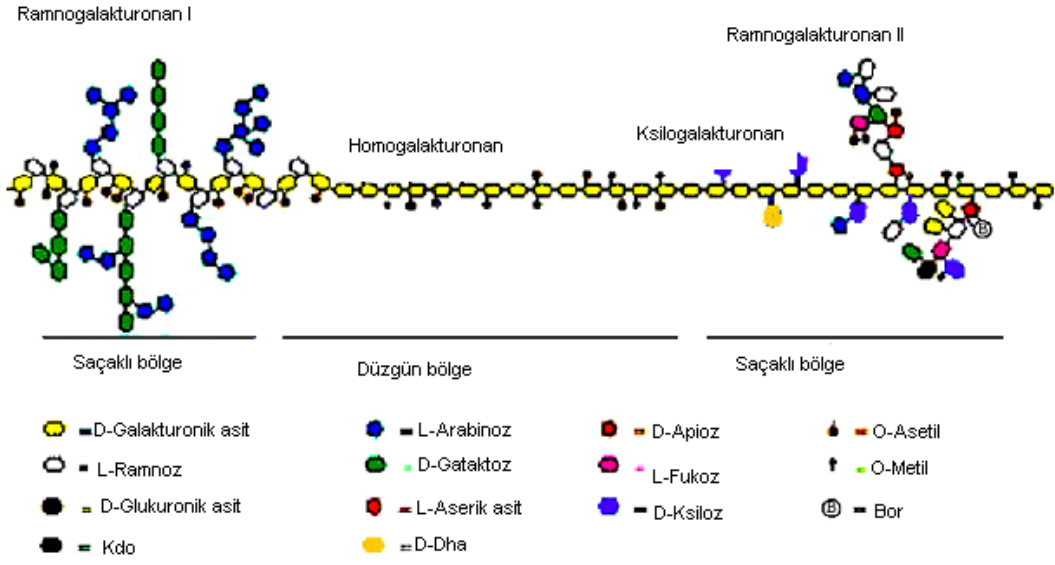
Tek çenekli bitkilerin primer hücre duvarının yaklaşık olarak % 35'i pektin içerir. İkincil duvarda pektin içeriği önemli derecede azalmaktadır; buna rağmen, pektin hem birincil hem de ikincil duvarın yapısında ve fonksiyonunda önemli role sahiptir (Şekil 1. 2).



Şekil 1.2. Bitki hücre duvarının yapısı (Private Üniversitesi Council)

Hücre duvarında bulunan pektin; bitkinin büyüme ve gelişmesi, savunma, hücre adezyonu, hücre duvarının yapısını oluşturma, selüler büyüme, porozite, iyon bağlama, tohumlara su katma, yaprak dökülmesi ve meyvenin gelişmesinden sorumludur (Marquez vd., 2011).

Pektik maddeler kompleks koloidal asit polisakkaritlerdir,  $\alpha$ -1,4 bağlı galakturonik asit rezidüleri pektik maddelerin omurgasını oluşturur (Şekil 1.3). Pektin, galakturonik asitçe (Gal A) zengin polisakkaritler içerir, bu galakturonik asitler kovalent olarak bağlanmış yapısal domainler olarak bulunur: homogalakturonan (HG), ksilogalakturonan (XGA), ramnogalakturonan I (RG-I), ramnogalakturonan II (RG-II) . HG; pektinde en bol bulunan bileşendir. HG,  $\alpha$ -D-1,4 bağlarıyla bağlanan yaklaşık olarak 100 tane GalA rezidüsünden oluşur, bu bağlar C-6 pozisyonundan metille esterleşebilir veya O-2 ya da O-3 pozisyonundan asetillenebilir (Marquez vd., 2011).



Şekil 1.3. Pektinin yapısı (Yadav vd., 2009)

Pektin molekülünün yan zinciri L-ramnoz, arabinoz, galaktoz ve ksiloz içerir. Galakturonik asitin karboksil grupları metil gruplarıyla kısmen esterleşebilir ve non-esterifiye galakturonik asit birimleri ya serbest asitlerle ya da kısmen veya tamamen  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  iyonları ile nötralize edilebilirler.

Omurga zincirine modifikasyonlarına bağlı olarak pektik maddeler protopektin, pektik asit, pektinik asit, pektin olarak sınıflandırılabilirler (Be Miller, 1986).

Protopektin: Esas pektik maddedir ve pektinin veya pektinik asitin hidroliz verimini sınırlandırır. Protopektin bitki dokularında bulunan suda çözünmeyen pektik maddeleri tanımlamak için kullanılır ve bunlardan; çözünen pektik maddeler oluşturulur (Be Miller, 1986).

Pektik asit: Galakturonanlardır, göz ardı edilebilir miktarda metoksil grubu içerir. Pektik asitlerin normal veya asit tuzları pektatlar olarak adlandırılır.

Pektinik asitler: Çeşitli miktarda metoksil grupları içeren galakturonanlardır. Pektinatlar, pektinik asitin normal veya asit tuzlarıdır (Be Miller, 1986).

Pektinik asitin eğer metil içeriği uygun miktarda düşükse, kalsiyum tuzları gibi diğer bileşiklerle veya şeker ve asit ile jel oluşturma özelliği eşsiz olan maddedir.

Pektinler: En büyük bileşeni olarak farklı bileşimlerde pektinik asit içeren karışım için kullanılan genel isimdir. Pektinin doğal formu hücre duvarında yer alır ve diğer yapısal polisakkarit ve proteinlerle bir araya gelerek çözünmeyen protopektini oluşturur (Be Miller, 1986).

Olgunlaşmamış meyvelerde, hücre duvarında pektin selüloz mikrofibrillere bağlanır. Bu pektin suda çözünmez ve bu yüzden hücre duvarının sertliğini sağlar.

### **1.3. Pektinolitik Enzimler**

Pektik maddeleri degrades eden enzimler, pektinolitik enzimler olarak tanımlanır. Pektinolitik enzimler 4 gruba ayrılabilir (Palomaki ve Saarilahti, 1997; Pedrolli vd., 2009):

- Protopektinazlar: Çözünmeyen protopektini degrades ederler ve yüksek derecede polimerize çözünür pektin meydana getirirler.
- Esterazlar: Metoksi esterlerinin uzaklaştırılması yoluyla, pektinin de-esterifikasyonunu katalizlerler. Bunlar, pektin metil esteraz (PME) ve pektin asetil esteraz (PAE)'dir.
- Depolimerazlar: Pektik maddelerin D-galakturonik asit parçalarındaki  $\alpha$ -(1-4) glikozidik bağlarının hidrolitik kırılmasını katalizlerler. Bunlar polimetil galakturonaz (PMG), poligalakturonaz (PG), pektat liyaz (PGL) ve pektin liyaz (PL)'dir.

- Pektinin yan zincirini parçalayan enzimler: Pektinin ramnogalakturonan I ve II yan zincirlerine etki ederler. Bunlar; ramnogalakturonan ramnohidrolazlar (RG ramnohidrolazlar), ramnogalakturonan galakturonohidrolazlar (RG galakturonohidrolaz), ramnogalakturonan hidrolazlar (RG hidrolazlar), ramnogalakturonan liyazlar (RG liyazlar), ramnogalakturonan asetilesterazlar (RG asetilesterazlar), ksilogalakturonan hidrolazlar (XGA hidrolazlar)'dır.

Protopektinazlar: Protopektinazlar protopektini çözerler, yüksek derecede polimerize çözünen pektin oluştururlar (Alkorta vd., 1998; Kashyap vd., 2001). 2 tip olarak sınıflandırılırlar:

A Tipi; protopektinin poligalakturonik asit bölgesiyle etkileşir.

B Tipi; poligalakturonik asit zinciri ve hücre duvarı bileşenleri ile bağlantılı polisakkarit zinciriyle etkileşir (Sakai vd., 1993).

Pektin metil esterazlar (PME): Pektin metil esteraz veya pektinesteraz (E.C 3.1.1.11), pektinin metoksil gruplarının de-esterifikasyonunu katalizler, metanol ve pektik asit oluşturur. Enzim, esterifiye olmamış galakturonat ünitelerinin yanındaki metil ester grupları üzerine tercihen etki eder. Esterifiye olmamış substratlara ihtiyaç duyan poligalakturonazlar ve pektat liyazlardan önce etki eder (Kashyap vd., 2001).

Pektin asetil esterazlar (PAE): Pektin asetil esteraz (E.C 3.1.1.-), pektinin asetil esterlerini hidrolizler, pektik asit ve asetat oluşturur (Shevchik ve Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997).

Polimetilgalakturonazlar (PMG): Polimetil galakturonaz pektin omurgasındaki  $\alpha$ -1,4 glikozidik köprünün hidrolitik kırılmasını katalizler. Yüksek esterifiye pektini tercih eder, sonuçta 6-metil D-galakturonat oluşur (Jayani vd., 2005).

Poligalakturonazlar (PG): Poligalakturonaz, poligalakturonik asitteki  $\alpha$ -1,4-glikozidik köprülerin hidrolizini katalizler, D-galakturonat oluşur (Jayani vd., 2005).

Hidrolaz enzimlerinin 2 grubu (PMG, PG) endo ve ekzo şeklinde etki gösterebilir. Endo- PG (3.2.1.15) ve endo-polimetil galakturonaz, substratın rastgele kırılmasını katalizler; ekzo-poligalakturonaz (E.C 3.2.1.67) ve ekzo-polimetil galakturonaz substratın indirgen olmayan ucundan hidrolitik kırılmayı katalizler, bazı durumlarda monogalakturonat veya digalakturonat oluşur (Rombouts ve Pilnik, 1980; Kashyap vd., 2001). Hidrolazlar temel olarak funguslar tarafından üretilir, 40-60 °C arasındaki sıcaklıklarda, nötral veya asidik ortamda daha aktiftirler.

Pektat liyazlar (PGL): Pektat liyaz, tercihen poligalakturonik asit üzerindeki glikozidik köprüleri transeliminasyon reaksiyonlarıyla kırar, doymamış ( $\Delta$ 4,5 -D-galakturonat ) oluşur. Poligalakturonat liyazın  $Ca^{2+}$  iyonlarına ihtiyacı vardır. Bu yüzden EDTA şelatlayıcı ajanı tarafından güçlü şekilde inhibe edilir. Pektat liyazlar endo-PGL (E.C 4.2.2.2) ve ekzo-PGL (4.2.2.9) olarak sınıflandırılırlar. Endo-PGL rastgele yolla substrata etki eder ve ekzo-PGL indirgen olmayan uçtan substratın kırılmasını katalizler (Rombouts ve Pilnik, 1980; Pitt,1988).

Pektin liyazlar (PL): Pektin liyaz, tercihen yüksek esterifiye pektinin rastgele kırılmasını katalizler, glikozidik köprülerin transeliminasyonu ile doymamış metil oligogalakturonat oluşur. Bugüne kadar tanımlanan tüm pektin liyazlar endo-Pektin liyazlardır (E.C 4.2.2.10) (Sinitsyna vd., 2007). Pektin omurgasına etki eden pektinolitik enzimlerin etki mekanizması şekil 1.4'te verilmiştir (Jayani vd., 2005).

Fungustan elde edilen liyazlar asidik ve nötral ortamda optimum aktivite göstermekteyken, bakteriden elde edilenler alkalın ortamda daha aktiftirler (Pedrolli vd., 2009).

Pektin substratının tamamen degradesyonu ramnogalakturonan zincirini kıran enzimlere ihtiyaç duyar (Pedrolli vd., 2009).

Ramnogalakturonan ramnohidrolazlar (RG ramnohidrolazlar): RG ramnohidrolaz, ramnogalakturonan  $\alpha$ -L-ramnopiranohidrolaz veya  $\alpha$ -L-ramnosidaz (E.C 3.2.1.40)

adlarıyla da bilinir. İndirgeyici olmayan uçtan ramnogalakturonan zincirinin hidrolitik kırılmasını katalizler (Mutter vd., 1994).

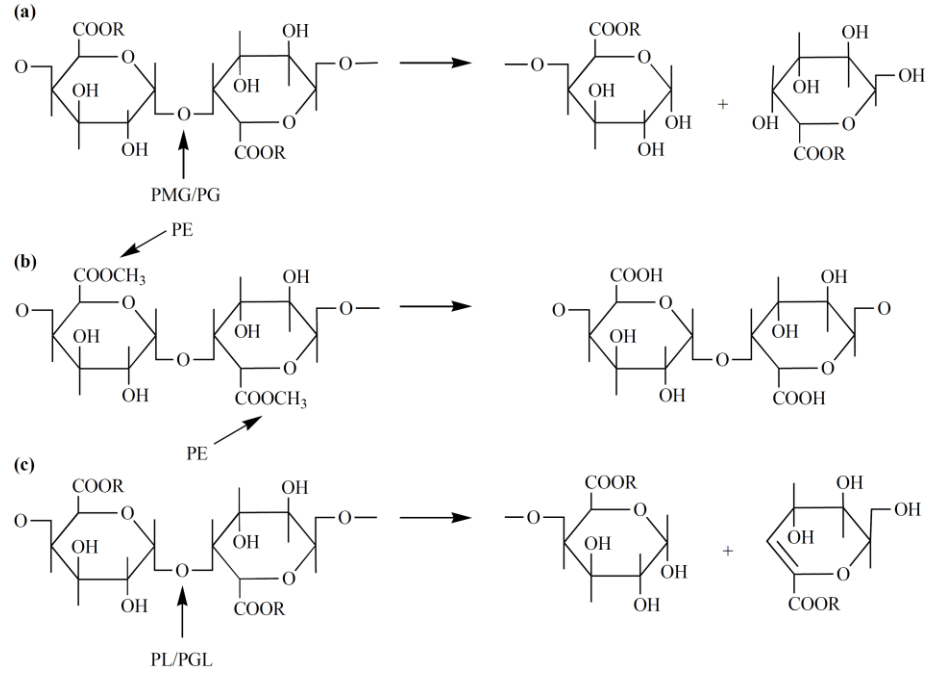
Ramnogalakturonan galakturonohidrolazlar (RG galakturonohidrolaz): Ramnogalakturonan galakturonohidrolaz (E.C 3.2.1.-), indirgeyici olmayan uçtan, ramnogalakturonan zincirinin hidrolitik parçalanmasını katalizler ve sonuçta monogalakturonat oluşur (Mutter vd., 1998).

Ramnogalakturonan hidrolazlar (RG hidrolazlar): Ramnogalakturonan hidrolaz, ramnogalakturonan zincirinin rastgele hidrolizini katalizler, sonuçta oligogalakturonat oluşur (Mutter vd., 1998).

Ramnogalakturonan liyazlar (RG liyazlar): RG liyaz ( E.C 4.2.2.-), ramnogalakturonan zincirinden ramnoz-galakturonat köprüsünün rastgele transeliminasyonunu katalizler (Mutter vd., 1996).

Ramnogalakturonan asetilesterazlar (RG asetilesterazlar): RG asetilesteraz (E.C 3.1.1.-), ramnogalakturonan zincirinden asetil gruplarının hidrolitik kırılmasını katalizler (Searle-Van Lee vd., 1992).

Ksilogalakturonan hidrolazlar (XGA hidrolazlar): Ksilogalakturonaz (E.C 3.2.1.-), ksilozla substitue olmuş ramnogalakturonan zincirindeki, 2 galakturonat zinciri arasındaki glikozidik köprünün hidrolitik kırılmasını katalizler, ksiloz-galakturonat dimerleri oluşur (Vlugt-Bergmans vd., 2000).



Şekil 1.4. Pektinazların etki mekanizması: (a) PG için R=H; PMG için R=CH<sub>3</sub>; (b) PE için R=H; (c) PGL için R=H; PL için R=CH<sub>3</sub>. PMG, polimetilgalakturonaz; PG, poligalakturonaz (E.C 3.2.1.15); PE, pektinesteraz (E.C 3.1.1.11); PL, pektin liyaz (E.C 4.2.2.10).

Çizelge 1.2. Pektinolitik enzimlerin sınıflandırılması (Jayanni vd., 2005)

Enzim	E.C.	E.C sistematik isminin modifiye hali	Etki mekanizması	Etki yolu	Öncül substrat	Ürün
<b>Esterazlar</b>						
1.Pektin metil esteraz	3.1.1.11		Hidroliz	Rastgele	Pektin	Pektik asit + metanol
<b>Depolimerize enzimler</b>						
<b>a.Hidrolazlar</b>						
1.Protopektinazlar			Hidroliz	Rastgele	Protopektin	Pektin
2.Endo-poligalakturonaz	3.2.1.15	Poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galaktosiduro-nat glikanohidrolaz	Hidroliz	Rastgele	Pektik asit	Oligogalakturonat
3.Ekzo-poligalakturonaz	3.2.1.67	Poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galaktosiduro-nat glikanohidrolaz	Hidroliz	Terminal	Pektik asit	Monogalakturonat
4.Exopoligalakturonan-digalakturono hidrolaz	3.2.1.82	Poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galaktosiduronat digalakturono hidrolaz	Hidroliz	Sondan bir önceki bağ	Pektik asit	Digalakturonat
5. Oligogalakturonat hidrolazlar			Hidroliz	Terminal	Üç galakturonat	Monogalakturonat
6. $\Delta$ 4:5 Doymamış oligogalakturonat hidrolaz			Hidroliz	Terminal	$\Delta$ 4:5 (Galakturonat) <sub>n</sub>	Doymamış monogalakturonat



Çizelge 1.2. Pektinolitik enzimlerin sınıflandırılması (Jayanni vd., 2005) (Devam)

7. Endopolimetil-galakturonazlar			Hidroliz	Rastgele	Yüksek derecede esterifiye pektin	Oligometilgalakturonat
8. Endopolimetil-galakturonazlar			Hidroliz	Terminal	Yüksek derecede esterifiye pektin	Oligogalakturonatlar
<b>b. Liyazlar</b>						
1. Endopoligalakturonat liyaz	4.2.2.2	Poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Rastgele	Pektik asit	Doymamış oligogalakturonatlar
2. Exopoligalakturonaz liyaz	4.2.2.9	Poli-(1-4)- $\alpha$ -D-galaktosiduronat ekzoliyaz	Trans-eliminasyon	Sondan bir önceki bağ	Pektik asit	Doymamış digalakturonatlar
3. Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	4.2.2.6	Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Terminal	Doymamış digalakturonat	Doymamış monogalakturonatlar
4. Endopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz	4.2.2.10	Poli(metil galaktosiduronat) liyaz	Trans-eliminasyon	Rastgele	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonat)	Doymamış metil oligogalakturonatlar
5. Exopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz			Trans-eliminasyon	Terminal		Doymamış metilmonogalakturonat

#### 1.4. Pektinazların Endüstriyel Uygulamaları

Pektinazlar, tekstil ve meyve endüstrilerinin gelecek vaat eden enzimlerinden birisidir. Bitki dokularının kompleks polisakaritlerini kırarak galakturonik asit gibi daha basit moleküllere dönüştürürler.

Asidik pektinazların rolü meyve sularının bulanıklığının ve sertliğinin giderilmesi üzerinedir.

Alkalın pektinazların rolü ise tekstil endüstrisinde fiberli ürünlerin zamksızlaştırılması ve havuzlanması, iyi kalitede kâğıt üretimi, kahve ve çay fermantasyonu, yağ ekstraksiyonu ve pektik atık sulara muameledir (Kashyap vd., 2000).

## **Alkalin pektinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları**

Yıllardır, alkalin pektinazlar, tekstil ve bitki lif prosesleri, çay ve kahve fermentasyonu, yağ ekstraksiyonu, pektinli materyal içeren endüstriyel atık sulara muamele gibi birçok endüstriyel proste kullanılmaktadır. Pektini degrede eden mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların ürettiği enzimlerin daha iyi anlaşılmasıyla alkalin pektinazlar bitki virüslerinin saflaştırılması, kâğıt yapımı gibi diğer birçok biyoteknolojik proste de yer almaya başlamıştır (Kashyap vd., 2000).

## **Tekstil prosesleri ve pamuk liflerinin temizlenmesi**

Tekstil proseslerinde enzim kullanılması hem çevresel hem de ürün kalitesi açısından faydalıdır. Fabrikada dokumada kullanılan ipler boyut ajanıyla kaplanır; bu, dokuma sırasında ipliği aşınmadan korur. Eskiden, pamuk dokumalı kumaşlar için boyut ajanı olarak nişasta kullanılırdı; çünkü nişasta mükemmel film oluşturma kapasitesine sahiptir ve oldukça düşük fiyatlıdır. Kumaş boyanmadan önce, pamuk içinde bulunan boyut ajanı ve doğal, selülozik olmayan materyaller uzaklaştırılmalıdır. Amilaz enzimlerinin keşfinden önce, nişasta tabanlı boyut ajanlarını uzaklaştırmanın tek yolu yüksek sıcaklıklarda kostik soda (% 3-6 sodyum hidroksit çözeltisi) ile muamele etmektir. Buna rağmen nişastanın uzaklaştırılmasında kimyasal muamele tamamen etkili olmamakta, pamuk liflerinin degradasyonu sonucunda pamuğun doğal yumuşak kumaş yapısı da zarar görmekteydi. Boyut ajanlarının uzaklaştırılması için amilaz, selülaz, lipaz ve diğer hemiselülotik enzimler ile birlikte pektinaz gibi enzimlerin kullanılması, tekstil endüstrisinde zararlı kimyasalların kullanılmasını azaltmaktadır, sonuçta atık kimyasalların çevreye atılması azalmakta, hem tekstil işçileri için çalışma koşulları daha güvenli hale gelmekte hem de kumaşın kalitesi artmaktadır (Hoondal vd., 2002).

Pamuk lifleri lümen, birincil ve ikincil duvar içermektedir. Yağ, mum, protein, pektin, doğal renk maddeleri, mineraller, suda çözünebilen bileşikler gibi selülozik olmayan safsızlıklar -birincil duvarın selülozik matriksi içinde bol miktarda bulunurlar, ikincil duvarda daha az miktarda bulunurlar- güçlü şekilde pamuk

fiberlerinin beyazlığını ve su emiciliğini sınırlarlar (Buschle-Diller, 2001). Pektin güçlü biyolojik yapışkana benzer; daha çok suda çözünmeyen pektin tuzları, proteinleri ve mumları bağlama görevi görerek fiberlerin koruyucu bariyerini oluşturur. Bu bariyerlerin miktarı ve bileşimi yetiştirme koşullarına, iklimsel faktörlere, pamuk çeşitliliğine göre değişir. Buna ek olarak çekirdeği kaplayan materyaller ve olgunlaşmamış pamuğun nep (lif düğümçüğü) içermesi durumunda boyanamama gibi ciddi problemler ortaya çıkar. Pamuğun temizlenmesi, geleneksel olarak yüksek sıcaklıklarda kostik alkalın çözeltisi (% 3-6 sodyum hidroksit çözeltisi) ile gerçekleştirilir. Buna rağmen safsızlıkların etkili şekilde uzaklaştırılmasında, prosesin tamamlanması için durulamada kullanılmak üzere yüksek miktarda suya ve enerjiye ihtiyaç vardır ve atık ürünler çevreye zarar vermektedir. Suyun aşırı şekilde kullanılması da maliyeti yükseltmektedir. Bu yüzden pamuk işleme proseslerinde etkin fiyatlı, çevreye zararı az olan yeni, etkili stratejiler geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Selüloz yıkımının negatif yan etkisi olmadan iyi şekilde su soğurmasını başarmak için pektinazlar gibi enzimler tarafından gerçekleştirilen hidroliz ile prosese destek sağlanmaktadır. Bu proses biyo-yıkama olarak adlandırılmaktadır. Biyo-yıkama selülozik olmayan safsızlıkları spesifik enzimlerle muamale etme fikrine dayanmaktadır. Örneğin pektinazlar pektinik maddelerin bozunması için, proteazlar proteinler için, lipazlar yağlar için kullanılır. Biyoyıkamada enzim kullanımı enerji tasarrufuna ek olarak, çevre dostudur. Biyo-yıkamada kullanılan enzimler selüloz omurgasını etkilemez, liflerin zarar görmesini büyük derecede engeller (Hoondal vd., 2002).

### **Bitki liflerinin zamksızlaştırılması**

Zamksızlaştırma, bitki dokusunu daha yumuşak ve parlak hale getirmek için degumming (zamksızlaştırma) denilen işleme tabii tutmadır. Serisin suda çözünebilen yapışkan özelliğe, protein yapısındaki makromoleküldür. Fibroin ise life oryante olmuş proteindir. Serisin, fibroinin etrafını yapışkan yapısı sayesinde sarmaktadır ve böylece bitki, ipek liflerini bir arada tutmaktadır. Ham ipek liflerinde bulunan yağ, anorganik maddeler ve boyarmaddelerin tamamına yakın bir kısmı

fibroini saran serisin tabakasında bulunmaktadır. Bu nedenle serisini uzaklaştırılan lifler bu yabancı maddelerden arınmış olurlar (Duran vd., 2003).

Pektinolitik enzimlerin en çok kullanıldığı yer kenevir, çin keneviri, hint keneviri, keten ve kendir gibi bitki fiberlerinin zamksızlaştırılmasıdır (Bruhlmann, vd., 1994). Enzimatik proses sonucunda fibere hiçbir zarar verilmemektedir; bunun yanı sıra enerji tasarrufu sağlanmakta ve proses çevreye zarar vermemektedir (Gurucharanam ve Deshpande, 1986).

### **Bitki liflerinin havuzlanması**

Keten lifleri yüksek oranda selüloz, hemiselüloz ve pektin içerir. Havuzlama sırasında pektinolitik ve hemiselülozik yapılar uzaklaştırılmaktadır. Havuzlama işleminin amacı, selüloz liflerini, onları çevreleyen dokulardan ayırarak, serbest kalmasını sağlamaktır. Bu işlem, mikroorganizmaların bitki gövdesinin içine nüfuz etmesiyle ya da enzimatik işlemler ile lif yığınlarını birbirine bağlayan pektik maddeleri, suda çözünebilir basit bileşiklere dönüştürerek yapılır (Pallesen, 1996).

Havuzlama çığde, durgun suda, akarsuda, sıcak suda, kimyasal olarak ya da enzimatik olarak yapılabilir (Körlü ve Bozacı, 2006). Anaerobik bakterilerle fermantasyon esasına dayanan suda havuzlama, yüksek lif kalitesi vermesine karşın, kabul edilemez çevresel atıklara sebep olduğu için, batılı ülkelerde yıllarca önce vazgeçilmiştir (Körlü ve Bozacı, 2006).

Çığde havuzlama, aerobik mantarlar ile açık alanda bekletilerek yapılmaktadır. Bu yöntem batılı ülkelerde tercih edilmekte ve birçok keten lifi bu şekilde üretilmektedir.

Ancak çığde havuzlama;

- Havuzlama için uygun nemi ve sıcaklığı olan belli coğrafik bölgelere bağımlılık
- Suda havuzlamaya göre daha kaba ve düşük kaliteli liflerin eldesi
- Lif özelliklerindeki tutarlılığın azalması

- Tarım alanlarını haftalarca meşgul etmek gibi dezavantajlara sahip olduğundan havuzlama, halen keten lifinin üretimi için büyük bir problemdir (Körlü ve Bozacı, 2006).

Fiberleri ayırmak ve pektini elimine etmek için Hint keneviri ve ketenin havuzlanmasında pektinazlar kullanılır. Böylece daha yüksek verim ve daha az çevresel kirlilikle endüstriyel proses tamamlanmış olur (Hoondal vd., 2002).

### **Pektik atık sulara ön muamele**

Geleneksel olarak, pektik maddeleri içeren sitrus (turunçgiller) prosesinden elde edilen atık suların muamelesi birden fazla basamakta gerçekleştirilir. Bunlar fiziksel olarak suyun uzaklaştırılması, püskürterek sulama, kimyasal pıhtılaştırma, doğrudan aktive edilmiş çamura muamele ve kimyasal hidrolizden oluşur. Kimyasal hidroliz metan oluşumuna sebep olur. Burada, muamelenin yüksek fiyatlı olması, kimyasalların kullanımında çevresel kirliliğine ek olarak uzun muamele süresi gibi birçok dezavantaj söz konusudur. Atık sulardan seçici bir şekilde pektik maddeleri uzaklaştırmak için alternatif, ucuz, çevre dostu metotlar bakteriden elde edilen pektinazların kullanımınıdır. Gıda prosesleri endüstrisinde, pektik atık sulara muamelede alkalın pektinazlar ve alkalofilik pektinolitik mikroorganizmaların kullanılması pektinli materyallerin uzaklaştırılmasında faydalıdır (Horikoshi, 1990). Alkalofilik *Bacillus* sp. GIR 62'dan elde edilen ekstraselüler endopektat liyazın (opt. aktivite pH 10,0) endüstriyel atık sulardan pektik maddelerin uzaklaştırılmasında etkili şekilde kullanıldığı belirtilmiştir (Tanabe, vd., 1987).

### **Kümes hayvanlarının yemleri**

Hayvan yemlerinde çeşitli enzimlerin kullanılmasıyla ilgili araştırmalar 1980'lerin başlarında gerçekleştirilmiştir. İlk ticari başarı, arpa içerikli yemlere  $\beta$ -glukanaz eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bunun ardından enzimler buğday içerikli yemlerde de denenmiş ve bu durumda en etkili enzimin ksilanaz olduğu belirlenmiştir. Genellikle yem enzim preparatları glukanaz, ksilanaz, proteinaz, pektinaz, amilaz

multienzim kokteylini içerir (Hoondal, vd., 2002). Yeme enzim eklenmesi viskoziteyi azaltır; bu, besinlerin absorpsiyonunun artmasını sağlar. Böylece hayvanın vücut ağırlığı artar ve kemikleri güçlenir (Petersen, 2001).

### **Virüslerin saflaştırılması**

Virüs saflaştırılmasıyla ilgili elde edilen bilgiler oldukça kısıtlıdır. Virüslerin çok saf preparatları kimyasal, fiziksel ve diğer biyolojik yöntemlerle elde edilmektedir. Bitkide enfeksiyon yapan birçok virüse birçok saflaştırma prosedürü uygulanabilmektedir. Buna rağmen virüsün çeşidine göre çok farklı saflaştırma prosedürleri mevcuttur. Bu durumlarda virüs floeme gizlenir, selüloz, alkalik pektinazlar gibi belli enzimler dokudan virüsün serbest bırakılmasında kullanılabilir (Hoondal vd., 2002).

### **Yağ ekstraksiyonu**

Limon yağı gibi sitrus yağları pektinazlarla ekstrakte edilebilir. Bitki hücre duvarını parçalayan enzim preparatları zeytinyağı preparatlarında da kullanılmaya başlanmıştır. Zeytinin ezilmesi sırasında enzimler eklenir, arka arkaya ayırma işlemleri ile yağın kolaylıkla uzaklaştırılması sağlanır (Scott, 1978).

### **Meyve suyu endüstrisinde asidik pektinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları**

Pektik maddeler meyve suyunun kararlılık, bulanıklık ve görünümünden sorumludur (Borrego, vd., 1989). Pektik maddelerin meyve suyunda bulunması meyve suyunun viskozitesinde dikkate değer bir artışa sebep olmaktadır. Bu yüzden pektik maddeler prosesin filtrasyonuna ve ardından konsantre edilmesine engel olur (Serra, vd., 1992).

Pektik enzimler, meyve suyunun veriminin artırılmasında ve berraklaştırılmasında uzun süredir kullanılmaktadır. Pektik enzimler tek başına göz önünde

bulundurulduğunda Dünya'daki gıda enzim üretiminin 4'te birini oluşturmaktadır (Rombouts, vd., 1980 ).

Meyve suyu berraklaştırılma işlemlerinde; filtrasyonu kolaylaştırmaya ve bulanıklığı gidermeye ihtiyaç duyulur; bu pektik enzimlerin en eski kullanımlarından birisidir (Rombouts vd., 1980 ).

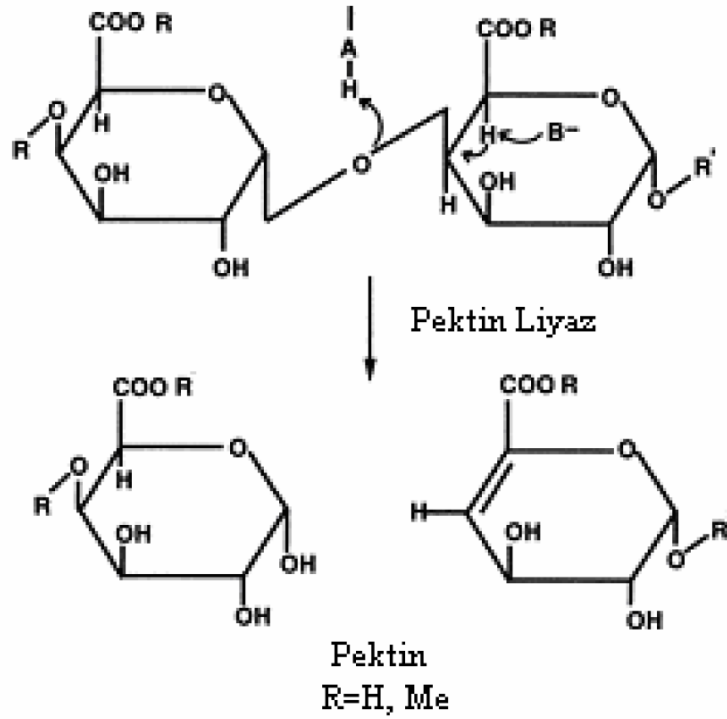
Çözünmeyen parçacıklar (pektik maddeler) meyve sularının berraklaştırılmasında sorun yaratır. Pektik enzimlerin eklenmesi, çökelmeye sebep olduğu kadar viskozitede hızlı düşmeye de sebep olur. Böylece bu parçacıkların çökme veya süzme ile ayrılması kolaylaşır (Alkorta, vd. 1996)

Meyve suyu proseslerinde, pektik enzimlerin diğer önemli uygulaması da meyve suyu ekstraksiyonundaki rolüdür. Pektinin bu enzimlerle bir kere daha degradasyonu preslemeyi kolaylaştırır ve yüksek verim sağlar. Kuş üzümü, ahududu ve siyah kiraz gibi yumuşak meyveler ezildikten sonra, bu ham meyve suları çok viskozdur ve kalan katıları meyve suyundan ayırmak çok zordur (Sakai, T., vd. 1993).

Pektik enzimlerin aktivitesi ile meyve suyunun viskozitesi düşürülür ve böylece presleme ile meyve suyunun ekstrakte edilmesine olanak sağlanır (Alkorta, vd, 1997).

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pektin liyaz (E.C. 4.2.2.10) enziminin sistematik adı endopolimetil-D-galaktoziduronat liyazdır. Pektin liyaz, pektin polimerini doğrudan  $\beta$ -eliminasyon mekanizmasıyla degrede ederek 4,5-doymamış oligogalakturnid oluşturur (Yadav vd., 2009). Aşağıda enzimin katalizlediği reaksiyon görülmektedir.



Şekil 3.1. Pektin liyaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Herron vd., 2000)

Pektin liyazlar, meyve suyu ve tekstil endüstrisinde yaygın uygulama alanlarına sahiptir (Yadav vd., 2009). Pektin liyazların, bu uygulama alanlarında kullanım verimini arttırmak için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda anlatılmaktadır:

*Aspergillus niger* NCIM 548 tarafından üretilen pektinolitik enzimler kullanılarak pektik maddelerin enzimatik hidrolizi için reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.



Response surface metodoloji ( cevap yüzeyleri yöntemi) ve central composite dizayn (merkezi karma tasarımı) yöntemleri kullanılarak reaksiyon parametreleri optimize edilmiştir. Pektin, polimetilgalakturonaz ve pektin liyaz için substrat olarak kullanılırken; poligalakturonik asit, poligalakturonaz için substrat olarak kullanılmıştır. Maksimum hidroliz için reaktiflerin hacim oranları belirlenmiştir. Polimetilgalakturonaz için optimum substrat ve enzim miktarı sırasıyla 0.2 cm<sup>3</sup> ve 0.074 cm<sup>3</sup>; poligalakturonaz için 0.4 cm<sup>3</sup> ve 0.086 cm<sup>3</sup>. Pektin liyaz için 0.63 cm<sup>3</sup> ve 0,7 cm<sup>3</sup> olarak bulunmuştur. Optimum pH ve sıcaklık polimetilgalakturonaz için sırasıyla 5,3 ve 30 °C; poligalakturonaz için 6,6 ve 26 °C; pektin liyaz için 4,8 ve 35 °C olarak bulunmuştur. Optimize edilmiş koşullar altındaki enzim aktivitesinin, optimize edilmeyen koşullardan daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Naidu ve Panda, 1999).

Ticari pektinaz olan Pectinex Ultra SP-L'nin kinetik özellikleri batch (kesikli) reaktörde çalışılmıştır. Enzim preparatının pektolitik aktivitesini belirlemek için enzimatik deneylerle, pektin çözeltisinin viskozitesindeki değişim takip edilmiştir. Pectinex Ultra SP-L'nin pektolitik aktivitesi pH 3,5'ta 35 °C'de ölçülmüş ve 0,025 pektin % (w/v)/sn/enzim % v/v olarak bulunmuştur. Enzim preparatının Michaelis-Menten sabiti (K<sub>m</sub>) 1,137 % (w/v) pektin olarak bulunmuştur. Reaksiyon hızının sıcaklığa bağımlılığının Arrhenius denkleminde uyduğu belirlenmiştir. Ticari enzim tarafından katalizlenen biyokimyasal reaksiyonun aktivasyon enerjisi 9,316 kkal. mol<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur (Mutlu vd., 1999).

%1 (w/v) buğday kepeği ile desteklenen Horikoshi ortamından izole edilen *Streptomyces QG-11-3*'ün, selülaz içermeyen termokararlı ksilanaz (96 IU mL<sup>-1</sup>) ve pektinaz (46 IU mL<sup>-1</sup>) ürettiği rapor edilmiştir. Karbon kaynağı olarak ksilanaz üretimi için pirinç tercih edilmiştir; pektinaz üretimi içinse pamuk çekirdeği ve pektin tercih edilmiştir. Kısmi olarak saflaştırılmış ksilanaz ve pektinazın 60 °C'de optimum olarak aktif olduğu belirlenmiştir. İki enzimin 50 °C'de 24 sa'ten daha fazla %100 kararlı olduğu bulunmuştur. Ksilanaz ve pektinazın 70, 75, 80 °C'de yarı ömürleri sırasıyla 90, 75, 9 dk ve 90, 53, 7 dk olarak belirlenmiştir. Ksilanaz ve pektinaz için 60 °C'de optimum pH değerleri sırasıyla 8,6 ve 3,0 olarak bulunmuştur.

Ksilanaz ve pektinaz geniş bir pH aralığında sırasıyla 5,4'ten 9,4'e kadar ve 2,0'dan 9,0'a kadar kararlıdır ve bu geniş aralıkta enzimlerin aktivitesinin % 85'inden daha fazlasını alıkoyduğu bulunmuştur (Beg vd., 2000).

Bir diğer çalışma havuç püresine immobilize enzimle muameleyi içermektedir. Püreye enzimatik muamele, meyve ve sebzelerden daha fazla meyve ve sebze suyu elde etmek için kullanılan modern bir prostestir. Bu tekniğe göre hücre duvarındaki ve orta lameldeki pektin, pektinaz ile degrede edilir. Bu teknik meyve suyu veriminin % 20 artması ve presleme kapasitesinin artmasının yanı sıra ürünün kuru madde karoten içeriğinin artması üzerine de pozitif etkiye sahiptir. Bu çalışmada amaç Pectinex Ultra SP-L adıyla bilinen immobilize ticari pektinazın aktivitesinin ve tekrar kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Immobilize enzimin pektinaz aktivitesi, pH 4,5 35 °C'de pektin çözeltisinin viskozitesindeki azalmayla belirlenmiştir. 1,252 pektin (% w/v)/s mL olarak bulunmuştur. 9 tekrardan sonra aktivite kaybı sadece % 20 olarak belirlenmiştir. Optimum başlangıç enzim konsantrasyonu, pektin çözeltisindeki en yüksek pektinaz aktivitesinin ölçülmesiyle % 6 (v/v) olarak bulunmuştur. Immobilize enzim havuç püresinin içine pH 4,5 35 °C'de çözünen ve çözünmeyen pektin polisakkaritlerini degrede etmek için katılır. Immobilize enzimim aktivitesi pH, kuru madde içeriği ve havuç püresinin viskozitesinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. 60 dk inkübasyondan sonra, immobilize enzim preparatı havuç püresinin viskozitesini 90'dan 6,5 Puaza ( $\text{g.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) düşürmektedir. Polisakkarit degradasyonundan ötürü havuç püresinin viskozitesi ve pH'ı azalırken, kuru madde içeriği ve total verimin arttığı belirlenmiştir. Havuç suyunun enzimik olmayan prosesinden elde edilen verim ile ilgili ortalama verim artışı % 30.23'tür. Immobilize enzim yukarıda tanımlanan koşullar altında havuç püresi ortamında 5 kez kullanılabilir ve aktivite kaybı sadece % 6,5'tur. Immobilize enzimin aktivitesinin ise oldukça kararlı olduğu rapor edilmiştir (Demir vd., 2000).

Çürümüş sebzelerden izole edilen 5 *Bacillus* suşu buğday kepeği ortamında yetiştirilerek, ham enzimatik çözeltide endo-poligalakturonaz, ekzo-poligalakturonaz, pektin liyaz aktivitesi elde edilmiştir. Tüm enzimlerde en yüksek aktivite, fermantasyon 28 °C'de gerçekleştirildiğinde elde edilmiştir. En yüksek

aktivite değerleri ekzo-poligalakturonaz için 120 saat inkübasyondan sonra, endo-poligalakturonaz ve pektin liyaz içinse 48 saat inkübasyondan sonra elde edilmiştir. Meyve ve sebzelere enzimatik muamele ile yüksek meyve suyu ekstraksiyonu ve iyi presleme özelliklerine sahip pulp elde edilmiştir (Soares vd., 2001).

Golden elma suyu; askorbik asit, izo askorbik asit, L-sistein, sorbik asit, benzoik asit, sinnamik asit,  $\beta$ -siklodekstrin olarak seçilen kahverengileşmeyi önleyici ajanlar varlığında, enzimik kahverengileşmeye tabi tutulmuştur. Elma suyundaki enzimik kahverengileşmenin inhibisyonu için kahverengileşmeyi önleyici ajanların etkisi,  $25 \pm 1$  °C'de, 1 günlük saklama periyodunda renk ve enzim aktivitesi cinsinden belirlenmiştir. En etkili ajanlar L-sistein, sinnamik asit, askorbik asit olarak belirlenmiştir. Enzimik kahverengileşmenin kontrolü için L-sistein, sinnamik asit, askorbik asit kombinasyonunun etkisi response surface metodoloji (cevap yüzeyleri yöntemi) metodu ile belirlemiştir. Bileşiklerin tek başına yaptıkları etkiden ziyade, bu üç bileşiğin kombinasyonu daha iyi sonuçlar vermiştir. Bulanık elma suyu için, üç bileşik kombine edildiğinde optimum derişimler askorbik asit için 0,49 mM, L-sistein için 0,42 mM ve sinnamik asit için 0,05 mM olarak belirlenmiştir (Özoğlu ve Bayındırlı, 2001).

PMG, PG, PL gibi pektinolitik enzimler pH ve sıcaklığın değişik şekillerinde deaktive edilebilmektedir. Deaktivasyon kinetikleri 1. mertebededir ve deaktivasyon hız sabitleri PMG için 23 °C, pH 2,2; PG için 28 °C, pH 4,8; PL için de 29 °C, pH 3,9 olarak bulunmuştur.  $\Delta G^*$ ,  $\Delta H^*$ ,  $\Delta S^*$  gibi termodinamik parametreler ve aktivasyon enerjileri ham enzim ekstraktları ve kısmi olarak saflaştırılmış enzimler için değerlendirilmiştir. 3 enzim için de entropi değerleri negatif olarak bulunmuştur. Kısmi olarak saflaştırılmış enzimin ham enzimden daha az kararlı olduğu belirlenmiştir. Deaktivasyon üzerine, enzimler arasındaki etkileşim ve BSA'nın etkisi de çalışılmıştır. Deaktivasyon üzerine pektinolitik enzimlerin etkileşiminin önemli olduğu belirlenmiştir (Naidu ve Panda, 2003).

Karışık karbon kaynaklarını içeren (mısır, glikoz) yetiştirilme ortamının glikoz içeriğinin, pektolitik enzimlerin sentezini önemli derecede etkilediği belirlenmiştir.

Glikoz fermentasyonda gerekli bir bileşendir, ortamın glikoz derişimi önemli derecede düşük olduğunda, pektolitik enzimlerin sentezi ikinci karbon kaynağı olan mısırdan önemli derecede etkilenmektedir. Yapılan çalışmalar da glikoz derişimi 5 g/L'nin üzerinde olduğunda poligalakturonaz ve polimetilgalakturonaz sentezi azalmakta, pektin liyaz sentezi ise bu durumdan etkilenmemektedir. In vitro çalışmalar, iki pektin hidrolazın inhibisyonunun tersinir ve yarışmalı olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları *Aspergillus niger* NCIM 548'de mısır tarafından pektolitik enzimlerin indüklendiğini göstermektedir (Panda vd., 2004).

Amasya elmasından elde edilen bulanık elma meyve suyunda, enzimatik kahverengileşme üzerine, kahverengileşmeyi önleyici ajanların etkisi, renk değişimi yoluyla karşılaştırılmıştır. Bu amaçla meyve suyunda (0-4 mM), farklı konsantrasyonlarda L-sistein, kojik asit ve 4-hekzilrezorsinol kullanılmıştır. Bunların etkili inhibitörler olduğu bulunmuştur. L-sistein, kojik asit ve 4-hekzilrezorsinol, enzimatik kahverengileşmenin kontrolü için de denenmiştir. Bulanık elma suyunda 3,96 mM L-sistein, 2,78 mM kojik asit ve 2,34 mM 4-hekzilrezorsinol kombinasyonunun, 24 saatlik saklama periyodu sonunda %89,2 inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. L-sisteinin kahverengileşmeyi önleyici en önemli ajan olduğu belirlenmiştir. Kojik asit ve 4-hekzilrezorsinol etkileşiminin, enzimatik kahverengileşmenin inhibisyonu üzerine pozitif etki gösterdiği bulunmuştur (İyidoğan ve Bayındırlı, 2004).

Şarap endüstrisindeki ana atık olan üzüm posası ile ilgili çalışmada; *Aspergillus awamori* kullanılarak hidrolitik enzimlerin (selülazlar, ksilanazlar, pektinazlar) katı besi ortamında üretimi denenmiştir. Petri kaplarındaki bu doğal besinle desteklenen sporlar, 7 gün statik koşullar altında inkübe edilerek, farklı zaman aralıklarında elde edilen enzim ekstraktları analiz edilmiştir. Enzim analiz sonuçları, üzüm posasının katı besi ortamında kullanılan diğer tipik substratlar ile yarışabileceğini göstermiştir (Botella vd., 2005).

Tek karbon kaynağı olarak pektini kullanıp, pektin liyaz ve pektat liyaz üreten *Debaryomyces nepalensis* isimli maya izole edilmiştir. Bu mayanın ürettiği

enzimlerin aktivitesini etkileyen parametreler 2 şekilde kategorize edilmektedir: kimyasal (substrat ve enzim miktarı) ve fiziksel (reaksiyon karışımının pH'sı ve inkübasyon sıcaklığı). Central composite dizayn (merkezi karma tasarımı) metodu kullanılarak pektin liyaz ve pektat liyaz üzerine bu fiziksel ve kimyasal parametrelerin etkisi incelenmiştir. Pektin liyaz için optimum substrat ve enzim miktarı sırasıyla 545 µL (yaklaşık olarak 1g/L pektin) ve 123 µL; pektat liyaz içinse 707 µL (1.1 g/L poligalakturonik asit) ve 96 µL olarak bulunmuştur. Reaksiyon için optimum pH ve sıcaklık, pektin liyaz için sırasıyla 6,4 ve 35 °C; pektat liyaz içinse 7,5 ve 32 °C'dir. Optimizasyondan sonra pektin liyaz ve pektat liyaz aktivitesi sırasıyla 1,3 ve 1,4 kat artmıştır (Gummadi ve Kumar, 2006).

Yeni tasarlanan bir metod ile enzim immobilizasyon bölgelerinin lokalizasyonu ve polimerik kapiler membran reaktörde enzimin katalitik aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kullanışlı yeni metod sayesinde, klasik enzim aktivite deneyleri ile Western Blot tekniği birleştirilmiştir. Böylece ışık mikroskopunda yüksek büyütmelemlerden ziyade daha düşük büyütmelemlerde de kolaylıkla sonuç elde edilebilmektedir. Zeytinden elde edilen β-glikozidaz, enzim modeli olarak seçilmiştir. Çünkü bu model yiyecek, biyoteknoloji ve tıbbi ürünlerde yaygın şekilde kullanılmaktadır ve çözünmeyen boyalarda bulunan sentetik substrat 5-brom-4-klor-3-indol-β-D-glukopiranozide karşı aktivite göstermektedir. Enzim, 30 kDa boyutundaki polisülfon membranlar içine fiziksel olarak immobilize edilmiş ve sentetik substratın immobilize enzim bölgelerinde ve enzim aktivitesinde, uygun lokalizasyonu belirlenmiştir (Mazzuca vd., 2006).

*Aspergillus niger* kullanılarak tohum vermeyen ayçiçeğinden, sıvı ve katı besi ortam koşullarında pektinaz üretimi gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus*un 2 suşu olan *Aspergillus* MF 27 ve *Aspergillus* DMF 45 pektinaz üretim yeteneğine ve pektoliziz katsayısı temeline dayalı olan çok basamaklı görüntüleme teknikleri (multi-step screening techniques) kullanılarak izole edilmiştir. *Aspergillus*un DMF 27 suşu sıvı besi ortamında enzim üretimi için, DMF 45 suşu'da katı besi ortamında enzim üretimi için kullanılmıştır. Bu besi ortamlarında maksimum pektinaz üretimini başarmak için ekim boyutu, pH, sıcaklık, parçacık büyüklüğü, nem içeriği gibi proses

değişkenleri optimize edilmiştir. Sıvı besi ortamı için optimum ekim boyutu  $1 \times 10^5$   $\text{ml}^{-1}$ ; katı besi ortamı içinse  $1 \times 10^7$  'dir. Katı besi ortamında maksimum pektinaz üretimi için substratın parçacık büyüklüğü 500  $\mu\text{m}$  ve substratın nem içeriği % 65 olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar altında katı besi ortamında maksimum ekzo-pektinaz üretimi 34,2 U/g; sıvı besi ortamında 12,6 U/mL olarak bulunmuştur (Patil ve Dayanand, 2006).

Çürümüş elmadan izole edilen *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413'in yüksek tuz ortamlarındaki halotoleransı (aşırı tuza dayanıklılık) ve gelişimi *Saccharomyces cerevisiae* ile karşılaştırılmıştır. *D. Nepalensis*'in spesifik gelişim hızı 1 M konsantrasyonunda olsa bile KCl'den etkilenmemekteyken, NaCl ve LiCl tuzlarının derişimi *D. Nepalensis*'in büyümesini etkilemektedir. Denenen tüm tuzlar arasında LiCl'ün büyümeye maksimum inhibisyon etki gösterdiği bulunmuştur. Tüm koşullarda, *D. Nepalensis*'in halotoleransı *S. Cerevisiae*'dan çok daha yüksek olarak belirlenmiştir. *D. Nepalensis* KCl ortamında ile büyütüldüğü zaman maksimum yaşama gücü % 80-100'dür ve bu değer NaCl ve LiCl ortamında yetiştirilmesinden daha yüksektir. *D. Nepalensi*'in 2 M NaCl, 2 M KCl ve 0,5 M LiCl gibi tüm yüksek tuz konsantrasyonlarında pektinaz üretebildiği ve 2 M NaCl ortamında büyütüldüğünde maksimum spesifik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Gummadi vd., 2007).

*Aspergillus flavus* MTCC 75892'den izole edilen alkali pektin liyaz, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi ve Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi yöntemleri ile saflaştırılmıştır. Enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8.0 ve 50 °C olarak bulunmuştur. pH 4-10 aralığında 24 saat boyunca enzimin kararlı kalabildiği belirlenmiştir. Enzim 1 saat boyunca 50°C'nin üzerindeki sıcaklıklara maruz bırakıldığında, enzimin aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir. 0,1-2,0 M arasında amonyum sülfat eklenmesinin enzimin termo kararlılığını arttırdığı, 60 ve 70 °C'de sırasıyla 0,6 ve 1,8 M amonyum sülfat eklenmesi enzim kararlılığının tamamlanmasını sağladığı belirlenmektedir. Enzimin  $K_m$  ve  $K_{cat}$  değerleri sırasıyla 0,59 mg/mL ve 52,2  $\text{s}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Enzimin

molekül ağırlığı 38 ±01 kDa olarak belirlenmiştir. Saflaştırılan enzimin *Crotalaria juncea* liflerinin havuzlanmasında etki gösterdiği belirlenmiştir (Yadav vd., 2008).

Bir diğer çalışmada fermantasyon teknolojisinin temeli olan biyoreaktörlerde, sıvı besi ortamı hazırlanmıştır. Bu sıvı besi ortamında farklı suşlar ve farklı substratlar kullanılarak, farklı fermantasyon süreleri denenerek pektinaz üretimi ve en yüksek verimde pektinaz eldesi için çalışma yapılmıştır (Khairnar vd., 2009).

Bir diğer çalışma meyve sularının berraklaştırılması üzerinedir. Endüstriyel olarak meyve suyunun berraklaştırılması, enzimatik olarak pektinin uzaklaştırılması, jelâtin-silika sol ve / veya bentonit muamelelerinin birleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Jelâtin-silika sol muamelesi çok yavaştır ve meyve suyu elde etmek için geniş kapsamlı proseslere ihtiyaç duyar. Jelâtin-silika sol prosesine alternatif olarak, endüstriyel olarak preslenmiş kiraz suyunun enzimatik olarak berraklaştırılmasında, *Aspergillus spp*'den elde edilen proteaz, Enzeco, Pectinex Smash, pektinazın etkisi 2<sup>4-1</sup> faktöriyel tasarım metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. 2<sup>4-1</sup> faktöriyel tasarım da gallik asit, tannik asit faktör; bulanıklık, protein, pektin ve fenolik bileşikler yanıt (response) olarak kullanılmıştır. Alternatif berraklaştırma işlemlerinin etkisi, belirli berraklaştırma işlemleri (ani bulanıklık) ve 14 gün soğukta saklama işlemlerinden (bulanıklığın gelişmesi) meydana gelir. Proteazla muamele, anlık bulanıklıkta önemli derecede azalma gösterirken, hemen ardından yapılan soğukta saklama işlemi üzerine düşük berraklaştırma etkisi göstermiştir. Bunun zıttı olarak, pektinaz eklenmesi anlık bulanıklığın azalması üzerine zayıf etki gösterirken, saklama sırasındaki bulanıklığın azalmasındaki (bulanıklığın gelişmesi) etkisi yüksektir. Fenolik asitlerin, pektinaz veya proteaz ile birlikte eklenmesinin bulanıklığın azalmasına katkı sağladığı belirtilmiştir. Buna rağmen gallik asit ve tannik asitin birlikte eklenmesinin bulanıklık oluşumunun artışına sebep olduğu belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada kiraz sularında soğuk ortamda anlık bulanıklığın görülmesinin sebebinin proteinlerden kaynaklandığı ve kiraz sularında soğuk ortamda bulanıklığın gelişmesinin sebebinin ise pektinlerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Pinelo vd., 2010).

Bir başka çalışma, pektince zengin olan patates pulpundan elde edilen besinsel fiberler üzerinedir. Patates pulpu endüstriyel patates nişastası üretiminden oluşan, yüksek hacimli üründür. Patates pulpunun yumru kökü bitki hücre duvarı materyali içerir, bu da pektince zengindir, özellikle de ramnogalakturonan I ile dallanmış pektin mevcuttur. Bu pektinin besinsel fiber olarak ümit verici özelliklere sahip olduğu daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Bu çalışmadaki amaçta patates pulpundan çözünebilen besinsel fiberleri tek basamaklı muamele prosedürüyle elde etmek ve bu fiberlerin prebiotik potansiyellerini değerlendirmektir. İstatistik olarak tasarlanan deneyler ile enzim katalizli çözünme üzerine; enzim tipinin, dozunun, substrat seviyesinin, inkübasyon süresinin ve sıcaklığın etkisi değerlendirilmiştir. Burada *Aspergillus aculeatus*'dan elde edilen poligalakturonaz ve *Aspergillus nidulans*'tan elde edilen pektin liyaz ile pH 6,0'da, 60 °C'de çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Thomassen, 2011).

Brezilya topraklarından ve çürümüş bitkilerden toplanan funguslar pektinaz üretimi için görüntülenmiştir. *R. microsporus* var. *Rhizopodiiformi*'in en iyi enzim üreticisi olduğu belirlendiği için çeşitli besinsel ve çevresel koşullar altında pektik enzimlerin üretimi açısından değerlendirilmiştir. 28 karbon kaynağı ile desteklenmiş ortamda 40 °C'de pektinaz üretimi çalışılmıştır. Şeker kamışı posası, buğday unu, mısır koçanı gibi tarımsal endüstriyel atıkların poligalakturonaz aktivitesi üstüne etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında şeker kamışı posası için 4 kat, buğday unu için 3 kat, mısır koçanı için 2 kat daha yüksek PG aktivitesi elde edilmiştir. Limon kabuğu içeren ortamda *R. microsporus*'un yüksek derecede PG (57,7 U/g) ve PL (88,6 U/g) ürettiği bulunmuştur. PG'nin optimum sıcaklığının 65 °C olduğu ve 55 °C'de 90 dk boyunca tamamen kararlı olduğu belirlenmiştir. PG'nin yarı ömrü 70 °C'de 68 dk olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar pektik enzimleri üreten *R. microsporus*'un atık karbon kaynaklarını faydalı bir şekilde kullanabildiğini göstermektedir. Bu çalışmanın atıkların ortadan kaldırılmasında çevreye faydalı olduğu ve üretim fiyatlarının düşürülmesi açısından oldukça yararlı bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Damasio vd., 2011).



Laboratuarda ve ticari olarak üretilen fungal pektinolitik preparatların elma, yaban mersini ve üzüm meyve sularının berraklaştırılma prosesleri üzerine etkisi incelenmiştir. Meyve sularının berraklaştırılmasında; katı besi ortamında ve sıvı besi ortamında sırasıyla *Aspergillus niger* T0005007-2 (TE1) ve *Aspergillus oryzae* IPT301 (TE2) tarafından üretilen 2 enzimatik ekstraktın, ticari olarak üretilen Pectinex Clear ve Pectinex BE Colour ile karşılaştırılmasını içermektedir. Meyve suyundaki 1U/mL total pektinaz aktivitesi ile reaksiyonlar 30 ve 50 °C’de; 30 ve 60 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Zamanın artması berraklaşmayı geliştirirken, sıcaklıktaki artışın daha iyi bir berraklaşma ile bağlantılı olmadığı belirlenmiştir. Ticari enzimlerle karşılaştırıldığında, TE1 enzim preparatının meyve suyu örneklerinde benzer berraklaşma sonuçları verdiği görülmüştür (Sandri vd., 2011).

Ekstraselüler pektin liyaz katı besi ortamında *Geobacillus stearothermophilus* Ah22’den elde edilmiştir. Bu enzim DEAE-selüloz ile 40,8 kat saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle enzimin molekül ağırlığı 36 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzimin saflaştırılma işlemleri SDS-PAGE ile doğrulanmıştır. Enzimin optimum pH’ı 6,0; optimum sıcaklığı ise 60 °C olarak bulunmuştur. 40 °C’de enzim çok karardır. Enzimin  $V_{max}$  değeri 0,47 mg/ml;  $K_m$  değeri 355,5  $\mu\text{mol/L.dk}$ ’dır. 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , EDTA, L-sistein ve askorbik asitin enzim aktivitesini önemli derecede arttırdığı bulunmuştur. Saflaştırılan pektin liyaz enzimi meyve suyu üretiminde kullanılmıştır ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, enzimin meyve suyu verimini önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir (Demir vd., 2011).

Elma posası kullanılarak katı besi ortamında *Aspergillus niger* tarafından pektinaz (pektin metil esteraz) üretimi gerçekleştirilmiştir. . %20-80 konsantrasyonlarında  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile kısmi saflaştırılma yapılmıştır. Saflaştırılan enzimin 60 günden daha fazla kararlı olduğu bulunmuştur. Enzimin 50 °C’nin üstündeki sıcaklıklarda kararlı olduğu; ama 90 °C’de tamamen inaktive olduğu gözlemlenmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin pH 3,5’te en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Kuş üzümü, şeftali, armut, kayısı meyve sularının berraklaştırılması ve meyve suyu ekstraksiyonu için de enzimin etkinliği değerlendirilmiştir. Enzimatik olarak

muamele edilmiş pulpların meyve sularının geri kazanımı; kuş üzümünde % 52'den 78'e; şeftalide % 38'den 63'e; armutta % 60'tan 72'ye; kayısıda % 50'den 80'e yükseldiği belirlenmiştir. Enzimatik olarak ekstrakte edilmiş meyve sularına pektinaz eklenmesinin; rengi, toplam çözünebilen katıları, titre edilebilir asitliği, toplam şeker miktarını önemli derecede arttırdığı belirlenmiştir. Enzim derişiminin artmasıyla askorbik asit içeriği etkilenmeden kalmaktadır. Ekstrakte edilen meyve sularının tüm duyumsal değerlendirmelerine bakıldığında renkte ve berraklaşmada önemli derecede gelişme olduğu görülmüştür. Farklı derişimlerde enzim eklendiğinde; ekstrakte edilen meyve sularının tadı, etkilenmeden kalmaktadır. % 2,5 enzim derişiminin meyve sularının ekstraksiyonu için en ideal olduğu belirlenmiştir. Buna rağmen elma ve armut sularının berraklaştırılması için sırasıyla % 1,0 ve 0,5 derişiminde enzim kullanılması optimum sonuç vermektedir (Joshi vd., 2011).

Kurutulup öğütülmüş muz kabuklarına ön muamele yapılmış, selülitik ve pektinolitik enzimlerin kombinasyonu kullanılarak, muz kabukları hidroliz edilmiştir. Selüla,  $\beta$ -glikozidaz, pektinaz konsantrasyonunun optimizasyonu ve glikoz ve indirgeyici şekerlerin üretimi için hidroliz süresi central composite dizayn (merkezi karma tasarımı) yöntemi ile belirlenmiştir. Muz kabuğundan indirgeyici şeker ve glikoz üretiminde % 95 güven aralığında selüla ve  $\beta$ -glikozidaz arasındaki etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir (Oberoi vd., 2011).

Patates pulpu endüstriyel patates nişasta imalatı sonucu oluşan yüksek hacimli oluşum ürünüdür. Patates pulpu özellikle pektince zengindir, bu pektin de ramnogalakturonan I ile dallanmış galaktandır. Bu çalışmanın amacı, 1 dk reaksiyonları ile patates pulpunda bulunan pektinli polisakkaritlerin çözünebilmesinde gerekli katalizleme yeteneğine sahip 4 homogalakturonan degrede edici enzimi karşılaştırmak ve karakterize etmektir. Buna ek olarak, bu çalışmada patates pulpundaki bu polisakkaritlerin salınımında şelatlayıcı etkisi bulunan tamponların ve pH'ın da etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır. *Aspergillus nidulans* ve *Aspergillus niger*'den elde edilen 2 tane pektin liyazın optimum pH'ı sırasıyla 8,6 ve 4.0'dır ve sıcaklığı  $\geq 100$  °C olarak bulunmuştur. *Aspergillus nidulans* ve *Aspergillus niger*'den elde edilen 2 tane poligalakturonaz için optimum şartlar pH

4.4 ve 46 °C; pH 3.7 ve sıcaklığı  $\geq 80$  °C olarak bulunmuştur. *Aspergillus aculeatus*'tan üretilen poligalakturonazın 50 °C'de sıcaklığa dayanıklılığı diğer enzimlerden 4 - 42 kat daha fazla olduğu bulunmuştur.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 0,3 - 0,6 g/L ve 0,5 ve 250,5 U/mg protein aralığında bulunmuştur. Yüksek miktarda kuru madde salınımında pH 6'da fosfat tamponu, Tris-asetat tamponundan daha etkilidir. Buna ek olarak fosfat tamponununun pH 6'da, pH 4'ten daha yüksek şelatlayıcı etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Thomassen vd., 2011).

Keten tohumundan yağ ekstraksiyonu için ultrasound (ses üstü dalga) destekli enzimatik proses uygulanmıştır. Keten tohumu 130 U/g hemiselülaz, pektinaz ve selülaz ile pH 5,0 45 °C'de 12 saat inkübe edildiğinde, % 68,'lik değer ile en yüksek yağ geri kazanımı elde edilmiştir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) aktivite deneyinin gerçekleştirilmesiyle ultrasound destekli enzimatik proses ve organik solvent ekstraksiyonundan (OSE) elde edilen  $IC_{50}$  (% 50 inhibitör derişimi) değerleri sırasıyla 2.27 mg/L ve 3.37 mg/L olarak bulunmuştur. Ultrasound destekli enzimatik proses türevli yağdan elde edilen doymamış yağ asidi içeriğinin, OSE 'den elde edilenden % 1.5 daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu yüzden keten tohumundan yağ eldesinde ultrasound destekli enzimatik proses metodunun çevre dostu ve geniş ölçüde ümit verici olduğu belirlenmiştir (Long vd., 2011).

Bir diğer çalışma, pektinin degradasyonunda önemli role sahip olan pektin liyaz (PL) ve poligalakturonaz (PG) enzimleri üzerinedir. Yüksek seviyelerde PL ve PG üreten *Penicillium griseoroseum* rekombinant suşunu elde ederek, meyve suyu endüstrisinde önemli role sahip olan PL ve PG enzimlerini ucuz şekilde üretmek hedeflenmiştir (Teixeira vd., 2011).

Tarımsal atık olarak buğday kepeği kullanılarak katı besi ortamında, yeni izole edilen fungal suş *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356 tarafından nötral pektin liyaz üretimi çalışılmıştır. Enzim % 30-60 amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılmış, DEAE anyon değişim ve Sephadex G-100 kolon kromatografileri ile de saflaştırılma işlemlerine devam edilmiştir. SDS-PAGE ve doğal PAGE ile enzimin moleköl ağırlığı tayininde, 42 ve 47 kDa boyutlarında 2 tane bant elde

edilmiştir. 4,5 U/mg spesifik aktivite ve % 2,25 verimle enzim 37 kat saflaştırılmıştır. Sitrus pektin kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1,2 mg/ml ve 0,36 IU/min olarak belirlenmiştir. Optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 7,0 ve 50 °C'dir. Enzimin pH kararlılığı 5,0 civarında 20 °C'de 24 sa'dir. Saflaştırılan enzimin maksimum aktiviteyi 50 °C'nin üstünde 30 dk sürdürdüğü ve termal denatürasyonu için aktivasyon enerjisinin 60,0 kJ/mol olduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesi üzerine çeşitli metal iyonlarının ve protein inhibitörlerinin etkisi incelendiğinde, 1 mM  $Ag^+$  ve  $Cu^+$  ve  $KMnO_4$  derişimlerinde enzim aktivitesinin total inhibisyonu gerçekleşmiştir. Nötral pektin liyazın EDTA varlığında *Crotalaria juncea* liflerinin havuzlanmasında etki gösterdiği bulunmuştur (Yadav vd., 2012).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250, sitrus pektin, maya (yeast) ekstrakt, DEAE-Selüloz, Sephadex G-100, TEMED Sigma-Aldrich şirketinden, etil alkol, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, HCl Merck'ten satın alındı. Diğer bütün kimyasallar analitik saflıktaydı.

##### 3.1.2. Yararlanılan alet ve cihazlar

Deneyde kullanılan alet ve cihazlar aşağıdaki gibidir:

Spektrofotometre	: T80 <sup>+</sup> UV/Vis Spectropotometer, PG Ins. Ltd.
Otoklav	: Nüve OT 4060,
Steril kabin	: Yerli yapım
Santrifüj	: Hettich Zentrifugen Universal 320 : Hettich Zentrifugen Micro 120 : Nüve NF 800
pH metre	: Hanna Instruments HI 2211 pH/ORP Meter
Görüntüleme sistemi	: DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro
Elektroforez tankı	: Cleaver Scientific Ltd. : Max Fill
Elektroforez güç kaynağı	: Major Science
Peristaltik pompa	: Mrc Scientific Instruments
Hassas terazi	: Denver Instruments : OHAUS Adventurer T
İnkübatör	: JSR JSGI-50T
Flash Kromotografi	: Bio-Rad Biologic LP
Kromotografi Kolonları	: Sigma Chemical Company

Otomatik pipetler	: Eppendorf research
Çalkalayıcı	: Shel Lab Shaking Incubator
Vorteks	: Dragon Lab MX-F
Saf su cihazı	: Millipore Elix Milli-Q Gradient
Magnetik karıştırıcı	: Hanna Instruments HI 190M
	: Wisestir MSH-20A
Su banyosu	: Buchi Heating Bath B-490
Vakum pompası	: Rocker

### 3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Patates dekstroz agar (PDA): 39 g PDA alındı, 1L saf suda çözüldü.

Fosfat tamponu (0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 8,0): 7,098 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  alındı, 990 mL saf suda çözüldü, 1 M HCl ile pH 8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Substrat çözeltisi: 5 g sitrus pektin (% 0,5 (w/v)) alındı, 1000 mL 0,05 M fosfat tamponunda (pH 8,0) çözüldü.

0,5 M HCl çözeltisi: 500 mL saf su üzerine 41,4 mL HCl eklendi, son hacim saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

Coomassie Brilliant Blue G-250 renk reaktifi: 0,05 g 25 mL etil alkol içinde çözüldü. 50 mL % 85'lik  $\text{H}_3\text{PO}_4$  çözeltisi katıldı. Son hacim saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. 0,5 M NaCl çözeltisi: 1,4625 g NaCl alındı, yıkama tamponu ile son hacim 50 mL'ye tamamlandı.

Sitrat-fosfat tamponu: 1,0507 g sitrik asit ve 0, 7098 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartıldı, 90 mL saf su içinde çözüldü. pH 4, ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Aynı tampondan pH 5, pH 6 için de hazırlandı.

Fosfat tamponu (0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7, pH 8, pH 9): 0,7098 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tartıldı, 90 mL saf su içinde çözüldü. pH 7'ye ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Aynı tampondan pH 8 ve pH 9 için de hazırlandı.

Karbonat tamponu (0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9, pH 10) (Pektin liyaz enziminin optimum pH'nı belirlemek için kullanılan çözelti): 0,5299 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartıldı. 90 mL saf su içinde çözüldü. pH 9'a (pH 10) ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Akrilamid/bis çözeltisi: 29,2 g akrilamid ve 0,8 g bis behere koyuldu ve 100 mL saf su içinde çözüldü.

Tris tamponu (1,5 M pH 8,8): 18,15 g Tris tartıldı, 90 mL saf suda çözüldü. 3M HCl ile pH 8,8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı

Tris tamponu (0,5 M pH 6,8): 3 g Tris tartıldı, 40 mL saf suda çözüldü. 5M HCl ile pH 6,8'e ayarlandı. Son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Sodyum dodesil sülfat (SDS) (%10 (w/v)): 10 g SDS tartıldı, 100 ml saf su içinde çözüldü

Amonyum persülfat (%10 (w/v) (Elektroforez jellerinde kullanılan polimerizasyon başlatıcısı): 0,5 g amonyum persülfat tartıldı, 5 ml saf su içinde çözüldü.

Örnek uygulama tamponu: 2,5 mL Tris (0,5 M, pH 6,8) üzerine, 4 mL SDS (% 10 (w/v)), 2 mL gliserol, 2-merkaptolanol eklendi. 5 M HCl ile pH 6,8'e ayarlandı. Bu çözeltinin üzerine 0,02 g bromfenol (% 0,2) eklendi.

Tank tamponu: 15 g Tris, 72 g glisin, 5 g SDS tartıldı. 1 L saf suda çözüldü.

Fiksatif çözeltisi: Elektroforez jelindeki proteinleri çöktürmek için kullanılan çözelti): 500 mL metanol, 100 mL asetik asit, 400 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Boyama çözeltisi: 1 g Coomassie brilliant blue R-250, 500 mL metanol içinde çözüldü, 100 mL asetik asit eklendi. Son hacim saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Yıkama çözeltisi: 125 mL metanol ve 175 mL asetik asit karıştırıldı. Son hacim saf su ile 2,2 litreye tamamlandı.

## **3.2. Yöntemler**

### **3.2.1. Bradford yöntemi ile protein tayini**

Bu yöntemle saflaştırma kademelerinde elde edilen enzim numunelerindeki protein miktarı belirlendi. Bu yöntem, Coomassie brilliant blue (Coomassie parlak mavisi) G-250 boyasının farklı derişimlerdeki protein çözeltilerinde değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. Boyanın özellikle arginin gibi bazik aminoasitlere ve bazik aromatik aminoasitlere bağlanma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Bu yöntemin duyarlılık sınırları 20-140 µg'dır. 495-595 nm arasında maximum absorpsiyon değerleri elde edilmektedir (Bradford, 1976; Temizkan vd., 2008; ).

Standart BSA (bovine serum albumin, sığır serum albumin) grafiği hazırlama: 1ml'sinde 1 mg protein içeren sığır serum albumin çözeltisinden deney tüplerine 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 µL koyuldu. Saf su ile her bir tüpün hacmi 100 µL'ye tamamlandı. 1'er dakika ara ile her tüpe 5 mL Coomassie brilliant blue eklendi, hafifçe vortekslendi. Her tüp için 10 dk beklendikten sonra 595 nm'de 3 mL'lik küvetlerle absorbans değerleri okundu. 100 µL saf su ve 5 mL Coomassie brilliant blue'dan oluşan karışım kör olarak kullanıldı. Absorbansa karşılık gelen standart BSA µg protein değerlerine göre standart grafik hazırlandı.

### **3.2.2. Pektin liyaz aktivite tayini**

Pektin liyaz aktivitesi Albersheim'in metoduna yapılan modifikasyonlarla gerçekleştirildi (Albersheim 1966). Aktivite tayini, pektin liyaz aktivitesi sonucunda



oluşan 4,5 doymamış galakturonidlerin 235 nm’de verdiği absorbansın ölçülmesiyle belirlendi. Elde edilen doymamış galakturonidin molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon$ )  $5550 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ’dir. Enzim aktivitesi dakikada  $\mu\text{mol}$  doymamış ürünün salınımı (1U) cinsinden tanımlandı.

### 3.2.3. Mikroorganizmaların büyütülmesi

Bu tez çalışmasında, pektin liyaz enzimi doğal kaynaklardan izole edilen Termofilik *Aspergillus niger* türü fungusun elde edildi. Termofilik *Aspergillus niger* Adnan Menderes Üniversitesi (ADÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Halil Bıyık’tan temin edildi.

Termofilik *Aspergillus niger*’in büyütülmesi için Patates Dekstroz Agar (PDA) katı besi ortamı kullanıldı. 19,5 g PDA 1 L’lik erlen içine 500 mL saf su eklenip çözülerek katı besi ortamı hazırlandı. Hazırlanan bu besi ortamı otoklavda  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de 15 dk sterilize edildi. Sterilize edilen besi ortamının pH’ı 3,5’a ayarlandı. ADÜ’den alınan stok funguslar PDA besi ortamına ekildi. PDA katı besi ortamı üzerinde büyütülen fungusların direkt  $-24 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de stoklanmasıyla ve PDA besi ortamının üzerine mineral yağ eklenip  $-24 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de stoklanmasıyla stoklama 2 şekilde yapıldı.

Pektin liyaz üretimi için Sandrie (Sandrie vd., 2011) metodu modifiye edilerek sıvı besi ortamı hazırlandı. Sıvı besi ortamı otoklavda  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de 15 dk sterilize edildi.

Fungusların steril kabinde sıvı besi ortamına ekimi yapıldı ve  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ’de 7 gün inkübasyon gerçekleştirildi. Sıvı besi ortamı 8.000 rpm’de 20 dk santrifüjlenerek süpernatant ve çökelek ayrıldı. Süpernatantta enzim aktivitesi belirlendi. Termofilik *Aspergillus niger*’in pektin liyaz ürettiğine karar verildi.

### 3.2.4. Amonyum sülfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile kısmi saflaştırma

Sıvı besi ortamının santrifüjlenmesiyle elde edilen süpernatanta pektin liyazın çöktüğü aralığı belirlemek amacıyla 10’ar birimler halinde %0 ile %100 arasında çöktürmeler yapıldı. Her kademedede 8.000 rpm’de 20 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant ve çökelek ayrıldı. Enzim aktivitesi gözlenen süpernatant ve çökelekler belirlendi.

Elde edilen çökelekler 0,05 M fosfat tamponunda (pH 8,0) çözüldü. Bu çökeleklerde aktivite çalışmaları ve protein tayinleri yapıldı.

### **3.2.5. Jel filtrasyon kolonunun hazırlanması**

2 g Sephadex G-100'ün üstüne 0,05 M fosfat tamponu (pH 8,0) eklendi. Dolgu maddesi 2 gün şişmeye bırakıldı. Peristaltik pompa ile kolon dolgu maddesi kolona paketlenildi. Fosfat tamponunun verdiği absorbans ve pH ile kolonun altından alınan fosfat tamponunun absorbansı ve pH'ı aynı olduğunda kolon dengelenmiş oldu.

### **3.2.6. Homojenatların jel filtrasyon kolonuna yüklenmesi ve enzim elüsyonu**

0,05 M fosfat tamponu (pH 8,0) içinde çözülen çökeleklerden enzim eldesi için Flash kromatografi cihazı kullanıldı. Cihaza takılan, Sephadex G-100 jel filtrasyon kolonu dengeye getirildikten sonra enzim numunesi kolona yüklendi. Aynı derişimde fosfat tamponu ile enzim kolondan elüe edildi. Flash kromatografi cihazının akış hızı 1mL/dk olarak ayarlandı. 1 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Cihazın UV lambasında 280 nm'de absorbans veren tüplerde aktivite çalışmaları yapıldı. Yüksek aktivite gösteren fraksiyonlar havuzlandı (Yadav, vd., 2008). Bu şekilde DEAE-Selüloz kolona yüklenecek enzimlerden enzim havuzu oluşturuldu.

### **3.2.7. İyon değişim kolonunun hazırlanması**

1 g DEAE-Selüloz üstüne 25 mL saf su eklendi ve 2 gün boyunca şişmeye bırakıldı. Peristaltik pompa ile kolon dolgu maddesi kolona paketlenildi. 0,05 M fosfat tamponu (pH 8,0) ile kolon dengelendi. Fosfat tamponunun verdiği absorbansla kolonun altından alınan fosfat tamponunun absorbansı aynı olduğunda kolon dengelenmiş oldu.

### **3.2.8. Homojenatların iyon değişim kolonuna yüklenmesi ve enzim elüsyonu**

Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisinden elde edilip havuzlanan enzim örnekleri Flash kromatografi cihazına takılan, önceden dengeye getirilmiş DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna yüklendi. 0'dan 1,5 M derişimlerindeki NaCl ile tuz gradienti yapıldı ve enzimler elüe edildi. Flash kromatografi cihazının akış hızı 1mL/dk olarak ayarlandı. 1 mL'lik fraksiyonlar toplandı. Cihazın UV lambasında 280 nm'de absorbans veren tüplerde aktivite çalışmaları yapıldı. Yüksek aktivite gösteren fraksiyonlar havuzlandı (Yadav et al., 2008). Havuzlanan enzimler ependorflara bölünerek ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -24 °C'de stoklandı.

### **3.2.9. SDS –PAGE jel elektroforezi çalışmaları**

Enzim saflaştırıldıktan sonra kesikli SDS jel elektroforezi ile 2 farklı derişimde (%5 ve %16) jel kullanılarak enzimin molekül ağırlığının belirlenmesi hedeflenmiştir (Laemmli, 1970).

Bunun için elektroforez plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikalara ince tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine kondu ve jel hazırlama cihazına yerleştirildi ve sıkıştırıldı. % 16'lık derişime sahip ayırma jeli hazırlandıktan sonra plakalar arasına mikropipetle döküldü. Jel içinde hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %10'luk SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Jelin polimerleşmesi tamamlanincaya kadar (yaklaşık 45 dakika) beklenildi. Polimerizasyon tamamlanınca % 5'lik yükleme jeli üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine dikkatlice tarak yerleştirildi. Yükleme jelinin polimerizasyonunun tamamlanması için 1 gece beklenildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarıldı, kuyucukların oluşması sağlandı, oluşan kuyucukların yeri işaretlendi ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Yürütme tamponu ile yıkama yapıldı (Temizkan vd., 2008).

Enzim numunesi ile örnek uygulama tamponu 1'e 1 oranlarında ependorfta karıştırıldı. 10 dk kaynar su banyosunda bekletilip buz banyosu içine alındı. Standart

proteine de aynı işlemler uygulandıktan sonra, mikropipet yardımıyla kuyucuklara yükleme yapıldı. Tank kapağı (+) kablo (anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirildi. Yürütme jelinde 50 V'ta 1,5 saat yürütme yapıldı. Ayırma jelinde ise 80 V'ta 6 saat yürütme yapıldı. Yürütme işlemi bittikten sonra jel, elektroforez plakalarının arasından dikkatlice çıkartıldı. Fiksatif çözeltisi içinde 2 saat düşük hızda çalkalandı. Bir gece boyunca boyama çözeltisi içinde bekletildi, yarım saat tekrar fiksatif çözeltisi içinde çalkalandı. Jelin araka planındaki koyu mavi renk açılıp bantlar belirginleşinceye kadar yıkama çözeltisi içinde jel düşük hızda çalkalandı. Görüntüleme sisteminde jelin fotoğrafı çekildi. Görüntüleme işleminden sonra jel % 7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı (Temizkan vd., 2008).

Ayırma jelinin hazırlanması: 4 mL akrilamid monomeri üzerine 1,88 mL Tris tamponu (1,5 M, pH 8,8), 75 µL SDS ((% 10 (w/v)), 1,48 mL saf su ve 3,75 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetlendiamin) eklendi. Plakalar üzerine yükleme yapılmadan hemen önce 350 µL % 10'luk amonyum persülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) eklenerek ayırma jeli hazırlandı (Temizkan vd., 2008).

Yükleme jelinin hazırlanması: 0,4 mL akrilamid monomeri üzerine 0,625 mL Tris tamponu (0,5 M; pH 6,8), 25 µL SDS (% 10 (w/v)), 1,41mL saf su ve 1,25 µL TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetlendiamin) eklendi. Yükleme jeli donan ayırma jelinin üzerine dökülmeden hemen önce 200 µL % 10'luk amonyum persülfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) eklenerek yükleme jeli hazırlandı (Temizkan vd., 2008).

### **3.2.10. Optimum sıcaklığın belirlenmesi**

Pektin liyaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için 40-80 °C arasında 10'ar birim farkla sıcaklık çalışmaları yapıldı. Elde edilen sonuçlardan enzimin optimum sıcaklığı belirlendi.

Sıcaklık çalışmalarında, bir tane kör, 3 tane numune için toplam 4 tüp hazırlandı. Her bir tüpe 1 mL substrat çözeltisi, 50 µL enzim numunesi eklendi. Su banyosu çalışılacak sıcaklığa ayarlanarak 10-120 dk zaman aralığında, 10'ar birim farkla

inkübasyon gerçekleştirildi. Enzimin aktivite değerlerine bakılarak en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık belirlendi.

### **3.2.11. Optimum pH'ın belirlenmesi**

Termofilik *Aspergillus Niger*'den elde edilen pektin liyazın aktif olduğu optimum pH'ı belirlemek için pH 4-10 arasında bir birim farkla pH çalışmaları yapıldı.

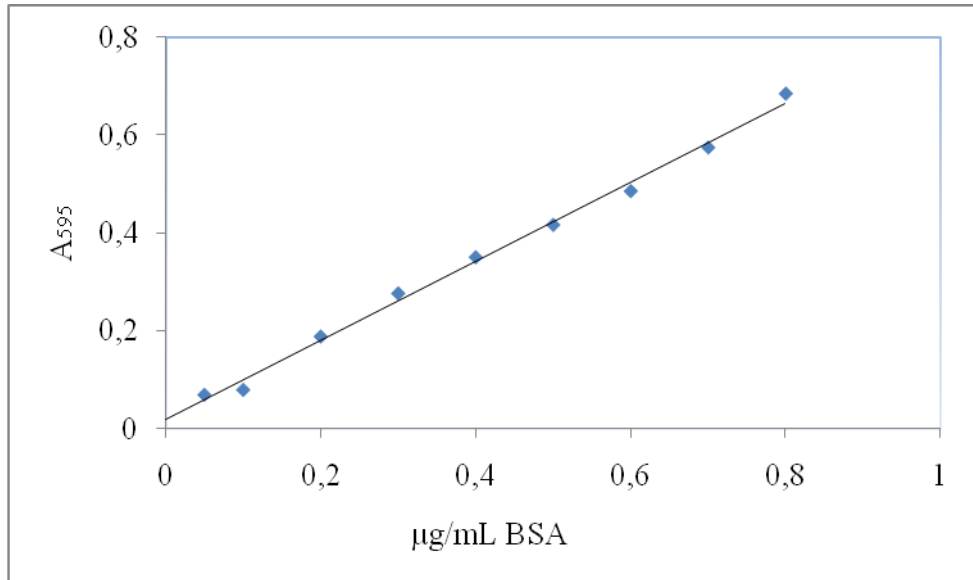
3 farklı tampon hazırlandı. pH 4-6 için 0,05 M sitrat-fosfat tamponu; pH 7-9 için 0,05 M sodyum fosfat tamponu; pH 10 için karbonat tamponu hazırlandı. 1M HCl ve 1M NaOH ile tamponların pH'ı 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10'a ayarlandı.

Her bir pH denemesi için bir kör ve üç numune olmak üzere üç tekrarlı çalışma yapıldı. Her bir tüpe 1 mL uygun tampon içinde çözülmüş substrat çözeltisinden ve 50 µL enzim çözeltisinden eklendi. 50 °C'de 40 dk inkübasyon yapıldı. Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi enzimin aktivite alışmaları her bir tampon için teker teker denendi.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde farklı derişimlerde BSA çözeltisi hazırlanarak, derişim absorbans grafiği elde edildi. *Aspergillus niger* Ocak 4 fungusundan elde edilen enzim ekstraktlarının ve saflaştırılan enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki  $\mu\text{g}$  /mL proteine karşılık absorbans değerleri Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Bradford yöntemi ile elde edilen protein standart grafiği

### 4.2. *Asp. niger* Ocak 4 Fungusunun Pektin Liyaz Üretme Kapasitesi

% 0,5 sitrus pektin (w/v) , % 4 buğday kepeği içeren sıvı besi ortamında *Asp. niger* Ocak 4 fungusu pektin liyaz enzimi üretti. Bu fungusun yetiştirildiği sıvı besi ortamı 8000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerak süpernatant ve çökelek ayrıldı. Süpernatantta aktivite bakıldı. *Asp. niger* Ocak 4 fungusunun 1 mL'de 0,056 EU pektin liyaz ürettiğine karar verildi. Elde edilen sonuçlar tablo 4.2'de detaylı Şekilde verilmiştir.

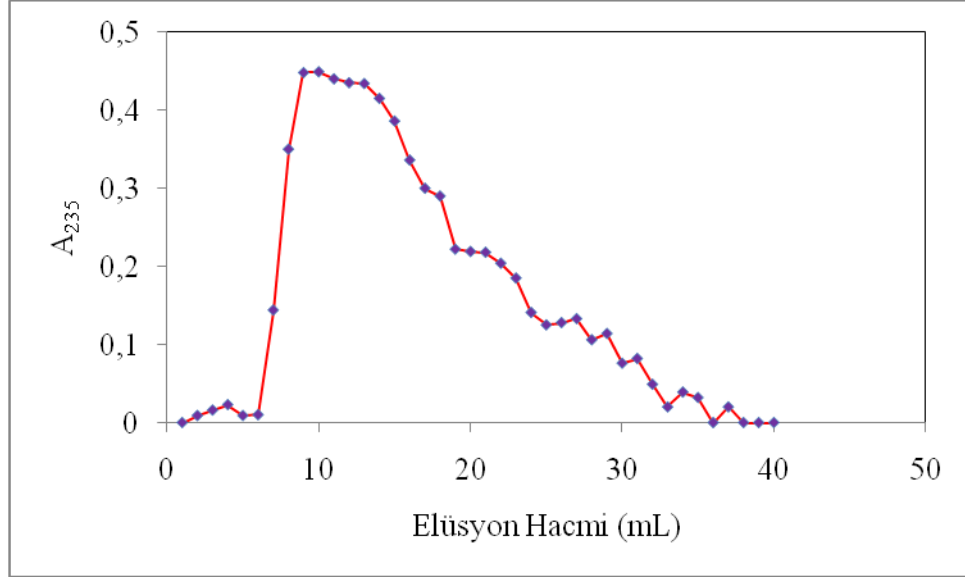
### **4.3. *Asp. niger* Ocak 4 Fungusundan Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırma Kademeleri**

Sıvı besi ortamında elde edilen pektin liyaz enzimi amonyum sülfat ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu amaçla 10'ar birimler halinde %0 ile %100 arasında çöktürmeler yapıldı. Pektin liyazın %30-90 arasında çöktüğü tespit edildi. Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırılmada 1,8 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Kısmi olarak saflaştırılan enzim, jel filtrasyon kromatografilerine tabii tutularak tablo 4.2'de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde 4,2 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Jel filtrasyon kromatografilerinde saflaştırılan enzim bir sonraki basamakta iyon değişim kromatografilerine tabii tutulmuştur. İyon değişim kromatografisinde de 76,5 kat saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Her basamakta elüe edilen enzim tüplerinin 235 nm de absorbansına bakılmış, aktivitesi yüksek olan tüpler birleştirilerek bir sonraki basamakta kullanılmıştır. En son iyon değişim kromatografisinde *Asp. niger* Ocak 4 fungusundan elde edilen pektin liyaz enziminin elüsyon hacmine karşılık 235 nm'de elde edilen absorbans değerleri şekil 4.2'de verilmiştir. Yine yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş, enzim aktivitesi ve protein miktarları belirlendikten sonra küçük miktarlarda bölünerek sonraki çalışmalar için dondurulmuştur. Enzim saflaştırma kademeleri ile ilgili sonuçlar tablo 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. İyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan PL enziminin elüsyon grafiği

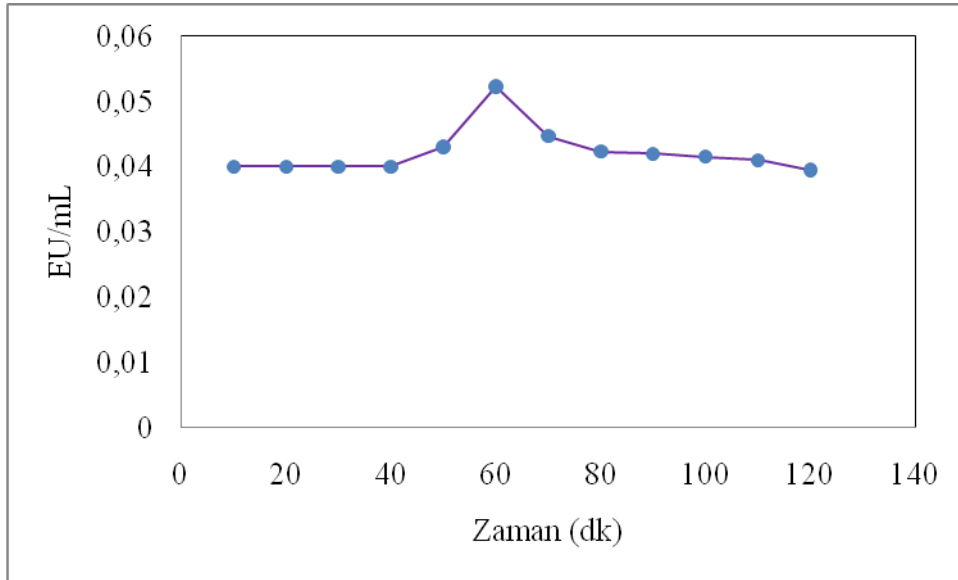
Çizelge 4.1. *Asp. niger* Ocak 4 fungusundan pektin liyaz enziminin saflaştırma kademeleri

	EU/ml	V ml	Total aktivite	mg /mL protein	Total Protein	Spesifik aktivite	% Verim	Saflaştırma katsayısı
İlk süpernatant,	0,056	50	2,8	10,92	546	0,005	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (%30-90)	0,126	18	2,27	13,96	12,56	0,009	81	1,8
Jel filtrasyon kromatografisi	0,054	15	0,81	2,62	39,27	0,02	29	4,2
İyon değişim kromatografisi	0,07	4	0,28	0,18	0,72	0,383	10	76,50

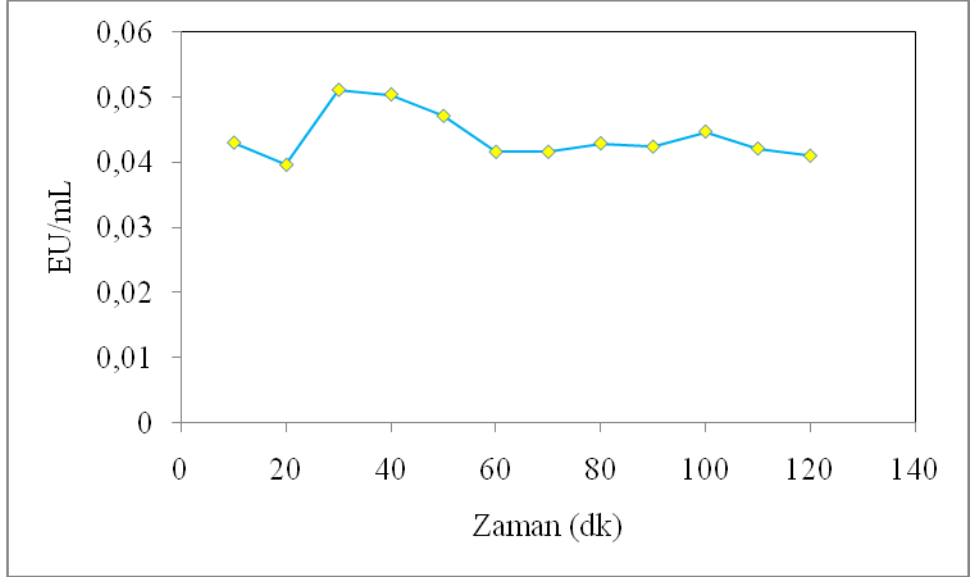


#### 4.4. *Asp. niger* Ocak 4 Fungusundan Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Optimum Sıcaklık Çalışmaları

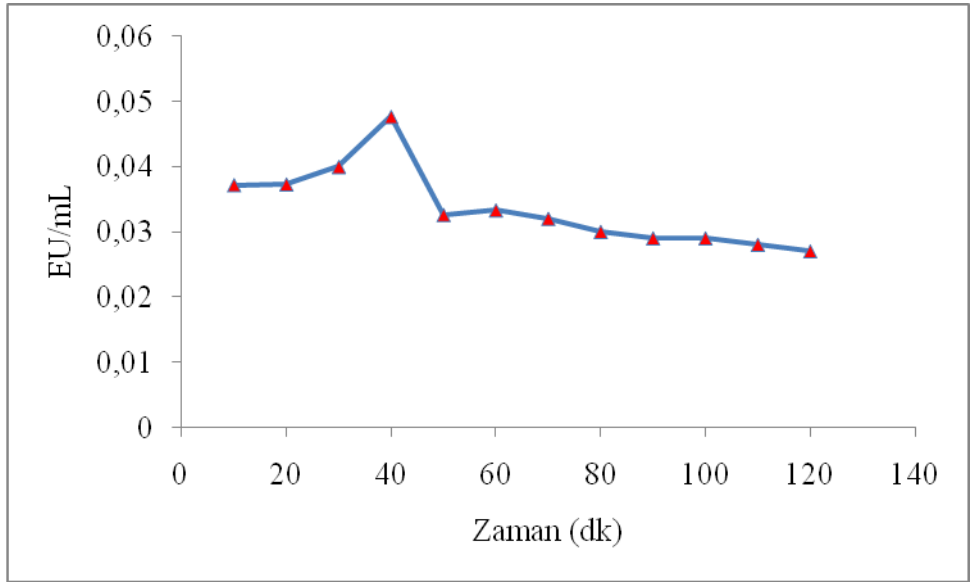
*Asp. niger* Ocak 4 fungusundan elde edilen PNL enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için 40-80 °C arasında 10-120 dakika zaman aralığında 10'ar birim farkla, zamana bağlı sıcaklık çalışmaları yapılmıştır. 40 °C'de en yüksek aktivite 60. dakikada; 50 °C'de en yüksek aktivite 40. dakikada; 60 °C'de en yüksek aktivite 40. dakikada; 70 °C'de en yüksek aktivite 40.dakikada; 80 °C'de en yüksek aktivite 10. dakikada tespit edilmiştir. Herbir sıcaklık için zamana bağlı aktivite grafiği şekil 4.3; şekil 4.4; şekil 4.5; şekil 4.6 ve şekil 4.7'de gösterilmiştir. Farklı sıcaklıkları birbiri ile kıyaslamak amacı ile çizilen grafik toplu olarak şekil 4.8 de verilmiştir.



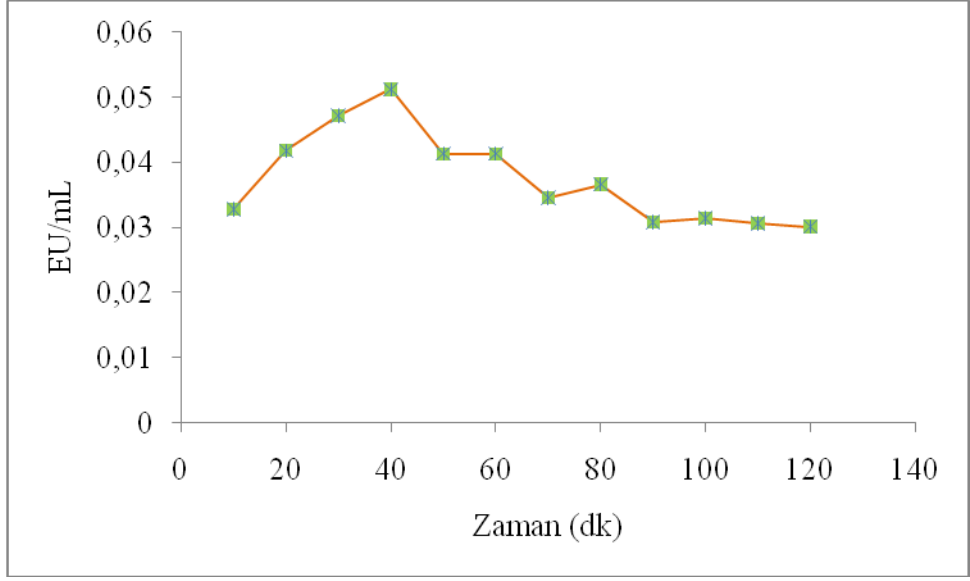
Şekil 4.3. 40 °C'de zamana bağlı çalışma



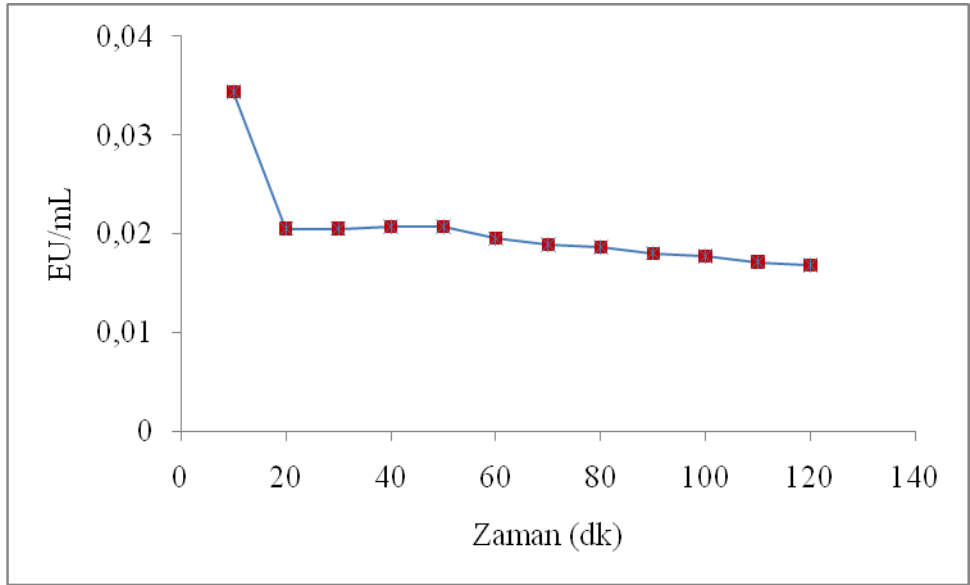
Şekil 4.4. 50 °C’de zamana bağlı çalışma



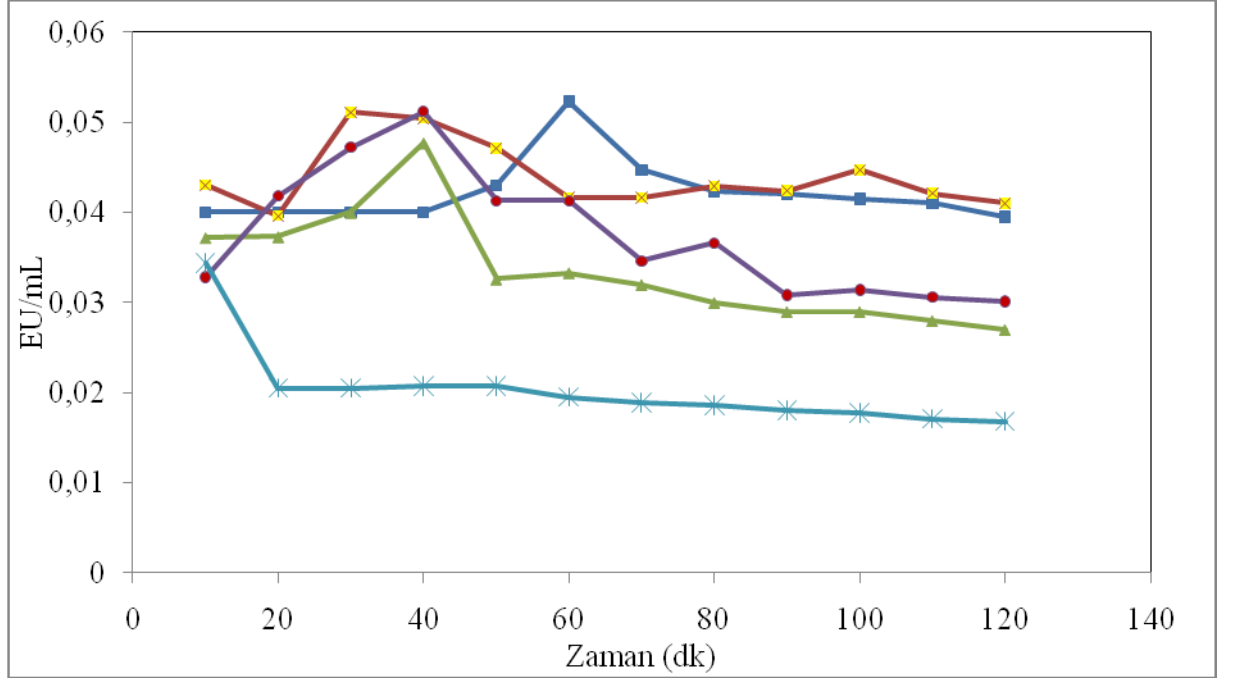
Şekil 4.5. 60 °C’de zamana bağlı çalışma



Şekil 4.6. 70 °C’de zamana bağlı çalışma



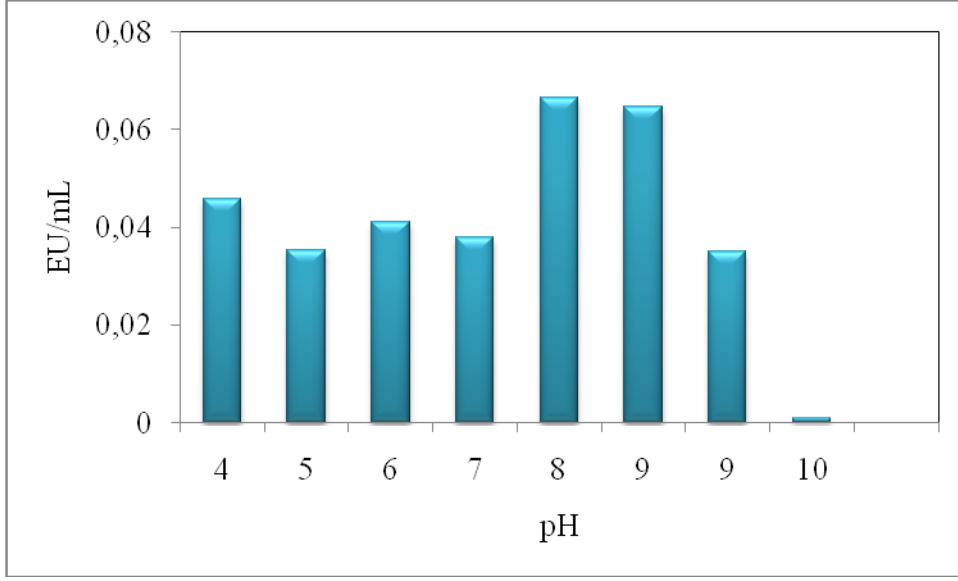
Şekil 4.7. 80 °C’de zamana bağlı çalışma



Şekil 4.8. Toplu sıcaklık çalışmaları ■, 40 °C’de; x, 50 °C’de; ▲, 60 °C’de; •, 70 °C’de; \*, 80 °C’de

#### 4.5. *Asp. niger* Ocak 4 Fungusundan Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Optimum pH Çalışmaları

*Asp. niger* Ocak 4 fungusundan elde edilen PNL enziminin yüksek aktivite gösterdiği pH aralığını belirlemek amacı ile pH 4, pH 5, pH 6’da sitrat-fosfat tamponu; pH 7, pH 8, pH 9’da fosfat tamponu; pH 9, pH 10’da karbonat tamponu kullanılmıştır. Optimum aktivite pH 8.0 fosfat tamponunda belirlenmiştir. Sonuçlar şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Optimum pH çalışması (pH 4, pH 5, pH 6 sitrat-fosfat tamponu; pH 7, pH 8, pH 9 fosfat tamponu; pH 9, pH 10 karbonat tamponu)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada termofilik mikroorganizmalardan pektin liyaz enziminin üretimi amaçlanmıştır. ADÜ Biyoloji Bölümü'nden termofilik *Aspergillus niger* Ocak 4 fungusu temin edilerek ekstraselüler pektin liyaz enzimi üretilmiştir. Farklı sıvı besi ortamı bileşenleri kullanılarak yüksek verimde pektin liyaz üretilmiştir.

Fermentasyon ortamından elde edilen ham enzim ekstraktı amonyum sülfat ile kısmi olarak saflaştırılmış ve ardından jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografi yöntemlerine tabii tutularak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir.

*Aspergillus* türü fungusların pektin liyaz enzim üretme kapasiteleri yüksektir ve pektin liyaz temel olarak fungustan üretilir (Gummadi ve Kumar, 2006). *Aspergillus niger* Ocak 4 fungusunun bu çalışmalar için uygun olduğu belirlenmiştir. Üretilen bu enzimin ekstrem endüstriyel koşullara uygulanması hedeflendiği için de termofilik *Aspergillus* suşu tercih edilmiştir.

Endüstriyel çalışmalarda, katı besi ortamından ziyade sıvı besi ortamında enzim üretimi gerçekleştiği için pektin liyaz sıvı besi ortamında üretilmiştir.

Flash kromatografi cihazında uygulanan jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografi yöntemleri ile saflaştırılan enzim numularının 280 nm'de absorbanları ölçülerek protein miktarları belirlenmiştir. Bu yöntem proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'de max absorbanı vermesi esasına dayanmaktadır (McIntosh 1969). Bu ölçüm flash kromatografi cihazının UV lambasında herhangi bir reaktifte ihtiyaç duyulmadan hemen o anda gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarları Bradford metodu ile denenmiştir. Duyarlılık sınırları 20-140 µg olan bu yöntemde hassasiyet yüksektir ve kısa sürede sonuç elde edilebilmektedir (Temizkan vd., 2008).

Pektin liyaz aktivitesi, doymamış oligogalakturonidin 235 nm'de absorbanının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Albersheim, 1966). Oluşan ürünün molar

ekstinksiyon katsayısı  $5550 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 'dir. Enzim aktivitesi dakikada salınan doymamış ürünün  $\mu\text{mol}$  miktarı olarak tanımlanmıştır. Kullanılan bu metot hassastır ve kısa sürede sonuç elde edilebilmektedir.

Mikroorganizmalardan enzim eldesi için kullanılan besi ortamlarından biri olan sıvı besi ortamı oldukça avantajlıdır. Endüstriyel enzim üretiminde katı besi ortamından ziyade bu yöntem kullanıldığı için bu çalışmada da tercih edilmiştir. Besi ortamlarında tarımsal atık olabilecek elma kabuğu, limon kabuğu, şeker kamışı ve portakal posası kullanılarak enzim üretilmesi, tarımsal atıkların geri kazanılması ve çevre dostu olması açısından oldukça önemlidir (Pedrolli vd., 2008).

*Aspergillus niger* Ocak 4 fungusundan enzim eldesi için farklı sıvı besi ortamı bileşenleri denenmiştir.

Amonyum sülfat ile kısmi olarak saflaştırılan enzim numuneleri, jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisiyle de daha saf halde elde edilmiştir.

*Aspergillus niger* Ocak 4 fungusundan üretilen pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz ile saflaştırılmasına dair elde edilen elüsyon hacmine karşılık absorbans grafiği şekil 4,2'de verilmiştir. Amonyum sülfat ve jel filtrasyondan elde edilen spesifik aktivite değerlerini, saflaştırma katsayısını içeren saflaştırma kademeleri hesaplanmıştır. Tablo 4,1'de sonuçlar gösterilmiştir. Amonyum sülfat ile kısmi saflaştırmadan 1,8 kat; jel filtrasyon kromatografisi ile 4,2 kat; iyon değişim kromatografisinde 76,5 kat saflaştırma elde edilmiştir.

Saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yapılan çalışmanın sonuçları şekil 4.3; şekil 4,4; şekil 4,5; şekil 4.6 ve şekil 4,7'de verilmiştir. Tüm sıcaklıkların aynı anda kıyaslanması amacıyla da şekil 4,8 verilmiştir. Pektin liyaz enzimi için optimum sıcaklık  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 60 dk olarak belirlenmiştir. Bunun yanı sıra çalışılan fungusun termofilik olmasından kaynaklı olarak enzimin yüksek sıcaklıklarda da ( $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) aktivite gösterdiği

bulunmuştur. Bu sonuçla da elde edilen pektin liyaz enziminin yüksek sıcaklık gerektiren endüstriyel koşullarda kullanılabilceği görölmektedir.

Saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum pH'ını belirlemek için çalışmalar yapılmıştır. Elde edilen değerlerden yararlanılarak pH'ya karşılık enzim ünitesi grafiği çizilmiştir. Sonuçlar şekil 4,9'da gösterilmiştir. Saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum pH'sı 8,0 olarak bulunmuştur. Enzimin pH 4-9 aralığında aktivite gösterdiği; ama pH 10.0'da diğer pH'lara göre çok düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir. SDS-PAGE'de bant elde edilememiştir.

Sonuç olarak; pektin liyaz enzimi pH 8,0'de; 40 °C 60 dakikada en yüksek aktiviteyi göstermektedir.

Saflaştırılıp karakterize edilen pektin liyaz enzimi akademik çalışmalarda ve endüstriyel anlamda meyve sularının berraklaştırılmasında kullanılabilmesi açısından gelecek vaat etmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abeles, R.H., Frey, P.A., Jencks, W.P., 1992. Biochemistry. Jones and Bartlett, 838p, Boston.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J.L., 1996. Immobilization of Pectin Lyase from *Penicillium italicum* by Covalent Binding to Nylon. Enzyme Microbial Technology, 18, 141-146.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., Serra, J.L. 1998. Industrial Applications of Pectic Enzymes: A Review. Process Biochemistry, 33, 21-28.
- Be Miller, J.N., 1986. An introduction to Pectins: Structure and Properties. Fishman, M., Jem, J.J. (Ed.), Chemistry and Functions of Pectins, ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, Washington DC.
- Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal, G.S., 2000. Production and Characterization of Thermostable Xylanase and Pectinase from *Streptomyces* QG-11-3. Journal of Industrial Biology & Biotechnology, 24, 396-402.
- Borrego, F., Tari, M., Manjon, A. and Iborra, J. L., 1989. Properties of Pectinesterase Immobilized on Glycophase-coated Controlled-pore Glass. Appl. Biochem. Biotechnology, 22, 129-140.
- Botella, C., Ory, I.D., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A., 2005. Hydrolytic Enzyme Production by *Aspergillus awamori* on Grape Pomace. Biochemical Engineering Journal, 26, 100-106.
- 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.
- Bruhlmann, F., Kim, K.S., Zimmerman, W., Fiechter A., 1994. Pectinolytic Enzymes from Actinomycetes for the Degumming of Ramie Bast Fibers. Appl Environ Microbiol, 60, 2107–2112.
- Buschle-Diller, G., 2001. Environmentally Friendly Bioscouring Processes. In: Proceedings of the ‘Seminario Internacional Aplicação Da Biotecnologia Na Indústria Têxtil’, Workshop for the Textile Industry. May 16–19, 2001, Santa Catarina, Brazil.
- Damáσιο, A.R.D.L., Maller, A., Silva, T.M.D., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Polizeli, M. L.T.M., 2011. Biotechnological Potential of Alternative Carbon Sources for Production of Pectinases by *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, 54, 141-148.

- Demir, N., Acar, J., Sarıoğlu, K., Mutlu, M., 2000. The Use of Commercial Pectinase in Fruit Juice Industry. Part 3: Immobilized Pectinase for Mash Treatment. *Journal of Food Engineering*, 47, 275-280.
- Demir, N., Nadaroğlu, H., Taşgin, E., Adıguzel, A., Güllüce, M., 2011. Purification and Characterization of a Pectin Lyase Produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and its Application in Fruit Juice Production. *Ann. Microbiol*, 61, 939-946.
- Duran, K., Özdemir, D., Namlıgöz E.S., 2007. The Enzymatic Degumming of Silk Fibers. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3, 182-186.
- Eggleston, G., 2007. Advances in the Industrial Application of Enzymes on Carbohydrate-Based Materials. Eggleston, G., Vercellotti, J.R. (Ed.), *Industrial Application of Enzymes on Carbonhydrate-based Materials (1-16)*. American Chemical Society, 246p, Washington DC.
- Gummadi, S.N., Kumar, D.S., 2006. Enhanced Production of Pectin Lyase and Pectate Lyase by *Debaryomyces nepalensis* in Submerged Fermentation by Statistical Methods. *American Journal of Food Technology*, 1, 19-33.
- Gummadi, S.N., Kumar, D.S., 2006. Optimization of Chemical and Physical Parameters Affecting the Activity of Pectin Lyase and Pectate Lyase from *Debaryomyces nepalensis*: A statistical approach. *Biochemical Engineering Journal*, 30, 130-137.
- Gummadi, S.N., Kumar, S., Aneesh, C.N.A., 2007. Effect of Salts on Growth and Pectinase Production by Halotolerant Yeast, *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413. *Current Microbiology*, 2007, 472-476.
- Gurucharanam, K., Deshpande, K.S., 1986. Polysaccharases of *Curvularia lunata* – Use in Degumming of Ramie Fibers. *Indian Phytopathol*, 3, 385–389.
- Herron, S.R., Benen, J.A.E., Scavetta, R.D., Visser, J., Jurnak, F., 2000. Structure and Function of Pectic Enzymes: Virulence Factors of Plant Pathogens. *PNAS*, 8762-8769.
- Hoondal, G. S., Tiwari R. P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q. K., 2002. Microbial Alkaline Pectinases and Their Industrial Applications: a Review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 409-418.
- Horikoshi, K., 1990. Enzymes from Alkalophiles. *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2, 275–295.
- İyidoğan, N.F., Bayındırlı, A., 2004. Effect of L-cysteine, Kojic acid and 4-hexylresorcinol Combination on Inhibition of Enzymatic Browning in Amasya Apple Juice. *Journal of food Engineering*, 62, 299-304.

- Jayani, S.R., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review. *Process Biochemistry*, 40, 2931-2944.
- Joshi, V.K., Parmar, M., Rana, N., 2011. Purification and Characterization of Pectinase Produced from Apple Pomace and Evaluation of its Efficacy in Fruit Juice Extraction and Clarification. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2, 189-197.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Tewari, R., 2001. Application of Pectinases in the Commercial Sector: a Review. *Bioresour Technol*, 77, 215-227.
- Khairnar, Y., Vamsi Krishna K., Boraste, A., Gupta, N., Trivedi, S., Patil, 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*, 1, 13-17.
- Körlü, A.E., Bozacı, E.G., 2006. Properties of Flax and Retting of Flax. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 1, 276- 280.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lara-Marquez, A.L., Zavala-Paramo, M.G., Lopez-Romero, E., Camacho, H.C., 2011. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnol Lett*, 33, 859-868.
- Long, J.J., Fu, Y.J., Zu, Y.G., Li, J., Wang, W., Gu, C.B., Luo, M., 2011. Ultrasound-assisted Extraction of Flaxseed Oil Using Immobilized Enzymes. *Bioresource Technology*, 102, 9991–9996.
- Mazzuca, S., Giorno, L., Spadafora, A., Mazzei, R., Drioli, E., 2006. Immunolocalization of  $\beta$ -glucosidase Immobilized within Polysulphone Capillary Membrane and Evaluation of its Activity in situ. *Journal of Membrane Science*, 285, 152-158.
- McIntosh, J.E.A., 1969. Carbonic Anhydrase Isoenzymes in the Erythrocytes and Dorsolateral Prostate of the Rat. *Biochemical Journal*, 114, 463-476.
- Mutlu, M., Sarıoğlu, K., Demir, N., Ercan, M.T., Acar, J., 1999. The use of Commercial Pectinase in Fruit Juice Industry. Part 1: Viscosimetric Determination of Enzyme Activity. *Journal of Food Engineering*, 41, 147-150.
- Mutter, M., Beldman, G., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 1994. Rhamnogalacturonan  $\alpha$ -L-Rhamnopyranohydrolase: a Novel Enzyme Specific for the Terminal

- Nonreducing Rhamnosyl Unit in Rhamnogalacturonan Regions of Pectin. *Plant Physiology*, 106, 241-250.
- Mutter, M., Colguhoun, I.J., Schols, H.A., Beldman, G., Voragen, A.G.J., 1996. Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* is a Rhamnogalacturonan  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1-4)- $\alpha$ -D-galactopyranosyluronide lyase. *Plant Physiol*, 110, 73-77.
- Mutter, M., Renard, C.M.G.C., Beldman, G., Schols, H.A., 1998. Mode of Action of RG-hydrolase and RG-lyase Toward Rhamnogalacturonan Oligomers: Characterization of Degradation Products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase. *Carbohydr Res*, 311, 155-164.
- Naidu, G.S.N., Panda, T., 1999. Performance of Pectolytic Enzymes During Hydrolysis of Pectic Substances under Assay Conditions: a Statistical Approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 116-124.
- Naidu, G.S.N., Panda, T., 2003. Studies on pH and Thermal Deactivation of Pectolytic Enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical engineering Journal*, 16, 57-67.
- Oberoi, H.S., Sandhu, S.K., Vadlani, P.v., 2012. Statistical Optimization of Hydrolysis Process for Banana Peels using Cellulolytic and Pectinolytic Enzymes. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 257-265.
- Özoğlu, H., Bayındırlı, A., 2001. Inhibition of Enzymic Browning in Cloudy Apple Juice with Selected Antibrowning Agents. *Food Control*, 13, 213-221.
- Pallesen, B.E., 1996. The Quality of Combine-Harvested Fibre Flax for Industrial Purposes Depends on the Degree of Retting. *Industrial Crops and Products*, 5, 65-78.
- Palomaki, T., Saarilahti, H.T., 1997. Isolation and Characterization of New C-terminal Substitution Mutation Affecting Secretion of Polygalacturonases in *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora*. *FEBS Lett*, 400, 122-126.
- Panda, T., Nair, S.R., Kumar, P., 2004. Regulation of Synthesis of the Pectolytic Enzymes of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 466-473.
- Patil, S.R., Dayanand, A., 2006. Optimization of Process for the Production of Fungal Pectinases from Deseeded Sunflower Head in Submerged and Solid-state conditions. *Bioresource Technology*, 97, 2340-2344.
- Pedrolli, D.B., Gomes, E., Monti, R., Carmona, E.C., 2008. Studies on Productivity and Characterization of Polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* Submerged Culture using Citrus Pectin and Orange Waste. *Appl Biochem Biotechnol*, 144, 191-200.

- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E. C., 2009. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3, 9-18.
- Petersen, S., 2001. Enzymes to Upgrade Plant Nutrients. *Feed Mix*, 9, 12–15. Sakamoto, T., Hallaert, J. and Vandamme, E. J., Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. In *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213-294.
- Pinelo, M., Zeuner, B., Meyer, A.S., 2010. Juice Clarification by Protease and Pectinase Treatments Indicates New Roles of Pectin and Protein in Cherry Juice Turbidity. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 259-265.
- Pitt, D., 1988. Pectin Lyase from *Fhoma Medicaginis* var. *Pinodella*. *Methods Enzymol*, 161, 350-354.
- Private Üniversitesi Council. Lisans ders içerikleri. Erişim tarihi 29.10.2012. <http://puc.edu.tr>.
- Purich, D.L., 2010. *Enzyme Kinetics: Catalysis and Control. A Reference of Theory and Best-Practice Methods*. Elsevier, 920p, Amsterdam.
- Rombouts, F. M. and Pilnik, W., 1980. Pectic enzymes. In *Microbial Enzymes and Bioconversions*, 5, 227-282.
- Rombouts, F.M., Pilnik, W., 1980. Pectic enzymes. In Rose, A.H. (Ed.), *Microbial Enzymes and Bioconversions (227-272)*. Academic Press, 693s, Londra.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., 1993. Pectin, Pectinase and Protopectinase: Production, Properties and Applications. *Appl Microbiol*, 39, 213- 294.
- Sandri, I.G., Fontana, R.C., Barfknecht, D.M., Silveira, M.M., 2011. Clarification of Fruit Juices by Fungal Pectinases. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 2217-2222.
- Sasson, A., 2005. In *Industrial and Environmental Biotechnology: Achievements, Prospects, and Perceptions* 28 p.
- Scott, D., 1978. Enzymes, Industrial. In: Grayson M, Ekorth D (Ed.), *Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology*. Wiley, New York, pp 173–224.
- Searle-Van Leeuwen, M.J.F., Lam, V.D.B., Schols, H.A., Beldman, G., Voragen, A.G.J., 1992. Rhamnogalacturonan Acetylerase: a Novel Enzyme from *Aspergillus aculeatus*, Specific for the Deacetylation of Hairy (ramified) Regions of Pectins. *Appl Microbiol Biotechnol*, 38, 347-349.

- Serra, J. L., Alkorta, I., Llama, M. J. and Alaiia, A., 1992. Aplicacion industrial de 10s enzimas pecticos. Production, Purification, Inmovilizacion y Algunas Propiedades de la Pectina Liasa de *Penicillium italicum*. Alimentacion. Equipos y Tecnologia, 11, 127-134.
- Shevchik, V.E., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., 1997. Identification of a Bacterial Pectin Acetyl Esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. Mol Microbiol, 24, 1285- 1301.
- Sinitsyna, O.A., Federova, E.A., Semenova, M.V., 2007. Isolation and Characterization of Extracellular Pectin Lyase from *Penicillium canescens*. Biochem (Moscow), 72, 565-571.
- Soares, M.M.C.N, Silva, R.D., Carmona, E.C., Gomes, E., 2001. Pectinolytic Enzyme Production by *Bacillus* species and Their Potential Application on Juice Extraction. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 17, 79-82.
- Tanabe, H., Yoshihara, Y., Tamura, K., Kobayashi, Y., Akamatsu, T., 1987. Pretreatment of Pectic Wastewater from Orange Canning Process by an Alkalophilic *Bacillus* sp. J Ferment Technol, 65, 243–246.
- Teixeira, J.A., Goncalves, D.B., Queiroz, M.V.D., Araujo, E.F.D., 2011. Improved Pectinase Production in *Penicillium griseoroseum*. Journal of Applied Microbiology, 111, 818-825.
- Temizkan, G., arda, N. (Ed.), 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevleri, 345s, İstanbul.
- Thomassen, L.V., Larsen, D.M., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2011. Definition and Characterization of Enzymes for Maximal Biocatalytic Solubilization of Prebiotic Polysaccharides from Potato Pulp. Enzyme and Microbial Technology, 49, 289-297.
- Thomassen, L.V., Vignæs, L.K., Licht, T.R., Mikkelsen, J.D., Meyer, A.S., 2011. Maximal Release of Highly Bifidogenic Soluble Dietary Fibers from Industrial Potato Pulp by Minimal Enzymatic Treatment. Appl Microbiol Biotechnol, 90, 873-884.
- Uhlir, H., 1998. Industrial Enzymes and Their Applications. A Wiley Interscience Publication, 472 p, New York.
- Vlugt-Bergmans C.J.B., Meeuwse P.J.A., Voragen, A.G.J., Van Ooyen A.J.J., 2000. Endo-xylogalacturonan hydrolyase, : a Novel Pectinolytic Enzyme. Appl Environ Microbiol, 59, 409-418.

- Yadav, S., Dubey, A.K., Anand, G., Yadav, D., 2012. Characterization of a Neutral Pectin Lyase Produced by *Oidiodendron echinulatum* MTCC 1356 in Solid State Fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1- 8.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S.,2009. Pectin lyase: A review. *Process Biochemistry*, 44, 1-10.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S., 2008. Purification and Charecterization of an Alkaline Pectin Lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry*, 43, 547-552.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kader POTURCU

Doğum Yeri ve Yılı : Uşak, 1985

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

E-posta : kaderpoturcu@sdu.edu.tr

### Eğitim Durumu

Lise : Şehit Necati Sargın Anadolu Lisesi, 2004

Lisans : Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya  
Bölümü

Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü

### Mesleki Deneyim

SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi, 2011-... (halen)

Kimya Bölümü Bilgisayar Koordinatörlüğü 2012-... (halen)

### Yayımları

Poturcu, K., Karipcin, F., Antep, M., Tuzmen, N., 2011. 4- Bifenilglioksilohidroksimoil Klorür (BFKKO) Bağlı Poli (Akrilamid-Allilglisidil Eter) Kriyojel ile Sulu Çözeltilerden  $Pb^{2+}$  İyonunun Uzaklaştırılması. Uluslararası Katılımlı XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 18-22 Mayıs 2011, Side-Antalya, 248-249.

Poturcu, K., Ozkorucuklu, P.S., Ozmen, I., 2012. Purification and Electrochemical Immobilization of Pectinolytic Enzymes Produced by *Aspergillus Niger*. 3rd International Symposium on Sustainable Development Green Information Technologies and Strategies ISSD, 2012 May 31- June 1, 2012 Sarajevo, Bosnia & Herzegovina, 318-319.



