


Prof. Dr. Nazan DEMİR danışmanlığında, Safinur YILDIRIM ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma 07/12/2007 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nazan DEMİR

İmza : 

Üye : Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

İmza: 

Üye : Doç. Dr. İsmet YILMAZ

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza: 

Üye : Doç. Dr. Yaşar DEMİR

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Mehmet ERTUĞRUL

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**MEYVE SUYU ÜRETİMİNDE KULLANIM AMAÇLI, PEKTİN
LİYAZ ÜRETEN YENİ MİKROORGANİZMALARIN ARANMASI
VE BULUNAN TÜRLERDE ENZİMİN SAFLAŞTIRILIP
KARAKTERİZE EDİLMESİ**

Safinur YILDIRIM ÇELİK

KİMYA ANABİLİM DALI

ERZURUM

2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

MEYVE SUYU ÜRETİMİNDE KULLANIM AMAÇLI, PEKTİN LİYAZ ÜRETEN YENİ MİKROORGANİZMALARIN ARANMASI VE BULUNAN TÜRLERDE ENZİMİN SAFLAŞTIRILIP KARAKTERİZE EDİLMESİ

Safinur YILDIRIM ÇELİK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nazan DEMİR

Bu çalışmadaki temel amaç, pektin liyaz enzimini üreten yeni mikroorganizmalar aramak ve yüksek aktivitede pektin liyaz üreten türlerden elde edilen pektin liyaz enzimlerini saflaştırıp karakterize etmektir. Ayrıca elde edilen pektin liyaz enzimlerinin meyve suyu üretiminde kullanılıp kullanılamayacağını araştırmaktır.

Bu amaçla yedi farklı mikroorganizmanın pektin liyaz üretilip üretilmediği araştırılmış ve bunlardan üçünün (*Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*) pektin liyaz enzimini ürettiği bulunmuştur. Bulunan bu türlerden pektin liyaz enzimi üretilmiş ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. SDS poliakrilamid jel elektroforezleri yapılarak saflıklar ve alt birimlerinin olup olmadığı kontrol edilmiştir. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum pH'ları, optimum sıcaklıkları, sıcaklık stabiliteyi, raf ömürleri, karbohidrat içerikleri, tirozin ve triptofan miktarları belirlenmiştir. Lineweaver-Burk metodu kullanılarak bu enzimlerin V_{max} ve K_M 'leri hesaplanmıştır. Molekül ağırlıkları ise Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile bulunmuştur. Saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , sitrik asit ve askorbik asidin etkisi de incelenmiştir.

İkinci aşamada ise saflaştırılan pektin liyaz enzimleri ve ham ekstraktlar, elma, havuç, muz ve şeftali suyu elde etmek için kullanılmışlardır. Kontrol amaçlı aynı meyvelerden enzim katılmadan meyve suyu elde edilmiştir. Saflaştırılan pektin liyaz ve ham ekstraktlardan elde edilen meyve suyu miktarları kontrol ile karşılaştırılarak meyve suyu elde etme veriminin ne kadar arttığı hesaplanmıştır. Ayrıca endüstride meyve suyu üretiminde yaygın olarak kullanılan ve ticari olarak satılan bir pektinaz enzim karışımı ile de aynı işlemler yapılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

2007, 106

Anahtar kelimeler: Pektin liyaz, *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*, *Geobacillus pallidus*, Meyve suyu üretimi

ABSTRACT

PhD. Thesis

IN ORDER TO USE IN FRUIT JUICE INDUSTRY, INVESTIGATION OF NEW
MICROORGANIZMS PRODUCING PECTIN LYASE ENZYME AND
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THESE ENZYMES

Safinur YILDIRIM CELIK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Nazan DEMİR

The aim of this study is to investigate new microorganisms which produce pectin lyase enzymes and purify and characterize it from microorganisms which produce high activity of pectin lyase enzymes. In addition to, it was researched whether obtained pectin lyase enzymes could be used in the production of fruit juice.

Seven different microorganisms were investigated whether they produce pectin lyase. It was determined that *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* and *Geobacillus pallidus* produce pectin lyase. Produced pectin lyase enzymes were purified by using DEAE-cellulose anion exchange column chromatography. Purification and sub-unit of enzymes were controlled by SDS-PAGE. Optimum pH, optimum temperature, temperature stability, shelf life, carbohydrate content and amount of tryptophan and tyrosine of purified pectin lyase were determined. V_{max} and K_M of purified pectin lyase enzymes were calculated by using Lineweaver-Burk graphic method. Molecular weights of these enzymes were found by using Sephadex G-100 gel filtration chromatography. The effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , citric acid and ascorbic acid on pectin lyase activity were also investigated.

In the last process, purified pectin lyase enzymes and extracts of crude enzyme were used in the production of apple, carrot, bananas and peach juice. Fruit juices were produced without adding enzyme for the control. The volume of the produced fruit juice from the control and the experiment were compared by calculating yield. The yield % of obtained fruit juice volume and hydrolyzing % of dry weight were calculated. These processes were repeated for a commercial enzyme too and results were compared.

207, 106 pages

Keywords: Pectin lyase, *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris*, *Geobacillus pallidus*, Fruit juice production

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu alışma, Atatürk Üniversitesi Araştırma Fonu Saymanlığınca desteklenen 2003/80 nolu araştırma projesinin bir kısmı olup, Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir.

Her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nazan DEMİR'e

Tezimin deneysel ve yazım aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve her konuda yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Yaşar DEMİR'e

Tez çalışmamda kullandığım bakterileri sağlayan ve onların üretilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, Sayın Arş. Gör. Özlem BARIŐ'a ve Sayın Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Fabrikada meyve suyu üretim proseslerini inceleme imkanı sağlayan Tokat Dimes fabrikasının yöneticisi olan Sayın Koray Aybek'e,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Hasan SEÇEN'e teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Suat ÇELİK'e, ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'a ve Sayın Arş. Gör. Azize ALAYLI GÜNGÖR'e, başta olmak üzere, tüm hocalarıma, arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Safinur YILDIRIM ÇELİK

Eylül 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Pektik Maddeler	2
1.2 Pektik Enzimler	6
1.3 Pektinazların Endüstriyel Kullanımları	9
1.3.1 Pektinazların lifli ürünlerin işlenme sürecinde kullanımı	10
1.3.2 Pektinazların tekstil endüstrisinde kullanımı	10
1.3.3 Pektinazların protoplast elde edilmesinde kullanımı	12
1.3.4 Pektinazların bitki dokularının yumuşatılmasında kullanımı	12
1.3.5 Pektinazların kümes hayvanlarının yemlerinde kullanımı	12
1.3.6 Pektinazların yağların ekstraksiyonunda kullanımı	13
1.3.7 Pektinazların çay ve kahvenin oksidasyonunda kullanımı	13
1.3.8 Pektinazların kağıt yapımında kullanımı	14
1.3.9 Pektinazların pektik atık suların işlenmesinde kullanımı	14
1.3.10 Pektinazların meyve suyu üretiminde kullanımı	15
2 KAYNAK ÖZETLERİ	17
3 MATERYAL ve YÖNTEMLER	31
3.1 Materyal	31
3.1.1 Bakterilerin temini	31
3.1.2 Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	31
3.1.3 Yararlanılan alet ve cihazlar	31
3.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	32
3.2 Yöntemler	34
3.2.1 Kalitatif protein tayini	34
3.2.2 Bradford yöntemiyle protein tayini	34

3.2.3 Pektin liyaz aktivitesi tayini	35
3.2.4 Mikroorganizmalardan pektin liyaz enziminin üretilmesi ve homojenat hazırlanması	36
3.2.5 DEAE-selüloz iyon değişim kolonunun hazırlanması	37
3.2.6 Hazırlanan homojenatların DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna yüklenmesi ve elüsyon alınması	37
3.2.7 SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile alt birim belirlenmesi.....	38
3.2.8 Optimum pH'nın belirlenmesi	39
3.2.9 Optimum sıcaklığın belirlenmesi	40
3.2.10 Enzim stabilitesinin üzerine sıcaklığın etkisi.....	40
3.2.11 Raf ömrünün incelenmesi	41
3.2.12 Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının tayini.....	41
3.2.13 V_{max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi	42
3.2.14 Karbohidrat içeriğinin belirlenmesi	43
3.2.15 Tirozin ve triptofan miktarlarının tayini	43
3.2.16 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , sitrik asit ve askorbik asit'in etkisinin incelenmesi.....	44
3.2.17 Meyve suyu denemeleri	45
4 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	47
4.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	47
4.2 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'un Pektin Liyaz Üretme Kapasiteleri.....	48
4.3 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin DEAE-selüloz İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları.....	48
4.3.1 <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	49
4.3.2 <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	50

4.3.3 <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları.....	52
4.4 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin SDS-poliakrilamid Jel Elektroforez Sonuçları	53
4.5 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları	56
4.6 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklık Sonuçları	58
4.7 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Sıcaklık Stabilite Sonuçları	60
4.8 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Raf Ömürleri Sonuçları.....	62
4.9 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığının Tayini Sonuçları.....	64
4.10 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin V_{max} ve K_M Değerlerinin Sonuçları	66
4.11 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Karbohidrat İçeriklerinin Sonuçları	68
4.12 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Tirozin ve Triptofan Miktarlarının Tayininin Sonuçları	70
4.13 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Aktiviteleri	

Üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Sitrik Asit ve Askorbik Asitin Etkisi.....	70
4.14 <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan Üretilip Safılaştırılan Pektin Liyaz Enzimleriyle Yapılan Meyve Suyu Elde Etme Sonuçları	86
5 TARTIŞMA ve SONUÇ	90
KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μ	Mikro
ε	Molar ekstinksiyon katsayısı
g	Yerçekim ivmesi

Kısaltmalar

DEAE-selüloz	Dietil aminoetil selüloz
ED	Metille esterleşme derecesi
EU	Enzim ünitesi
NA	Nutrient Agar CM0003
NB	Nutrient Broth
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PDA	Potato dextrose agar CM0139
PER	Amonyum persülfat
PL	Pektin liyaz
rpm	Devir/dakika
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletildiamin
TSA	Tryptone Soya Agar CM0131

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Bitki hücresinin şematik görüntüsü	3
Şekil 1.2. Bitki hücre duvarı ve orta lamelin şematik görüntüsü (McCann <i>et al.</i> 1990)	3
Şekil 1.3. Pektin molekülünün yapısı.....	4
Şekil 1.4. Pektik asit molekülünün yapısı	5
Şekil 1.5. Pektinik asit molekülünün yapısı.....	5
Şekil 1.6. PMGL: Polimetilgalakturonat liyaz (pektin liyaz); PMG: polimetilgalakturonaz (pektin hidrolaz); PMGE; Polimetilgalakturonat esteraz (pektinesteraz); PGL: poligalakturonat liyaz (pektat liyaz); PG: poligalakturonaz (pektat hidrolaz) (Alkorta <i>et al.</i>)	9
Şekil 2.1 Pektin liyaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Herron <i>et al.</i> 2000)	17
Şekil 2.2. <i>Aspergillus Niger</i> 'den saflaştırılan pektin liyaz B (PLB) enziminin üç boyutlu şematik görüntüsü (Herron <i>et al.</i> 2000)	18
Şekil 3.1. Pektin liyaz enziminin katalizlediği reaksiyonun şematik görüntüsü.....	35
Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik	47
Şekil 4.2. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içinde 0-0,4 M NaCl ile gradient elüsyonu; (—o—): 280 nm'de absorbansı, (—●—): aktivite kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL	49
Şekil 4.3. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içinde 0-0,4 M NaCl ile gradient elüsyonu; (—o—): 280 nm'de absorbansı, (—●—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL	51
Şekil 4.4. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içinde 0-0,4 M NaCl ile gradient	

elüsyonu; (—o—): 280 nm’de absorbansı, (—●—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL.	52
Şekil 4.5. <i>Agrobacterium radiobacter</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı (I: homojenat, II. Pektin liyaz.....	54
Şekil 4.6. <i>Xanthomonas campestris</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı	55
Şekil 4.7. <i>Geobacillus pallidus</i> ’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı	56
Şekil 4.8. <i>Agrobacterium radiobacter</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine pH’nın etkisi	57
Şekil 4.9. <i>Xanthomonas campestris</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine pH’nın etkisi	57
Şekil 4.10. <i>Geobacillus pallidus</i> ’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine pH’nın etkisi	58
Şekil 4.11. <i>Agrobacterium radiobacter</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	59
Şekil 4.12. <i>Xanthomonas campestris</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	59
Şekil 4.13. <i>Geobacillus pallidus</i> ’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi	60
Şekil 4.14. <i>Agrobacterium radiobacter</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	61
Şekil 4.15. <i>Xanthomonas campestris</i> ’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	61
Şekil 4.16. <i>Geobacillus pallidus</i> ’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi	62
Şekil 4.17. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> ’dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin oda sıcaklığında (~25°C) aktivite değişimleri.....	63

Şekil 4.18. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin 4°C'deki aktivite değişimleri.....	63
Şekil 4.19. Sığır serum albümin (66.000 Da), selüloz (45.000 Da) ve lipaz (31.000 Da) proteinleri ile hazırlanan jel filtrasyon kromatografisi standart eğrisi. Sephadex G-100, 0, 05 M NaH ₂ PO ₄ , 1 mM ditiotritol, pH:7 (Ve: elüsyon hacmi, V _o : Kolonun boşluk hacmi).....	64
Şekil 4.20. <i>Agrobacterium radiobacter</i> üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları. Sephadex G-100, 0,05 M NaH ₂ PO ₄ , 1 mM ditiotritol, pH:7.....	65
Şekil 4.21. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları. Sephadex G-100, 0,05 M NaH ₂ PO ₄ , 1 mM ditiotritol, pH:7.....	65
Şekil 4.22. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları. Sephadex G-100, 0,05 M NaH ₂ PO ₄ , 1 mM ditiotritol, pH:7.....	66
Şekil 4.23. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	67
Şekil 4.24. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	67
Şekil 4.25. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği.....	68
Şekil 4.26. Fenol sülfürik asit yöntemi ile karbohidrat tayini için kullanılan standart grafik.....	69
Şekil 4.27. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca ²⁺ 'nin etkisi.....	71
Şekil 4.28. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca ²⁺ 'nin etkisi.....	71
Şekil 4.29. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca ²⁺ 'nin etkisi.....	72
Şekil 4.30. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Mg ²⁺ 'nin etkisi.....	72

Şekil 4.31. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi.....	73
Şekil 4.32. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi.....	73
Şekil 4.33. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Co^{2+} 'nin etkisi	74
Şekil 4.34. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Co^{2+} 'nin etkisi.....	74
Şekil 4.35. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Co^{2+} 'nin etkisi.....	75
Şekil 4.36. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'nin etkisi	75
Şekil 4.37. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'nin etkisi	76
Şekil 4.38. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'nin etkisi	76
Şekil 4.39. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi.....	77
Şekil 4.40. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi.....	77
Şekil 4.41. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi.....	78
Şekil 4.42. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} 'nin etkisi	78
Şekil 4.43. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} 'nin etkisi	79
Şekil 4.44. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} 'nin etkisi	79
Şekil 4.45. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi	80
Şekil 4.46. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi.....	80

Şekil 4.47. <i>Geobacillus pallidus</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi.....	81
Şekil 4.48. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asidin etkisi.....	81
Şekil 4.49. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asidin etkisi.....	82
Şekil 4.50. <i>Geobacillus pallidus</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asidin etkisi	82
Şekil 4.51. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sitrik asidin etkisi.....	83
Şekil 4.52. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sitrik asidin etkisi.....	83
Şekil 4.53. <i>Geobacillus pallidus</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sitrik asidin etkisi	84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı meyvelerde pektik madde oranları	6
Çizelge 1.2. Bazı sebzelerde pektik madde oranları	6
Çizelge 1.3. Pektik enzimlerin sınıflandırılması (Alkorta <i>et al.</i> 1998) (Enzimler Enzim Komisyonuna (EC) göre sınıflandırılmış ve isimlendirilmiştir).....	8
Çizelge 2.1. Bakteri ve mantarlardan saflaştırılan pektin liyaz enziminin bazı karakteristik özellikleri (Schlemmer <i>et al.</i> 1987; Sakiyama <i>et al.</i> 2001; Chen <i>et al.</i> 1998; Papi and Kyriakidis 2003; Godfrey <i>et al.</i> 1994; Kim <i>et al.</i> 1998; Nikaidou <i>et al.</i> 1995; Martin <i>et al.</i> 2004; Martin <i>et al.</i> 2004; Hamdy 2005; Nakagawa <i>et al.</i> 2005; Afifi <i>et al.</i> 2002; Alana <i>et al.</i> 1991; Obi ve Moneke 1985).....	23
Çizelge 4.1. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'in yetiştirildiği ortamdan elde edilen homojenatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonundan elde edilen pektin liyaz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	50
Çizelge 4.2. <i>Xanthomonas campestris</i> 'in yetiştirildiği ortamdan elde edilen homojenatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonundan elde edilen pektin liyaz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	52
Çizelge 4.3. <i>Geobacillus pallidus</i> 'un yetiştirildiği ortamdan elde edilen homojenatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonundan elde edilen pektin liyaz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.....	53
Çizelge 4.4. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimleri için yapılan optimum pH çalışmasında elde edilen sonuçlar.....	58
Çizelge 4.5. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimleri için yapılan optimum sıcaklık çalışmasında elde edilen sonuçlar	60

Çizelge 4.6. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları	66
Çizelge 4.7. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan V_{max} ve K_M değerleri.....	68
Çizelge 4.8. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin % karbohidrat içerikleri.....	70
Çizelge 4.9. <i>Agrobacterium radiobacter</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> ve <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin tirozin ve triptofan miktarları	70
Çizelge 4.10. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , askorbik asit ve sitrik asitin etkisinin sonuçları	84
Çizelge 4.11. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , askorbik asit ve sitrik asitin etkisinin sonuçları	85
Çizelge 4.12. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , askorbik asit ve sitrik asitin etkisinin sonuçları	85
Çizelge 4.13. <i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen meyve suyu miktarının kontrole göre artış oranı.....	86
Çizelge 4.14. <i>Xanthomonas campestris</i> 'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen meyve suyu miktarının kontrole göre artış oranı.....	87
Çizelge 4.15. <i>Geobacillus pallidus</i> 'dan elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen meyve suyu miktarının kontrole göre artış oranı.....	87

- Çizelge 4.16. *Agrobacterium radiobacter*'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinin kuru maddelerindeki (K.M.) yüzde parçalanma oranı 88
- Çizelge 4.17. *Xanthomonas campestris*'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinin kuru maddelerindeki (K.M.) yüzde parçalanma oranı..... 88
- Çizelge 4.18. *Geobacillus pallidus*'dan elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinin kuru maddelerindeki (K.M.) yüzde parçalanma oranı..... 89

1 GİRİŞ

Enzimler, biyolojik katalizörlerdir. Reaksiyon için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonun daha ılımlı şartlarda ve daha hızlı bir şekilde oluşmasını sağlamaktadırlar. Ayrıca enzimler, diğer katalizörlerden farklı olarak katalizledikleri reaksiyonlarda, substratlarını herhangi bir yan ürün meydana getirmeden %100 ana ürüne dönüştürmektedir. Katalitik RNA molekülleri hariç, %98'i protein yapısında olan enzimler hücre içerisinde kimyasal reaksiyonların meydana gelmesini de sağlamaktadırlar (Onat ve Emerk 1997; Karlson ve Telefoncu 1998).

Bitki ve hayvanlardan elde edilen ham materyallerin işlenmesinde, yüzyıllardır enzimlerin ve mikroorganizmaların kullanıldığı bilinmektedir. Hamurun ekşitilmesinde ekşi hamurun kullanılması bilinen en eski kullanım alanlarından biridir. Peynir yapılarak sütün bozulmasının önlenmesini bu olaya örnek olarak verebiliriz (Uhlig 1998).

Yukarıdaki verilen örnek uygulamaların hiç birinde insanlar olayın enzimatik bir reaksiyon olduğunun farkında değillerdir. Bu anlamda bilinçli olarak ilk enzimatik parçalanma reaksiyonunun gözlemlendiği deney 1783'te İtalyan bir papaz olan Spallanzani (1729-1799) tarafından yapılmıştır. Spallanzani, bir delikli kapsülün içine bir miktar et koymuş ve etçil bir kuş olan doğana yedirmiştir. Bir müddet sonra deneyde kullandığı doğanı kusturarak kusmuğu incelemiş ve kapsülün içinin boş olduğunu gözlemlemiştir. Bu gözlem üzerine etin sıvılaştırıldığı kanaatine varmıştır. Böylece Spallanzani enzimatik parçalanmanın gözlemlendiği deneyi yapan ilk kişi olarak literatüre geçmiştir (Uhlig 1998).

1857'de Pasteur, fermantasyon olayını canlı mayaların gerçekleştirdiğini göstermiştir. Ayrıca Pasteur hücreler (organize fermentler) ve enzimlerin (çözülebilir fermentlerin) birbirlerinden farklı olduğunu anlamıştır. 1878'de Kühne Pasteur'ün keşfettiği çözülebilir fermentlere "enzyme" ismini vermiştir. Bu isim Yunanca'da ekşi hamur anlamına gelen "en zyme"den türemiştir. 1897'de Buchner canlı hücrelerden arındırılmış maya

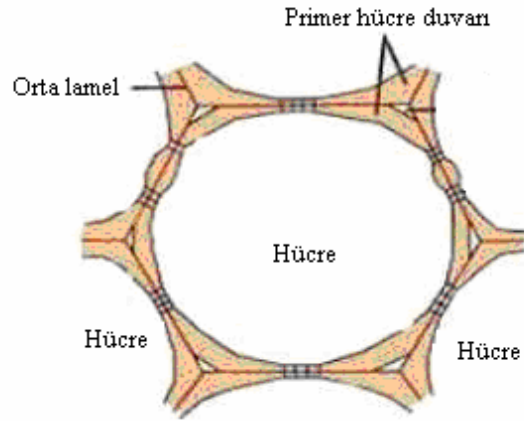
ekstraktlarının şekerli alkole dönüştürdüğünü göstererek enzimatik kataliz olayının bizzat çözünebilen fermentler (enzimler) tarafından gerçekleştirildiğini ortaya koymuştur (Uhlig 1998).

Endüstriyel olarak önemli mikrobiyal enzimlerin kullanımı ise bir Japon olan Jakichi Takamine ile başlamıştır. Jakichi Takamine, küflerden enzim üretimi konusunda çalışmış ve 1894'de küflerden diastaz enzimini üretmeyi başararak çalışması için patent almıştır (Wolfgang 2003).

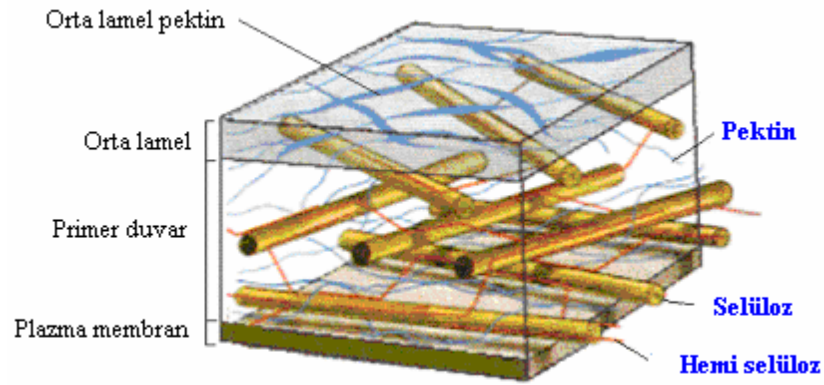
Modern enzim teknolojisi uygulamalarının amaçlarından biride; yiyeceklerin korunması, ham materyallerin daha etkili kullanılması ve yiyeceklerin görüntü ve tat gibi özelliklerinin değiştirilerek kalitesinin artırılmasıdır. Enzimler aynı zamanda işlem maliyetini düşürmek ve çevreye zararlı maddelerin kullanımını azaltmak için de kullanılmaktadır (Wolfgang 2003).

1.1 Pektik Maddeler

Pektik maddeler büyük molekül ağırlıklarına sahip olan glikozidik makromoleküllerdir. Bu maddeler, genç bitki hücrelerinin bitişik duvarları arasında bulunan, yapıştırıcı ekstraselüler maddenin ince bir tabakası olan orta lamelin ana bileşenini oluştururlar (Alkorta *et al.* 1998). Ayrıca, pektik maddeler bitki hücre duvarının en önemli bileşenidir (Şekil 1.1, 1.2).

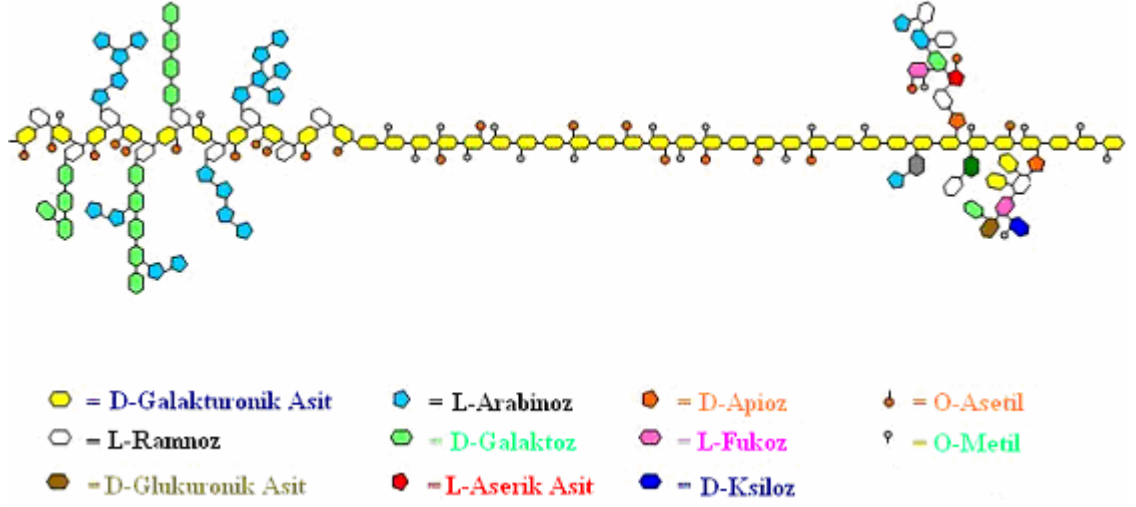


Şekil 1.1. Bitki hücrelerinin şematik görünümü



Şekil 1.2. Bitki hücre duvarı ve orta lamelin şematik görünümü (McCann *et al.* 1990)

Pektik maddeler, kimyasal olarak beş yüz ile bin rezidü uzunluğunda olan metille esterleşmiş galakturonik asitlerin oluşturduğu dallanmış heteropolisakkaritlerdir (Şekil 1.3.). Pektik maddelerin ana zinciri, D-galakturonik asitlerin α -(1, 4) bağlarıyla oluşturduğu, poligalakturonatlardan meydana gelmektedir. D-galakturonik asit birimlerinden oluşan ana zincir zengin L-ramnoz bölgeleri ihtiva etmektedir. Ana zincire bağlı yan zincirlerin L-arabinoz, D-galaktoz ve D-ksiloz birimlerinden oluştuğu bilinmektedir. Galakturonik asitin karboksil gruplarının bir kısmı metil gruplarıyla esterleşmişken diğerleri kısmen veya tamamen sodyum, potasyum veya amonyum iyonları ile nötralize edilmiştir. C2 ve C3 üzerindeki hidroksil gruplarının bazılarının asetillenmiş olabileceği de ifade edilmektedir (Pilnik and Voragen 1970).

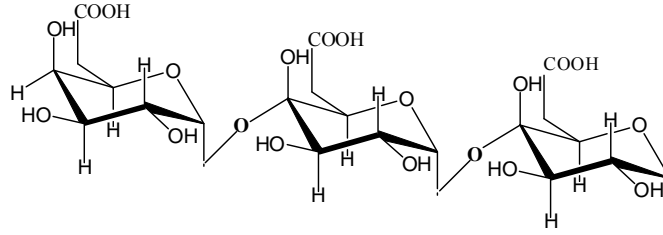


Şekil 1.3. Pektin molekülünün yapısı

Amerikan Kimya Derneği pektik maddeleri protopektinler, pektik asitler, pektinik asitler ve pektinler olmak üzere dört ana grupta toplamıştır. Bu maddelerden protopektinler suda çözünmezken, diğer üçü kısmen veya tamamen suda çözünmektedir (Alkorta *et al.* 1998).

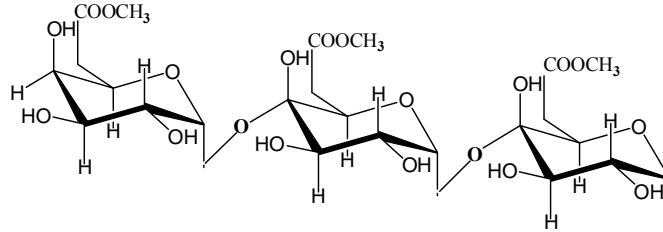
Temel pektik maddelerden biri olan protopektin, genellikle bitki dokusunda bulunan suda çözünmeyen pektik maddeler olarak tanımlanmaktadır. Protopektinlerin pektin ve pektinik asitlerin hidrolizlenmesini sınırladığı da bilinmektedir (Be Miller 1986). Protopektinin büyük molekül ağırlığına sahip olması, pektinin karboksilik asit grupları ile diğer hücre bileşenlerinin hidroksil grupları arasında oluşan ester bağları ve pektinin karboksilik asit grupları ile proteinlerin basit grupları arasında oluşan hidrojen bağları protepektinin çözünürlüğünü sınırlayan faktörlerden olduğu bilinmektedir (Yoshitake *et al.* 1994).

Pektik asitler poligalakturonat birimlerinden oluşmaktadır. Pektik asitlerin içerdiği poligalakturonat birimlerinde bulunan karboksil gruplarının çok az bir miktarı metille esterleşmiştir (Şekil 1.4.). Normal tuzları veya asit tuzları pektat olarak isimlendirilmektedir (Kilara 1982).



Şekil 1.4. Pektik asit molekülünün yapısı

Metille esterleşmiş poligalakturonat birimlerinden oluşan polisakkaritlere pektinik asit denilmektedir (Şekil 1.5.). Pektinik asitlerin ihtiva ettikleri galakturonat birimleri farklı oranlarda metille esterleşmiştir. Pektinik asitlerin normal tuzları veya asit tuzları pektinatlar olarak isimlendirilmektedir. Pektinik asitler, asit ve şekerlerle jel formuna dönüşebilmektedir. Ayrıca düşük oranda metille esterleşmiş ise kalsiyum ile de jel formuna dönüştüğü bilinmektedir (Kilara 1982) .



Şekil 1.5. Pektinik asit molekülünün yapısı

Pektin ise, en büyük bileşenini pektinik asitlerin oluşturduğu farklı kompozisyonlara sahip bileşiklere verilen genel isimdir. Doğal yapıdaki pektinler, hücre duvarına esterleşmiş proteinlere ve diğer polisakkaritlere bağlanarak pektik maddelerin çözilemeyen yapısı olan protopektinleri oluşturmaktadır (Kilara 1982).

Pektin molekülleri çoğunlukla jelleştirici madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca az da olsa kıvam artırıcı, stabilizatör olarak da kullanılmaktadır. Metille esterleşme yüzdesi 50'den düşük olan pektinler, düşük pH (3,5-4,0) ve kalsiyum iyonları varlığında ısıyla geri dönüşümlü olarak jel formuna dönüşürken, metille esterleşme yüzdesi 50'den yüksek olan pektinler yeterli miktarda şeker (sakkaroz) ve düşük pH (<3,5) da ısıyla geri

dönüşümsüz bir şekilde jel yapısına dönüşmektedirler (Dickinson 2003). Çizelge 1.1. ve 1.2.'da bazı meyve ve sebzelerde bulunan pektik madde miktarları verilmektedir.

Çizelge 1.1. Bazı meyvelerde pektik madde oranları

Meyve	Doku	Pektik Madde (%)
Elma	Taze	0,5-1,6
Muz	Taze	0,7-1,2
Şeftali	Taze	0,1-0,9
Çilek	Taze	0,6-0,7
Kiraz	Taze	0,2-0,5
Armut	Taze	0,9-1,4
Portakal	Kuru Madde	12,4-28,0

Çizelge 1.2. Bazı sebzelerde pektik madde oranları

Sebze	Doku	Pektik Madde (%)
Patates	Kuru Madde	1,8-3,3
Domates	Kuru Madde	2,4-4,8
Şeker pancarı	Kuru Madde	10,0-30,0

1.2 Pektik Enzimler

Pektik maddeleri, substrat olarak kullanan enzimler; pektik enzimler, pektinazlar veya pektinolitik enzimler olarak isimlendirilmektedir. Pektik enzimler, pektik maddelerin omurgalarını oluşturan galakturonat rezidülerinde bulunan bağlar üzerindeki aktivitele-
rine göre sınıflandırılmaktadır (Çizelge 1.3.).

Temel olarak üç tip pektik enzim varlığı bilinmektedir ;

1. Ester bağına parçalayanlar (pektin esterazlar),
2. Depolimerize edenler (pektinazlar: hidrolaz veya liyaz),

3. Protopektinazlar (Alkorta *et al.* 1998).

Birinci gruba giren enzimler, ester bağının parçalanmasını katalizlemektedir (Şekil 1.6.). Bu enzimler; mantar, bakteri, maya ve yüksek bitkilerden elde edilmektedir (Sakai *et al.* 1993). Pektin esteraz olarak adlandırılan bu enzim ticari olarak hazırlanmış bütün pektinolitik enzim preparatlarında bulunmaktadır (Voragen 1972).

Depolimerazlar, ya hidroliz (hidrolazlar) ya da β -eliminasyonu ile (liyazlar) pektik maddelerdeki galakturonik monomerlerinin arasında bulunan α -(1,4) glikozid bağı parçalamaktadırlar (Şekil 1.6.).

Hidrolazlar dört ana grup altında toplanmıştır;

- a. Pektini rasgele parçalayan endopolimetilgalakturonazlar,
- b. Pektini sadece uçtan parçalayabilen ekzopolimetilgalakturonazlar,
- c. Pektatı rasgele parçalayan endopoligalakturonazlar,
- d. Pektatı sadece uçtan parçalayabilen ekzopoligalakturonazlar.

Endopoligalakturonazların, birçok mantar ve bakteride, birkaç mayada, yüksek bitkilerde ve bazı bitki parazitlerinde var olduğu tespit edilmiştir. Ekzopoligalakturonazların ise mantar ve bazı bakterilerde olduğu kadar farklı meyve ve sebzelerde de aktivitelerinin olduğu görülmüştür (Sakai *et al.* 1993).

Polimetilgalakturonazlar'ın aktivitelerinin olduğunu gösteren bazı çalışmalar olmasına rağmen, varlıkları konusunda büyük şüpheler bulunmaktadır (Alkorta *et al.* 1998).

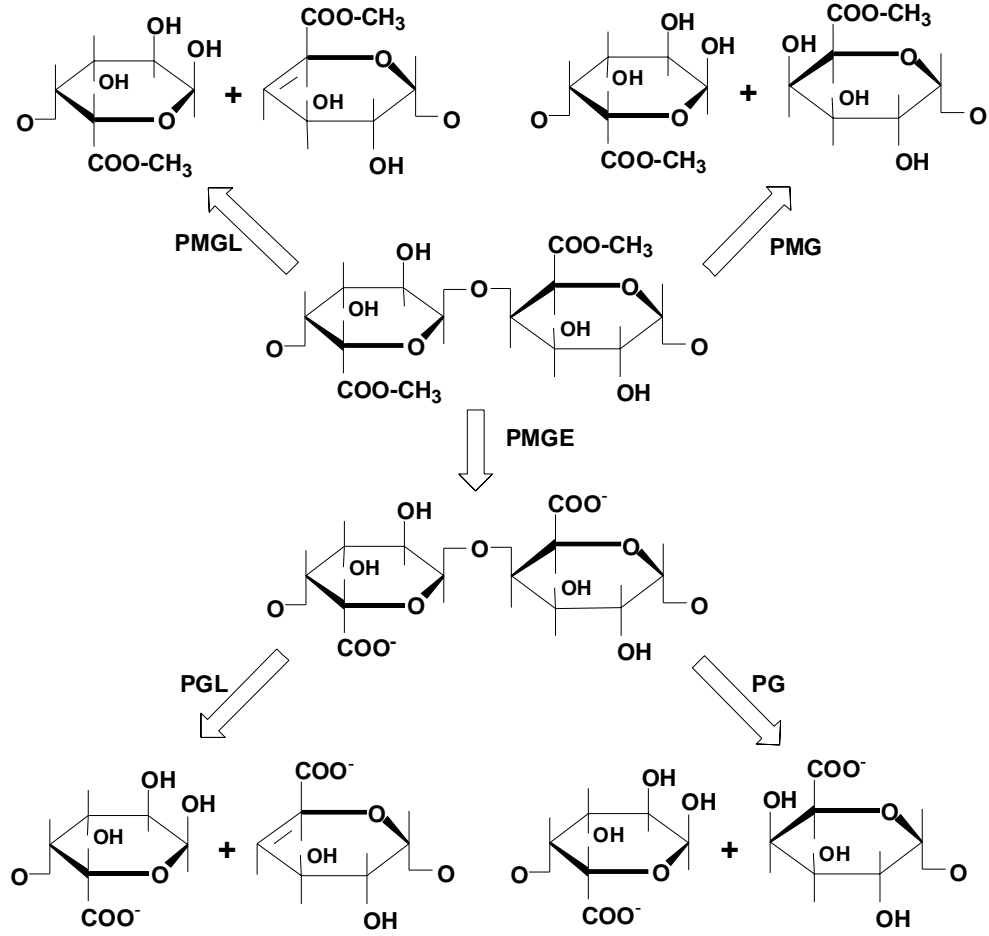
Trans-eliminazlar olarak da adlandırılan liyazlar, hem pektatın (endo- ve ekzopoligalakturonat liyaz) hem de pektinin (endo- ve ekzopolimetilgalakturonat liyaz) glikozidik bağlarını parçalamaktadırlar. Reaksiyon sonunda polisakkarit zincirinin indirgen olmayan ucunda bir çift bağ oluşturmaktadırlar. Pektin veya pektat liyazın aktivite tayinleri bu doymamış uronik estere dayanmaktadır (Sakai *et al.* 1993).

Üçüncü grupta bulunan protopektinazlar, protopektinden pektini depolimerize ederek pektini çözünürleştiren enzimler olarak ta bilinmektedirler ve iki alt grubu bulunmaktadır;

- Protopektin bileşenlerinden poligalakturonik asit üzerinde aktif olanlar,
- Hücre duvar bileşenleri ve galakturonik asit zincirini birleştiren polisakkarit zincir üzerinde aktif olanlar (Sakai *et al.* 1993).

Çizelge 1.3. Pektik enzimlerin sınıflandırılması (Alkorta *et al.* 1998) (Enzimler Enzim Komisyonuna (EC) göre sınıflandırılmış ve isimlendirilmiştir)

Enzimin ismi (EC tarafından önerilen)	Yaygın ismi	EC Numarası	Substrat	Aktivite endo-, ekzo-
Ester bağı parçalayan enzimler				
Polimetilgalakturonat esteraz (PMGE)	Pektin esterazlar	3.1.1.11	Pektin	Rasgele
Depolimerize eden enzimler; Hidrolazlar				
Endopoligalakturonaz (Endo-PG)	Poligalakturonaz	3.2.1.15	Pektat	Rasgele
Ekzopoligalakturonaz 1 (Endo-PG1)	Poligalakturonaz	3.2.1.67	Pektat	Uç
Ekzopoligalakturonaz 2 (Endo-PG2)	Poligalakturonaz	3.2.1.82	Pektat	Sondan bir önceki bağ
Endopolimetilgalakturonaz (endo-PMG)	Pektin hidrolaz		Pektin	Rasgele
Ekzopolimetilgalakturonaz (ekzo-PMG)	Pektin hidrolaz		Pektin	Uç
Liyazlar				
Endopoligalakturonat liyaz (endo-PGL)	Pektat liyaz	4.2.2.2	Pektat	Rasgele
Ekzopoligalakturonat liyaz (ekzo-PGL)	Pektat liyaz	4.2.2.9	Pektat	Sondan bir önceki bağ
Endopolimetilgalakturonat liyaz (endo-PMGL)	Pektin liyaz	4.2.2.10	Pektin	Rasgele
Ekzopolimetilgalakturonat liyaz (ekzo-PMGL)	Pektin liyaz		Pektin	Uç



Şekil 1.6. PMGL: Polimetilgalakturonat liyaz (pektin liyaz); PMG: polimetilgalakturo-naz (pektin hidrolaz); PMGE; Polimetilgalakturonat esteraz (pektinesteraz); PGL: poliga-lakturonat liyaz (pektat liyaz); PG: poligalakturonaz (pektat hidrolaz) (Alkorta *et al.*)

1.3 Pektinazların Endüstriyel Kullanımları

Pektinazlar, evde kullanılan ilk enzimler olmakla birlikte ticari hayatta kullanımları 1930'lu yıllarda meyve suyu ve şarap endüstrisi ile başlamıştır. 1960'lı yıllarda bilim adamlarının doğal bitki dokusuna ait elde ettikleri bilgiler, enzimlerin endüstride daha verimli bir şekilde kullanılmasına yol açmıştır (Kashyap *et al.* 2001).

Günümüzde pektinazlar, ticari sektörde oldukça yüksek düzeyde kullanılmaktadır. 1995'te endüstriyel enzimlerin ulaştığı yıllık satış cirosu 1 milyar dolardır. Bu satış rakamının içinde pektinazların payı ise %7,5 (75 milyon dolar) olarak hesaplanmıştır.

2005'te toplam endüstriyel enzim satışlarının yaklaşık olarak 1,7-2,0 milyar dolar olabileceği tahmin edilmiştir (Godfrey and West 1996).

Pektinazlar, genç bitki hücre duvarlarının orta lamel ve birinci hücre duvarında bulunan pektin olarak bilinen kompleks ve uzun yapısal polisakkaritlerin parçalamasından sorumludurlar. Bu işlevlerinden dolayı bitkilerden elde edilen ürünlerin işlenmesi sürecinde etkili olarak kullanılmaktadırlar. Çevre bilinci gelişmiş uluslarda çevreyi kirleten ürünler yerine çevre dostu enzimlerin endüstride kullanımının tercih edilmesi de enzimlerin endüstride kullanımını artırmaktadır (Kashyap *et al.* 2001).

Pektinazlar, lifli ürünlerin işlenme sürecinde, tekstil endüstrisinde, protoplast elde edilmesinde, bitki dokularının yumuşatılmasında, hayvan yemlerinde, yağ ekstraksiyonunda, çay ve kahvenin oksidasyon sürecinin hızlandırılmasında, kâğıt yapımında, atık suların temizlenmesinde ve meyve suyu, sirke ve şarap üretiminde kullanılmaktadır (Kashyap *et al.* 2001).

1.3.1 Pektinazların lifli ürünlerin işlenme sürecinde kullanımı

Pektik enzimler, hint keneviri ve hindistan cevizi gibi lifli bitkilerden lif üretimi esnasında kullanılır. Bazı bakteri ve mantarların fermantasyonu ile lifli bitkilerdeki pektinler ayrıştırılır ve lifler serbest bırakılır. Liflerin ayrıştırılması bakteri ve mantarların ürettiği pektinaz enzimlerince yapılır (Bruhlmann *et al.* 1994).

1.3.2 Pektinazların tekstil endüstrisinde kullanımı

Tekstil üretiminde enzimlerin kullanımı, hem çevresel açıdan hem de ürün kalitesi açısından oldukça yararlı sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Kumaş üretimi sürecinde ipliklerin aşınmasını engellemek için kumaş iplikleri dokumadan önce kola ajanları ile kaplanmaktadır. Pamuk kumaş üretiminde, düşük maliyeti, kolay elde edilebilirliği ve iyi film tabakası oluşturmasından dolayı nişasta temel kola ajanı olarak kullanılır.

mıştır. Kullanılmış olan kola ajanları ve ipliğin yapısındaki selüloz olmayan maddelerin kumaş boyanmadan önce ortamdaki uzaklaştırılması gerekmektedir. Geleneksel yöntemde ise bu maddeleri uzaklaştırmak için kumaşlar, enzimler yerine aşındırıcı soda ile yüksek sıcaklıkta muamele edilmektedir. Soda kullanımı yöntemi, hem pamuğun doğal yumuşak dokusuna hasar vermekte hem de safsızlıkların tamamen uzaklaştırılmasında etkili sonuç vermemektedir (Hoondal *et al.* 2002).

Yağ, mum, pektin, doğal boya ve mineral gibi selüloz olmayan maddeler bitkinin birinci hücre duvarında selüloz matriksinin içinde bulunmaktadır (Li and Hardin 1998). Pektinler güçlü birer biyolojik tutkalla benzetilebilir. Pektinler liflerin üzerinde koruyucu tabaka oluşturmak için proteinleri ve mumları birbirine bağlamakla görevlidir. Bu tabakanın bileşimi ve miktarı büyüme koşullarına, iklim etmenlerine ve pamuğun cinsine göre değişmektedir. Selüloz matriksin içinde bulunan bu maddeler pamuk liflerinin beyazlığını ve su absorplama kapasitesini oldukça sınırlamaktadır. Ayrıca, bu maddelerin varlığı kumaş boyandığında her tarafının aynı oranda boyanmasına engel olmaktadır. Geleneksel yöntemde, bu maddeleri uzaklaştırmak için, kumaşlar yüksek sıcaklıkta aşındırıcı alkali çözeltilerle (%3-6'lık sodyum hidroksit) muamele edilmektedir. Kullanılan bu yöntemin, kumaşı durulamak için oldukça fazla miktarda su gerektirmesi, işlem süresince fazla miktarda enerji kullanımını gerektirmesi, işlemde kullanılan alkali çözeltilerin kumaşa zarar vermesi ve sürecin sonunda çevreyi kirleten bir sürü atık maddenin oluşması gibi birçok dezavantajı bilinmektedir. Bu dezavantajları gidermek için, enzimatik temizleme yöntemi geliştirilmiştir. Enzimatik temizleme olarak isimlendirilen bu metotta selüloz liflerinin arasındaki diğer maddeleri temizlemek için enzimler (lipaz, proteaz, pektinaz) kullanılmaktadır. Pektinaz enzimleri selüloz liflerin arasında bulunan suda çözünmeyen pektinleri uzaklaştırarak pamuğun su tutma kapasitesini arttırmaktadır. Enzimlerin kullanılması ile çevreye daha az zarar verilmekte, enerji tasarrufu sağlanmakta ve selüloz liflerinin zarar görmesi engellenmektedir (Hoondal *et al.* 2002).

1.3.3 Pektinazların protoplast elde edilmesinde kullanımı

Bitki türlerinin geliştirilmesinde protoplastlar kullanılmaktadır. Protoplastlar, bitki hücre duvarının enzimlerle yıkılmasıyla elde edilir. Oluşan protoplastlar izole edilir ve bunlar in vitro şartlarda aralarında birleşerek yeni özelliklere sahip hücreleri oluştururlar. Elde edilen bu hücreler uygun ortamda büyütülerek yeni hibrit türler elde edilmektedir (Gleba 1978).

1.3.4 Pektinazların bitki dokularının yumuşatılmasında kullanımı

Bitki dokularının yumuşatılması, dokuların bütünlüğü bozulmamış hücrelere çevrilmesi işlemidir. Bu şekilde elde edilen ürün; bulanık meyve suları ve nektarları, puding ve yoğurt gibi günlük yiyeceklerin katkı maddeleri ve bebek ek besinleri için temel materyal olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin çoğu bozulmamış olarak korunabilirse, ılımlı bir mekaniksel işlemde sonra pektin moleküllerinin enzimatik parçalanması ürünün özelliklerinin arttırmaktadır. Enzimatik işlemin amacı, dokunun bozulmamış hücre süspansiyonlarına dönüştürülmesidir. Pektinlerin parçalanması ise sadece bitki dokusunun orta lamelini etkileyerek bitki hücresinin bütünlüğüne zarar vermeden süspansiyonlar oluşturmaktadır (Kashyap *et al.* 2001).

1.3.5 Pektinazların kümes hayvanlarının yemlerinde kullanımı

1980'lerin başlarında kümes ve diğer hayvan yemlerine çeşitli enzimler ilave edilmeye başlanmıştır. Enzim ve yem karışımı hazırlanmasında genellikle, glukanaaz, proteaz, pektinaz ve amilaz enzimleri kullanılmaktadır. Hayvan yemlerine enzim ilavesinin amacı, hayvanlar için aynı miktarda yem tüketerek daha fazla et verimi elde etmektir. Enzimlerin yemlere ilavesi, besinlerin absorpsiyonunu artırmakta, dışkı miktarlarını azaltmakta, lifleri hidrolizleyerek aralarında bulunan besinlerin serbest kalmasını sağlamakta ve böylece besin değerini yükselterek hayvanların aynı miktarda yem yiyerek daha fazla kilo almasını sağlamaktadır. Petersen (2001), piliçlerin sebze ve pro-

tein karışımı olan yiyeceklerine pektinaz, glukanaz ve selüloz içeren enzim karışımını ilave etmiştir. İlave edilen bu enzimlerin etkisiyle piliçlerin kilolarının nasıl değiştiği 49 gün boyunca incelenmiş ve sonuçta piliçlerin önemli ölçüde kilo aldıkları belirlenmiştir (Hoondal *et al.* 2002).

1.3.6 Pektinazların yağların ekstraksiyonunda kullanımı

Ayçiçeği tohumu, hindistancevizi veya zeytin gibi yağlı bitkilerin yağlarını ekstrakte etmek için eskiden organik çözücüler kullanılırdı. Kullanılan organik çözücülerin en yaygın olanı kanserojen olduğu bilinen hekzandır. Günümüzde ise yağlar, hücre duvarını parçalayan enzimler kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Pektinazlar ve diğer enzimler yağlı bitkinin hücre duvarlarını parçalayarak yağların ekstraksiyon işlemine yardımcı olmaktadır. Bu yöntem organik çözücülere tercih edilmektedir (Kashyap *et al.* 2001).

Son zamanlarda bitki hücre duvarını parçalayan enzimler zeytinyağı hazırlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır. West (1996), zeytinlerin öğütülmesi işleminde enzim kullanımının ayırma işlemlerinde karışımdan yağın daha kolay bir şekilde çıkarılabildiğini göstermiştir. Bunun sonucu olarak da yağ elde etme veriminin arttığı gözlenmiştir (Kashyap *et al.* 2001).

Pektinolitik aktivitenin yanı sıra hemiselülotik ve selülotik aktivite içeren ticari bir ürün olan Olivex enzim karışımının yağ ekstraksiyonunu ve depolama esnasında yağ stabilitesini arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca E vitamini ve fenol içeriğinin de arttığı tespit edilmiştir (Kashyap *et al.* 2001).

1.3.7 Pektinazların çay ve kahvenin oksidasyonunda kullanımı

Oksidasyon süreci, çay üretim aşamalarından biridir. Carr (1985) tarafından yapılan bir çalışmada, bu süreç esnasında pektinazların kullanımının çayın oksidasyonunu hızlandırdığı bulunmuştur (Hoondal *et al.* 2002). Ayrıca, pektinazlar, pektinleri hidrolizleye-

rek köpük oluşturma özelliklerini yok etmektedir. Pektinazlar, kahve tanelerini kaplayan pektinleri atmak için de kullanılmaktadır (Hoondal *et al.* 2002).

1.3.8 Pektinazların kağıt yapımında kullanımı

Pulp ve kâğıt üretimindeki bazı sorunları çözmek için enzimler kullanılmaya başlanmıştır. Kâğıt yapımında su ile süspansiyon edilmiş liflerin ve inorganik dolgu materyallerinin (kalsiyum karbonat ve kil) sürekli filtrasyonu esastır. Suyun yapraktan çekilmesi için suyun yanı sıra liflerin ve dolgu materyallerinin de geçmesine izin veren kumaşlar kullanılmaktadır. Modern kâğıt yapımında, suyun çekilmesini hızlandırmak ve kâğıt yaprağını oluşturan dolgu materyallerinin ve liflerinin akmasını engellemek için tutucu maddeler pulpa ilave edilmektedir. Horn ve Linhart (1996) katyonik maddelerin tutucu maddeler olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir (Kashyap *et al.* 2001). Pulpların ağartılması esnasında polisakkaritler çözülebilmektedir (Holmbom *et al.* 1991). Çözülen bu polisakkaritler, pektinler veya poligalakturonik asitlerdir. Poligalakturonik asitlerin katyonik polimerlerle (tutucu maddeler) kompleks yapabilmesi polimerizasyon derecesine bağlıdır. Monomer, dimer ve trimer galakturonik asitler katyonik polimerlerle kompleks oluşturamazken heksamer ve daha uzun zincirli poligalakturonatlar katyonik polimerlerle kompleks oluşturabilmektedir (Thornton *et al.* 1994). Pektinazlar, galakturonik asit polimerlerini parçalayarak katyonik polimerlerle kompleks oluşturmalarına engel olmaktadır. Böylece suyun filtrelenmesi esnasında dolgu maddeleri ve lifler korunarak daha kaliteli kâğıt üretimi sağlanmaktadır (Kashyap *et al.* 2001).

1.3.9 Pektinazların pektik atık suların işlenmesinde kullanımı

Turunçgilleri işleyen endüstrilerin atık suları, aktifleştirilmiş sulu çamur işlemleri süresince mikroplar tarafından kolayca parçalanamayan pektik maddelerce zengin olduğu bilinmektedir (Tanabe *et al.* 1986). Tanabe (1987) alkali mikroorganizmaları kullanarak yeni bir atık su işleme süreci geliştirmeye çalışmıştır. Toprakten izole edilen alkali *Bacillus sp.* (GIR 621) pH 10'da alkali ortamda ekstraselüler endopektat liyaz üretmek-

tedir. İzole edilen bu türlerin, atık suların pektik maddeleri uzaklaştırmak için oldukça kullanışlı oldukları bulunmuştur.

Turunçgilleri işleyen endüstrilerin atık sularının temizlenmesi işlemi, fiziksel olarak suyu çekmek, spreyle sulama, kimyasal çöktürme, aktifleştirilmiş sulu çamurla işleme ve metan fermantasyonunu takip eden kimyasal hidroliz gibi birçok yöntemle araştırılmıştır (Tanabe *et al.* 1986). Fakat bu süreçlerin, pektik maddelerin kimyasallara karşı dayanıklılığı, maliyetinin fazla olması, işlem süresinin uzunluğu ve işlem süreçlerinin karmaşıklığı gibi bazı zafiyetlere sahip olduğu bilinmektedir.

Endopektat liyaz üreten yumuşak kök patojeni olan *Erwinia carotovora* (FERM P-7576)'nın atık suların işlenmesinde oldukça kullanışlı olduğu Tanabe (1986) tarafından bildirilmiştir. Pektik atık sular bakteriden üretilen pektinolitik enzimlerle işleme tabi tutulmuş ve içerdikleri pektik maddelerin hemen hemen hepsinin çözülebildiği rapor edilmiştir (Tanabe *et al.* 1986).

1.3.10 Pektinazların meyve suyu üretiminde kullanımı

Pektik maddelerin, meyve sularının kıvamlarını, bulanıklıklarını ve görünüşlerini etkileyen en önemli faktörler olduğu kabul edilmektedir (Borrego *et al.* 1989). Pektik enzimler; şarap, sirke ve meyve sularını berraklaştırmak ve verimlerini artırmak için kullanılmışlardır (Whitaker 1990). Ticari olarak hazırlanan pektik enzim preparatlarının çoğu meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin, dünyada gıda endüstrisi için hazırlanan enzimlerin dörtte birini oluşturdukları göz önünde tutulduğunda, enzim kullanımı ile sistemlerin verimini artırma ve ekonomik maliyetleri düşürme çalışmalarında çok ilgi göreceği tahmin edilmektedir.

Meyvelerin olgunlaşması esnasında pektinlerin önemli bir rolü vardır. Pektinler olgunlaşmamış meyvelerin hücre duvarında selüloz liflerine bağlı olarak bulunmaktadırlar. Selülozlara bağlı olan pektinler çözülebilir olmadıklarından dolayı hücre duvarına bir sertlik vermektedirler. Meyvelerin olgunlaşma sürecinde, meyvede doğal olarak meyda-

na gelen enzimler tarafından pektinin ana zinciri ve ana zincire bağlı dallanmış yan zincirleri parçalanmaktadır. Bu olay sonucunda pektinler daha çözülebilir hale gelerek hücre duvarındaki hâkimiyetleri azalmakta ve böylece meyvenin yumuşamasına yol açmaktadırlar (Kashyap *et al.* 2001).

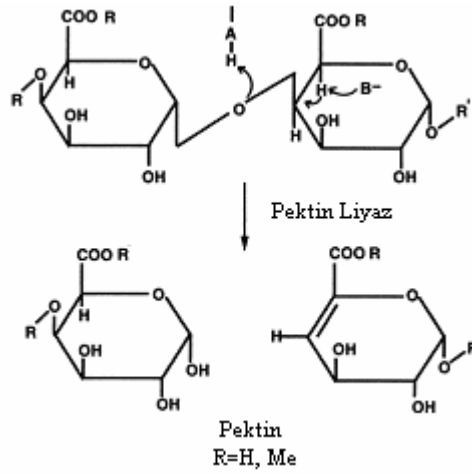
Pektik maddeler, taze meyve ve sebzelerin %0,5-4,0'ını oluşturmaktadır. Dokular ezildiğinde, meyve suyunun viskozitesini artıran ve bulanıklık yapan partikülleri oluşturan çözülebilir pektin sulu faza geçmekte, diğer pektinler ise hemiselüloz vasıtasıyla selüloz liflerine bağlı olarak kalmaktadır. Pres veya diğer mekanik metotlar kullanarak meyve suyunu ekstrakte etmek oldukça zor olmaktadır. Pektinazların ilavesi meyve suyunun vizkozitesini azaltmakta ve preslenebilirliğini artırarak daha verimli meyve suyu üretimini sağlamaktadır (Kashyap *et al.* 2001).

İşlem görmemiş meyve suyu, temel olarak pektik maddelerin oluşturduğu çözünmeyen partiküllerce zengindir. Bu partiküller pozitif yüklü proteinlerin negatif yüklü pektinlerce sarılması sonucunda oluşmaktadır. Bu negatif yüklü partiküller ayrıca birbirlerini de itmektedir. Pektinazlar pektinleri parçalayarak, birbirlerini iterek büyük moleküllü agregatlar oluşturan bu partiküller arasındaki itmeyi azaltmakta ve böylece meyve suyundaki bulanıklığın giderilmesine yardımcı olmaktadır (Kashyap *et al.* 2001).

Özellikle *Aspergillus niger*'den üretilmiş pektinazlar meyve suyu ve şarap endüstrisinde kullanılmaktadır. Ticari olarak üretilen meyve suları berrak ve bulanık olmak üzere iki çeşitir. Pektinazlar, berrak meyve sularının üretiminde presleme ve süzme esnasında meyve suyunun verimini artırmak ve asılı duran parçacıkların neden olduğu bulanıklığı gidermek için kullanılırlar. Limon suyu, nektar ve püreler gibi bulanık meyve sularının bulanıklık stabiliteyi, oldukça yüksek poligalakturonaz aktivitesi içeren pektik enzimlerce sağlanır (Kashyap *et al.* 2001).

2 KAYNAK ÖZETLERİ

Pektin liyaz (PL) enziminin sistematik ismi polimetilgalakturonat liyazdır (EC 4.2.2.10, PMGL). Metille esterleşmiş poligalakturonatların α -(1,4) bağlarını trans-eliminasyonla parçalayan bu enzim, reaksiyon sonunda zincirin indirgen olmayan ucunda bir doymamış uronik ester (dimer, trimer, vd.) oluşturmaktadır (Van-Alebeek *et al.* 2002). Aşağıda enzimin katalizlediği reaksiyonun şeması görülmektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1 Pektin liyaz enziminin katalizlediği reaksiyon (Herron *et al.* 2000)

Aspergillus niger'den saflaştırılan pektin liyaz enziminin, pektin liyaz A (PLA), pektin liyaz B (PLB), pektin liyaz C (PLC) ve pektin liyaz D (PLD) olarak adlandırılan dört farklı izoenzimi karakterize edilmiş (Kester and Visse 1994; Gysler *et al.* 1990; Herron *et al.* 2000) ayrıca pektin liyaz B'nin de üç boyutlu şeması çizilmiştir (Şekil 2.2.) (Herron *et al.* 2000).



Şekil 2.2. *Aspergillus Niger*'den saflaştırılan pektin liyaz B (PLB) enziminin üç boyutlu şematik görüntüsü (Herron *et al.* 2000)

Pektik liyaz, pektik transeliminaz olarak da bilinen pektin liyaz ve pektat liyaz enzimlerinin, yiyecek ve tekstil endüstrisinde oldukça geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Fakat bu enzimlerinin üretim verimleri diğer pektinazlardan daha düşüktür. Pektik transeliminazların kullanım alanları geniş olduğu için bu enzimlerin üretim proseslerinin geliştirilmesi önemlidir (Gummadi and Kumar 2005). Pektin liyaz enzimini üretmek ve üretim verimini arttırmak için birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan bazıları aşağıda verilmektedir;

Çimen içeren bir ortamda yetiştirilen *Neocallimastix sp.*'den pektinolitik enzim üretilmiş ve enzim aktivitesi viskozimetrik yöntemle tayin edilmiştir. En yüksek pektinolitik enzim aktivitesi, pH'sı 8 olan ve CaCl_2 içeren bir ortamdan elde edilmiştir. Anaerobik mantar olan *Neocallimastix sp.*'nin pektin varlığında endo-aktivite gösteren pektin liyaz da ürettiği rapor edilmiştir (Gordon and Phillips 1992).

Penicillium griseoroseum'un tek karbon kaynağı olarak limon pektininin kullanıldığı sıvı besi yerinde yetiştirilerek, pektin liyaz enzimini üretmesi sağlanmış ve üretilen pektin liyaz enzimi karakterize edilmiştir. Fosfat tamponu en yüksek pektin liyaz üretimini sağlarken Ca^{2+} 'nin varlığı pektin liyaz üretimini arttırmamıştır. Elde edilen pektin liyaz

enzimi Ramie lifleri ve limon pektini üzerinde aktivite gösterirken poligalakturonatı parçalayamamıştır (Brumano *et al.* 1993).

Yapılan başka bir çalışmada, doğal liflerin üretiminde kullanmak için *Penicillium griseoroseum*'dan pektin liyaz enziminin üretimine sakkaroz ve maya ekstraktının etkisi araştırılmıştır. Pektik olmayan karbon kaynağı olan sukroz ve maya ekstraktının kültür ortamına ilavesi *Penicillium griseoroseum*'dan pektin liyaz üretimini olumsuz etkilemiştir. Kültür ortamına maya ekstraktı ilave edilmemesi durumunda mikroorganizmanın geliştiği ve kültür ortamının pH'sının belirgin bir oranda düştüğü fakat pektin liyaz enziminin üremediği görülmüştür. Maya ekstraktı olmayan yüksek tampon kapasiteli kültür ortamına pektin ilave edilmesiyle pektin liyaz üretimi sağlanmıştır. %0,06 maya ekstraktı ve %0,1 oranında pektin içeren kültür ortamının 48 saat inkübasyonu ile ortamın pH'sının çok az bir miktarda değiştiği, mikroorganizmanın maksimum seviyede gelişmesinin sağlandığı ve oldukça yüksek verimle pektin liyaz üretildiği tespit edilmiştir. Sakkaroz olmayan besi ortamında maya ekstraktının konsantrasyonunun 0'dan 0,16'ya kadar değiştirilmesiyle pektin liyaz üretimi araştırılmış fakat enzim üretiminin olmadığı belirtilmiştir. Pektin liyaz üretiminde sakkaroz ve maya ekstraktı arasında bir sinerji olduğu sonucuna varılmıştır (BaracatPereira *et al.* 1994).

DNA'ya hasar veren mitomisin C'nin besi yerine ilave edilmesiyle *Erwinia carotovora* *supsp. atroseptica* SCRI 1043'ün pektin liyaz enzimini üretmesi sağlanmıştır (Godfrey *et al.* 1994).

Pseudomonas marginalis N6301'den pektin liyaz enzimi, kültür ortamına mitomisin C'nin ilavesiyle üretilmiştir. Pektin liyaz enzimi gliserol içeren ortamdan da üretilerek saflaştırılmış ve molekül ağırlığının mitomisin C içeren ortamdan saflaştırılmış enzimle benzer olduğu bulunmuştur (Nikaidou *et al.* 1995).

Yetiştirme ortamına farklı konsantrasyonlarda inducer ilave edilmesiyle *Penicillium griseoroseum*'dan ekstracellülar pektin liyaz üretimi araştırılmıştır. *Penicillium griseoroseum*; tek karbon kaynağı olarak sakkarozun kullanıldığı, inducer olarak

kafeinin, maya ekstraktının, çay ekstraktının ve pektinin ayrı ayrı kullanıldığı besi yerlerinde üretilmiştir. *Penicillium griseoroseum*'un sakkarozla birlikte çay ekstraktı, maya ekstraktı ve kafein içeren ortamda ve tek başına çay ekstraktı bulunan ortamda pektin liyaz enzimini üretmesi sağlanmıştır. Düşük konsantrasyonlarda da benzer sonuçların elde edildiği görülmüştür (Minussi *et al.* 1996).

Çalışmada induser olarak pektin yerine farklı bir madde kullanılarak pektinazların üretim maliyetinin düşürülmesi amaçlanmıştır. *Penicillium griseoroseum*'dan pektin liyaz ve poligalakturonaz üretimi üzerine şeker kamışı suyunun etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, mantarlar 25°C'de 48 saat süreyle 150 rpm'de karıştırılarak pH'sı 6,3 olan mineral ortamda yetiştirilmiştir. Kültür ortamına şeker kamışı suyunun ilave edilmesiyle pektin liyaz enzim üretiminin ve misellerin kuru ağırlığının arttığı görülmüştür. Ayrıca maya ekstraktı ile şeker kamışı suyunun birlikte fermantasyon ortamına eklenmesi ile de poligalakturonaz üretim veriminin arttığı belirlenmiştir. Çalışma, daha düşük şeker kamışı suyu konsantrasyonlarının bile selüloz üretimine yol açmaksızın sadece pektin liyaz ve poligalakturonaz enzimlerinin aktivitesini arttırdığını göstermiştir (Minussi *et al.* 1998).

Topraktan izole edilen bir bakteri türü olan PN33'ün oldukça önemli miktarda ekstraselüler pektin liyaz (EC 4.2.2.10) ürettiği bulunmuştur. İzole edilen bakterinin bir *Bacillus sp.* olduğu belirlenmiştir. *Bacillus sp.*'nin sadece tek karbon kaynağı olarak yüksek derecede esterleşmiş pektin kullanıldığında pektin liyaz ürettiği gözlenmiştir. Pektin liyaz üretme ortamının optimum şartlarının bir litrede 10 g pektin, 2 g maya ekstraktı, 4 g K₂HPO₄.3H₂O, 0,6 g MgSO₄ ve 0,11 g CaCl₂ (pH 7,0) olduğu bulunmuştur. Optimum kültür şartlarında 37°C'de ve 32 saat inkübasyon sonucunda kültür süpernatantında 132 EU/mL pektin liyaz aktivitesine ulaşılmıştır (Kim *et al.* 1998).

Trametes trogii'den farklı kültür ortamlarında pektinaz enzimlerinin üretilebilirliği araştırılmıştır. *Trametes trogii*'nin pektin içeren ortamda polimetilgalakturonaz, poligalakturonaz ve pektin liyaz enzimlerini ürettiği fakat pektat liyaz enzimini üretmediği gözlenmiştir. Yetiştirme ortamına ksilan ve karboksimetilselüloz ilavesinin enzim

üretimini artırdığı belirlenmiştir. Yetiştirme ortamına glikoz ilave edildiğinde enzim üretiminin azaldığı ve tek karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında ise poligalakturonazın üretilmediği pektin liyazın ise çok az üretildiği gözlenmiştir. Yetiştirme ortamındaki pektin konsantrasyonunun artırılmasının hem mikroorganizmanın üremesini hem de enzim üretmesini artırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Tween 80'nin yetiştirme ortamına ilavesinin pektin liyaz üretimini artırdığı, Tween 20 ve Triton X-100'ün mikroorganizmanın hem üremesini hem de enzim üretmesini inhibe ettiği belirlenmiştir. (Levin and Forchiassin 1998).

Penicillium griseoroseum sakkaroz ve maya ekstraktı ilave edilen mineral ortamda yetiştirilerek havalandırma, pH, karbon kaynağı konsantrasyonu ve mikroorganizma ekim şartlarının pektin liyaz üretimine olan etkisi araştırılmıştır. Ayrıca karbon kaynağı olarak şeker kamışı şurubu kullanıldığında *Penicillium griseoroseum*'un pektin liyaz üretme kapasitesi de incelenmiştir. Ekim konsantrasyonunun pektin liyaz üretimini etkilemediği ve enzim üretiminin havalandırılmış ortamda havalandırılmamış ortamdaki daha fazla olduğu bulunmuştur. Pektin liyaz üretimi için en iyi şartların 60 mM sakkaroz ve pH 6,3-7,2 olduğu belirlenmiştir (Piccoli-Valle *et al.* 2001).

Penicillium viridicatum strain Rfc3'den, karbon kaynağı olarak muz ve hintkirazı kabukları, buğday kepeği ve portakal posası kullanılarak katı ortam fermantasyonu ile pektin liyaz enzimi ve poligalakturonaz enzimi üretilmiştir. Maksimum poligalakturonaz enzimi üretimi buğday kepeğinden oluşturulan fermantasyon ortamından elde edilirken pektin liyaz enziminin maksimum üretimi portakal posasından oluşturulan fermantasyon ortamında elde edildiği bulunmuştur. Muz veya hint kirazı kabuklarından oluşturulan fermantasyon ortamına şeker kamışı posası ilave edildiğinde hem poligalakturonaz hem de pektin liyaz enzimlerinin üretiminin şeker kamışı posasının ilave edilmediği ortama göre arttığı gözlenmiştir (Silva *et al.* 2002).

Pektin liyaz ve poligalakturonaz enzimleri yeni izole edilmiş *Moniliella* SB9 ve *Penicillium sp.* EGC5'den katı ortam fermantasyonu ile üretilmiştir. Fermantasyon or-

tamı olarak portakal posası, şeker kamışı posası ve buğday kepeği karışımları kullanılmıştır (Martin *et al.* 2004).

Rhizopus oryzae'dan katı ortam fermantasyonu ile selülotik ve pektinolitik enzimlerin üretildiği yapılan çalışmayla doğrulanmıştır. Fermantasyon ortamına NH_4NO_3 ve NH_4Cl ilavesinin enzim miktarını arttırarak yumuşatma kapasitesini de arttırdığı görülmüştür (Hamdy 2005).

Endüstriyel bir atık olan portakal posası kullanılarak *Curvularia inaequalis* (Shear) *Boedijn* NRRL 13884'den katı ortam fermantasyonu ile pektin liyaz enzimi üretilmiştir (Afifi *et al.* 2002).

Pektin liyaz enziminin endüstriyel öneminden, dolayı farklı besi yerleri kullanılarak birçok mikroorganizmadan üretilmiştir. Pektin liyaz enzimi daha çok mantarlar tarafından üretilse de bazı bakteriler tarafından da üretildiği bilinmektedir. En iyi pektin liyaz üretiminin *Penicillium italicum* ve *Penicillium expansum* adlı mantarlar tarafından gerçekleştirildiği rapor edilmiştir (Alana *et al.* 1989, 1990). Üretilmiş olan pektin liyaz enzimleri saflaştırılmış ve optimum pH, optimum sıcaklık, molekül ağırlığı, V_{\max} ve K_M 'leri belirlenmiştir. Çalışmalarda elde edilen karakterizasyon sonuçları aşağıda çizelge halinde verilmiştir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Bakteri ve mantarlardan saflaştırılan pektin liyaz enziminin bazı karakteristik özellikleri (Schlemmer *et al.* 1987; Sakiyama *et al.* 2001; Chen *et al.* 1998; Papi and Kyriakidis 2003; Godfrey *et al.* 1994; Kim *et al.* 1998; Nikaidou *et al.* 1995; Martin *et al.* 2004; Martin *et al.* 2004; Hamdy 2005; Nakagawa *et al.* 2005; Afifi *et al.* 2002; Alana *et al.* 1991; Obi ve Moneke 1985)

Saflaştırıldığı Kaynaklar	Optimum pH	Optimum Sıcaklık °C	Molekül Ağırlığı kDa	Vmax	Km mg/mL
Bakteriler					
<i>Pseudomonas fleurensceus</i>	8, 0-8, 5	15-42	34	-	-
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	7, 9	40	-	94 x 10 ⁻⁸ mol/mL. dak.	4, 6
<i>Pythium splendens</i>	8, 0	10-50	23	-	-
<i>Pseudomonas marginalis</i>	6, 6	30	39	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> supsp. atroseptica SCRI 1043	8, 0	35	31	-	-
<i>Bacillus</i> sp. PN33	6, 0	40	52	-	-
<i>Pseudomonas marginalis</i> N6301	6, 5	30	34	-	-
Mantarlar					
<i>Moniliella</i> SB9' dan	10, 0	45	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp. EGC5	9, 0	40	-	-	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	7, 5	50	31	297 U/mL	3, 87
<i>Cystofilobasidium capitatum</i> PPY-I	-	40	42	3000 EU/mg	36, 6
<i>Curvularia inaequalis</i> (Shear) Boedijn NRRL 13884	5, 0		-	33 mM	-
<i>Penicillium italicum</i>	9, 0	35-50	34	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	4, 0-5, 0	35	30	-	-

Pektin liyaz enziminin yapısında kofaktör olarak metal iyonu bulundurduğuna dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Fakat pektin liyaz enziminin aktivitesini bazı metal iyonlarının ve bazı maddelerin değiştirdiği bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda enzimin prote-in yapısında da inhibitörlerinin olduğu anlaşılmıştır.

Şeker pancarı köklerinden elde edilen bir protein, *Rhizoctonia solani*'den üretilen pektin liyaz enzimini inhibe etmiştir. Pektin liyazı inhibe eden protein sağlıklı şeker pancarının hücre duvarından ekstrakte edilmiş ve amonyum sülfat çöktürmesi ve katyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. SDS-PAGE'i yapılarak molekül ağırlığının 57,5 kDa olduğu ve izoelektrik fokuslamada p H_1 'sının 9,9 olduğu belirlenmiştir. Çürümüş dokuların hücre duvarı ekstraktlarının pektin liyazı inhibe etme aktivitesinin, sağlıklı dokuların hücre duvarı ekstraktlarına kıyasla daha büyük olduğu görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkılarak inhibitör proteinin pektin liyaza karşı kökleri koruduğu düşünülmüştür (Bugbee 1993).

Erwinia carotovora supsp. atroseptica SCRI 1043'den üretilen enzim katyon değişim kromatografisi ve S-Sepharose ile 66,5 kat saflaştırılmış ve 1,37 mM Ca²⁺ ve 1,37 mM Mg²⁺'nin varlığında enzim aktivitenin sırasıyla dört ve altı kat arttığı bulunmuştur (Godfrey *et al.* 1994).

Pseudomonas marginalis N6301'den üretilen pektin liyaz enzimi CM-selüloz, hidroksiapatit ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan pektin liyaz enzimi 2 mM maleik anhidrit ve p-klorofenilsulfonik asit tarafından inhibe edilmiştir (Nikaidou *et al.* 1995).

Topraktan izole edilen bir bakteri türü olan *Bacillus sp.* PN33'ün oldukça önemli miktarda ekstraselüler pektin liyaz ürettiği gözlenmiştir. Üretilen pektin liyaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ve katyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ca²⁺ (1 mM) saflaştırılan pektin liyaz enziminin hem aktivitesini %50 arttırmış hem de stabilitesini arttırmıştır. Fenilmetilsülfonilflorid ve dietilkarbonat'ın 5 mM konsantrasyonda enzimi tamamen inhibe ettiği bulunmuştur. Bu sonuçlar enzimin aktivite göster-

mesinde histidin ve serin rezidülerinin önemli olduğunu göstermektedir (Kim *et al.* 1998).

Pektin liyaz enzimi salatalık meyvesini enfekte eden *Pythium splendens* tarafından da üretilmiştir. Üretilen enzim amonyum sülfat çöktürmesi, CM-sepharose kolon kromatografisi ve izoelektrik fokuslama ile saflaştırılmıştır. Yüksek derecede metille esterleşmiş pektini trans eliminasyon reaksiyonuyla parçalayan pektin liyaz enziminin Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Sr^{2+} iyonları ile aktivitesi artarken Zn^{2+} ilavesi ile %36 oranında inhibe olduğu bulunmuştur (Chen *et al.* 1998).

Kahve içeceğinin kalitesi üzerine endofitik bakterilerin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla; yüzeyleri steril edilmiş kahve tanelerinden birçok endofitik bakteri izole edilmiş ve pektinolitik türlerden biri karakterize edilmiştir. Bu endofitik türden elde edilen pektin liyaz enziminin aktivitesini EDTA ve metal iyonlarının hemen hemen hiç etkilemediği görülmüştür (Sakiyama *et al.* 2001).

Rhizopus oryzae'den üretilen pektin liyaz amonyum sülfat ve iki basamak kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Ca^{2+} iyonunun saflaştırılmış pektin liyaz enziminin sıcaklığa karşı dayanıklılığını ve aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Mg^{2+} , Na^+ ve K^+ iyonlarının enzimi uyarırken Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Hg^{2+} iyonlarının enzimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Hamdy 2005).

Curvularia inaequalis (Shear) Boedijn NRRL 13884'den üretilen pektin liyaz enzimi Sephadex G-100 and DEAE-selüloz kolon kromatografisi kullanılarak 50 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim Co^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} iyonları ile kısmen, Hg^{2+} ve Ag^{2+} iyonları ile de tamamen inhibe olmuştur. Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ ve K^+ iyonlarının ise enzimin aktivitesini yükselttiği bulunmuştur (Afifi *et al.* 2002).

Pektin liyaz enziminin yüksek derecede metille esterleşmiş pektinlere yüksek afinite gösterdiği bilinmektedir. Substrat olarak kullandığı pektinin C-6 karbonunda olan karboksi grubuna bağlı bulunan metil grubu ($-COOCH_3$) ile farklı grupların yer değiştiri-

rilmesiyle ve yine C-6 karbonundaki metilin çıkartılmasıyla enzimin aktivitesinin nasıl değişeceği aşağıdaki çalışmada araştırılmıştır.

Aspergillus niger'den üretilmiş pektin liyaz enziminin C-6 karbonunda farklı gruplar bulduran oligogalakturonidleri parçalayıp parçalayamadığı ve şayet parçalıyorsa ortaya çıkan ürünlerin yardımıyla parçalama şekli belirlenmiştir. Pektin liyazın, tamamem metille esterleşmiş oligogalakturonidlere yüksek afinite gösterdiği bilinmektedir. C-6 karbonundaki metil grubu etil ile yerdeğiştğinde veya transamidasyonla oluşan yeni substrat üzerinde pektin liyaz enziminin aktivite gösteremediği bulunmuştur. Farklı polimerizasyon derecesine sahip oligogalakturonidler pektin liyaz enzimi ile parçalanmış ve ürünlerin yapısı araştırılmıştır. Ürünlerin analizinde doyunluğu aynı olan fakat farklı polimerizasyon derecesine sahip D-4,5-doymamış ürünler görülmüştür. Polimerizasyon derecesi 8 olan substratlar kullanıldığında ana ürün D-4,5-doymamış trimerler iken, polimerizasyon derecesi 9 ve 10 olan substratlar kullanıldığında ise ana ürünün D-4,5-doymamış tetramerler olduğu belirlenmiştir. Tamamen metille esterleşmiş pentamer ve heksamerlerden sınırlandırılmış alkaline deesterifikasyon metodu kullanılarak kısmen metille esterleşmiş pentamer ve heksamerler hazırlanmış, elde edilen pentamer ve heksamerler incelendiğinde rasgele metille esterleşmiş oldukları görülmüştür. Kısmen metille esterleşmiş oligosakkaritlerin, tamamen metille esterleşmiş substratlara oranla reaksiyon hızını 10 kat azalttığı görülmüştür. Elde edilen ürünlerin metille esterleşme dağılımları analiz edildiğinde pektin liyaz enziminin metille esterleşmemiş karboksil gruplarını da parçalayabileceği anlaşılmıştır. Sonuç olarak pektin liyaz enzimi, metille esterleşmiş ve serbest karboksil grubunun bulunduğu bağı parçalayabilmiş fakat daima metille esterleşmiş rezidünün indirgenmemiş ucunda D-4,5 doymamış ürünü oluşturmuştur (Van-Alebeek *et al.* 2002).

Pektik enzimlerin immobilize edilmesinin ve immobilize enzimlerin endüstride kullanılmasının getireceği yenilikler ve dezavantajlar araştırılmış ve konuyla ilgili bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Pektik enzimler, meyve sularının berraklaştırılmasında ve verimlerinin artırılmasında çok uzun zamandır kullanılmalarına rağmen, sürekli akış sistemleri ve immobilizasyon materyalleri gibi teknolojik yenilikler sadece son zamanlarda meyve suyu üretim proseslerinde kullanılmaya başlanmıştır (Alkorta *et al.* 1998).

Penicillium italicum'dan elde edilen pektin liyaz [E.C. 4.2.2.10] Nylon 6 maddesine kovalent olarak bağlanarak immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize edilmiş enzimin fizikokimyasal ve kinetik özellikleri karşılaştırılmıştır. Enzimin pH'sı, sıcaklık stabilitesi, kinetik parametreleri ve immobilizasyon işleminin optimum şartları belirlenmiştir. Immobilize enzimin pH eğrisinin serbest enzimle karşılaştırıldığında düşük pH'ya doğru kaydığı görülmüştür. Benzer şekilde immobilize enzimin stabil olduğu pH'nın serbest enzime göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Immobilize enzimin, sıcaklık stabilitesinin belirgin bir oranda yükseldiği ve 4°C'deki depolama süresince görülmemiş bir şekilde aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Immobilize enzimin 12. kez kullanılmaya kadar aktivitesini tamamen koruduğu bulunmuştur. Serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize pektin liyaz enziminin viskoziteyi düşürme kapasitesinin daha az olduğu görülmüştür. Nylon'a immobilize edilen pektin liyaz enziminin pH: 3 ve 40°C'de meyve suyunu berraklaştırdığı belirlenmiştir (Alkorta *et al.* 1996).

Pektinaz enzimlerinin bitkilerde hastalık yapan faktörlerden biri oldukları da bilinmektedir. Pektinaz enzimlerinden biri olan pektin liyaz enziminin bitkilerde hastalık yapma etkisi araştırılmıştır. Bu konuyla ilgili literatürlerden bazıları aşağıda verilmektedir.

Erwinia carotovora supsp. atroseptica SCRI 1043'den üretilen pektin liyaz enziminin patates yumrularının hızla yumuşamasına neden olduğu bulunmuştur (Godfrey *et al.* 1994).

Erwinia chrysanthemi çeşitli bitki hastalıklarına neden olan bir bakteridir. Bu bakterinin patojenitesi, hücre duvarlarını parçalayan pektinazları üretmesinden kaynaklanmaktadır. *E. chrysanthemi* 3937 türünün en az iki çeşit pektin metilesteraz, en az yedi çeşit pektat liyaz, poligalakturonaz ve pektin liyaz ürettiği gözlenmiştir. Pektinlerin ekstraselüler

parçalanmasının intraselüler yol vasıtasıyla metabolize edilen oligalakturonidlerin oluşmasına neden olduğu bulunmuştur. Pektinazların transkripsiyonu; bitki ekstraktı ve pektinlerin varlığı, düşük sıcaklık, oksijen ve çok az demirin bulunduğu ortam şartları tarafından arttırılmıştır. Oysa pektin liyazın transkripsiyonunun DNA'ya hasar veren ajanlara bağlı olduğu tespit edilmiştir. Pektinazların transkripsiyonundaki bu farkın onların bitkiyi enfekte etme süreçlerini yansıttığı düşünülmektedir (HugouvieuxCottePattat *et al.* 1996).

Pektin liyaz enzimi salatalık meyvesini enfekte eden *Pythium splendens* tarafından da üretilmiştir. Saflaştırılan pektin liyaz enziminin patates ve salatalıkların hızla yumuşamasına neden olduğu gözlenmiştir (Chen *et al.* 1998).

Zehirli ve çok zehirli olmak üzere iki farklı cins *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* (FOC) izolatları, limon pektini içeren minimal besi yerinde yetiştirildiklerinde pektin liyaz ve poligalakturonaz enzimlerini üretmişlerdir. Çok zehirli izolatlar ile karşılaştırıldığında, daha az zehirli izolatların pektin liyaz enzimini daha çok ürettikleri, çok zehirli olan izolatların ise poligalakturonaz enzimini daha çok ürettikleri bulunmuştur. Çok zehirli izolatların, kültür filtratlarında bulunan bitki zehirlerinin poligalakturonaz enziminin kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Ozer *et al.* 2003).

Thanatephorus cucumeri, dünya genelinde çok çeşitli bitki hastalıklarına sebep olan her yerde bulunan bir mantar türüdür. Hastalıklı *Hevea brasiliensis* ağaçlarından elde edilen bütün izolatlarda pektinolitik (poligalakturonaz, pektin liyaz) ve selüloolitik (beta-glukozidaz, sellobiyaz) aktiviteler bulunmuştur. *Thanatephorus cucumeri* ile aşılansız kauçuk ağacının ekstraktlarında poligalakturonaz (PG) aktivitesine rastlanmazken pektin liyaz (PL) aktivitesinin bulunduğu gözlenmiştir (Jayasinghe *et al.* 2004).

Enzim preparatlarıyla patates köklerinin yumuşaması, boya olarak floresin diasetat kullanılarak floresans mikroskopisi ile incelenmiştir. *Aspergillus aculeatus*'tan elde edilen Pectinex Ultra-SP-L ile muamele edilen patates köklerinden oldukça yüksek miktarda canlı tek hücreler elde edilmiştir. Pectinex Ultra-SP-L'den anyon değişim

kromatografisi ile saflaştırılan yüksek pektin liyaz aktivitesi ve düşük poligalakturonaz aktivitesi patates köklerini en yüksek seviyede yumuşatmıştır. *A. Aculeatus*'tan klonlanmış pektin liyaz (PL1) ve iki farklı poligalakturonaz (PG1 ve PG2) incelendiği zaman, yumuşamanın en iyi PL1 ile gerçekleştiği bulunmuştur. Bu bulgulardan yola çıkılarak, patates köklerinin yumuşamasından Pectinex Ultra-SP-L içindeki enzimlerden pektin liyazın sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır (vandenBroek *et al.* 1997).

Pektin liyaz; meyve suyu, sirke ve şarap endüstrisinde kullanılan pektinaz enzim preparatının içinde bulunan enzimlerden biridir. Günümüzde, yiyecek endüstrisinde kullanılan enzim preparatlarının dörtte birini pektinaz enzimleri oluşturmaktadır. Ayrıca dokuları yumuşatmada (maserasiyon) da kullanıldığı bilinmektedir. Bu enzimler, çürümeye neden olduklarından dolayı meyve ve sebzelerin taşınmasında ve depolanmasında da önem kazanmışlardır. Fakat buna rağmen bu enzimler hakkında fazla bir bilgi yoktur.

Poligalakturonaz, pektat liyaz ve pektin liyaz enzimleri pektin molekülünü parçalayan enzimlerdir. Pektin liyaz başka bir enzim aktivitesine ihtiyaç duymadan tek başına uzun zincirli metille esterleşmiş poligalakturonatları parçalayabilirken, depolimerize eden diğer enzimler olan poligalakturonaz ve pektat liyaz ise, pektin esterazın pektinik asiti (metille esterleşmiş poligalakturonatları) pektata (poligalakturonatlar) dönüştürmesinden sonra pektini parçalayabilmektedirler (Alana *et al.* 1991). Bu enzimler substrat olarak kullandıkları pektinin esterleşme derecesine göre farklı afiniteler göstermektedir. Pektin liyaz enziminin afinitesi meyvelerde fazla miktarda bulunan yüksek derecede esterleşmiş (esterleşme derecesi %50 ve yukarısı) pektinlere karşı diğer pektinazlardan daha yüksektir. Pektat liyaz enzimi esterleşme derecesi %0-50 arasında olan poligalakturonatlara karşı aktif olup esterleşme derecesi arttıkça afinitesi azalmaktadır (Van-Alebeek *et al.* 2002). Poligalakturonaz ve pektat liyaz uzun zincirli polimetilgalakturonatları parçalayabilmek için öncelikle pektin esterazın metil gruplarını metanol formunda uzaklaştırması gerektiğinden ortamda metanol oluşmasına neden olmaktadır. Pektin liyaz enzimi ise polimetilgalakturonatları parçalarken ortamda metanol oluşmasına neden olmadığından dolayı pektinaz enzim karışımlarında en çok pektin liyaz olması tercih edilmektedir. Bu da dünya enzim pazarında önemli bir paya sahip olan

pektin liyaz enzimini aynı amaç için kullanılan diğer enzimlerden daha ayrıcalıklı bir konuma taşımaktadır (Delgado *et al.* 1993).

Bu çalışmadaki temel amaç, pektin liyaz enzimini üreten yeni mikroorganizmalar aramak ve yüksek pektin liyaz aktivitesi üreten türlerden elde edilen pektin liyaz enzimlerini saflaştırıp karakterize etmektir. Bu amaçla birçok mikroorganizma taranarak bunlardan pektin liyaz enzimini üreten mikroorganizmalar belirlenecektir. Daha sonra yüksek pektin liyaz aktivitesi üreten mikroorganizmalar kullanılarak enzim üretilenektir. Üretilen enzim saflaştırılacak ve optimum pH'sı, optimum sıcaklığı, moleköl ağırlığı, V_{max} ve K_M başta olmak üzere karakteristik özellikleri belirlenecektir. Son basamakta ise karakterize edilen pektin liyaz enziminin meyve suyu üretiminde kullanılıp kullanılmayacağı araştırılacak ve ticari olarak satılan pektinaz enzim karışımları ile karşılaştırılacaktır.

3 MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1 Materyal

3.1.1 Bakterilerin temini

Mikroorganizmalar Biyoloji bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler

Çalışmada kullanılan serum albumin, Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol, fosforik asit, Na_2HPO_4 , HCl, pektin (ED %93), pektin (ED %9,4), tiyobarbütirik asit, NaOH, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , Sephadex G-100, DEAE-selüloz, diyaliz torbası, metanol, glisin, asetik asit, N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED), N,N-metilen-bisakrilamid, gliserin, ditiotritol, CH_3COOH , NaHCO_3 , akrilamid, Tris (trihidroksimetilaminometan), amonyum persülfat (PER), Coomassie Brilliant Blue R-250, brom timol mavisi isimli kimyasallar Sigma (P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA) firmasından, Potato Dextrose Agar (PDA) CM0139, Nutrient Agar (NA) CM0003, Tryptone Soy Agar (TSA) CM0131, Nutrient Broth (NB) CM0001 isimli kimyasallar ise Oxoid (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, ENGLAND) firmasından alınmıştır.

3.1.3 Yararlanılan alet ve cihazlar

Soğutmalı Santrifüj	: Heraus Sepatech
Spektrofotometre	: Pharmacia LKB-Biochrom, ULTROSPEC-III
pH metre	: Schott C6 840 pH metre
Elektroforez tankı	: Owl (Separation systems)
Peristaltik pompa	: Cole-parmer Instrument Co
Hassas terazi	: Mettler Ha 51 Gallenkamp

Kromatografi kolonu	: Cole-parmer Intrument Co
Otomatik pipetler	: Fisher
Gradient mikser GH-Y	: Pharmacia Fine Chemicals
Vorteks	: Fisons
Çalkalayıcı	: GFL
Magnetik karıştırıcı	: İka Combimag RCO

3.1.4 Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan çözeltiler, hazırlanış biçimleri ve kullanıldıkları yerler aşağıda belirtilmiştir.

1. Coomassie Brilliant Blue G-250 renk reaktifi (Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözeltiler); 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL %95'lik etanol'de çözüldü. Bu çözeltiler %95'lik fosforik asitten 100 mL ilave edildi. Çözeltinin hacmi deiyonize suyla 1 litreye tamamlandı.
2. 0,05 M fosfat tamponu, pH: 8 (Substrat çözeltisinin hazırlanmasında ve enzimin saflaştırılması esnasında kullanılan tampon çözeltisi); 7,075 g Na_2HPO_4 950 mL deiyonize suda çözüldü ve 1 N HCl ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra toplam hacmi deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.
3. %1'lik NaCl çözeltisi (Katı ortam fermantasyonu ile yetiştirilen bakterilerin homojenatını hazırlamak için kullanılan çözeltisi); 1 g NaCl 95 mL deiyonize suda çözüldü ve deiyonize suyla toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
4. % 1,5'lik pektin çözeltisi (Pektin liyaz enziminin substratı olarak kullanılan çözeltisi); 0,15 g pektin (ED %93) 10 mL 0,05 M pH: 8 olan fosfat tamponuna ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak çözüldü.
5. 1 N HCl çözeltisi (Pektin liyaz enziminin aktivite tayininde kullanılan çözeltisi); Yoğunluğu 1,12 g/mL olan %36,5'lik derişik HCl'den 13,4 mL alındı ve deiyonize suyla 150 mL'ye seyreltildi.

6. 1 N NaOH çözeltisi (Pektin liyaz enziminin aktivite tayininde kullanılan çözelti); 4 g NaOH 95 mL deiyonize suda çözüldü ve deiyonize suyla toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
7. 0,04 M tiyobarbütirik asit çözeltisi (Pektin liyaz enziminin aktivite tayininde kullanılan çözelti); 40 mL deiyonize su bulunan tüp içerisine 0,23 g tiyobarbütirik asit ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak çözüldü.
8. Besleyici solüsyon (Bakteri üretme ortamına ilave edilir); 0,14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g KH_2PO_4 ve 0,02 g MgSO_4 95 mL deiyonize suda çözüldü ve pH metre kullanarak pH: 7'sı ayarlandıktan sonra deiyonize suyla toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.
9. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan numune tamponu; 5 mL 1 N HCl pH 6,8, 3 mL %1'lik SDS, 1 mL %100'lük gliserin ve 1 mL %0,1'lik brom timol mavisinden karıştırılarak hacimlerinin saf su ile 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampon kullanılmadan hemen önce 1 mL numune tamponuna 50 μL olacak şekilde β -merkaptotanol ilave edildi.
10. SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu; 1,5 g tris ve 7,2 g glisin, 450 mL suda çözüldü. Hazırlanan bu çözelti üzerine 5 ml %1'lik SDS ilave edildi ve hacimi 500 mL'ye saf su ilave edilerek tamamlandı.
11. Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi; 0,66 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 120 mL metanolde çözüldükten sonra üzerine 24 mL saf asetik asit ve 20 mL deiyonize su ilave edilerek hazırlandı.
12. Renksizleştirme çözeltisi ise; %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 sudan ibarettir.
13. 0,05 M CH_3COONa pH: 4 ve pH: 5 (Pektin liyaz enziminin optimum pH'sını bulmak için kullanıldı); 0,41 g CH_3COONa 95 mL deiyonize suda çözüldü ve pH'sı 4'e (pH: 5) 1 N HCl ile ayarlandıktan sonra toplam hacmi deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.
14. 0,05 M NaHCO_3 pH: 9, pH: 10 ve pH: 11 (Pektin liyaz enziminin optimum pH'sını bulmak için kullanıldı); 0,42 g NaHCO_3 95 mL deiyonize suda çözüldü ve pH'sı 9'a (pH: 10 ve pH: 11) 1 N HCl veya 1 N NaOH ile ayarlandıktan sonra toplam hacmi deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.
15. 0,05 M Na_2HPO_4 , 1 mM ditiotritol, pH: 7,0 (Molekül ağırlığını tespit etmek için kullanıldı); 0,1542 g ditiotritol ve 7,075 g Na_2HPO_4 950 mL deiyonize suda çözüldü ve

1 N HCl ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra toplam hacmi deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

16. %4'lük fenol çözeltisi (Karbohidrat miktarını belirlemek için kullanıldı); 4 gram fenol 95 mL saf su içerisinde çözüldü ve toplam hacmi deiyonize suyla 100 mL'ye tamamlandı.

17. Katı ortam fermantasyonu için hazırlanan besi yeri; 250 mL'lik erlene içerisinde 5 gram kepek %1 oranında pektin (ED %9,4) ile karıştırıldı ve üzerine besleyici solüsyon ilave edilerek hazırlandı.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Kalitatif protein tayini

Kromatografi işlemleri sırasında eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kalitatif protein tayini yapıldı. Bu metot 280 nm'de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbands göstermesi esasına dayanmaktadır (McIntosh 1969). Fraksiyonlar kuartz küvetlere alınarak, absorbandsları spektrofotometrede köre karşı okundu.

3.2.2 Bradford yöntemiyle protein tayini

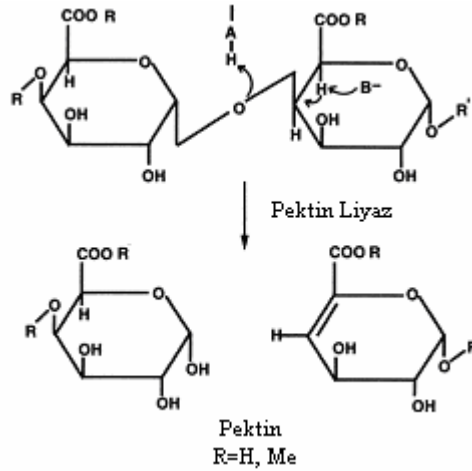
Bu yöntemle DEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve homojenatlardaki protein miktarı belirlendi. Bu yöntem Coomassie Brilliant Blue G-250'nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleks 595 nm'de maksimum absorbands göstermektedir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı (2 dakika) gelişmektedir. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 mikrogram arasında değişmektedir (Bradford 1976).

Tayin işlemleri şöyle yapıldı; 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 mL'ye tamamlandı. 5 mL coomassie blue reaktifi tüplere ilave

edildi ve vorteks ile karıştırıldı. 10 dakika sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. 0,1 mL saf su ve 5 mL commassie blue reaktifinden oluşan karışım kör olarak kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri ile standart grafik çizildi.

3.2.3 Pektin liyaz aktivitesi tayini

Pektin liyaz aktivitesi renkli türev oluşum yöntemiyle belirlendi (Nedjma *et al.* 2001). Aktivite tayini, pektin liyaz aktivitesi sonucunda oluşan doymamış uronik ester türevlerinin tiyobarbütirik asit ile oluşturduğu renkli türevlerin 550 nm’de absorpsiyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.1.). Elde edilen renkli türevin molar ekstinksiyon (ϵ) katsayısı $54.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ’dir. Bir enzim ünitesi (EU) 1 dakikada 1 nmol ürün oluşturan enzim miktarı olarak belirlendi.



Şekil 3.1. Pektin liyaz enziminin katalizlediği reaksiyonun şematik görüntüsü

Tayin işlemlerinde şu prosedür takip edildi. 0,25 mL enzim çözeltisi (%1,5 pektin, ED %93) 0,25 mL substrat çözeltisine ilave edildikten sonra 10 dakika uygun sıcaklıkta inkübe edildi. Daha sonra 0,5 mL olan reaksiyon karışımına 50 μL 1 N NaOH ilave edildi ve 80°C olan su banyosunda 5 dakika inkübe edildikten sonra soğutuldu. Soğutulan reaksiyon karışımına 0,6 mL 1 N HCl ve 0,5 mL 0,04 M tiyobarbütirik asit çözeltisi ilave edildikten sonra ikinci kez 5 dakika 80°C’de inkübe edildi ve soğutuldu. Elde edi-

len renkli türevin optik dansitesi 550 nm’de köre karşı okundu. Enzim çözeltisi yerine enzimin içinde bulunduğu tampon ilave edilerek hazırlanan numune kör olarak kullanıldı.

3.2.4 Mikroorganizmalardan pektin liyaz enziminin üretilmesi ve homojenat hazırlanması

Bu tez kapsamında pektin liyaz enzimi, *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus* olmak üzere üç farklı bakteriden üretildi ve saflaştırıldı. Bu bakterilerden *Agrobacterium radiobacter* ve *Xanthomonas campestris* (Taragano and Pilosof 1999) katı ortam fermantasyonu, *Geobacillus pallidus* ise sıvı besi yerinde yetiştirilerek pektin liyaz enzimi üretildi.

Topraktan izole edilen *Agrobacterium radiobacter* ve bitkiden izole edilen *Xanthomonas campestris*’ten pektin liyaz enzimini üretmek için besi yeri olarak kepek kullanıldı. 250 mL’lik erlenlerde %0,1 oranında pektin (ED %9,4) ile karıştırılmış 5 gram kepek üzerine 10 mL (%0,14 (NH₄)₂SO₄, %0,2 KH₂PO₄ ve %0,02 MgSO₄, pH: 7) besleyici solüsyon ilave edilerek besi yerleri hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu besi yerleri otoklavda 121°C’de 20 dakika tutularak steril edildiler. TSB’de üretilmiş olan mikroorganizmalar steril kabinde besi yerlerine ekimleri yapıldı ve 5 gün boyunca 27°C’de inkübe edildiler. Besi yerine %1 NaCl içeren 60 mL deiyonize su ilave edildi ve 1 saat boyunca magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 10.000 x g’de (4°C, 20 dk.) santrifüjlenerek süpernatant (yetiştirme ortamı) ve çökelek (kepek+mikroorganizma) ayrıldı. Süpernatantlarda pektin liyaz aktivitesi tespit edilerek *Agrobacterium radiobacter* ve *Xanthomonas campestris*’in pektin liyaz enzimini ürettiği anlaşıldı. Elde edilen homojenat 0,01 M pH’sı 8 olan fosfat tamponuna karşı iki defa ikişer saat diyalizlendikten sonra DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna yüklemek için hazır hale getirildi (Taragano and Pilosof 1999).

Erzurum Hasankale kaplıcalarından izole edilen *Geobacillus pallidus*’u üretmek için NB (Nutrient Broth) kullanıldı. 6,25 g NB 500 mL’lik bir erlende 250 mL deiyonize

suyla çözülmesiyle besi ortamı hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu besi yerleri otoklavda 121°C'de 20 dakika süresince steril edildi. TSB'de üretilmiş olan mikroorganizmalar steril kabinde besi yerlerine ekimleri yapıldıktan sonra 5 gün boyunca 56°C'de inkübe edildiler. Besi yerleri 10.000 x g'de (4°C, 20 dakika) santrifüjlenerek süpernatant (yetiştirme ortamı) ve çökelek (mikroorganizma) ayrıldı. Süpernatantta pektin liyaz aktivitesi tespit edilerek *Geobacillus pallidus*'un pektin liyaz enzimini ürettiği anlaşıldı. Elde edilen homojenat 0,01 M pH'sı 8 olan fosfat tamponuna karşı iki defa ikişer saat diyalizlenerek DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna yüklemek için hazır hale getirildi.

3.2.5 DEAE-selüloz iyon değişim kolonunun hazırlanması

20 g DEAE-selüloz 200 mL 0,5 N HCl ile aktifleştirildi. Kullanılan HCl iyon değişim uçlarının dışarı çıkmasını sağladı. 0,5 N NaOH ile yıkanarak ortam nötralize edildi. Jel 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içine alındı. Kromatografi kolonuna bir huni yardımıyla tampon çözelti dolduruldu. Hazırlanan jel peristaltik pompa yardımıyla kolona paketlenildi. Kolon aynı tampon çözelti ile dengelendi. Kolonun dengelendiği üstten alınan sıvı ile alttan alınan sıvının absorbanslarının aynı olması ile anlaşıldı.

3.2.6 Hazırlanan homojenatların DEAE-selüloz iyon değişim kolonuna yüklenmesi ve elüsyon alınması

0,01 M (pH: 8) fosfat tamponuna karşı diyalizlenen homojenat önceden dengelenmiş kolona tatbik edildi. Daha sonra 0'dan 0,4 M'a NaCl ile bir konsantrasyon gradienti oluşturularak enzim elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla akış hızı 80 mL/saat'e ayarlandı. 3'er mL'lik fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlarda 280 nm dalga boyunda kalitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirilerek enzim havuzu oluşturuldu (Afifi *et al.* 2002).

3.2.7 SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile alt birim belirlenmesi

Enzim saflaştırılmasından sonra, iki farklı akrilamid konsantrasyonu kullanılan (%3-10) kesikli sodyumdodesilsülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi Laemmli (1970) tarafından anlatıldığı gibi uygulanarak enzimin saflık derecesi ve alt biriminin olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı.

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 poşetler geçirilerek jel hazırlama cihazına konuldu ve sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlandıktan sonra plakalar arasına cam pipetle döküldü. Jel içine hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için %1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşıncaya kadar (yaklaşık yarım saat) beklenildi. Katılaşıncaya üstündeki %1'lik SDS döküldü. Daha sonra yığıma jeli üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine dikkatlice tarak yerleştirildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kâğıdı konulup, 1 gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlendi, jelin üstü önce saf su, sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinden 20 µg olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 1 mL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika su banyosunda kaynatıldı. Numuneler soğutulularak, enjektör yardımıyla yuvalara ekildi. Tank kapağı (+) kablo (anot) ve (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 volt'da yarım saat bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesildikten sonra cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına konuldu. Jel renklendirme çözeltisine alındı. 1,5-2 saat kadar çalkalandı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarıldı ve renksizleştirme çözeltisine konuldu. Belirli aralarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılarak, protein bantlarının belirginleşmesi sağlandı. Renksizleştirme çözeltisi aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel, renksizleştirme çözeltisinden çıkartıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı; 15 mL Tris-HCl (pH 8,8), 13,2 mL %30'luk akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid, 0,6 mL %1'lik SDS, 0,4 mL %5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin) ve 9,4 mL su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 mL %1,5'lik amonyum persülfat [(NH₄)₂S₂O₈] ilave edildi.

Yığıma jelinin hazırlanması ise şöyle yapıldı; 1 M'lik Tris-HCl'den 1,24 mL, %30 akrilamid-%0,8'lik bisakrilamid'den 1 mL, %0,1'lik SDS'den 0,1 mL, %5'lik TEMED'den 0,1 mL ve sudan 7,8 mL alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış, %1,5'lik PER'den 0,2 mL ilave edildi.

3.2.8 Optimum pH'nın belirlenmesi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin, pH 4-11 arasında 1'er birim arayla aktivite belirlenerek optimum pH'ları ve aktif oldukları pH aralıkları bulundu.

Aktivite tayininde kullanılan substrat çözeltisini hazırlamak için üç farklı tampon çözelti kullanıldı. pH: 4-6 arasında 0,05 M asetat, pH: 7-8 arasında fosfat ve pH: 9-11 arasında ise karbonat tamponu kullanıldı. Her bir tampondan ayrı ayrı substrat çözeltileri hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu substrat çözeltilerinin pH'ları 1 M NaOH ve 1 M HCl ile 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11'e ayarlandı. Seyreltilmiş NaOH ve HCl kullanılarak enzim çözeltilerinin pH'ları da pH: 4'den 11'e kadar ayarlandı.

Her bir pH denemesi için bir numune ve bir kör olmak üzere iki şer tüp hazırlandı. Enzimli deneme için; tüpe pH'sı ayarlanmış 250 µL enzim ve aynı pH'daki sustrattan 250 µL ilave edildi. 250 µL enzimin içinde bulunduğu tampon 250 µL aynı pH'ya sahip substrata ilave edilerek hazırlanan numune kör olarak kullanıldı. 10 dakika uygun sıcaklıkta inkübe edildikten sonra 3.2.3. anlatıldığı gibi aktivite tayinine devam edilerek enzimlerin aktiviteleri belirlendi.

3.2.9 Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin, 0-90°C arasında 10'ar birim artırılarak aktiviteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlarla enzimlerin optimum sıcaklıkları ve aktif oldukları sıcaklık aralıkları bulundu.

Her sıcaklık denemesi için bir numune ve birde kör olmak üzere ikişer tüp hazırlandı. 250 µL enzim çözeltisine 250 µL substrat ilave edildi ve sıcaklığı ayarlanmış su banyosunda 10 dakika inkübe edildi. 250 µL substrata enzimin içinde bulunduğu tampondan 250 µL ilave edilerek hazırlanan numune aynı su banyosuna konuldu ve kör olarak kullanıldı. 3.2.3. anlatıldığı gibi aktivite tayinine devam edilerek enzimlerin aktiviteleri belirlendi.

3.2.10 Enzim stabilitesinin üzerine sıcaklığın etkisi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin stabilitesi üzerine sıcaklığın (40, 50, 60, 70 ve 80°C) etkisi incelendi.

Her sıcaklıkta enzim stabilitesinin belirlenebilmesi için 4 mL enzim çözeltisi sıcaklığı ayarlanmış su banyosunda 24 saat inkübe edildi. Enzim çözeltisi su banyosuna konulmadan önce 250 µL alınarak 3.2.3. anlatıldığı gibi aktivite belirlendi ve grafikte 0. dakika olarak verildi. Daha sonra her saat başı su banyosunda inkübe edilen enzim çözeltisinden 250 µL alınarak 3.2.3. anlatıldığı gibi aktivite tayini yapıldı. Enzim yerine enzimin içinde bulunduğu tampon çözeltiden 250 µL ilave edilen numune kör olarak kullanıldı. Sonuçlar EU'ye karşı zaman grafiği olarak verildi.

3.2.11 Raf ömrünün incelenmesi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri oda sıcaklığında (~ 25°C) ve buzdolabında (4°C) bekletilerek enzim aktivitelerindeki değişiklik incelendi. Saflaştırılan enzimlerin aktivitelerine bakıldı ve 0. gün olarak kaydedildi. Daha sonra bu enzimlerden belirli miktarlarda tüplere konuldu, tüplerin ağızları parafilmle kapatılarak oda sıcaklığında ve 4°C'da bekletildiler. Belirli aralıklarla kontrol edilerek enzim aktivitelerindeki değişme olup olmadığı 3 ay boyunca takip edildi. Elde edilen sonuçlar grafik halinde verildi.

3.2.12 Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığının tayini

Enzimler saflaştırıldıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlıkları tayin edildi.

Bunun için önce, Sephadex G-100 destile su içerisinde 90°C'de 5 saat süreyle şişirildi. Hazırlanan jel bir huni vasıtasıyla (1,3x30 cm) kolona paketlenildi. Kolon 24 saat süreyle 0,05 M Na₂HPO₄, 1 mM ditiotritol, pH 7,0 tamponu ile dengelendi. Dengelenme işlemine, kolonun altından alınan çözelti 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. Dengelenmiş olan kolona önce konsantrasyonu 0,2 mg/ml olacak şekilde standart proteinler yüklendi (sığır serum albümin; 66.000 Da, selülaz; 45.000 Da; 31.000 Da; lipaz) ve 0,05 M Na₂HPO₄, 1 mM ditiotritol, pH 7,0 tamponu ile elüe edildi. Elüatlar 3 ml olacak şekilde alındı. Peristaltik pompa vasıtasıyla akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde ayarlandı (Whitaker 1963). Elüatların 280 nm'de absorbans değerleri belirlendi. Alınan sonuçlar grafik halinde verildi. Aynı şartlarda, dengelenmiş kolona ayrı ayrı saf enzimler yüklendi ve elüsyonlar alındı. Elüatların 280 nm'de absorbans değerleri belirlendi ve sonuçlar grafik halinde verildi.

3.2.13 V_{\max} ve K_M değerlerinin belirlenmesi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin maksimum hızları (V_{\max}) ve hız sabitleri (K_M), beş farklı sustrat konsantrasyonuna karşı aktivitesi bulunarak hesaplandı.

Aktivite ölçümlerinde ana substrat çözeltisinden 50, 100, 150, 200 ve 250 μL alındı ve her birinin toplam hacmi tampon çözelti (0,05 M fosfat, pH: 8) ile 250 μL 'ye tamamlandı. Daha sonra 250'şer μL saf enzim ilave edilerek 30 dakika uygun sıcaklıklarda bekletildiler. Reaksiyon hızı şöyle hesaplandı: α -, β - doymamış galakturonik asit türevlerinin tiyobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucunda oluşan ürünün molar ekstinksiyon (\mathcal{E}) katsayısı $54.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 'dir (Nedjma *et al.* 2001).

$$\alpha\text{-}, \beta\text{- doymamış galakturonik asit türevlerinin miktarı} = \frac{A}{54.000} \quad \text{M}$$

$$\alpha\text{-}, \beta\text{- doymamış galakturonik asit türevlerinin miktarı} = \frac{A}{54 \times 10^{-3}} \quad \mu\text{M}$$

Bulunan bu değer 30 dakika için olduğuna göre 1 dakikada oluşan ürünün miktarını bulmak için 30'a bölünür. Toplam hacim 1,65 mL ve 0,25 mL enzim olduğuna göre;

$$\text{Ürün} = \frac{[A(\text{OD})]}{54 \times 10^{-3} * 30} * 6,6 = A(\text{OD}) * 4,07 \quad \mu\text{mol/ L*dak.}$$

bulunur.

Yukarıda anlatılan işlem saflaştırdığımız her enzim için ayrı ayrı yapıldı ve her enzim için V_{\max} ve K_M değerleri belirlendi.

3.2.14 Karbohidrat içeriğinin belirlenmesi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin karbohidrat içeriğini belirlemek için fenol sülfürik asit metodu kullanıldı (Hounsell *et al.* 1997).

Fenol sülfürik asit metoduyla karbohidrat miktarını belirlemek için standart bir grafikten yararlanılmaktadır. Bu standart grafiği hazırlamak için 1 mg/mL konsantrasyonunda standart glukoz çözelti hazırlandı. Bu çözelten tüplere 10, 20, 30, 40 ve 50 µL konuldu ve saf su ile hacimleri 0,1 mL'ye tamamlandı. Her bir tüpe 250 µL fenol ilave edildi ve 5 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda her tüpe 2'şer mL derişik H₂SO₄ konulararak 492 nm'de absorbanları ölçüldü. 100 µL saf su, 250 µL fenol ve 2 mL derişik H₂SO₄ karışımından hazırlanan numune kör olarak kullanıldı.

Pektin liyaz enzimlerinin karbohidrat içerikleri 1-10 µg arasında üç farklı protein miktarı içeren numuneler için ayrı ayrı yapıldı ve ortalamaları alındı. Saf enzim çözeltilerinden 0,1'er mL tüplere konuldu ve üzerlerine % 4'lük 250 µL fenol çözeltisi ilave edildi. 5 dakika sonra derişik H₂SO₄ ilave edildi ve 492 nm'de absorbanları ölçüldü. Elde edilen absorban değerlerine karşılık gelen karbohidrat miktarları standart grafikten yararlanılarak bulundu.

3.2.15 Tirozin ve triptofan miktarlarının tayini

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin tirozin ve triptofan miktar tayinleri Goodwin ve Mortona (1946) metodlarından yararlanılarak yapıldı. 0,1 N NaOH içerisindeki enzim çözeltisi, 300-220 nm dalga boyu arasında spektrofotometre kullanılarak tarandı. 280 nm ve 294,4 nm'deki absorbanları kaydedildi. Hesaplama için

$$w = \frac{(A_{280} - x * \epsilon_y)}{(\epsilon_w - \epsilon_y)}$$

formülü kullanıldı.

w = litredeki mol cinsinden triptofan konsantrasyonunu verir.

\mathcal{E}_w ve $\mathcal{E}_y = 0,1$ N NaOH içinde 280 nm'deki tirozin ve triptofan için molar ekstinksiyon katsayıları ($\mathcal{E}_w=5225$ ve $\mathcal{E}_y=1576$).

x = toplam tirozin ve triptofan konsantrasyonudur. $\mathcal{E}_{294,4}=2375$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanır.

3.2.16 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , sitrik asit ve askorbik asit'in etkisinin incelenmesi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , sitrik asit ve askorbik asit'in etkisinin incelendi.

Efektörlerin üç farklı konsantrasyonda ki (2×10^{-2} , 2×10^{-4} ve 2×10^{-6}) çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerden 100, 200, 300, 400 ve 500 μL alındı ve her birinin toplam hacmi saf su ile 500 μL 'ye tamamlandı. Daha sonra üzerlerine 250'şer μL enzim çözeltisi ilave edildi. Enzim çözeltisi ile efektörler 15 dakika bekletildikten sonra 250 μL substrat çözeltisi ilave edilerek enzimatik reaksiyon başlatıldı ve uygun sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edildi. Her bir deneme için kör tüp hazırlandı. Enzim yerine enzimin içinde bulunduğu tampon kullanılarak yapılan deneme kör olarak kabul edildi. İnkübasyon sonunda aktivite tayininde anlatıldığı gibi tiyobarbütirik asit ile renkli türevleri oluşturularak 550 nm'de absorbansları okundu.

EU'ye karşı efektörlerin μL grafiği çizildi. Efektör bulunmayan numunenin aktivitesi 100 olarak kabul edilip diğer numunelerin %'de aktiviteleri hesaplandı. 10^{-2} , 10^{-4} ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda efektörlerin aktiviteye olan etkisi tablo halinde verildi.

3.2.17 Meyve suyu denemeleri

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanılarak meyve suyu elde etme verimini nasıl etkilediği incelendi. Saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak amacıyla ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus'da meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanıldı. Bu deneylerde kullanılan Pectinex 100 L Plus meyve suyu üretim aşamalarında kullanılmak üzere Ultrazyme firması tarafından üretilmektedir. Meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanılan Pectinex 100 L Plus ve ham ekstrakt deiyonize suyla seyreltilerek mililitre başına düşen protein miktarı saf enzimin protein miktarına eşitlendi.

Yerel marketlerden alınan elma (Amasya), muz, havuç ve şeftali meyveleri meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanıldı. Meyveler yıkandı, kabukları soyuldu ve blender ile homojen püreler haline getirildi. Püreler 1/1 oranında saf suyla seyreltildi ve pH'ları 8'e ayarlandı. Meyve püreleri 10'ar gram alınarak 50'şer mL'lik beherlere konuldu ve üzerlerine ikişer mililitre saflaştırılmış pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ilave edildi. 10 gram meyve püresine 2 mL saf su ilave edilerek hazırlanan örnek kör olarak kullanıldı. Beherler 50°C'lik bir su banyosunda karıştırılarak 5 saat inkübe edildi. Püreler soğutulduktan sonra meyve suları süzgeç kâğıdından vakumla süzülerek elde edildi. Elde edilen meyve suları kontrol (saf su ile yapılan deneme) numune ile karşılaştırılarak meyve suyu elde etme verimi aşağıda verilen şekilde hesaplanarak tablo halinde verildi.

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Enzimli deneme (mL)} - \text{Kontrol (mL)}}{\text{Kontrol (mL)}} \times 100$$

Meyve suyu alındıktan sonra geriye kalan meyve posası sabit tartıma gelinceye kadar 105°C'de kurutuldu. Saf pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus kullanılarak elde edilen meyve sularından geriye kalan kuru maddelerdeki ağırlık kaybı saf su ile

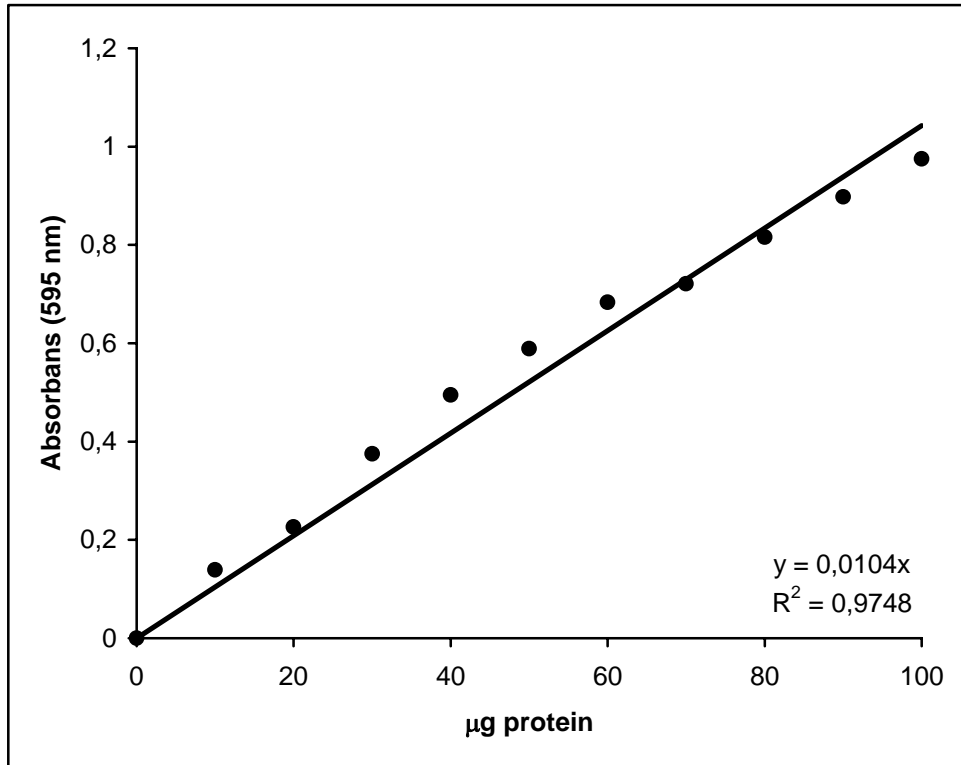
yapılan deneme (kontrol deneme) ile karşılaştırılarak % parçalanma olarak aşağıda verilen şekilde hesaplandı ve tablo halinde verildi (Soares *et al.* 2001).

$$\% \text{ Parçalanma} = \frac{\text{Enzimli deneme (g)} - \text{Kontrol (g)}}{\text{Kontrol (mL)}} \times 100$$

4 ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde coomassie-blue yöntemi kullanıldı. Coomassie-blue yöntemi için önce standart bir eğri hazırlandı. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'un yetiştirme ortamından elde edilen ekstraktlarda ve saflaştırılan enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbands değerleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Bradford yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik

4.2 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'un Pektin Liyaz Üretim Kapasiteleri

Agrobacterium radiobacter ve *Xanthomonas campestris* katı ortam fermantasyonu ile geliştirilerek pektin liyaz enzimi üretildi. Kültür ortamı %1 oranında pektin içeren 5 g buğday kepeğine besleyici solüsyondan 10 mL ilave edilmesiyle hazırlandı. Hazırlanan yetiştirme ortamına bakteriler ekilip yetiştirildikten sonra 60 mL %1 sodyum klorür içeren çözelti ile homojenize edildi ve santrifüjlenerek süpernatantta aktivite bakıldı. *Agrobacterium radiobacter*'in bir gram kepekten 1152 EU pektin liyaz ürettiği *Xanthomonas campestris*'in ise 48 EU ürettiği hesaplandı.

Kaplıcadan izole edilen *Geobacillus pallidus*, 6,25 g NB 250 mL saf suda çözülerek oluşturulan ortamda yetiştirilerek pektin liyaz enzimi üretildi. Besi yerine 10.000 x g'de (4°C, 20 dakika) santrifüjlenerek süpernatant ve çökelek (mikroorganizma) ayrıldı. Süpernatantta pektin liyaz aktivitesi tespit edilerek *Geobacillus pallidus*'un pektin liyaz enzimini ürettiği anlaşıldı. *Geobacillus pallidus*'un bir gram NB'den 36 EU pektin liyaz ürettiği hesaplandı.

4.3 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin DEAE-selüloz İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları

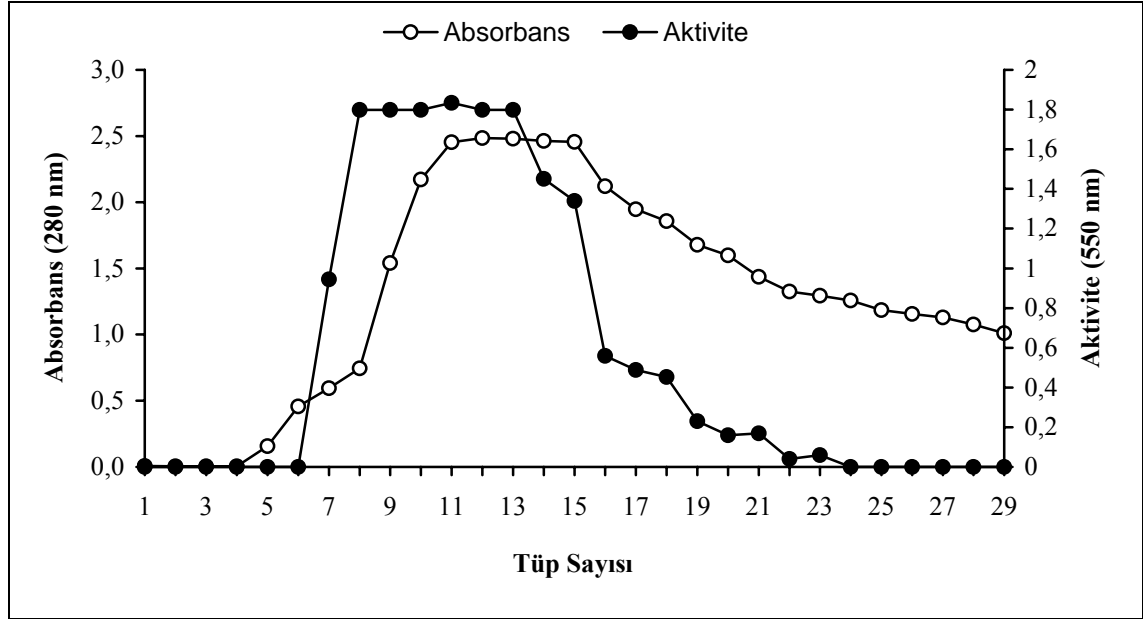
Kinetik çalışmalarda ve meyve suyu işlemlerinde kullanılmak üzere *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen pektin liyaz enzimleri iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı.

DEAE-selüloz iyon değişim jeli hazırlandı, kolona paketlenildi ve *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'un yetiştirme ortamlarından hazırlanan ve diyaliz edilen homojenatlar kolona ayrı ayrı yüklendi. Daha sonra 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içinde 0'dan 0,4 M NaCl ile bir konsantrasyon gradienti oluşturularak enzimler 3'er mililitrelik fraksiyonlar halinde elüe edildi. Her tüpteki nu-

mune için 280 nm’de kalitatif protein tayini yapıldı. Absorpsiyon gösteren fraksiyonların aktivite ölçümleri yapıldı ve aktivite gösteren fraksiyonlar kinetik çalışmalarda ve meyve suyu işlemlerinde kullanılmak üzere birleştirildi.

4.3.1 *Agrobacterium radiobacter*’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Agrobacterium radiobacter’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kolonunun sonucu Şekil 4.2.’de verilmektedir.



Şekil 4.2. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kolonu kullanılarak *Agrobacterium radiobacter*’den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içinde 0-0,4 M NaCl ile gradient elüsyonu; (—○—): 280 nm’de absorpsiyonu, (—●—): aktivite kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL

Pektin liyaz enzimini üreten *Agrobacterium radiobacter*’nin yetiştirme ortamından hazırlanan homojenat 12,5 kat seyreltilerek aktivite tayinleri yapılmıştır. Seyreltilmiş homojenattan 0,25 mL alınarak aktivite tayini, seyreltilmemiş homojenattan 0,1 mL alınarak Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Mililitre homojenat için protein miktarı 0,45 mg/mL ve aktivitesi 90 EU/mL bulundu.

Homojenat için spesifik aktivite ise; $90/0,45 = 200$ EU/mg protein olarak hesaplandı.

DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda (8-15) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Saf enzimin aktivite tayini 12,5 kat seyreltilerek yapılmıştır. Protein miktarı 0,04 mg/mL ve aktivitesi 184 EU/mL olarak bulundu.

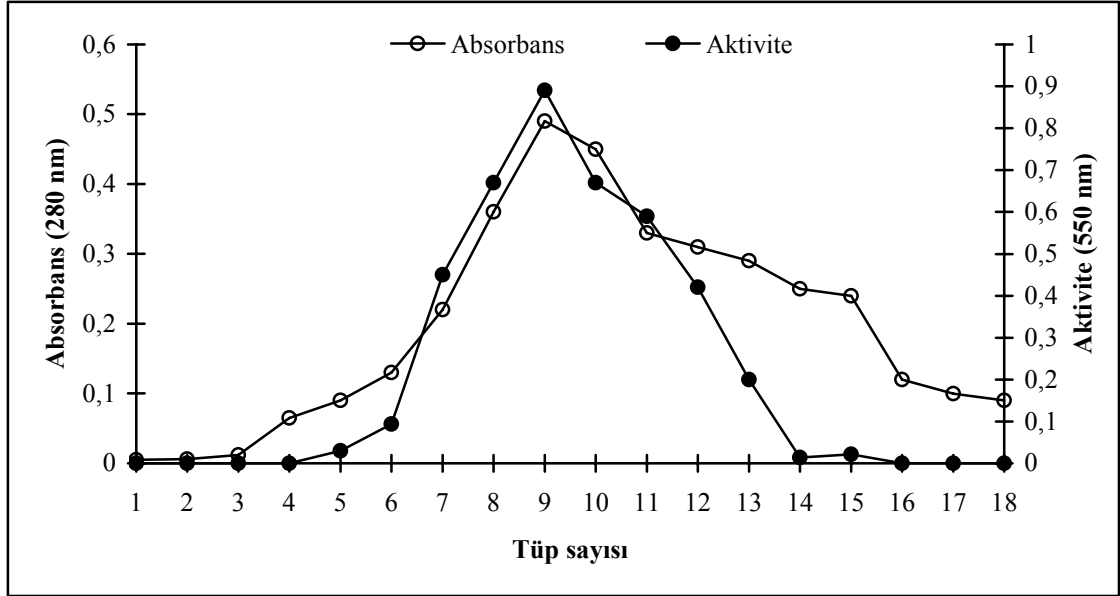
Elde edilen enzim havuzunun spesifik aktivitesi ise; $184/0,04 = 4600$ EU/mg protein olarak hesaplandı. Enzimin $4600/200 = 23$ kat saflaştırıldığı anlaşıldı (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. *Agrobacterium radiobacter*'in yetiştirildiği ortamdan elde edilen homojenatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonundan elde edilen pektin liyaz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları

	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Total Aktivite EU %	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Oranı
Ham Ekstrakt	64	90	5760 100	0,45	200	-
DEAE-Selüloz	23	184	4232 73	0,04	4600	23

4.3.2 *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Xanthomonas campestris'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonunun sonucu Şekil 4.3.'de verilmektedir.



Şekil 4.3. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içinde 0-0,4 M NaCl ile gradient elüsyonu; (—○—): 280 nm'de absorbansı, (—●—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL

Pektin liyaz enzimini üretmek için *Xanthomonas campestris*'nin yetiştirme ortamından hazırlanan homojenattan 0,25 mL alınarak aktivite tayini, 0,1 mL alınarak Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Mililitre homojenat için protein miktarı 2,70 mg/mL ve aktivitesi 3,69 EU/mL bulundu.

Homojenat için spesifik aktivite ise; $3,69/2,70 = 1,37$ EU/mg protein olarak hesaplandı.

DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda (7-12) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Protein miktarı 0,08 mg/mL ve aktivitesi 4,72 EU/mL olarak bulundu.

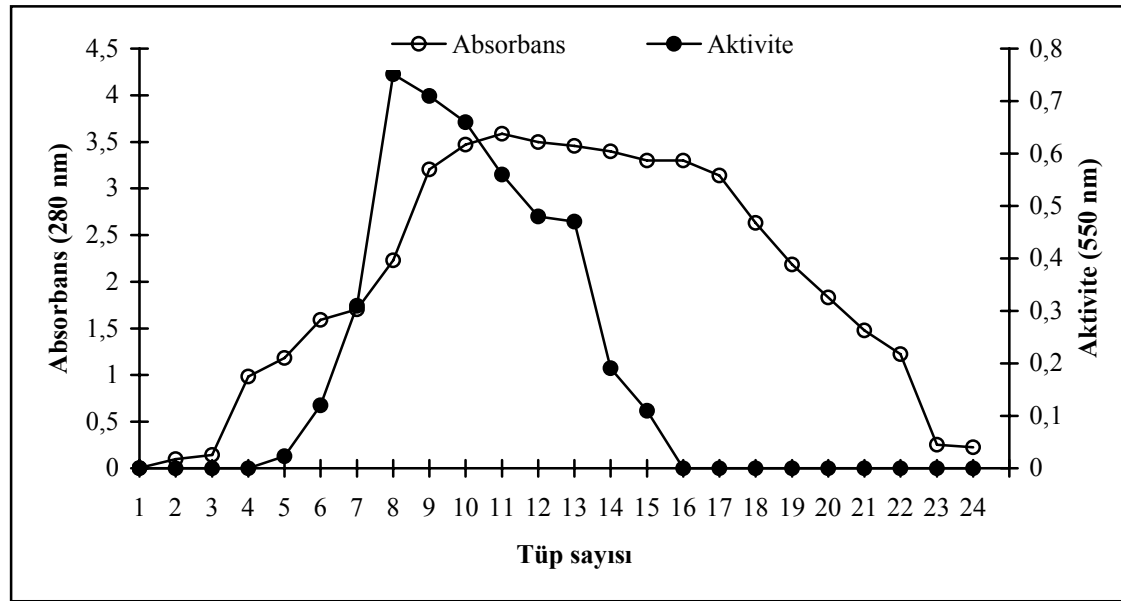
Elde edilen enzim havuzunun spesifik aktivitesi ise; $4,72/0,08 = 59,00$ EU/mg protein olarak hesaplandı. Enzimin $59,00/1,37 = 43$ kat saflaştırıldığı anlaşıldı (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *Xanthomonas campestris*'in yetiştirildiği ortamdan elde edilen homojenatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonundan elde edilen pektin liyaz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları

	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Total Aktivite EU %		Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Oranı
Ham Ekstrakt	65	3,69	240	100	2,70	1,37	-
DEAE-selüloz	19	4,72	90	38	0,08	59,00	43

4.3.3 *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

Geobacillus pallidus'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonunun sonucu Şekil 4.4.'de verilmektedir.



Şekil 4.4. DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 0,01 M (pH: 8) fosfat tamponu içinde 0-0,4 M NaCl ile gradient elüsyonu; (—○—): 280 nm'de absorbanısı, (—●—): aktivite, kolon 3 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 mL/saat ve fraksiyon hacmi 3 mL.

Pektin liyaz enzimini üretmek için *Geobacillus pallidus*'dan yetiştirme ortamından hazırlanan homojenattan 0,25 mL alınarak aktivite tayini, 0,1 mL alınarak Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Mililitre homojenat için protein miktarı 0,94 mg/mL ve aktivitesi 0,89 EU/mL bulundu.

Homojenat için spesifik aktivite ise; $0,89 / 0,94 = 0,95$ EU/mg protein olarak hesaplandı.

DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda (7-13) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve Bradford yöntemiyle protein tayini yapıldı. Protein miktarı 0,09 mg/mL ve aktivitesi 2,90 EU/mL olarak bulundu.

Elde edilen enzim havuzunun spesifik aktivitesi ise; $2,90/0,09 = 32$ EU/mg protein olarak hesaplandı. Enzimin $32,00/0,94 = 34$ kat saflaştırıldığı anlaşıldı (Çizelge 4.3.).

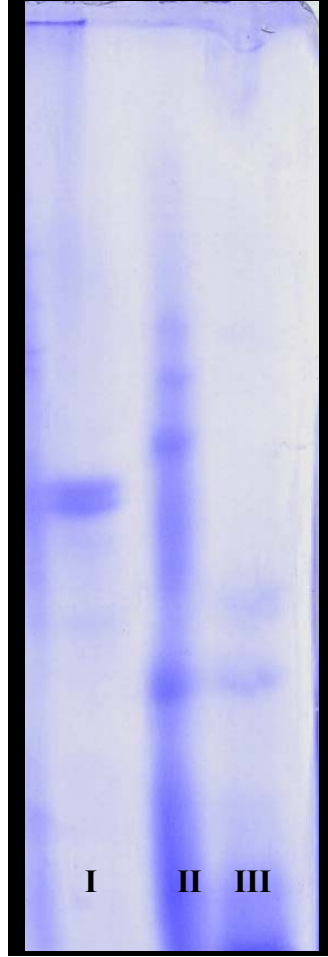
Çizelge 4.3. *Geobacillus pallidus*'un yetiştirildiği ortamdan elde edilen homojenatta enzim ünitesi, spesifik aktivite ve DEAE-selüloz iyon değişim kromatografi kolonundan elde edilen pektin liyaz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları

	Hacim (mL)	Aktivite (EU/mL)	Total Aktivite EU %		Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (EU/mg)	Saflaştırma Oranı
Ham Ekstrakt	85	0,89	76	100	0,94	0,95	-
DEAE-selüloz	21	2,90	61	80	0,09	32,22	34

4.4 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin SDS-poliakrilamid Jel Elektroferez Sonuçları

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin saflığını kontrol etmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrofrez yapıldı. Bunun için 3.2.7.'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel

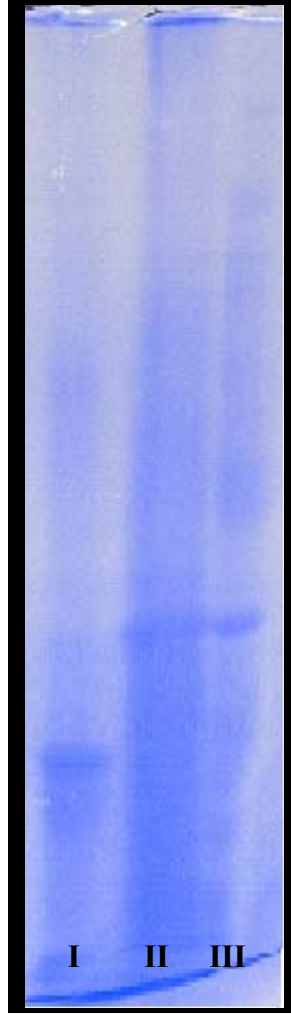
elektroforezine numuneler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafları çekildi (Şekil 4.5., 4.6. ve 4.7.).



Şekil 4.5. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı (I: Karbonik anhidraz; II: homojenat, III. Pektin liyaz)



Şekil 4.6. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı (I: Karbonik anhidraz, II : Pektin Liyaz)

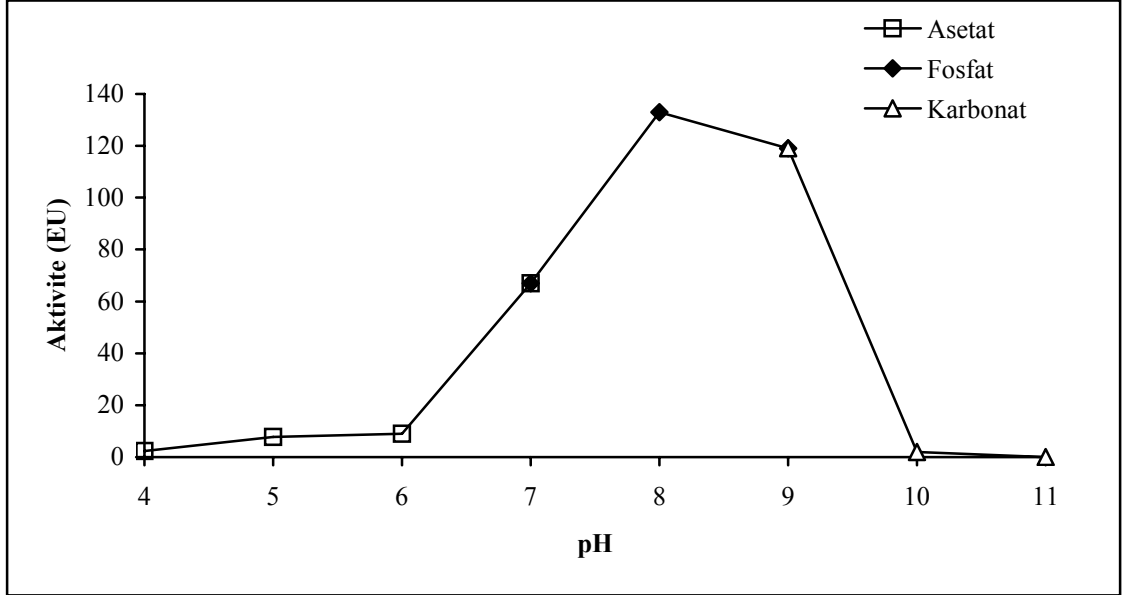


Şekil 4.7. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı (I: Karbonik anhidraz, II,III : Pektin Liyaz)

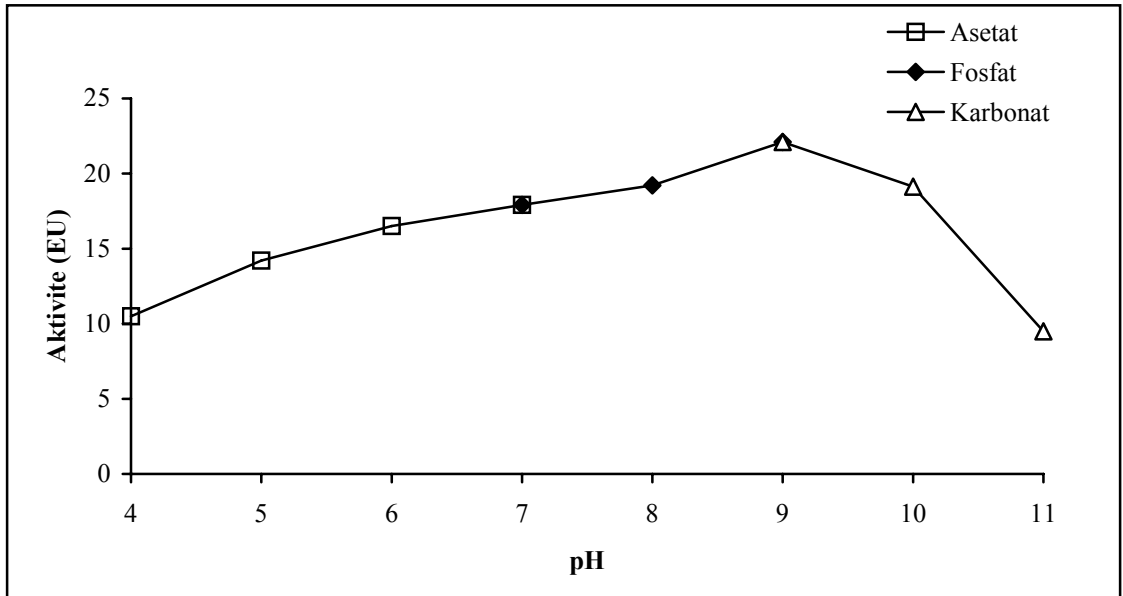
4.5 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum pH'larını belirlemek için 3.2.8.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve Aktivite-pH grafikleri çizildi (Şekil 4.8., 4.9. ve 4.10.).

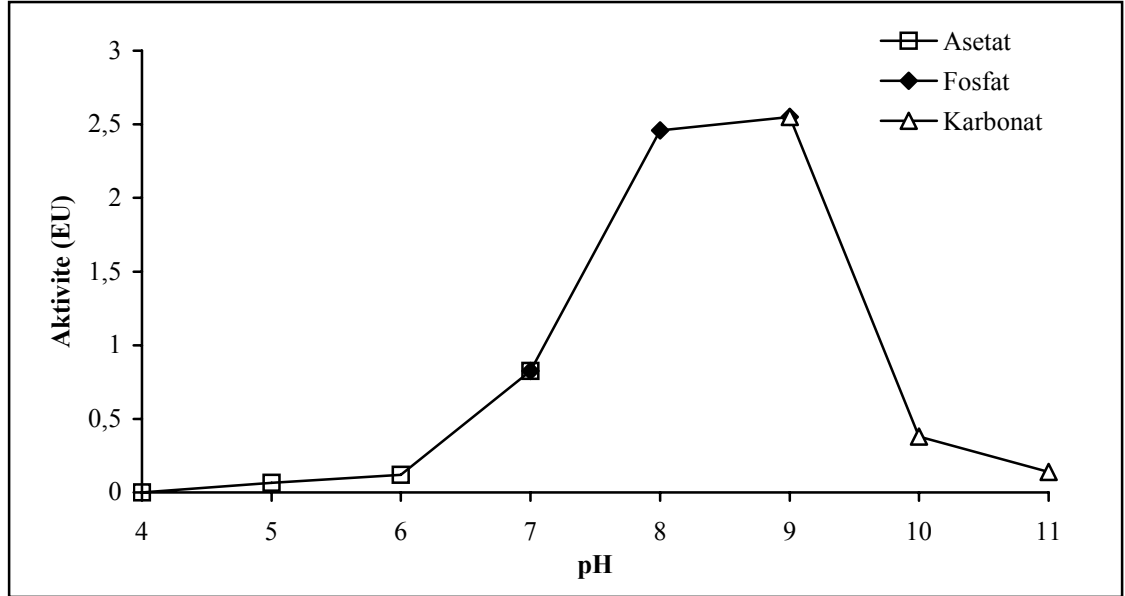
Enzimlerin optimum pH'ları ve aktivite gösterdikleri pH aralıkları toplu olarak Çizelge 4.4.'te verildi.



Şekil 4.8. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



Şekil 4.9. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi



Şekil 4.10. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

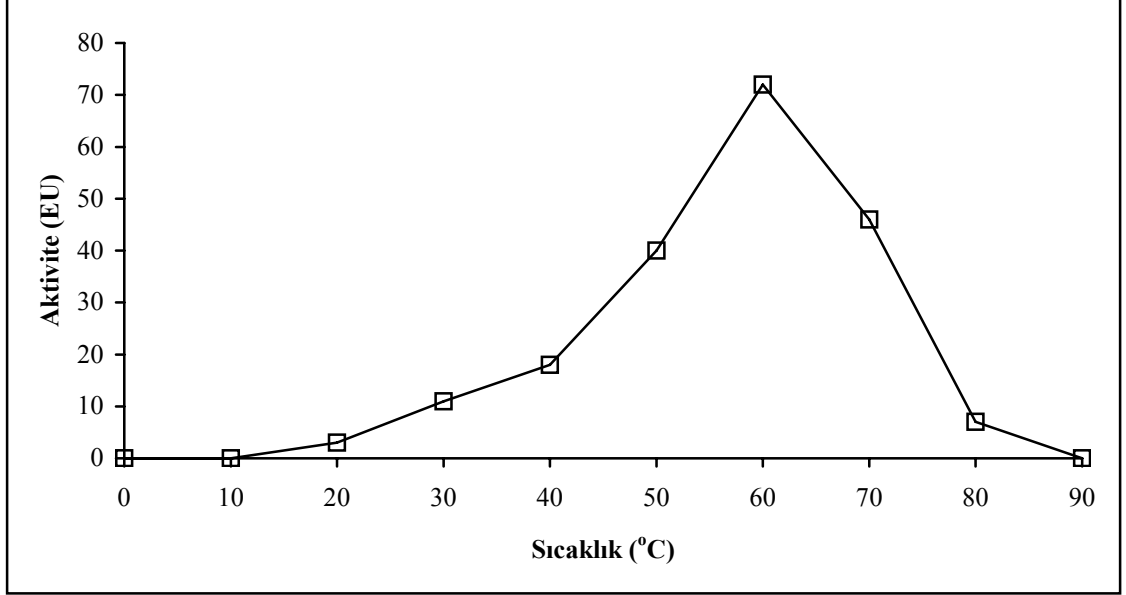
Çizelge 4.4. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimleri için yapılan optimum pH çalışmasında elde edilen sonuçlar

Enzimler	Optimum pH	Aktivite Gösterdikleri pH Aralığı
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilen pektin liyaz	8	5-9
<i>Xanthomonas campestris</i> üretilen pektin liyaz	9	4-11
<i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilen pektin liyaz	9	5-11

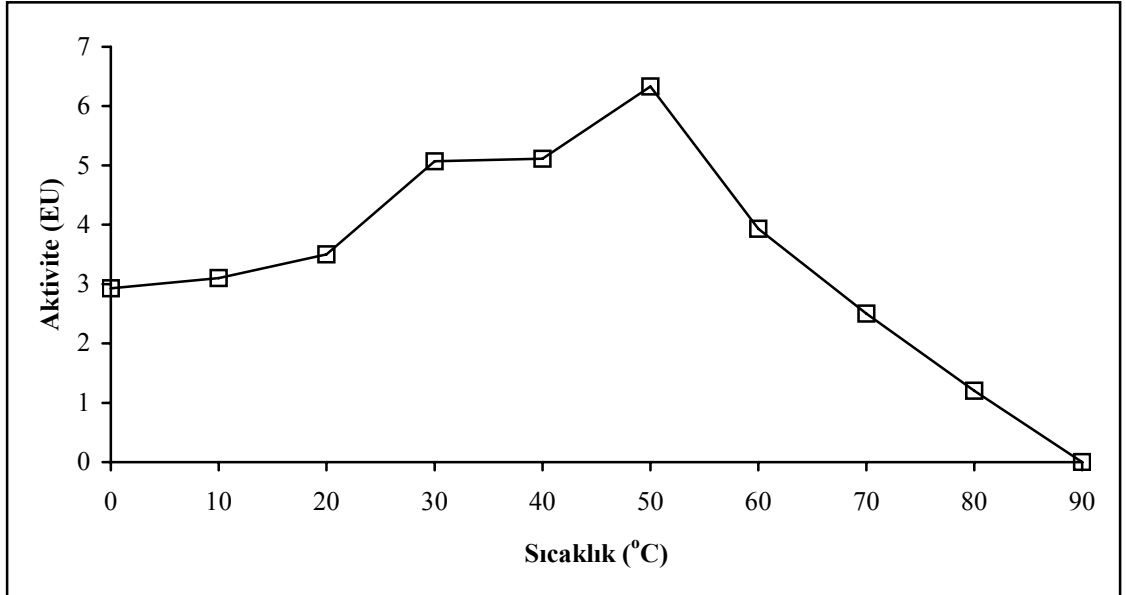
4.6 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Optimum Sıcaklık Sonuçları

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarını belirlemek için 3.2.9.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve Aktivite-°C grafikleri çizildi (Şekil 4.11., 4.12. ve 4.13).

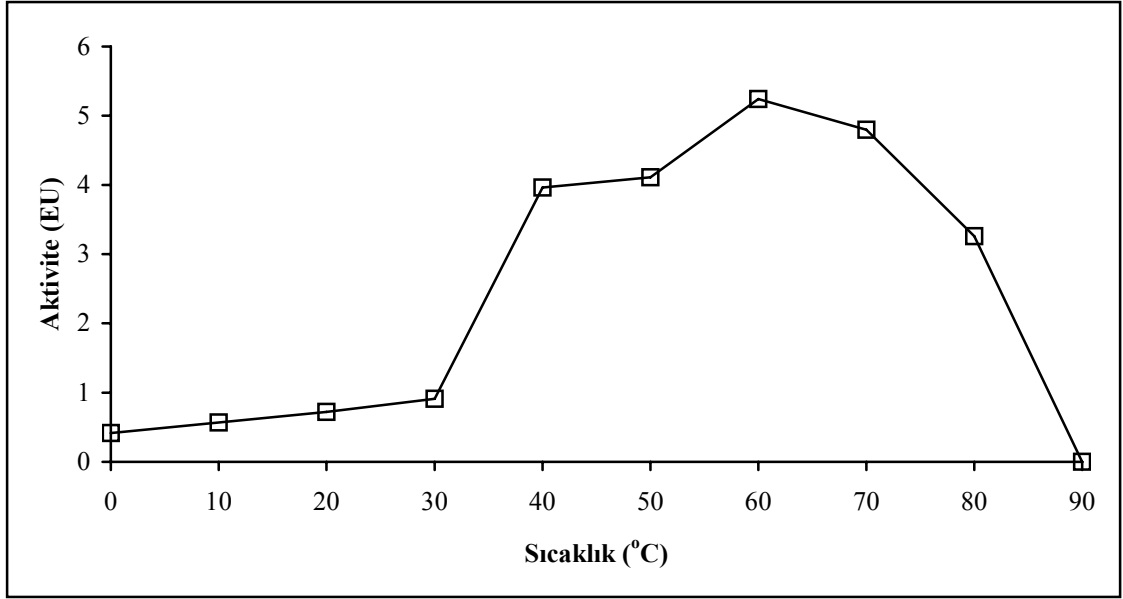
Enzimlerin optimum sıcaklıkları ve aktivite gösterdikleri sıcaklık aralıkları toplu olarak Çizelge 4.5.'te verildi.



Şekil 4.11. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 4.12. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi



Şekil 4.13. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

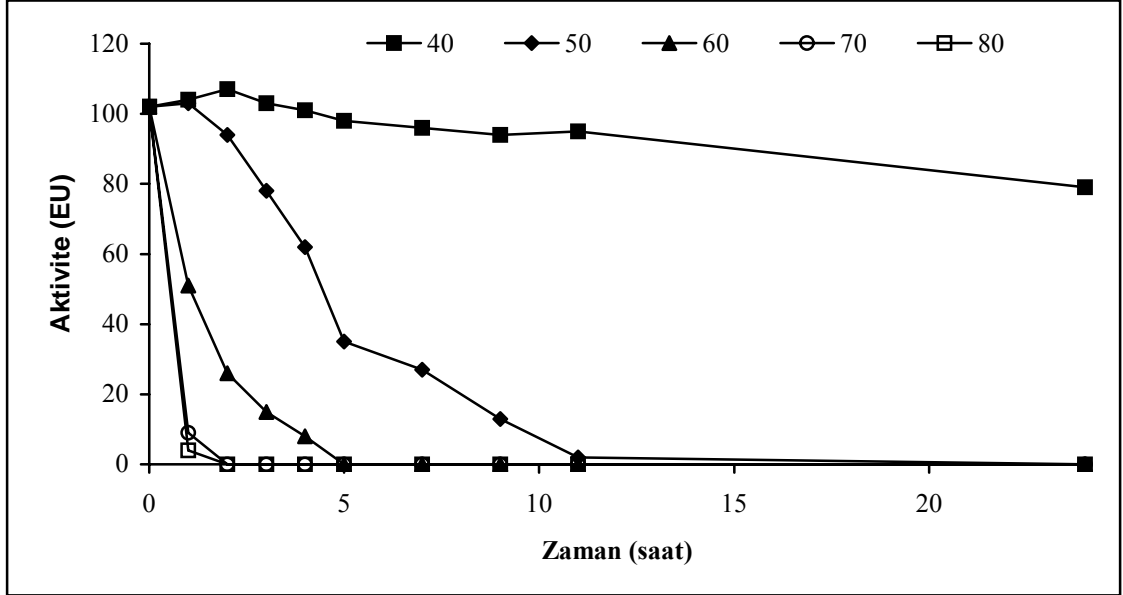
Çizelge 4.5. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimleri için yapılan optimum sıcaklık çalışmasında elde edilen sonuçlar

Enzimler	Optimum °C	Aktivite Gösterdikleri Sıcaklık Aralığı (°C)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilen pektin liyaz	60	20-80
<i>Xanthomonas campestris</i> üretilen pektin liyaz	50	0-80
<i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilen pektin liyaz	60	0-80

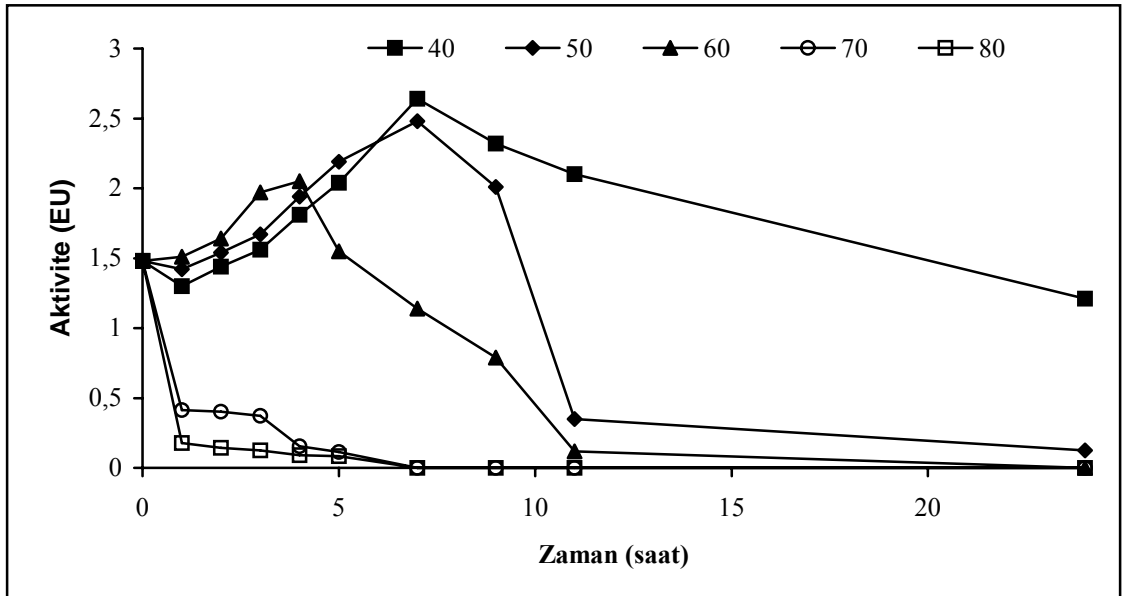
4.7 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Sıcaklık Stabilite Sonuçları

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarını belirlemek için 3.2.10.'da anlatıldığı gibi ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla aktivite hesaplandı ve Aktivite-Zaman grafikleri çizildi.

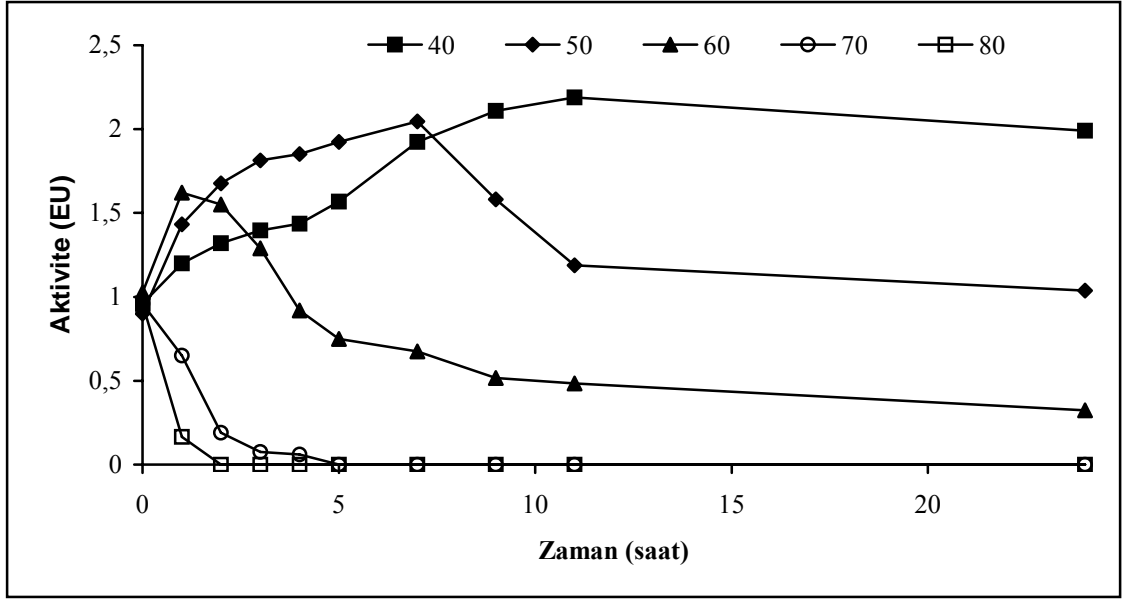
Her enzim için ayrı ayrı yapılan işlemlerin sonuçları Şekil 4.14., 4.15. ve 4.16.'da verildi.



Şekil 4.14. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi



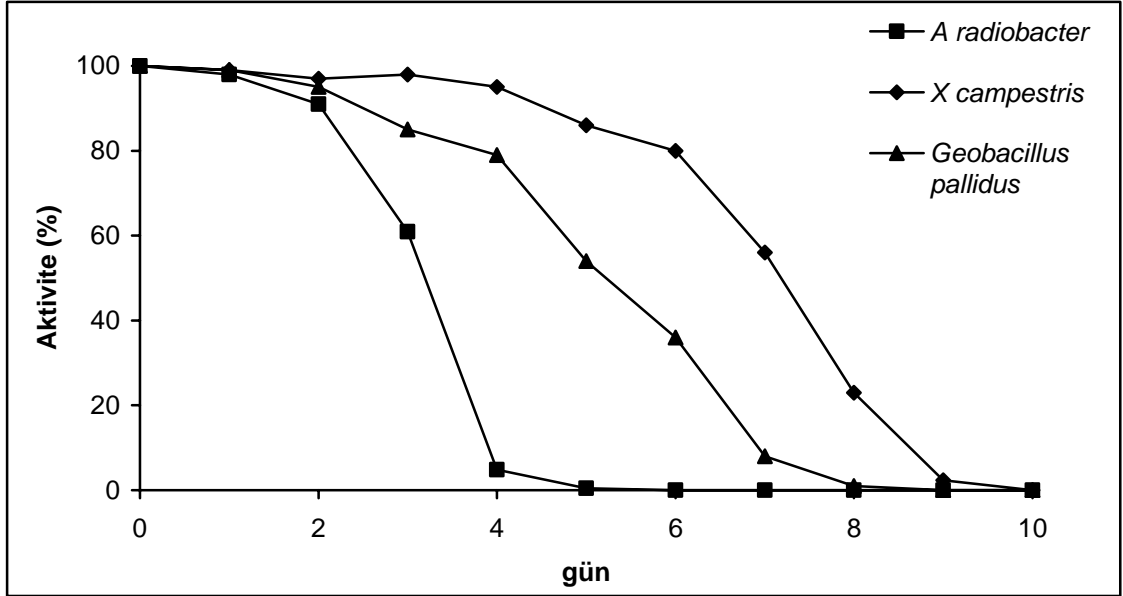
Şekil 4.15. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi



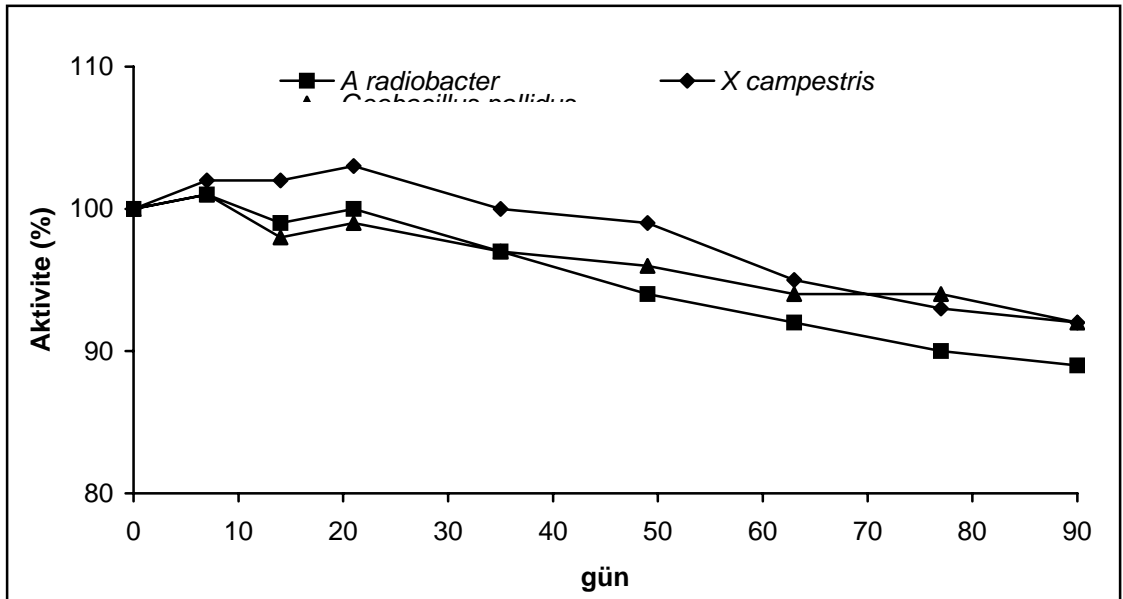
Şekil 4.16. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin stabilitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.8 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Raf Ömürleri Sonuçları

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri oda sıcaklığında ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) ve buzdolabında (4°C) bekletilerek enzim aktivitelerindeki değişiklik 3 ay boyunca incelendi. İlk gün yapılan aktivite tayini 100 kabul edilerek diğer günler bulunan aktiviteler buna göre hesaplandı ve grafik halinde Şekil 4.17. ve 4.18.'de verildi.



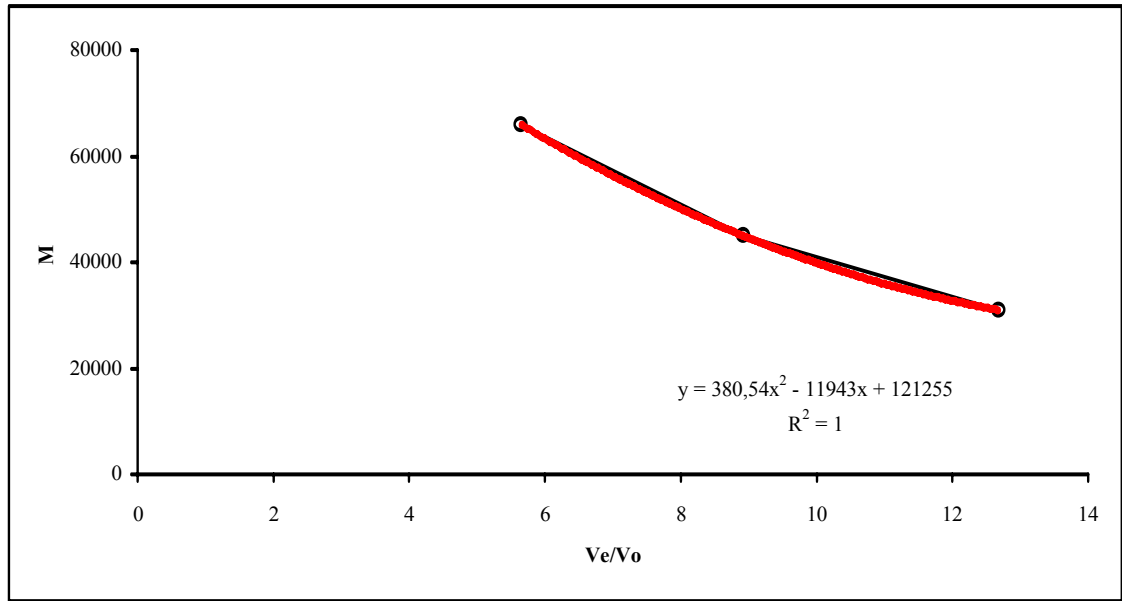
Şekil 4.17. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin oda sıcaklığında ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) aktivite değişimleri



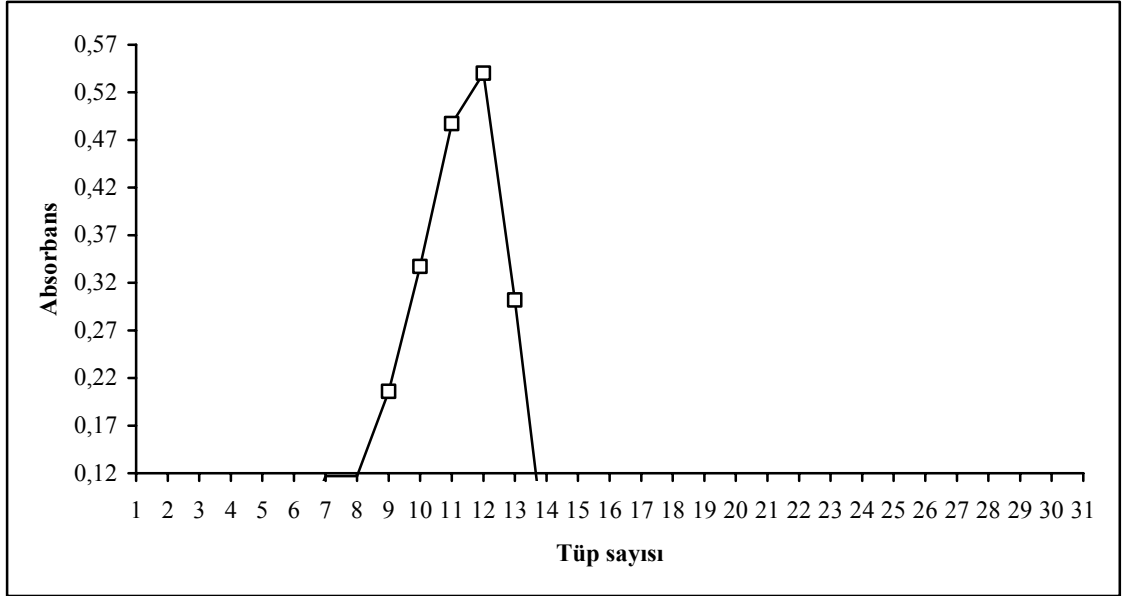
Şekil 4.18. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin 4°C 'deki aktivite değişimleri

4.9 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığının Tayini Sonuçları

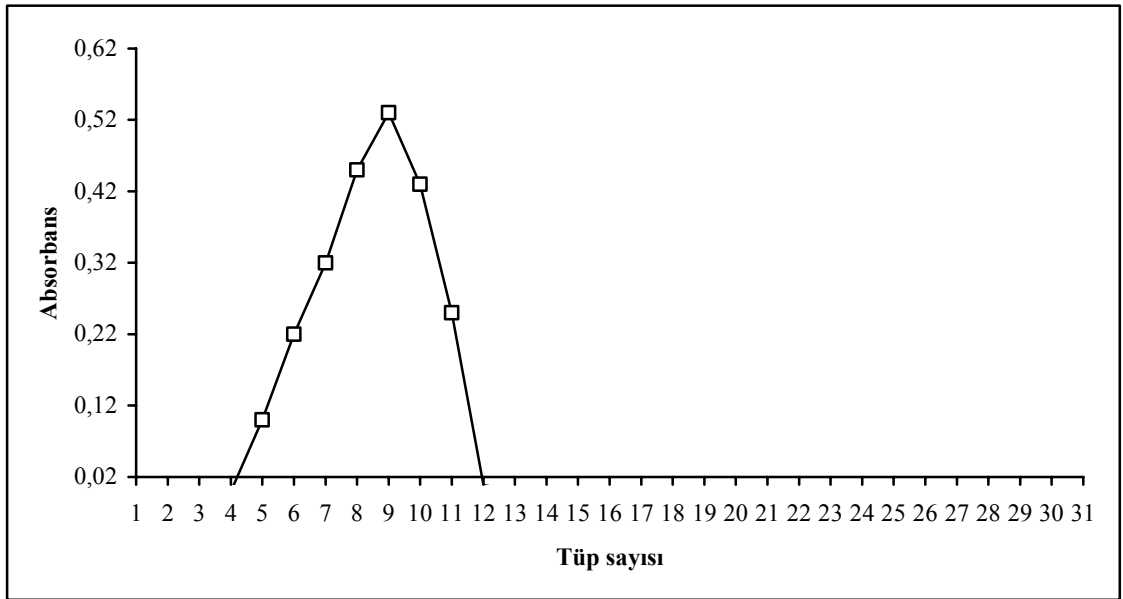
Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin molekül ağırlıkları Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak belirlendi. Hazırlanan standart grafik Şekil 4.19'da verildi. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin molekül ağırlıkları belirlemek için çizilen grafikler Şekil 4.20, 4.21, 4.22'de verildi. Saflaştırılan enzimlerin molekül ağırlıkları Çizelge 4.6'da verildi.



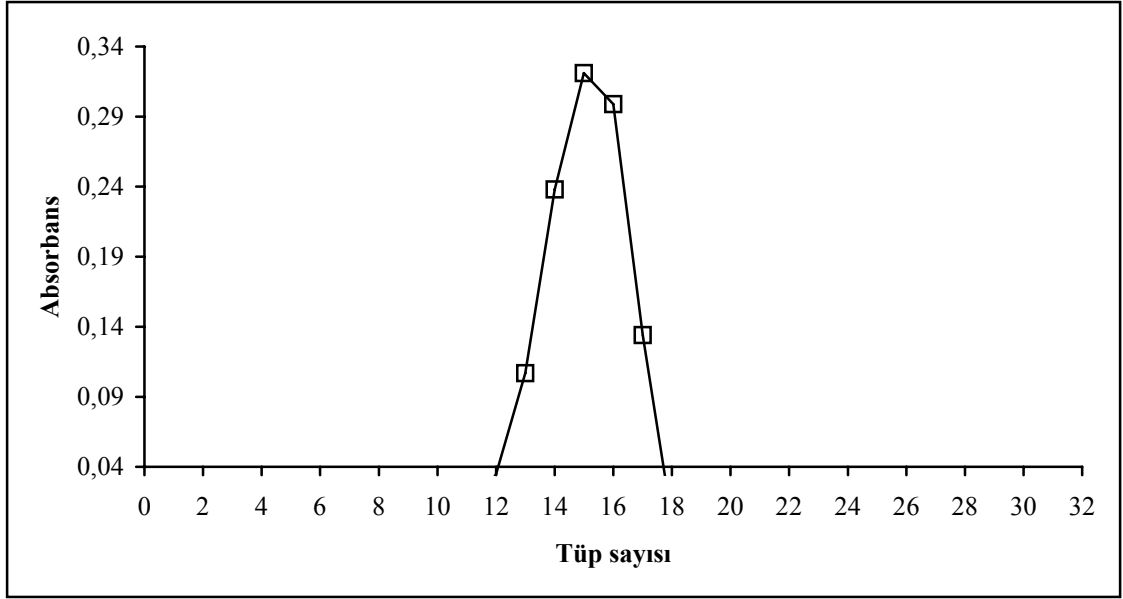
Şekil 4.19. Sığır serum albümin (66.000 Da), selülaz (45.000 Da) ve lipaz (31.000 Da) proteinleri ile hazırlanan jel filtrasyon kromatografisi standart eğrisi. Sephadex G-100, 0, 05 M NaH₂PO₄, 1 mM ditiotritol, pH:7 (Ve: elüsyon hacmi, Vo: Kolonun boşluk hacmi)



Şekil 4.20. *Agrobacterium radiobacter*' dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları. Sephadex G-100, 0,05 M NaH₂PO₄, 1 mM ditiotritol, pH:7



Şekil 4.21. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları. Sephadex G-100, 0,05 M NaH₂PO₄, 1 mM ditiotritol, pH:7



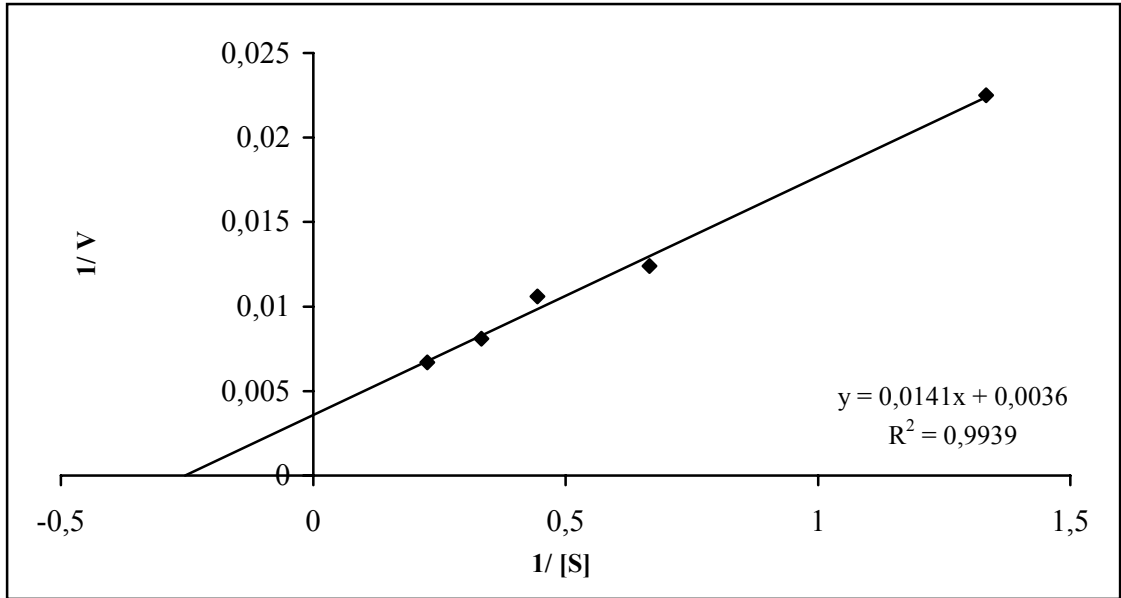
Şekil 4.22. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları. Sephadex G-100, 0,05 M NaH₂PO₄, 1 mM ditiotritol, pH:7

Çizelge 4.6. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin jel filtrasyon kromatografisi sonuçları

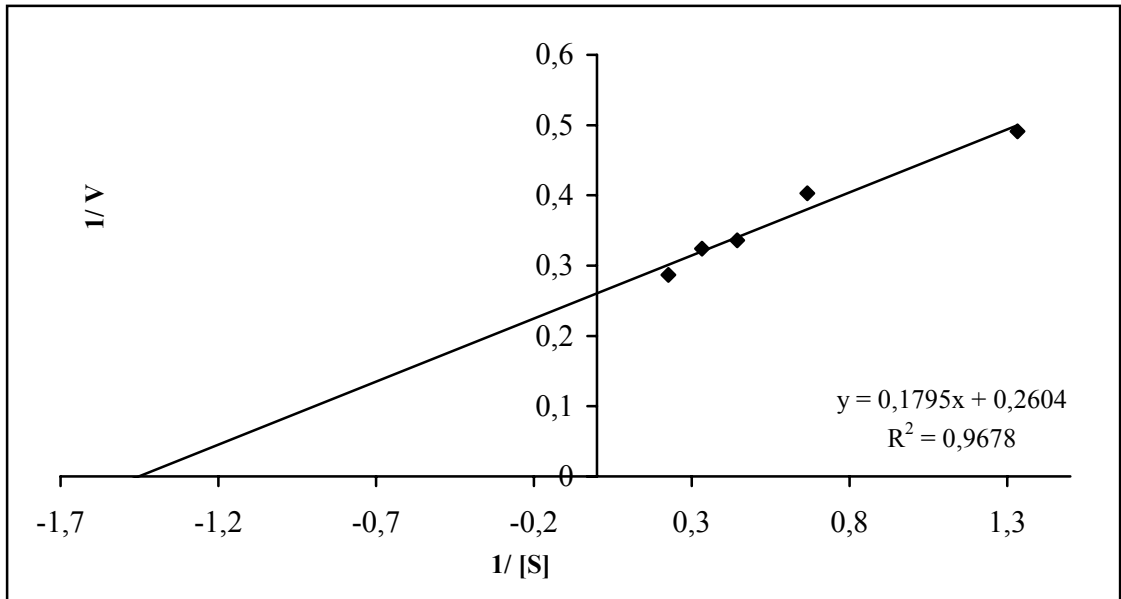
Enzimler	Molekül Ağırlıkları (Da)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilen pektin liyaz	66.000
<i>Xanthomonas campestris</i> üretilen pektin liyaz	77.545
<i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilen pektin liyaz	56.036

4.10 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin V_{max} ve K_M Değerlerinin Sonuçları

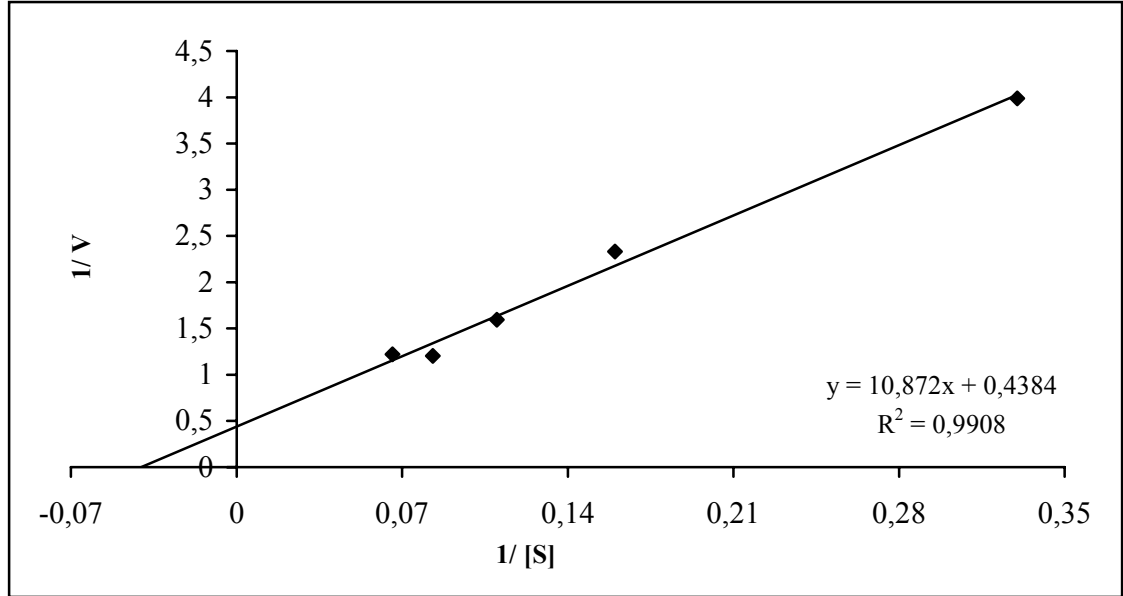
Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin V_{max} ve K_M değerlerini belirlemek için 3.2.13.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi (Şekil 4.23., 4.24. ve 4.25). Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanarak enzimler için hesaplanan K_M ve V_{max} değerleri Çizelge 4.7.'de verildi.



Şekil 4.23. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.24. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.25. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin Lineweaver-Burk grafiği

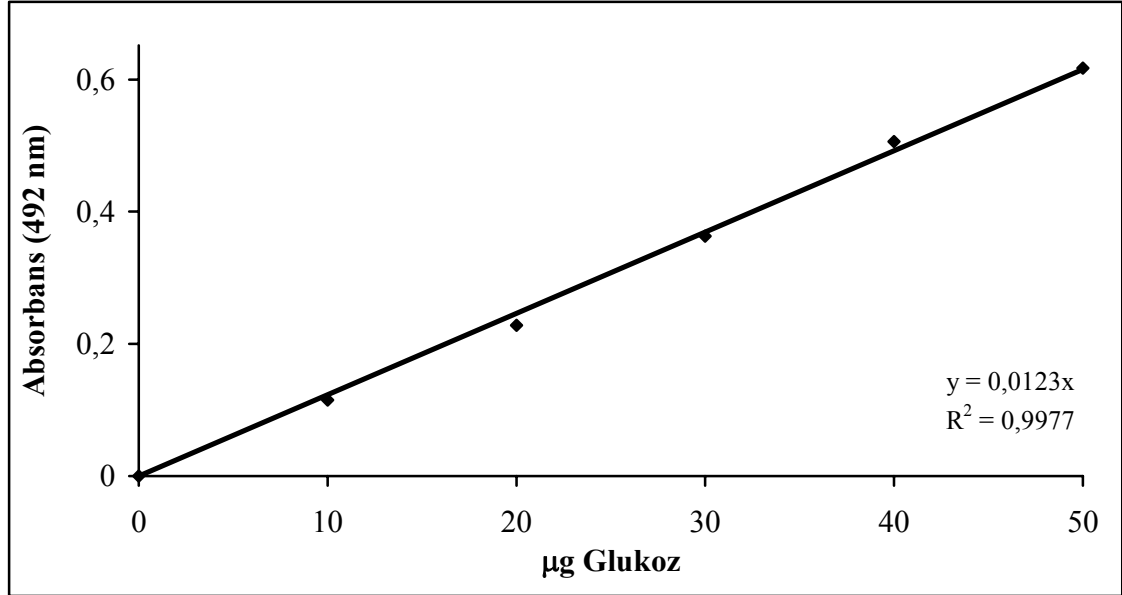
Çizelge 4.7. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanan V_{max} ve K_M değerleri

Enzimler	V_{max} ($\mu\text{mol/L. dak.}$)	K_M (mg/mL)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilen pektin liyaz	277, 78	3, 92
<i>Xanthomonas campestris</i> üretilen pektin liyaz	3, 84	0, 69
<i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilen pektin liyaz	2, 28	24, 80

4.11 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Karbohidrat İçeriklerinin Sonuçları

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin karbohidrat içeriğini belirlemek için fenol sülfürik asit metodu kullanıldı. Karbohidrat miktarını belirlemek için önce bir standart eğri hazırlandı. Saflaştırılan enzim çözeltisindeki karbohidrat içeriği bu eğriye göre be-

lirlendi (Çizelge 4.8.). Standart çözeltideki μg glukozla karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.26.'da gösterildi.



Şekil 4.26. Fenol sülfürik asit yöntemi ile karbohidrat tayini için kullanılan standart grafik

Agrobacterium radiobacter'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin mililitresinde 1,71 μg , 3,45 μg ve 6,31 μg protein içeren çözeltisindeki sırasıyla karbohidrat miktarları 3,25 μg , 7,31 μg ve 14,39 μg olarak bulunmuştur. Buradan enzimin ortalama olarak %68 oranında karbohidrat içerdiği hesaplanmıştır.

Xanthomonas campestris'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin mililitresinde 1,83 μg , 3,39 μg ve 5,44 μg protein içeren çözeltisindeki sırasıyla karbohidrat miktarları 3,09 μg , 6,55 μg ve 8,28 μg olarak bulunmuştur. Buradan enzimin ortalama olarak %63 oranında karbohidrat içerdiği hesaplanmıştır.

Geobacillus pallidus'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin mililitresinde 1,84 μg , 3,08 μg ve 4,31 μg protein içeren çözeltisindeki sırasıyla karbohidrat miktarları 4,95 μg , 7,72 μg ve 10,89 μg olarak bulunmuştur. Buradan enzimin ortalama olarak %72 oranında karbohidrat içerdiği hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin % karbohidrat içerikleri

Enzimler	% Karbohidrat
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilen pektin liyaz	68
<i>Xanthomonas campestris</i> üretilen pektin liyaz	63
<i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilen pektin liyaz	72

4.12 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Tirozin ve Triptofan Miktarlarının Tayininin Sonuçları

Saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin tirozin ve triptofan miktarları 3.2.15'da anlatıldığı gibi yapıldı ve 1000 µg enzim için hesaplandı (Çizelge 4.9.).

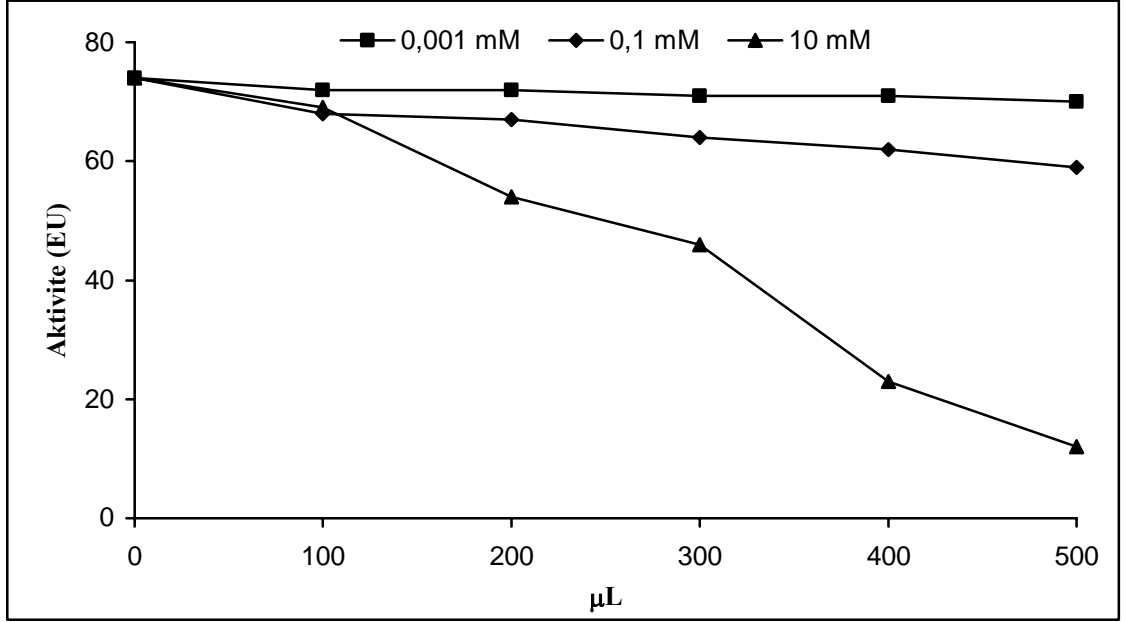
Çizelge 4.9. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin tirozin ve triptofan miktarları

Enzimler	Tirozin (µg)	Triptofan (µg)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> 'den üretilen pektin liyaz	47	98
<i>Xanthomonas campestris</i> üretilen pektin liyaz	16	23
<i>Geobacillus pallidus</i> 'dan üretilen pektin liyaz	30	26

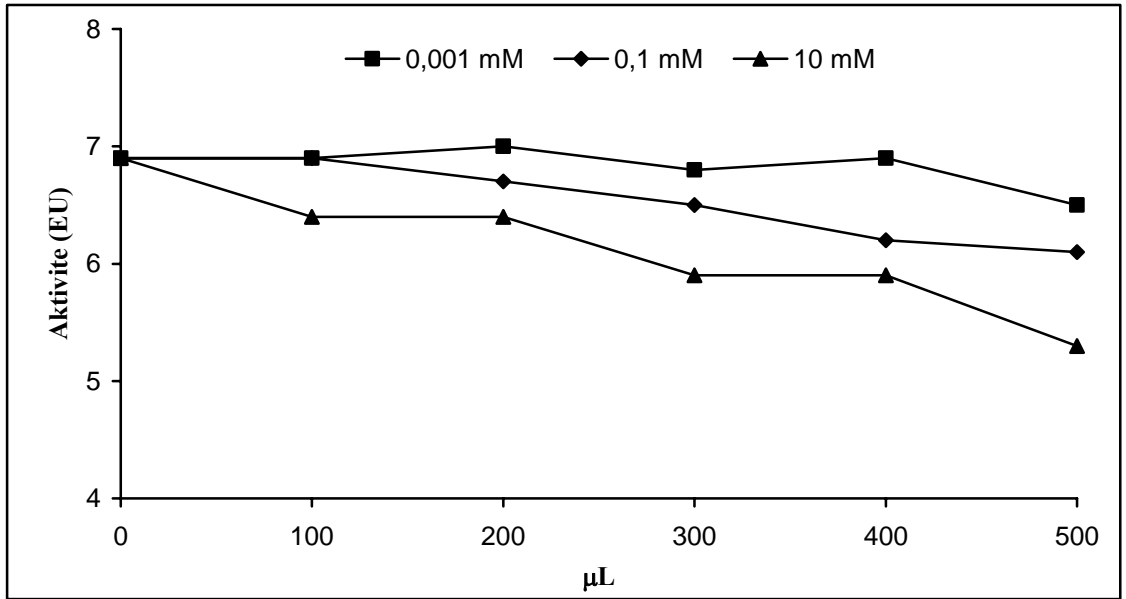
4.13 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Sitrik Asit ve Askorbik Asitin Etkisi

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , sitrik asit ve askorbik asitin etkisi üç farklı konsantrasyon ve her bir konsantrasyonda beş farklı hacimde aktivite ölçümü yapılarak incelendi. Bulunan değerlere göre aktivite birimi hesaplanarak aktivite-µL grafiği çizildi (Şekil 4.27.- 4.53.).

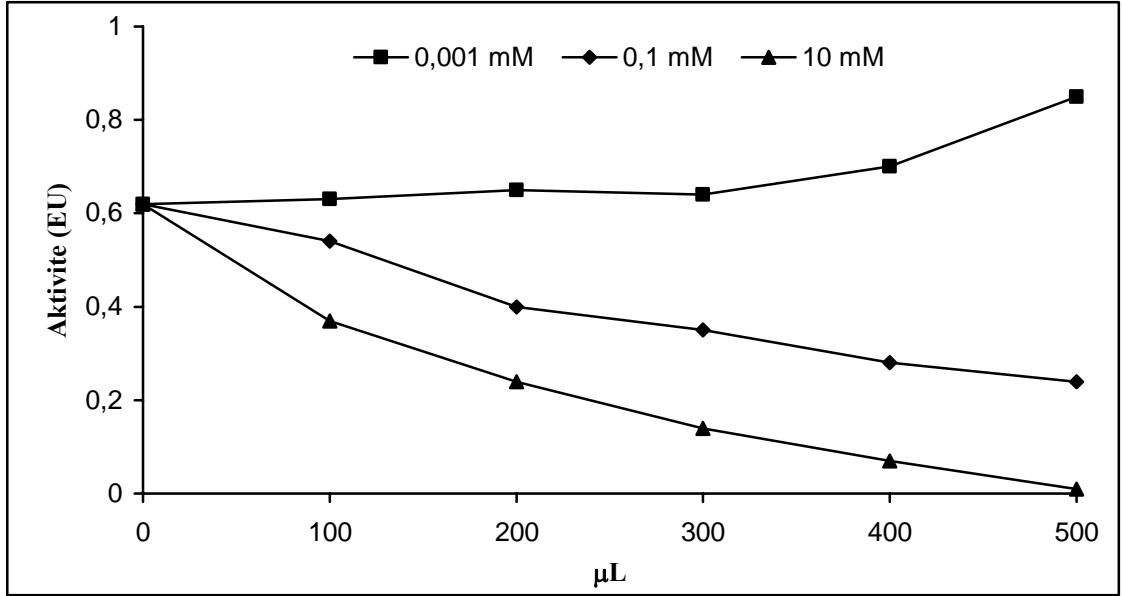
İnhibitörsüz aktivite 100 olarak kabul edildi ve 10^{-2} , 10^{-4} ve 10^{-6} M inhibitör konsantrasyonundaki aktiviteler buna göre oranlanarak Çizelge 4.10., 4.11. ve 4.12.'de verildi.



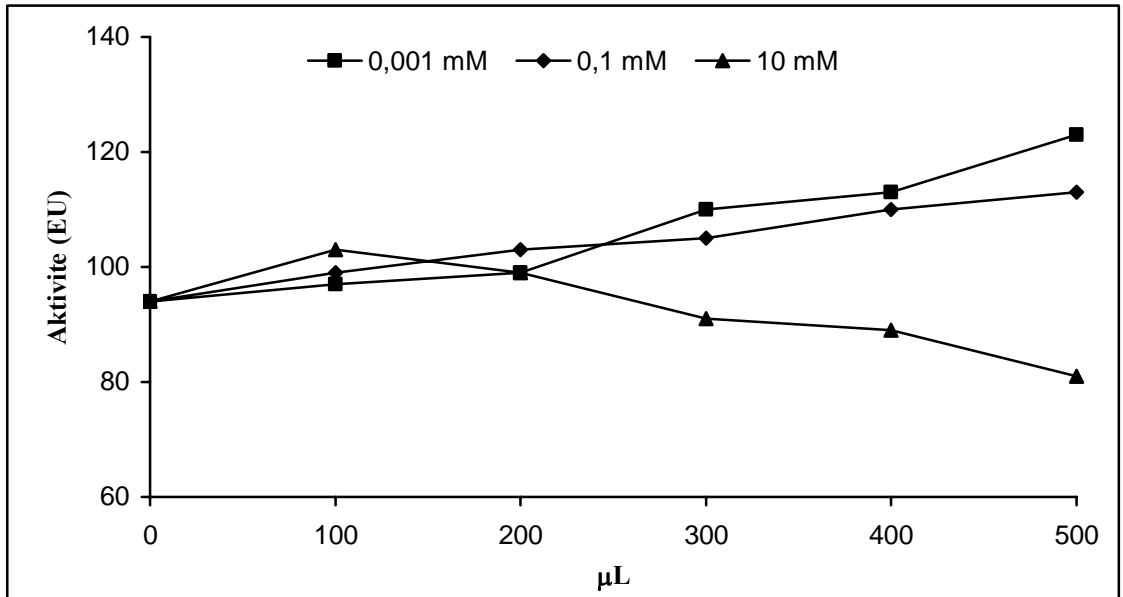
Şekil 4.27. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'nin etkisi



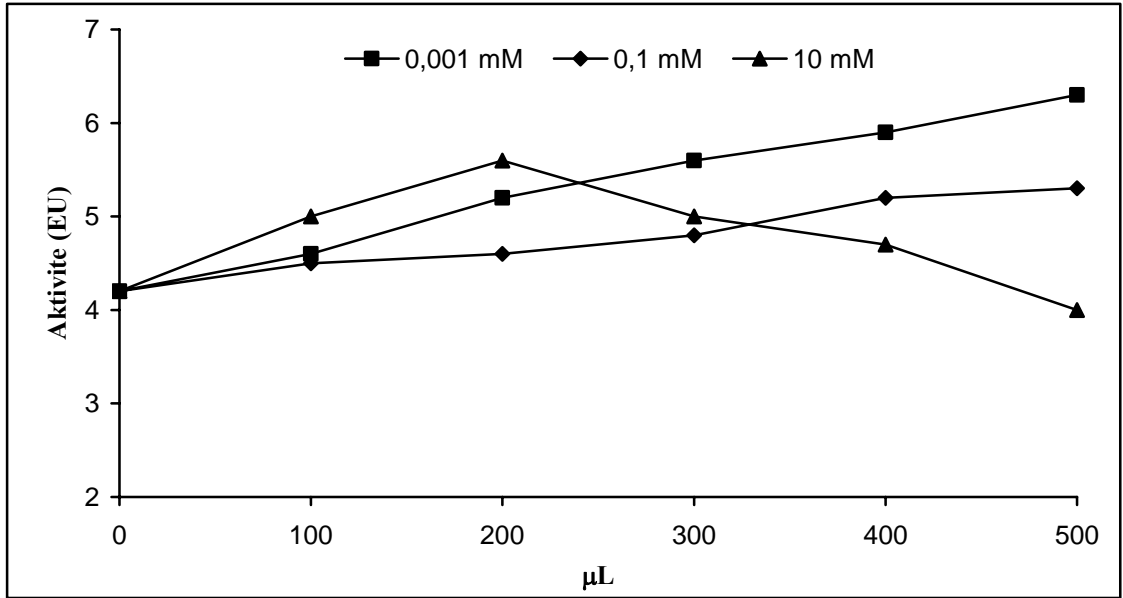
Şekil 4.28. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'nin etkisi



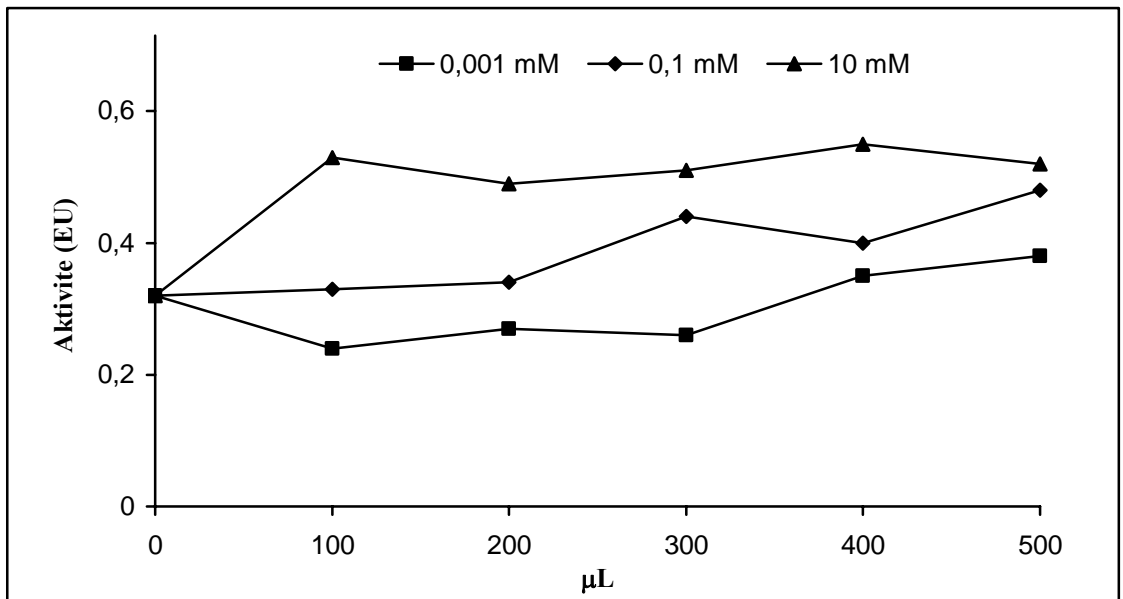
Şekil 4.29. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} 'nin etkisi



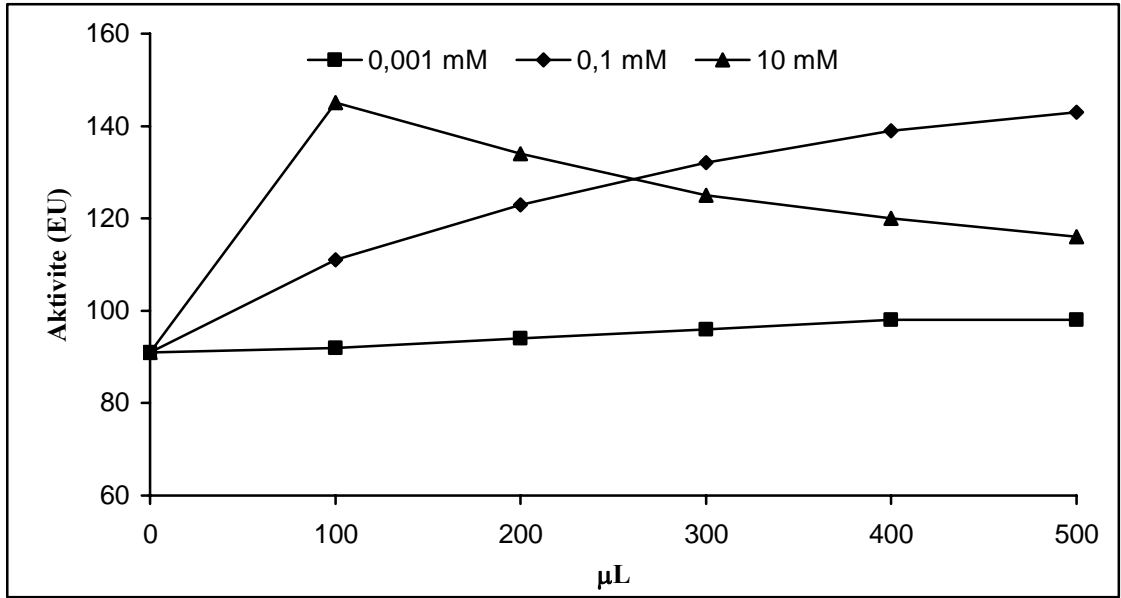
Şekil 4.30. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi



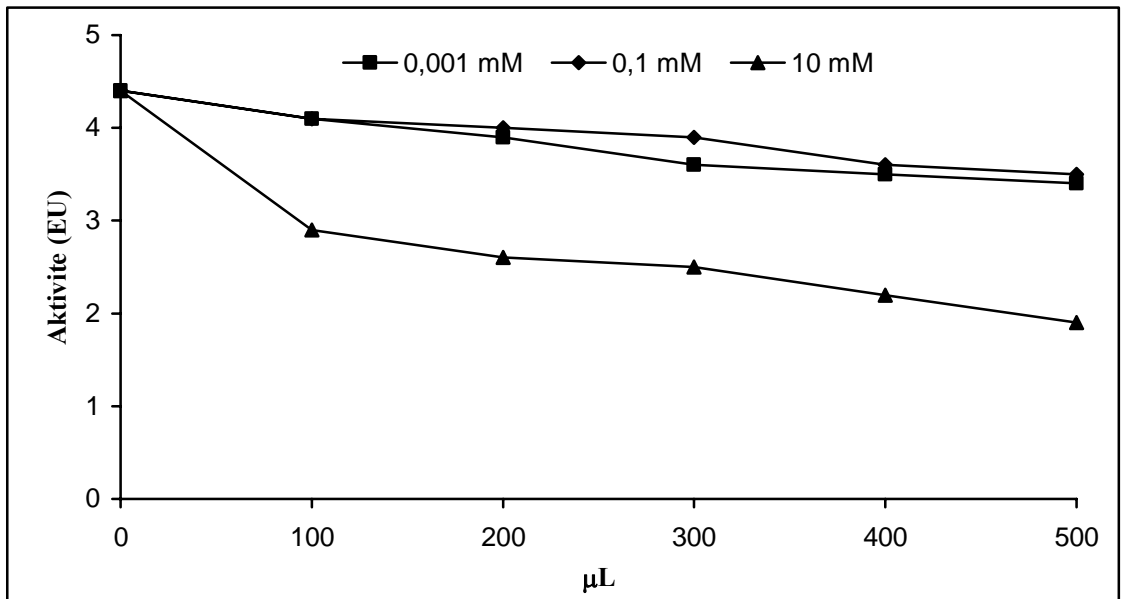
Şekil 4.31. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi



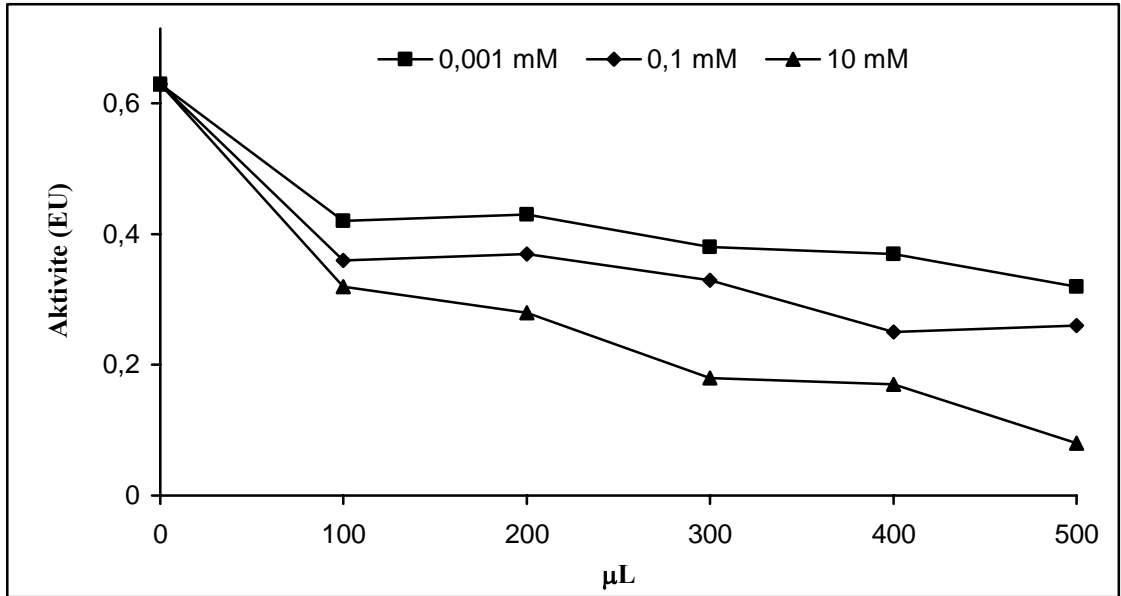
Şekil 4.32. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Mg^{2+} 'nin etkisi



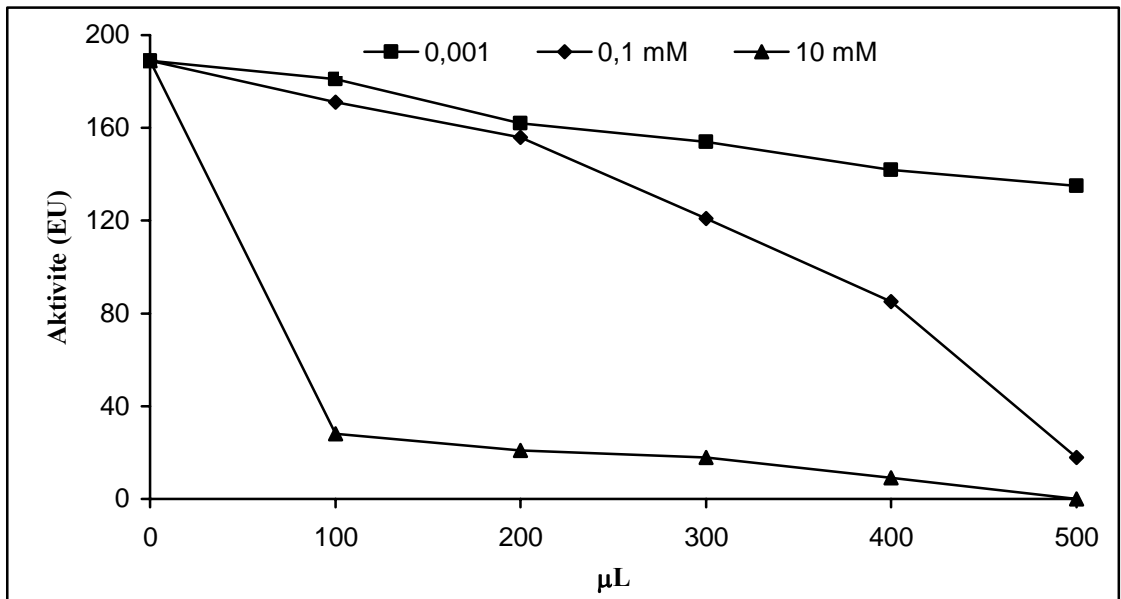
Şekil 4.33. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Co^{2+} 'nin etkisi



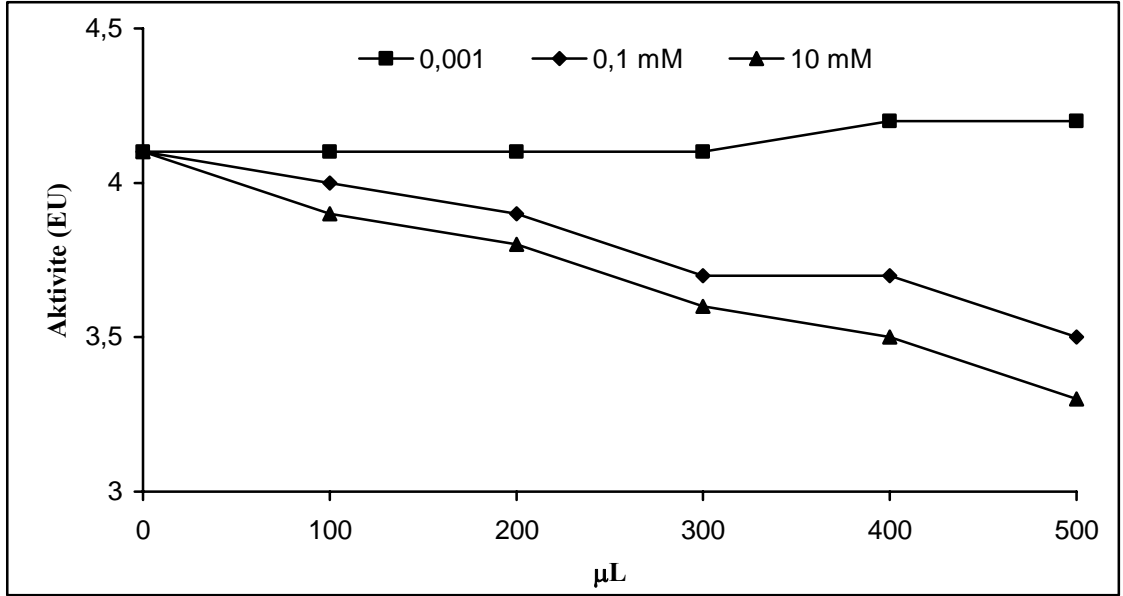
Şekil 4.34. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Co^{2+} 'nin etkisi



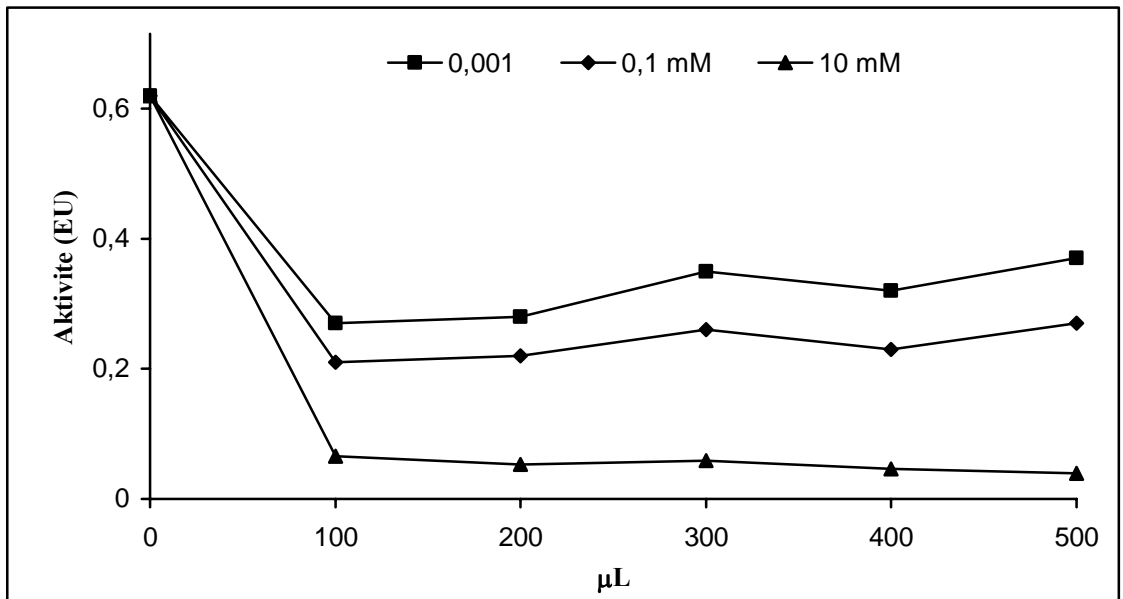
Şekil 4.35. *Geobacillus pallidus*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Co^{2+} 'nin etkisi



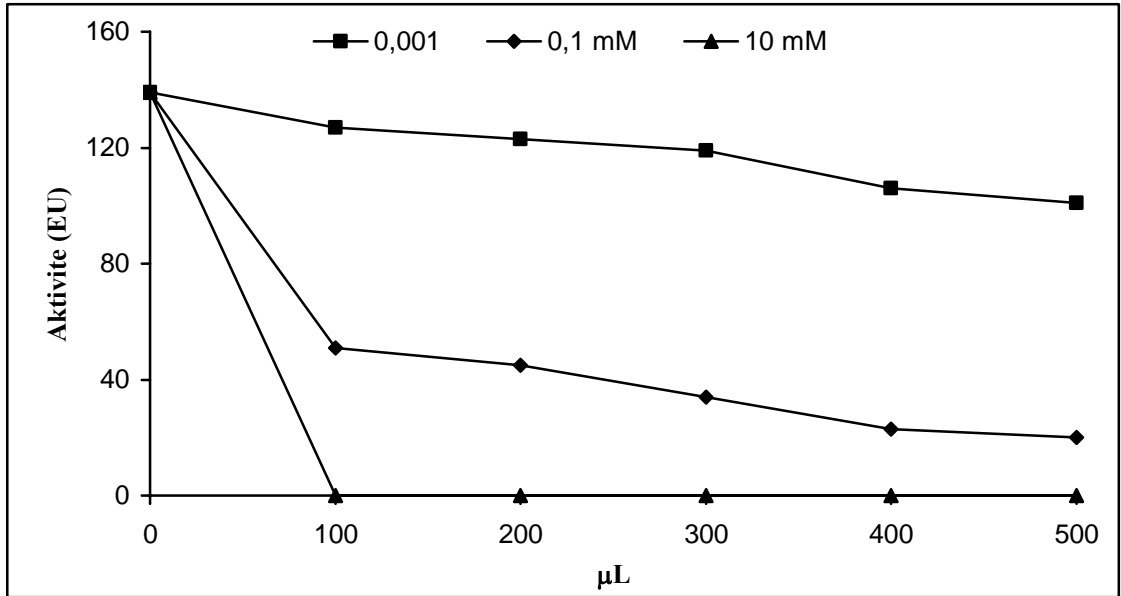
Şekil 4.36. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'nin etkisi



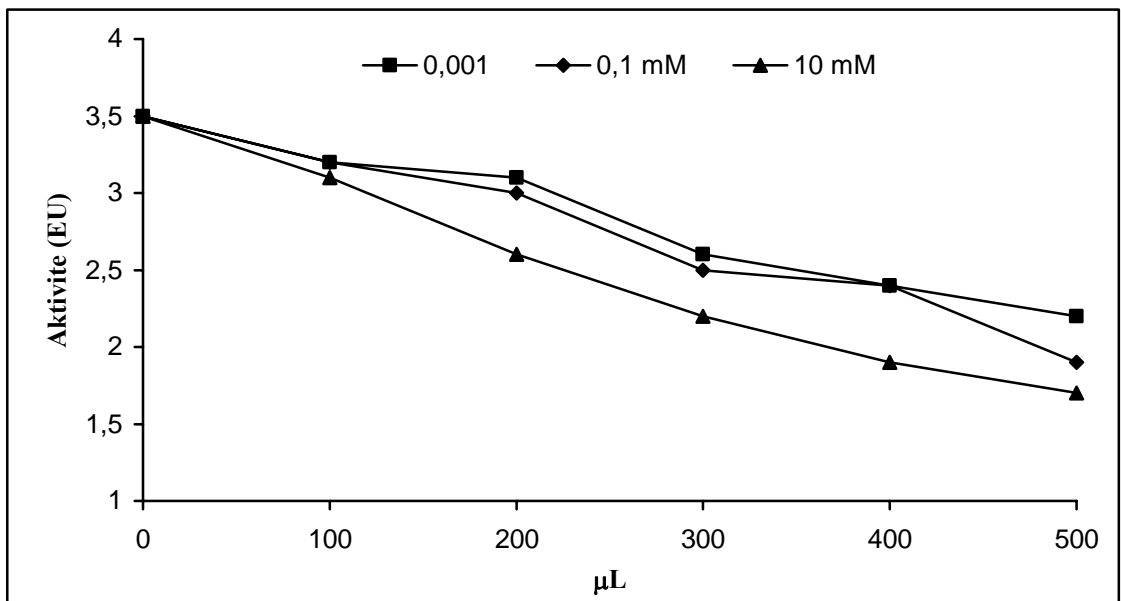
Şekil 4.37. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'nin etkisi



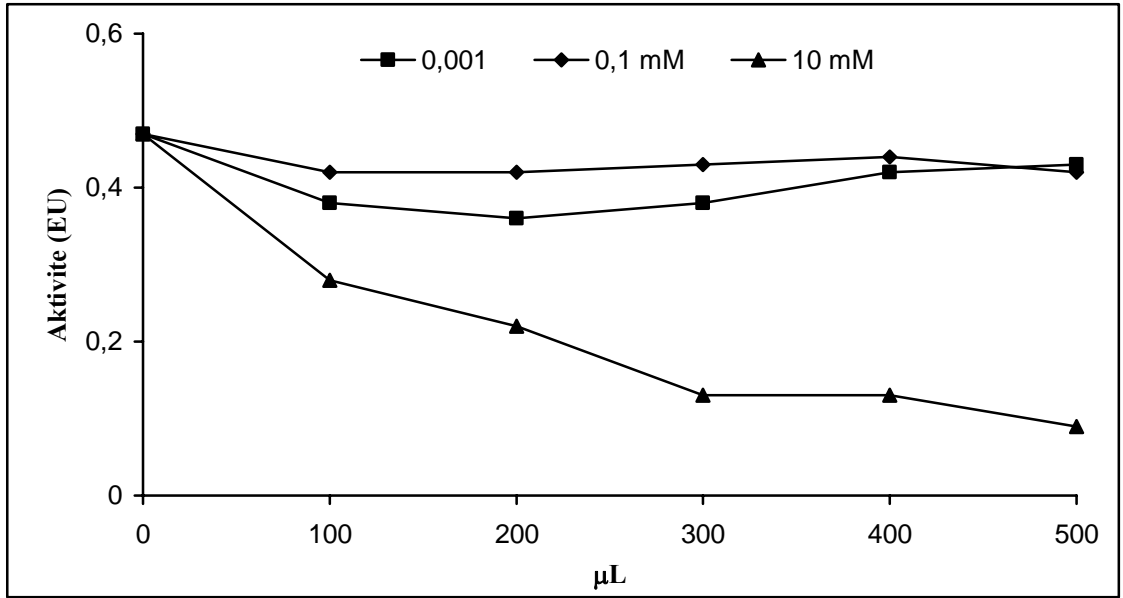
Şekil 4.38. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Fe^{3+} 'nin etkisi



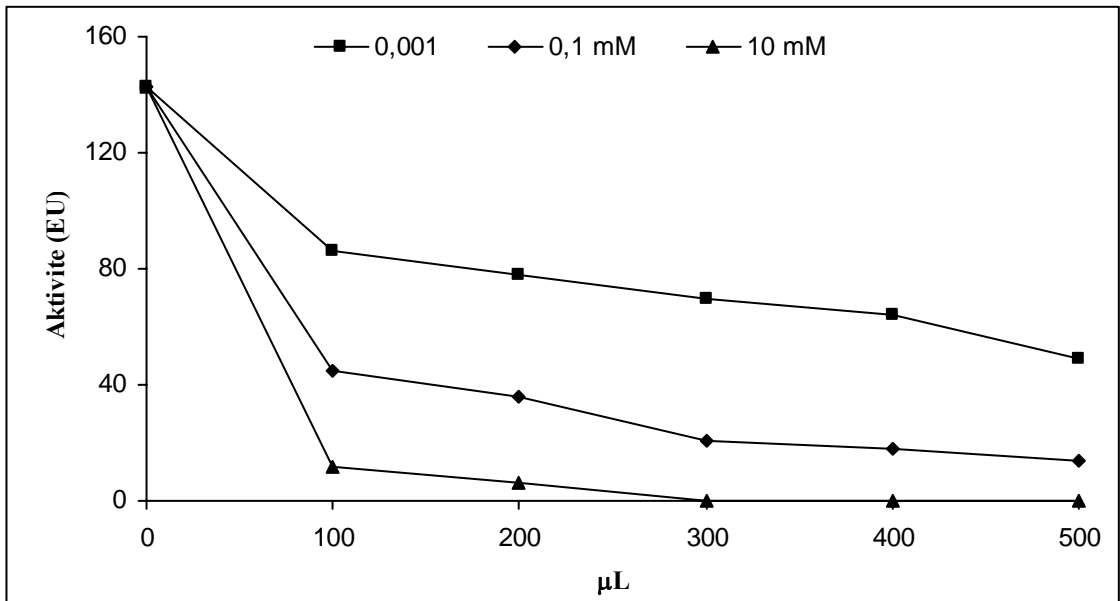
Şekil 4.39. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi



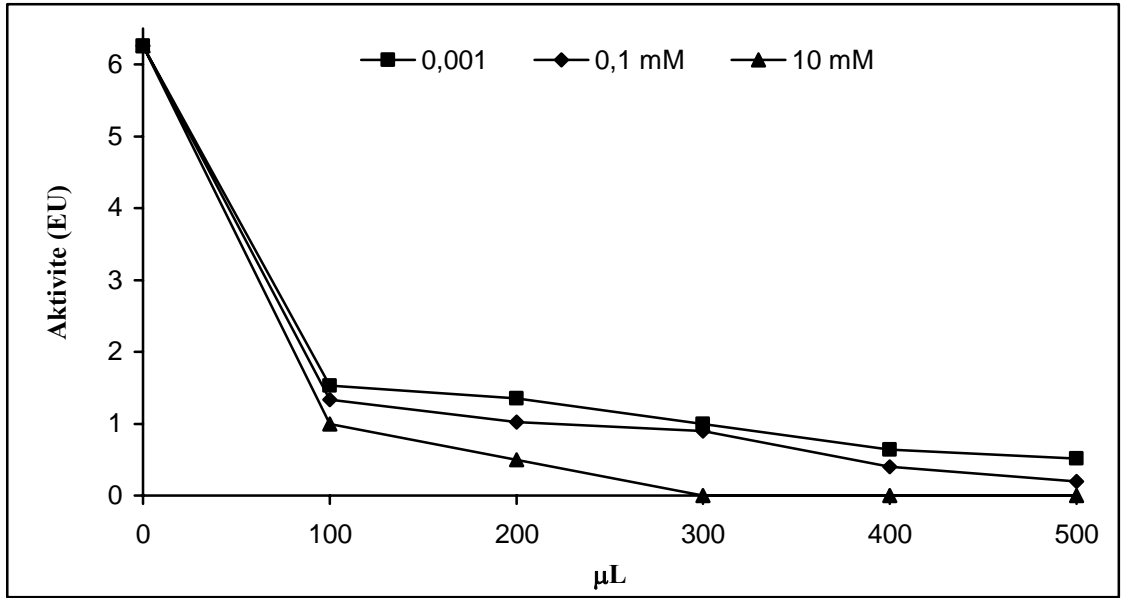
Şekil 4.40. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi



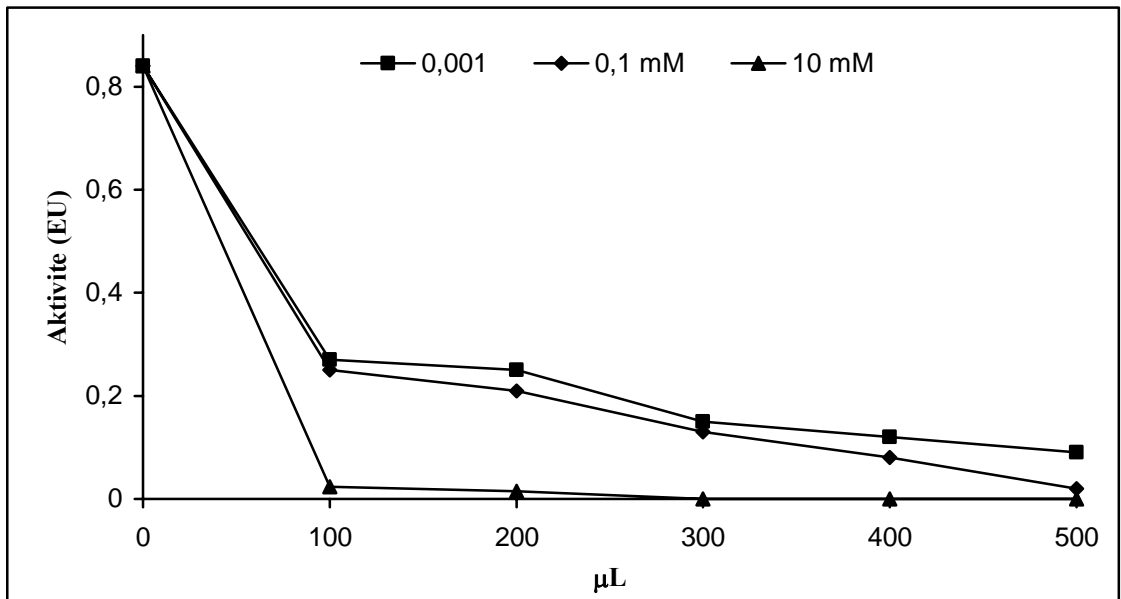
Şekil 4.41. *Geobacillus pallidus*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Zn^{2+} 'nin etkisi



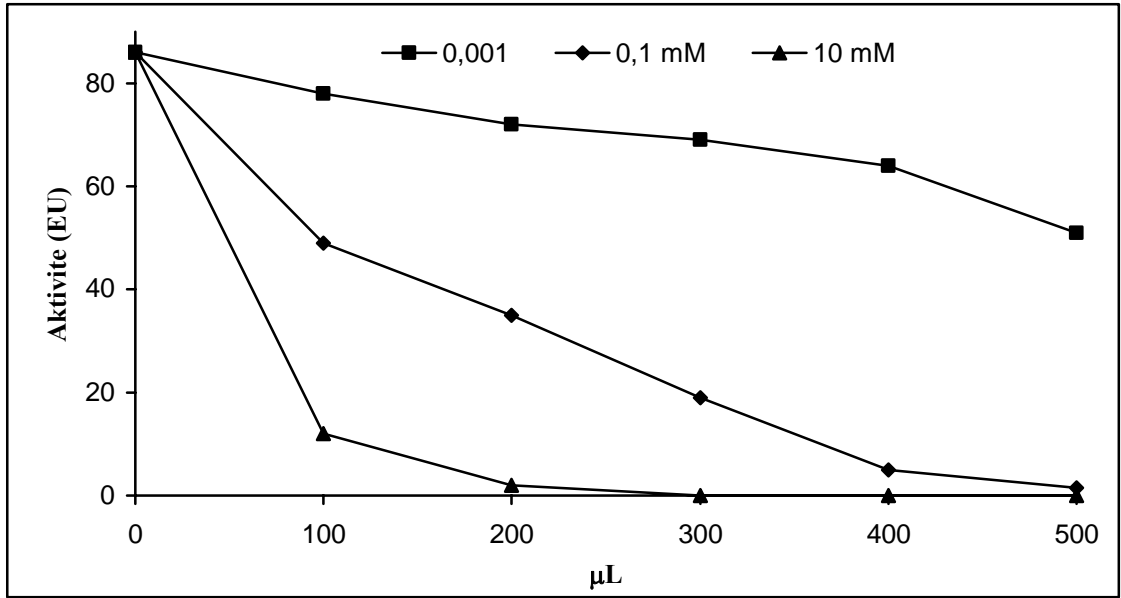
Şekil 4.42. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} 'nin etkisi



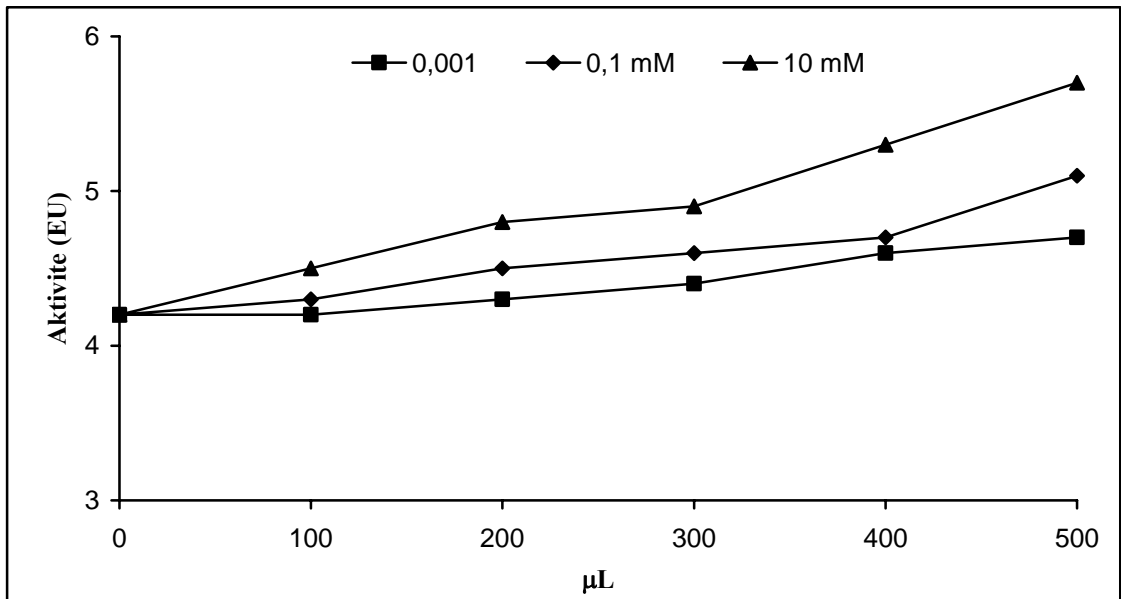
Şekil 4.43. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} 'nin etkisi



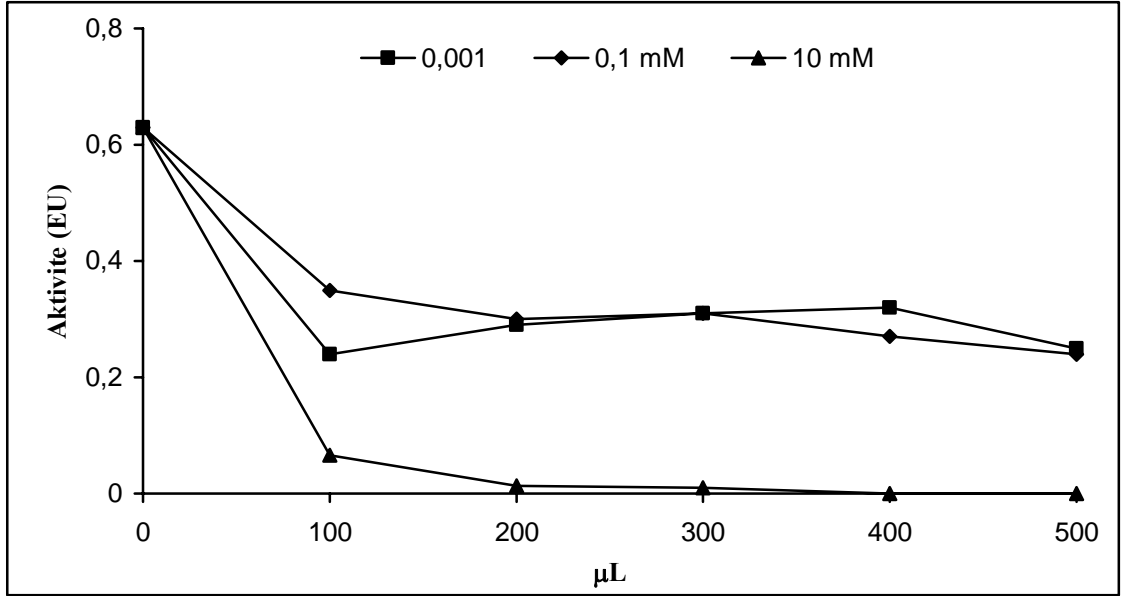
Şekil 4.44. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Hg^{2+} 'nin etkisi



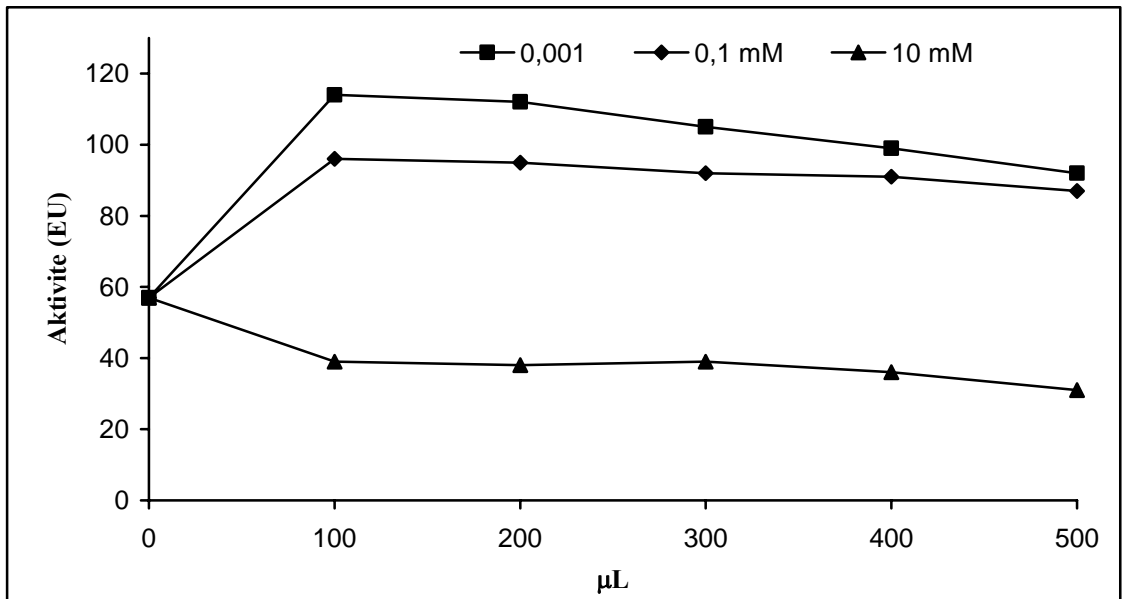
Şekil 4.45. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi



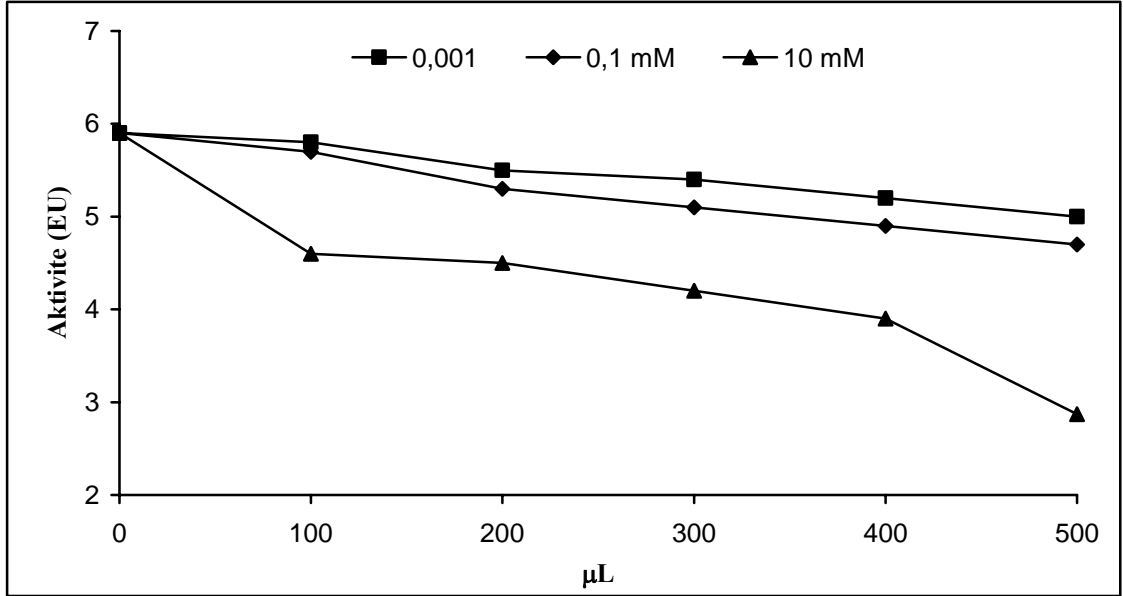
Şekil 4.46. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi



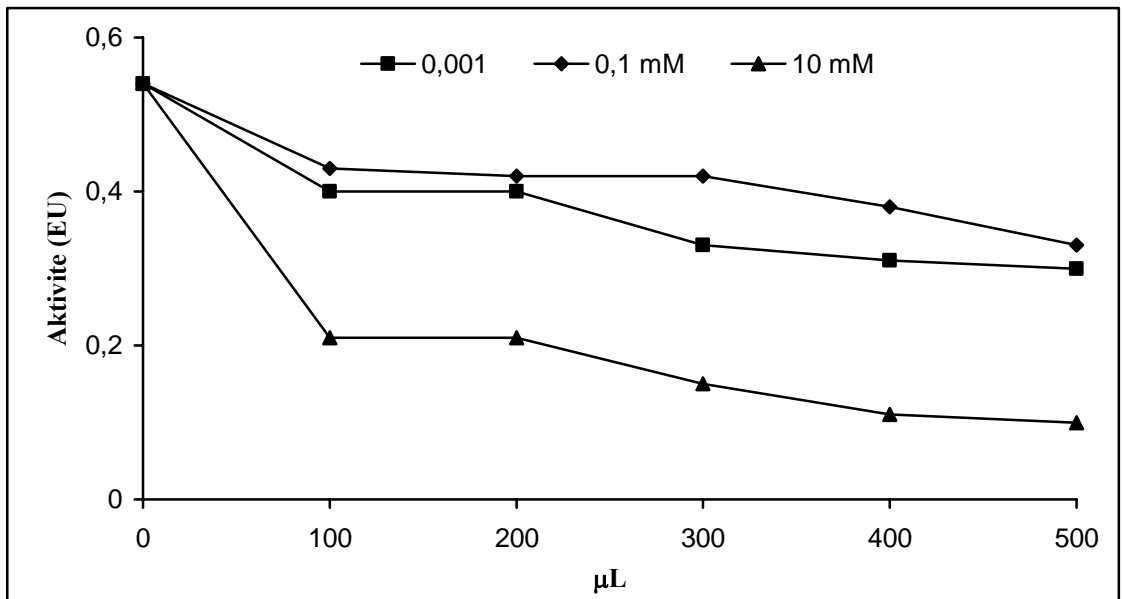
Şekil 4.47. *Geobacillus pallidus*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Cu^{2+} 'nin etkisi



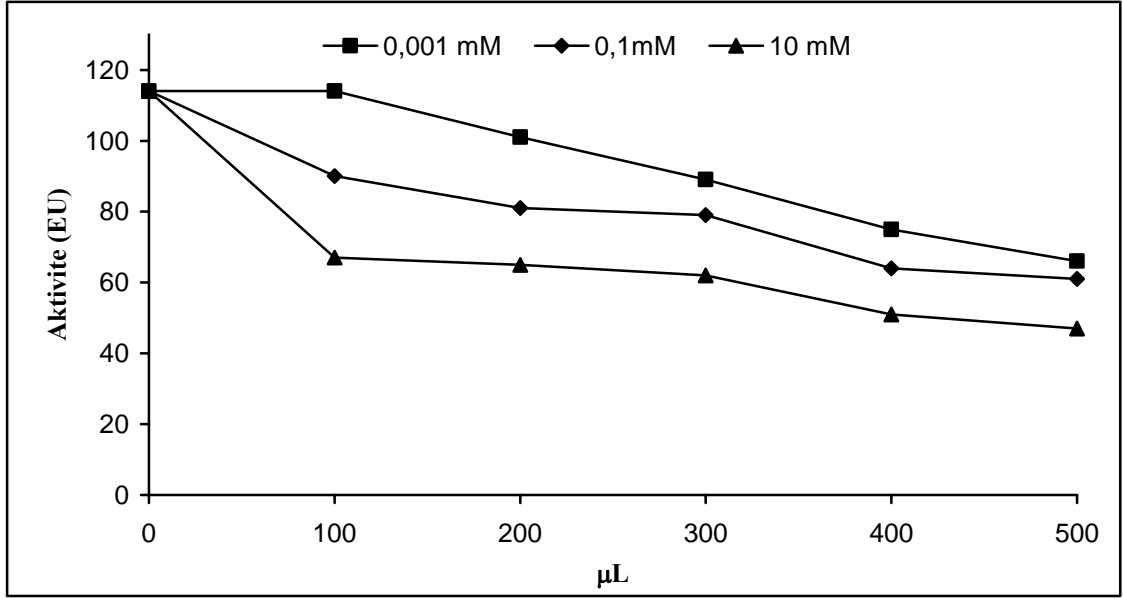
Şekil 4.48. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asidin etkisi



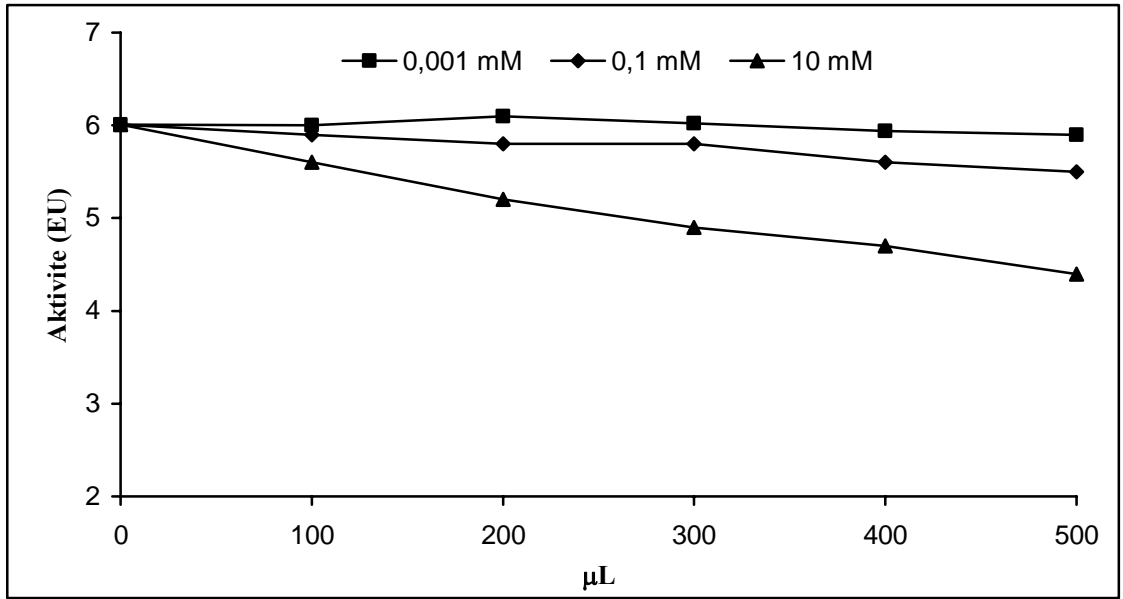
Şekil 4.49. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asidin etkisi



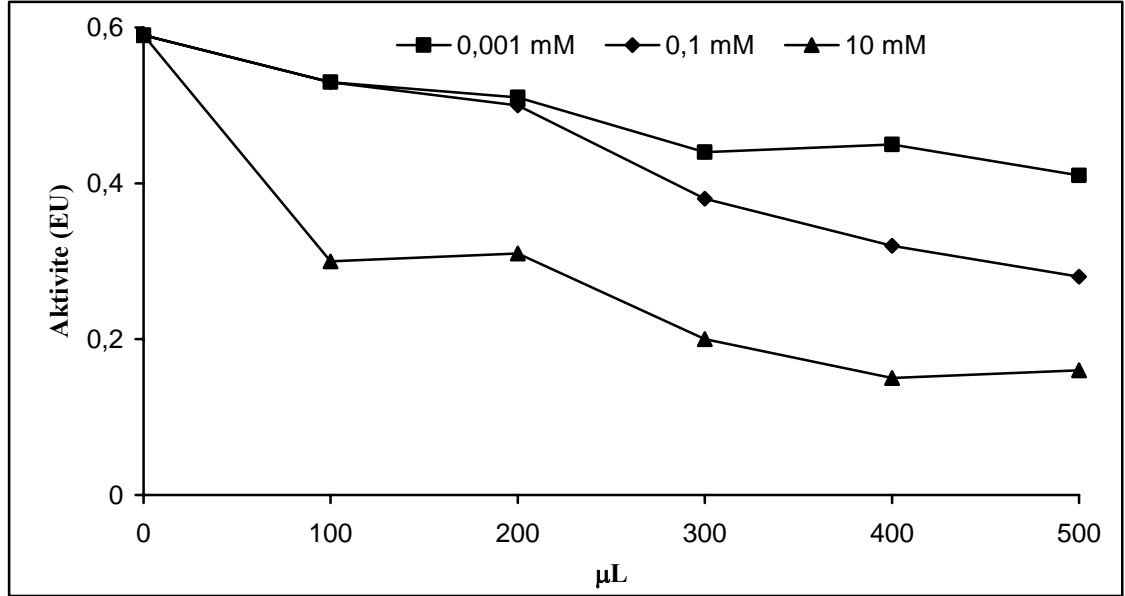
Şekil 4.50. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine askorbik asidin etkisi



Şekil 4.51. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sitrik asidin etkisi



Şekil 4.52. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sitrik asidin etkisi



Şekil 4.53. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine sitrik asidin etkisi

Çizelge 4.10. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , askorbik asit ve sitrik asidin etkisinin sonuçları

Konsantrasyon	% Aktivite		
	10^{-2} M	10^{-4} M	10^{-6} M
Kontrol	100	100	100
Ca^{2+}	16	80	95
Mg^{2+}	86	120	131
Co^{2+}	128	157	108
Fe^{3+}	0	10	71
Zn^{2+}	0	14	73
Hg^{2+}	0	10	34
Cu^{2+}	0	2	59
Askorbik asit	54	153	161
Sitrik asit	41	54	58

Çizelge 4.11. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , askorbik asit ve sitrik asitin etkisinin sonuçları

Konsantrasyon	% Aktivite		
	10^{-2} M	10^{-4} M	10^{-6} M
Kontrol	100	100	100
Ca^{2+}	77	88	94
Mg^{2+}	95	126	150
Co^{2+}	43	80	77
Fe^{3+}	81	85	102
Zn^{2+}	49	54	63
Hg^{2+}	0	3	8
Cu^{2+}	136	121	112
Askorbik asit	49	80	85
Sitrik asit	73	92	98

Çizelge 4.12. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , askorbik asit ve sitrik asitin etkisinin sonuçları

Konsantrasyon	% Aktivite		
	10^{-2} M	10^{-4} M	10^{-6} M
Kontrol	100	100	100
Ca^{2+}	2	39	137
Mg^{2+}	163	150	119
Co^{2+}	13	41	51
Fe^{3+}	6	44	60
Zn^{2+}	19	89	92
Hg^{2+}	0	2	11
Cu^{2+}	0	38	40
Askorbik asit	19	61	56
Sitrik asit	27	48	70

4.14 *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan Üretilip Saflaştırılan Pektin Liyaz Enzimleriyle Yapılan Meyve Suyu Elde Etme Sonuçları

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri meyve suyu üretiminde kullanılarak meyve suyu elde etme verimini nasıl etkilediği incelendi. Saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak amacıyla ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus da meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanıldı.

Yerel marketlerden alınan elma (Amasya), muz, havuç ve şeftali püre haline getirilerek meyve suyu elde edildi. Elde edilen meyve suyunun hacminin kontrole göre kaç kat arttığı 100 gram meyve için hesaplandı ve Çizelge 4.13, 4.14, 4.15'de verildi. Kalan kuru madde miktarı kontrol ile karşılaştırılarak % kaç oranında parçalandığı 100 gram meyve için hesaplandı ve Çizelge 4.16, 4.17, 4.18'de verildi.

Çizelge 4.13. *Agrobacterium radiobacter*'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen meyve suyu miktarının kontrole göre artış oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Pektin liyaz	Ham Ekstrakt	Pectinex 100 L Plus
Elma	Hacim (mL)	125	164	142	176
	Verim %	-	31	14	41
Muz	Hacim (mL)	20	180	175	195
	Verim %	-	800	775	875
Havuç	Hacim (mL)	162	202	190	210
	Verim %	-	25	17	30
Şeftali	Hacim (mL)	100	118	110	142
	Verim %	-	18	10	42

Çizelge 4.14. *Xanthomonas campestris*'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen meyve suyu miktarının kontrole göre artış oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Pektin liyaz	Ham Ekstrakt	Pectinex 100 L Plus
Elma	Hacim (mL)	123	140	125	171
	Verim %	-	14	2	39
Muz	Hacim (mL)	10	22	42	196
	Verim %	-	120	320	1860
Havuç	Hacim (mL)	150	170	160	178
	Verim %	-	12	7	19
Şeftali	Hacim (mL)	94	122	140	160
	Verim %	-	30	49	70

Çizelge 4.15. *Geobacillus pallidus*'dan elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen meyve suyu miktarının kontrole göre artış oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Pektin liyaz	Ham Ekstrakt	Pectinex 100 L Plus
Elma	Hacim (mL)	123	131	148	171
	Verim %	-	7	20	39
Muz	Hacim (mL)	10	112	50	196
	Verim %	-	1020	400	1860
Havuç	Hacim (mL)	150	164	168	178
	Verim %	-	9	12	19
Şeftali	Hacim (mL)	94	102	115	160
	Verim %	-	9	22	70

Çizelge 4.16. *Agrobacterium radiobacter*'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinin kuru maddelerindeki (K.M.) yüzde parçalanma oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Pektin liyaz	Ham Ekstrakt	Pectinex 100 L Plus
Elma	K.M. (g)	3,3	2,9	3,1	2,5
	Azalma %		12,1	6,1	24,2
Muz	K.M. (g)	19,0	4,8	7,3	6,6
	Azalma %		75,0	62,0	65,0
Havuç	K.M. (g)	3,4	2,7	3,0	2,3
	Azalma %		21,0	12,0	33,0
Şeftali	K.M. (g)	4,5	4,2	4,4	2,9
	Azalma %		7,0	2,0	36,0

Çizelge 4.17. *Xanthomonas campestris*'den elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinin kuru maddelerindeki (K.M.) yüzde parçalanma oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Pektin liyaz	Ham Ekstrakt	Pectinex 100 L Plus
Elma	K.M. (g)	4,2	4,1	3,9	2,7
	Azalma %		2,4	7,1	32,5
Muz	K.M. (g)	16,1	15,3	13,3	7,6
	Azalma %		5,0	17,4	52,8
Havuç	K.M. (g)	3,6	3,3	2,5	2,2
	Azalma %		8,3	30,6	38,9
Şeftali	K.M. (g)	4,6	4,5	4,4	1,4
	Azalma %		2,2	4,3	69,6

Çizelge 4.18. *Geobacillus pallidus*'dan elde edilen pektin liyaz, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinin kuru maddelerindeki (K.M.) yüzde parçalanma oranı

Meyve (100 g)		Kontrol	Pektin liyaz	Ham Ekstrakt	Pectinex 100 L Plus
Elma	K.M. (g)	4,0	3,1	2,9	2,7
	Azalma %		22,5	27,5	32,5
Muz	K.M. (g)	16,1	12,8	14,7	7,6
	Azalma %		20,5	8,7	52,8
Havuç	K.M. (g)	3,6	3,4	3,3	2,2
	Azalma %		5,6	8,3	38,9
Şeftali	K.M. (g)	4,6	4,5	4,4	1,4
	Azalma %		2,2	4,3	69,6

5 TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, pektin liyaz enzimini üreten yeni ve patojen olmayan mikroorganizmalar aranmıştır. Yapılan çalışma sonunda ekstraselüler pektin liyaz enzimini üreten *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus* olmak üzere üç farklı tür bulunmuştur. Bulunan bu türlerden farklı fermantasyon ortamları kullanılarak en yüksek verimle pektin liyaz enzimi üretilmiştir.

Fermantasyon ortamından elde edilen ekstraktlardan DEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılarak pektin liyaz enzimleri saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Saflaştırılan enzimler meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanılarak meyve suyu elde etme verimini nasıl değiştirdikleri incelenmiştir. Çalışma sonuçları tartışılmadan önce kullanılan yöntemlerin seçiliş nedenleri şöyle izah edilebilir:

Pektin liyaz enzimlerinin iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması esnasında eluatlardaki nispi protein miktarları 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlenmiştir. Kullanılan bu metot protein yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır (McIntosh 1969). Bu metot da protein çözeltilisine herhangi bir reaktif katılmadan direkt köre karşı absorbans okutulmaktadır. Saflaştırılan enzim çözeltilerinde bulunan protein miktarları Bradford metodu kullanılarak ölçülmüştür. Metot 1-200 µg aralığında hassas olup bozucu faktörleri azdır ve kısa zamanda bitirilebilmektedir (Bradford 1976).

Pektin liyaz aktivitesi renkli türev oluşum yöntemiyle belirlenmiştir (Nedjma *et al.* 2001). Aktivite tayini, pektin liyaz aktivitesi sonucunda oluşan doymamış uronik ester türevlerinin tiyobarbütirik asit ile oluşturduğu renkli bileşiklerin 550 nm'de absorpsiyonunun ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Elde edilen renkli türevin molar ekstinksiyon (ϵ) katsayısı $54.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 'dir. Bir enzim ünitesi (EU) 1 dakikada 1 nmol galakturonik asit oluşturan enzim miktarı olarak bulunmuştur. Pektin liyaz aktivi-

tesini tayin eden farklı metotlar bulunmaktadır. Kullandığımız bu metot daha hassas, kullanışlı ve spesifiktir.

Pektin liyaz aktivite tayini için kullanılan metotlardan biri, enzimatik reaksiyon sonunda oluşan doymamış uronik ester türevlerinin 230-240 nm arasında absorbanlarının okunmasına dayanmaktadır ve molar ekstinksiyon katsayısı $5.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 'dir. Kullanılan renkli türev oluşum metodunun molar ekstinksiyon katsayısının bu metottan 10 kat daha büyük olmasından dolayı daha hassastır. Ayrıca bu yöntemde enzim çözeltisinin saf olması gerekmektedir. Oysa ki bizim fermantasyon ortamından elde edilen ham ekstraktlarda da aktivite tayini yapmamız gerekmektedir. Bu nedenle renkli türev oluşum yöntemi daha kullanışlıdır.

Pektin liyaz enziminin aktivite tayininde kullanılan diğer yöntemde enzimatik reaksiyon sonunda oluşan ürünlerin renkli türevleri oluşturularak aktivite belirlenmektedir. Pektin liyaz enzimi pektin molekülünü parçalarken poligalakturonaz enziminden farklı olarak hidrolaz reaksiyonu ile doymuş ürünler yerine β -eliminasyonu ile doymamış uronik esterleri oluşturmaktadır. Pektin liyaz enzim aktivitesinde kullanılan diğer renkli türev oluşum yöntemleri doymamış ürünler ile de renkli türevler oluşturduklarından pektin liyaz enzim aktivitesine spesifik değildir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan pektin liyaz enzimini üretmek için farklı fermantasyon ortamları kullanılmıştır. *Agrobacterium radiobacter* ve *Xanthomonas campestris*'den pektin liyaz enzimini besi yeri olarak kepeğin kullanıldığı katı ortam fermantasyonu ile üretilmiştir. *Geobacillus pallidus*'dan pektin liyaz enzimi aynı yöntemle üretilmediği için NB'nin (Nutrient Broth) kullanıldığı sıvı ortam fermantasyonu kullanılmıştır.

Mikroorganizmaları üretmek için kullanılan yöntemlerden biri olan katı ortam fermantasyon yöntemi oldukça avantajlı bir metottur. Devasa miktarlarda gıda ve tarımsal atıklar bulunmaktadır. Bu atıkların karbonhidrat ve diğer besinlerce oldukça zengin oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla katı ortam fermantasyon tekniği kullanılarak temel kim-

yasal maddeler ve enzimlerin üretimi için bu atıkların kullanılabilmesi katı ortam fermantasyonu tekniğinin bir avantajıdır. Katı ortam fermantasyonu metodunun en büyük avantajı ise temel substrat olarak kullanılan materyalin oldukça ucuz olmasıdır (Couto and Sanroman 2006).

Pektin liyaz enzimi DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmıştır. Pektin liyaz enzimini saflaştırmak için literatürlerde verilen metotlar denenmiş ve enzimi en yüksek verimle saf olarak elde edilebilen bu metot seçilmiştir.

Enzim saflığı ve alt biriminin olup olmadığı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

Saflaştırılan enzimlerin V_{max} ve K_M 'leri Lineweaver-Burk metodu kullanılarak bulunmuştur. Bu yöntem V_{max} ve K_M 'leri bulmak için literatürde en çok kullanılan yöntemdir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen pektin liyaz enzimleri DEAE-selüloz anyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılmış ve aktivite-absorbans grafikleri Şekil 4.2. , 4.3. ve 4.4.'da verilmiştir. Ayrıca homojenatlar ve saf enzim için spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma çizelgeleri çıkarılmıştır. Çizelgelere bakıldığında *Agrobacterium radiobacter*'den üretilen pektin liyaz enziminin 23 kat (Çizelge 4.1.), *Xanthomonas campestris*'den üretilen pektin liyaz enziminin 43 kat (Çizelge 4.2.) ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen pektin liyaz enziminin ise 34 kat (Çizelge 4.3.) kat saflaştırıldığı görülmektedir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan PL enzimlerinin saflıkları ve alt birimlerinin olup olmadığı SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Elde edilen elektroforez görüntülerinde tek bandın varlığı enzimlerin saf olduklarını göstermektedir. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan PL enziminin aynı molekül ağırlığına sahip dört alt birime sahip olduğu, *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan PL enziminin ise aynı molekül ağırlığına sahip iki alt birime sahip olduğu düşünülmektedir.

Geobacillus pallidus'dan üretilip saflaştırılan PL enziminin ise monomer olduğu sanılmaktadır.

Saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum pH'ları ve aktif oldukları pH aralıkları bulunmuştur. Elde edilen verilerden yararlanılarak aktivite-pH grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.8., 4.9. ve 4.10.'da verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.4.'de toplu olarak sonuçlar verilmektedir. Şekil 4.8.'de de görüldüğü gibi *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum pH'sı 8'dir ve pH: 5-9 aralığında ise aktivitesini korumaktadır.

Xanthomonas campestris ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum pH'ları 9'dur ve sırasıyla aktif olduğu pH aralıkları 4-11 ve 5-11 olarak belirlenmiştir. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan PL enziminin optimum pH'sı 8 ve aktif olduğu pH aralığı ise 5-9'dur. *Geobacillus pallidus* ve *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan PL enzimlerinin yüksek aktivite gösterdikleri pH aralığı 8-9 olduğu grafiklerden görülmektedir. *Xanthomonas campestris* üretilip saflaştırılan PL enziminin ise oldukça geniş bir pH aralığında yüksek aktivite sahip olduğu görülmektedir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum sıcaklığı ve aktivite gösterdiği sıcaklık aralıkları da belirlenmiştir. Elde edilen verilerden yararlanılarak aktivite-sıcaklık grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.11. , 4.12. ve 4.13.'de verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.5.'de sonuçlar toplu olarak da verilmektedir.

Şekil 4.11. ve 4.13.'de *Agrobacterium radiobacter* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarının 60°C olduğu görülmektedir. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan PL enziminin optimum sıcaklığı ise 50°C olarak bulunmuştur. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan PL enziminin aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 20-80°C iken *Xanthomonas campestris* ve

Geobacillus pallidus'dan üretilip saflaştırılan PL enzimlerinin aktivite gösterdikleri sıcaklık aralığı 0-80°C olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlara bakılarak *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan PL enziminin oda sıcaklığının altında aktivite göstermediği anlaşılmaktadır. Ayrıca termofilik bir kaynaktan izole edilen *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin diğerlerinden farklı olarak yüksek sıcaklıklarda da oldukça iyi aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin sıcaklık stabiliteleri incelenmiştir. Elde edilen verilerden yararlanılarak aktivite-zaman grafikleri çizilmiş ve Şekil 4.14., 4.15. ve 4.16.'de verilmiştir.

Agrobacterium radiobacter'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 40°C'de oldukça stabil olduğu belirlenmiştir. PL enzimi 50°C'de 5. saatte ve 60°C'de ise 1. saatte %50 inhibe olmuştur. Ayrıca 50°C'de bekletilen enzim 11. saatin sonunda 60°C'de bekletilen enzim ise 5. saatin sonunda tamamen inhibe olmuşlardır. 70 ile 80°C'de bekletilen enzimlerin ise ilk 1 saat içinde aktivitelerinin tamamını kaybettikleri belirlenmiştir.

Xanthomonas campestris'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin ilk 5 saat içinde 40°C, 50°C ve 60°C'de aktivitesi yükselmiştir. Daha sonraki zamanlarda 50°C ve 60°C'de PL enzim aktivitesinin ani bir düşüşle azalarak 11. saatte %100 inhibe olduğu görülmüştür. Pektin liyaz enzimi daha yüksek sıcaklıklar olan 70°C ve 80°C'de ilk 1 saat içinde aktivitelerinin çok büyük bir kısmını kaybetmişlerdir. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin de en stabil olduğu sıcaklığın 40°C olduğu belirlenmiştir.

Geobacillus pallidus'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminde olduğu gibi ilk saatlerde

40°C, 50°C ve 60°C'de aktivitesi yükselmektedir. 40°C'de bekletilen pektin liyaz enziminin aktivitesinin 10. saatin sonunda 2 kat arttığı görülmektedir. 24 saatin sonuna kadar elde edilen bu aktivite korunmaktadır. 24 saatin sonunda 50°C'de bekletilen enzimin başlangıçla aynı aktiviteyi koruduğu, 60°C'de ise sadece %50 aktivite kaybettiği görülmektedir. Pektin liyaz enzimi daha yüksek sıcaklıklar olan 70°C ve 80°C'de ilk 1 saat içinde aktivitelerinin çok büyük bir kısmını kaybetmektedirler. Bu sonuçlara bakılarak *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin stabil olduğu en yüksek sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir.

Geobacillus pallidus'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin yüksek sıcaklıklara diğer kaynaklardan saflaştırılan enzimlerden daha fazla dayanıklı olması ve oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda enzimin aktivitesinin arttığı bulunması termofilik bir kaynak tarafından üretilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yukarıdaki değerlendirmelerden yola çıkılarak *Agrobacterium radiobacter* ve *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin 40°C'de stabil oldukları söylenebilir. Termofilik bakteri olan *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimi *Agrobacterium radiobacter* ve *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinden farklı olarak 50°C ve 60°C'de 24 saat boyunca tamamen inhibe olmamıştır. 24. saatte 50°C'de aktivitesini tamamen koruduğu için sıcaklık stabilitesini 50°C olarak kabul edilebilir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri oda sıcaklığında (~25°C) ve buzdolabında (+4°C) bekletilerek enzim aktivitelerindeki değişiklik 3 ay boyunca incelenmiştir. İlk gün yapılan aktivite tayini 100 kabul edilerek diğer günler bulunan aktiviteler buna göre hesaplanmış ve grafik halinde Şekil 4.17. ve 4.18.'de verilmiştir. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri oda sıcaklığında 2 gün stabil oldukları daha sonra hızla aktivite kaybettikleri görülmüştür. Buzdolabında +4°C'de ise enzimler üç ay boyunca aktivi-

telerini yaklaşık olarak %90 oranında korumuşlardır. Bu sonuçlara bakılarak enzimlerin en iyi saklama koşulunun +4°C’de olduğu belirlenmiştir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin molekül ağırlıkları jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak (Şekil 4.19., 4.20., 4.21. ve 4.22.) belirlenmiştir. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin molekül ağırlıklarının sırasıyla 66.000, 77.545 ve 56.036 Da olduğu bulunmuştur.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin V_{max} ve K_M değerlerini Lineweaver-Burk grafik yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7.’de verilmektedir. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 277,78 $\mu\text{mol/L. dak.}$, 3,84 $\mu\text{mol/L.dak.}$ ve 2,28 $\mu\text{mol/L.dak.}$, K_M değerleri ise sırasıyla 3,92 mg/mL, 0,69 mg/mL ve 24,80 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin karbohidrat içerikleri fenol sülfürik asit yöntemi kullanılarak sırasıyla %68, %63 ve %72 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8.’de verilmektedir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin tirozin ve triptofan içerikleri Goodwin ve Mortona (1946) yönteminden yararlanılarak bulunmuş ve 1000 μg enzimin içerdiği tirozin ve triptofanın miktarı μg cinsinden hesaplanarak Çizelge 4.9.’da verilmiştir. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*’dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin tirozin içerikleri sırasıyla 47 μg , 16 μg ve 30 μg , triptofan içerikleri yine sırasıyla 98 μg , 23 μg ve 26 μg olarak hesaplanmıştır.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , sitrik asit ve askorbik asitin etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada üç farklı konsantrasyon ve her bir konsantrasyonda beş farklı hacimde aktivite ölçümü yapılmıştır. Bulunan değerlere göre aktivite birimi hesaplanarak aktivite- μL grafiği çizilmiştir. Sonuçlar toplu olarak Çizelge 4.10. , 4.11. ve 4.12.'da verilmiştir.

Agrobacterium radiobacter'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimini Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} ve sitrik asitin inhibe ettiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisinin bu maddelerin konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak arttığı grafiklerden görülmektedir. Mg^{2+} ve askorbik asitin 10^{-2} M'da pektin liyaz enzimini inhibe ettikleri daha düşük konsantrasyonlarda (10^{-4} M, 10^{-6} M) ise aktive ettikleri bulunmuştur. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimini 10^{-2} M, 10^{-4} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda aktive eden tek madde ise Co^{2+} iyonu olduğu bulunmuştur.

Xanthomonas campestris'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimini Fe^{3+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , askorbik asit ve sitrik asitin inhibe ettiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisinin bu maddelerin konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak arttığı grafiklerden görülmektedir. Hg^{2+} iyonu enzimi 10^{-2} M konsantrasyonda tamamen inhibe etmiştir. Mg^{2+} yüksek konsantrasyonlarda pektin liyaz enzimini inhibe ederken daha düşük konsantrasyonlarda ise aktive etmektedir. *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimini bütün konsantrasyonlarda aktive eden tek maddenin Cu^{2+} olduğu bulunmuştur.

Geobacillus pallidus'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimini Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , askorbik asit ve sitrik asitin inhibe ettiği belirlenmiştir. İnhibisyon etkisinin bu maddelerin konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak arttığı grafiklerden görülmektedir. Hg^{2+} ve Cu^{2+} iyonları 10^{-2} M konsantrasyonda enzimi tamamen inhibe etmişlerdir. Ca^{2+} iyonu 10^{-2} M'da pektin liyaz enzimini inhibe ettiği daha düşük konsantrasyonlarda (10^{-4} M, 10^{-6} M) ise aktive ettiği bulunmuştur. *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimini bütün konsantrasyonlar aktive eden tek iyon ise Mg^{2+} 'dır.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanılarak meyve suyu elde etme verimini nasıl etkilediği incelenmiştir. Saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinden elde edilen sonuçlarla karşılaştırmak amacıyla ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus da meyve suyu elde etme işlemlerinde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13, 4.14, 4.15'de verilmiştir.

Agrobacterium radiobacter'den üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimi ile işlem görmüş elma, muz, havuç ve şeftali pürelerinden elde edilen meyve suyunun kontrole göre sırasıyla artmış olduğu görülmektedir. Saf pektin liyaz ile işlem görmüş muz, havuç ve elma pürelerinden elde edilen meyve suyu veriminin Pectinex 100 L Plus ile elde edilen verimden daha düşük olmasına rağmen oldukça yakın oldukları, fakat şeftali suyundan elde edilen verimin çok daha düşük olduğu görülmektedir. Saf pektin liyaz enzimi ile elde edilen meyve suyu miktarı ham ekstrakt ile elde edilen meyve suyu miktarından daha büyük olduğu görülmektedir. Pektin liyaz enzimi, ham ekstrakt ve Pectinex 100 L Plus ile işlem görmüş 100 g muz püresinden sırasıyla 180 mL, 175 mL ve 195 mL meyve suyu elde edilmiştir. Kontrol (20 mL) ile karşılaştırıldığında verimin ortalama 8 kat arttırdığı görülmektedir. Saf pektin liyaz enzimi ile elde edilen en iyi verimin muz meyvesinde alındığını gözlenmiştir.

Xanthomonas campestris'den üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimi ile işlem görmüş elma, muz, havuç ve şeftali pürelerinden elde edilen meyve suyunun kontrole göre artmış olduğu görülmektedir. Saf pektin liyaz ile elde edilen verimin Pectinex 100 L Plus ile elde edilen verimden daha düşük olduğu görülmektedir. Yinede saf enzimle işlem görmüş havuç püresinden elde edilen verimin Pectinex 100 L Plus ile elde edilen verime oldukça yaklaştığı görülmektedir. *Xanthomonas campestris*'den üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimi ile en iyi verim alınan meyvenin havuç olduğu görülmektedir.

Geobacillus pallidus'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimi ile işlem görmüş elma, muz, havuç ve şeftali pürelerinden elde edilen meyve suyunun kontrole göre art-

mış olduğu görülmektedir. Muz ve havuç pürelerinden saf pektin liyaz enzimi ile elde edilen meyve suyu verimi Pektinex 100 L Plus ile elde edilen meyve suyu veriminden yaklaşık %50 daha düşük olduğu bulunmuştur. Diğer meyveler için bulunan değerler ise çok daha düşük olduğu görülmektedir.

Pektinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen verim daha büyük olmasına rağmen içerdiği pektin esteraz enzimi yüzünden meyve suyunun içinde metanol da üremektedir. Ayrıca esteraz aktivitesi meyveye aroma veren esterleri de parçalayabileceğinden dolayı meyve suyu tadında da değişikliğe neden olabilmektedir. Bundan dolayı hem sağlık açısından hem de kalite açısından saf pektin liyaz enziminin gıda üretiminde kullanılması daha avantajlıdır.

Kullanılan enzimlerin meyve suyunun verimini artırmasının sebebi, viskoziteyi yükselterek filtrasyon işlemlerini zorlaştıran pektinleri parçalamasından ileri gelmektedir. Bu parçalama işleminin miktarını görebilmek için meyve suyu elde etme işleminden sonra kalan meyve posası miktarına bakılarak 100 gram meyve için % parçalanma miktarı belirlenmiştir.

Agrobacterium radiobacter, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri, ham ekstraktlar ve Pektinex 100 L Plus ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen meyve suyu miktarı ile % parçalanma oranı doğru orantılı bir şekilde arttığı görülmektedir. Muz püresi çok viskoz olduğundan enzimlerle işlem görmesiyle gözle görülür bir oranda viskozitesi azalmıştır. Viskozitesinin çok azalmasının nedenini muz püresinde bulunan pektinlerin %75'e varan oranlarda parçalanmasında kaynaklanmaktadır. Meyve suyu verimininde aynı oranda da arttığı görülmüştür.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri için;

1. *Agrobacterium radiobacter*'den üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum pH'sı 8 iken *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum pH'sı 9 olduğu bulunmuştur.
2. *Agrobacterium radiobacter* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin optimum sıcaklıkları 60°C, *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan PL enziminin optimum sıcaklığı ise 50°C olduğu bulunmuştur.
3. *Agrobacterium radiobacter* ve *Xanthomonas campestris*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin sıcaklık stabiliteyi 40°C, *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin sıcaklık stabilitesi ise 50°C olduğu bulunmuştur.
4. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin +4°C'de 3 ay boyunca stabil oldukları fakat oda sıcaklığında 2 gün içinde aktivite kaybettikleri bulunmuştur.
5. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin molekül ağırlıklarının sırasıyla 66.000, 77.545 ve 56.036 Da olarak hesaplanmıştır.
6. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla 277,78 $\mu\text{mol/L.dak.}$, 3,84 $\mu\text{mol/L.dak.}$ ve 2,28 $\mu\text{mol/L. dak.}$, K_M değerleri ise sırasıyla 3,92 mg/mL, 0,69 mg/mL ve 24,80 mg/mL olarak hesaplanmıştır.
7. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin karbohidrat içerikleri sırasıyla %68, %63 ve %72 olarak hesaplanmıştır.
8. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin tirozin içerikleri sırasıyla 47 μg , 16 μg ve 30 μg , triptofan içerikleri yine sırasıyla 98 μg , 23 μg ve 26 μg olarak hesaplanmıştır.
9. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimleriyle işlem görmüş elma, muz, havuç ve şeftali pürelerinden elde edilen meyve suyunun kontrole göre artmış oldukları bulunmuştur.

10. *Agrobacterium radiobacter*, *Xanthomonas campestris* ve *Geobacillus pallidus*'dan üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimleri ile işlem görmüş meyve pürelerinden elde edilen katı madde miktarının azaldığı yani % parçalanma oranının arttığı görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Afifi, A.F., Fawzi, E.M. and Foad, M.A., 2002. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Curvularia inaequalis* NRRL 13884 on orange peels waste, solid state culture. *Annals of Microbiology*, 52 (3), 287-297.
- Alana, A., Alkorta, I., Dominguez, J.B., Llama, M.J. and Serra, J.L., 1990. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (12), 3755-3759.
- Alana, A., Gabilondo, A., Hernando, F., Moragues, M.D., Dominguez, J.B., Llama, M.J. and Serra, J.L., 1989. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1612-1616.
- Alana, A., Llama, M.J. and Serra, J.L., 1991. Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. *FEBS Letters*, 280 (2), 335-340.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, L.J. and Serra, J.L., 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1), 21-28.
- 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 And Microbial Technology*, 18 (2), 141-146.
- BaracatPereira, M.C., Coelho, J.L.C. and Silva, D.O., 1994. Production of pectin lyase by *Penicillium-griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. *Letters in Applied Microbiology*, 18 (3): 127-129.
- Be Miller, J.N., 1986. An introduction of pectins; Structure and properties. *Chemistry and Functions of Pectins*, Fishman, M.L. and Jem, J.J. ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, Washington, DC.
- Borrego, F., Tari, M., Manjon and Iborra, J.L., 1989. Properties of pectinesterase immobilized on glycoPhase-coated controlled-pore glass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 22, 129-140.
- 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 (1-2), 248-254.
- Bruhlmann, F., Kim, K.S., Zimmerman, W. and Fiechter, A., 1994. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (6), 2107-2112.
- Brumano, M.H.N., Coelho, J.L.C., Dearaujo, E.F. and Silva, D.O., 1993. Pectin lyase activity of *Penicillium-griseoroseum* related to degumming of ramie. *Revista De Microbiologia*. 24 (3), 175-178.
- Bugbee, W.M., 1993. A pectin lyase inhibitor protein from cell-walls of sugar-beet. *Phytopathology*, 83 (1), 63-68.
- Carr, J.G., 1985. Tea, coffee and cocoa. *Microbiology of fermented food*, vol. 2, Ed: Wood B.J.B., Elsevier, London, 133-154.
- Chen, W.C., Hsieh, H.J. and Tseng, T.C., 1998. Purification and characterization of a pectin lyase from *Pythium splendens* infected cucumber fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39 (3), 181-186.
- Couto S.R. and Sanroman M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*. 76 (3), 291-302.

- Delgado, L., Trejo, B., Huitron, C. and Aguilar, C., 1993. Pectin lyase from *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39 (4-5), 515-519.
- Dickinson, E., 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. *Food hydrocolloids*, 17 (1), 25-39.
- Gleba, Y.Y., 1978. Microdroplet culture: Tobacco plants from single mesophyll protoplasts. *Naturwissenschaften* 65 (3), 158–159.
- Godfrey, Y., Hyman, L.J., McMillan, G.P., Old, D.C. and Perombelon, M.C.M., 1994. Purification and characterization of mitomycin-C induced pectin lyase of *Erwinia-carotovora* subsp *atroseptica* strain SCRI-1043. *Journal of Applied Bacteriology*, 76 (1), 13-21.
- Goodwin, T.W. and Morton, R.A., 1946. The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Biochemical Journal*, 40 (5-6), 628–632.
- Gordon, G.L.R. and Phillips, M.W., 1992. Extracellular pectin lyase produced by *Neocallimastix* sp IM1, a rumen anaerobic fungus. *Letters in Applied Microbiology*, 15 (3), 113-115.
- Gummadi, S.N. and Kumar, D.S., 2005. Microbial pectic transeliminases. *Biotechnology Letters*, 27 (7), 451-458.
- Gysler, C. , Harmsen, J.A.M., Kester, H.C.M., Visser, J. and Heim, J., 1990. Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. *Gene*, 89 (1), 101-108.
- Hamdy, H.S., 2005. Purification and characterization of the pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. *Annals of Microbiology*, 55 (3), 205-211.
- Herron, S.R., Benen, J.A.E., Scavetta, R.D., Visser, J. and Jurnac, F., 2000. Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (16), 8762-8769.
- Holmbom, B., Ekman, R., Sjöholm, R., Eckerman, C. and Thornton, J., 1991. Chemical-changes in peroxide bleaching of mechanical pulps. *Das Papier*, 45 (10), 16–22.
- Hoondal, G.S., Tiwari R.P., Tewari, R., Dahiya N. and Beg Q.K., 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4-5), 409-418.
- Horn, D. and Linhart, F., 1996. Retention aids. *Paper Chemistry*, Ed: Roberts, J.C. Blackie Academic and Professional, London, 64–82.
- Hounsell, E.F., Davies, M.J., Smith, K.D., 1997. Chemical methods of analysis of glycoproteins. *The Protein Protocol Handbook*, 2nd ed., Ed. Walker J.M., Humana Press, Totawa, New Jersey, 804–805.
- HugouvieuxCottePattat, N., Condemine, G., Nasser, W. and Reverchon, S., 1996. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology*, 50, 213-257.
- Jayasinghe, C.K., Wijayarathne, S.C.P. and Fernando, T.H.P.S., 2004. Characterization of cell wall degrading enzymes of *Thanatephorus cucumeris*. *Mycopathologia*, 157 (1), 73-79.
- Karlson, P. ve Telefoncu, A. 1998, *Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya*, s. 68, Sermet Matbaası, Kırıkkale.

- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., and Tewari, R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77 (3), 215-227.
- Kester, H.C.M. and Visser, J., 1994. Purification and characterization of pectin lyase B, a novel pectinolytic enzyme from *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 120 (1-2), 63-67.
- Kilara, A., 1982. Enzymes and their uses in the processed apple industry: A review. *Process Biochemistry*, 17 (4), 35-41.
- Kim, J.C., Kim, H.Y. and Choi, Y.J., 1998. Production and characterization of acid-stable pectin lyase from *Bacillus* sp. PN33. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8 (4), 353-360.
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
- Levin, L. and Forchiassin, F., 1998. Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes by the white-rot fungus *Trametes trogii* on a laboratory scale. *Acta Biotechnologica*, 18 (2), 157-166.
- Li, H.Y. and Hardin, I.R., 1998. Enzymatic scouring of cotton-surfactants, agitation, and selection of enzymes. *Textile Chemist and Colorist*, 30 (9), 23-29.
- Martin, N., de Souza, S.R., da Silva, R. and Gomes, E., 2004. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (5), 813-819.
- McCann, M.C., Wells, B. ve Roberts, K. 1990. Direct visualization of cross-links in the primary plant cell. *Journal of Cell Science*, 96, 323-334.
- McIntosh, J.E.A., 1969. Carbonic anhydrase isoenzymes in the erythrocytes and dorsolateral prostate of the rat. *Biochemical Journal*, 114 (3), 463-476.
- Minussi, R.C., Coelho, J.L.C., BaracatPereira, M.C. and Silva, D.O., 1996. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*: Effect of tea extract, caffeine, yeast extract, and pectin. *Biotechnology Letters*, 18 (11), 1283-1286.
- Minussi, R.C., Soares-Ramos, J.R.L., Coelho, J.L.C. and Silva, D.O., 1998. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. *Revista De Microbiologia*, 29 (4), 246-250.
- Nakagawa, T., Nagaoka, T., Miyaji, T. and Tomizuka, N., 2005. A cold-active pectin lyase from the psychrophilic and basidiomycetous yeast *Cystofilobasidium capitatum* strain PPY-I. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 42 (3), 193-196.
- Nedjma, M., Hoffmann, N. and Belarbi, A., 2001. Selective and sensitive detection of pectin lyase activity using a colorimetric test: Application to the screening of microorganisms possessing pectin lyase activity. *Analytical Chemistry*, 291 (2), 290-296.
- Nikaidou, N., Nagnuma, T., Kamio, Y. and Izaki, K., 1995. Production, purification, and properties of a pectin lyase from *Pseudomonas-marginalis* N6301. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 59 (2), 323-324.
- Obi, S.K.C. and Moneke, N.A., 1985. Pectin lyase and polygalacturonase of *Aspergillus niger* pathogenic for yam tubers (*Dioscorea rotundata*). *International Journal Food Microbiology*, 1 (5), 277-289.
- Onat, T. ve Emerk, K. 1997, *Temel Biyokimya*, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir.

- Ozer, N., Koycu, D., Chilosi, G., Pizzuolo, P.H., Coskuntuna, A. and Magro, P., 2003. Pectolytic isoenzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae and antifungal compounds in onion cultivars as a response to pathogen infection. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie*, 25 (3), 249-257.
- Papi, R. and Kyriakidis, D., 2003. Overexpression of the pectin lyase gene of *Pseudomonas marginalis* in *Escherichia coli* and purification of the active enzyme. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37 (2), 187-194.
- Petersen, S., 2001. Enzymes to upgrade plant nutrients. *Feed Mix*, 9, 12-15.
- Piccoli-Valle, R.H., Passos, F.M.L., Passos, F.J.V. and Silva, D.O., 2001, Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32 (2), 135-140.
- Pilnik, W. and Voragen, A.G.J., 1970. *The Biochemistry of Fruits and Their Products*. Pectic substances and other uronides, Ed: Hulme, A.C. Academic Press, London, 53-87.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. and Vandamme, E.J., 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213-294.
- Sakiyama, C.C.H., Paula, E.M., Pereira, P.C., Borges, A.C. and Silva, D.O., 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters In Applied Microbiology*, 33 (2), 117-121.
- Schlemmer, A.F., Ware, C.F. and Keen, N.T., 1987. Purification and characterization of a pectin lyase produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. *Journal of bacteriology*, 169 (10), 4493-4498.
- Silva, D., Martins, E.S., da Silva, R. and Gomes, E., 2002. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33 (4), 318-324.
- Soares, M.M.C.N., da Silva, R., Carmona, E.C. and Gomes, E., 2001. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application an juice extraction. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17 (1), 79-82.
- Tanabe, H., Kobayashi, Y. and Akamatsu, I., 1986. Pretreatment of pectic wastewater from orange canning by soft-rot *Erwinia carotovora*. *Journal of Fermentation Technology*, 64 (3), 265-268.
- Tanabe, H., Yoshihara, K., Tamura, K., Kobayashi, Y., Akamatsu, I., Niyomwan, N. and Footrakul, P., 1987. Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 65 (2), 243-246.
- Taragano, V.M. and Pilosof, A.M.R., 1999. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25 (3-5), 411-419.
- Thornton, J., Ekman, R., Holmbom, B. and Orsa, F., 1994. Polysaccharides dissolved from Norway Spruce in thermomechanical pulping and peroxide bleaching. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 14 (2), 159-175.
- Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. A Wiley Interscience Publication, 472 p, New York.

- Van-Alebeek, G.J.W.M., Christensen, T.M.I.E., Schols, H.A., Mikkelsen, J.D. and Voragen, A.G.J., 2002. Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C6-substituted oligogalacturonides. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (29), 25929-25936.
- VandenBroek, L.A.M., denAantrekker, E.D., Voragen, A.G.J., Beldman, G. and Vincken, J.P., 1997. Pectin lyase is a key enzyme in the maceration of potato tuber. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75 (2), 167-172.
- West, S., 1996. Olive and other edible oils. *Industrial Enzymology*, 2nd ed., Ed: Godfrey, T., West, S. Stockholm Press, New York, 293–300.
- Whitaker, J.R., 1963. Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. *Analytical Chemistry*, 35 (12), 1950-1953.
- Whitaker, J.R., 1990. New and future uses of enzymes in food processing. *Food Biotechnology*, 4, 669-697.
- Wolfgang, A., 2006. *Enzymes in Industry: Production and Applications*. Wiley-VCH, p. 508, Weinheim.
- Yoshitake, S., Numata, T., Katsuragi, T., Hours, R.A. and Sakai, T., 1994. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *Journal Fermentation Bioengineering*, 77 (4), 370-375.

ÖZGEÇMİŞ

1975 Yılında Erzurum'da doğdu. İlk Öğrenimini Fransa'da, orta öğrenimini İstanbul'da, lise eğitimini de Erzurum'da tamamladı. 1994 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Kimya bölümünden 1998 yılında mezun oldu. 1998-2001 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında yüksek lisans öğrenimini bitirdi ve 2001-2007 yılları arasında aynı enstitüde doktora öğrenimini sürdürdü. Halen Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.