



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ALKALİ BACILLUS SP. SUŞLARINDAN ELDE
EDİLEN PEKTİN LİYAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE PORTAKAL SUYU
ÜZERİNE ETKİSİ***

HAMDİ GÖKAHMETOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK VE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2018

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALKALİ BACILLUS SP. SUŞLARINDAN ELDE
EDİLEN PEKTİN LİYAZ ENZİMİNİN
SAFLAŞTIRILMASI VE PORTAKAL SUYU
ÜZERİNE ETKİSİ

HAMDİ GÖKAHMETOĞLU

Bu tez,
Biyomühendislik Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
Derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2018

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Hamdi GÖKAHMETOĞLU tarafından hazırlanan “ALKALİ BACILLUS SP. SUŞLARINDAN ELDE EDİLEN PEKTİN LİYAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE PORTAKAL SUYU ÜZERİNE ETKİSİ” adlı bu tez, jürimiz tarafından 24/07/2018 tarihinde oy birliği ile Biyomühendislik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğretim Üyesi Özlem KIRAN (DANIŞMAN)

Biyoloji Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Burhan Arıkan (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı

Çukurova Üniversitesi

Doç. Dr. Ashabil AYGAN (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Doç.Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hamdi GÖKAHMETOĞLU



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı (KSÜ BAP) tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2014/2-17YLS

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

**ALKALİ BACILLUS SP. SUŞLARINDAN ELDE EDİLEN PEKTİN LİYAZ
ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI VE PORTAKAL SUYU ÜZERİNE ETKİSİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

HAMDİ GÖKAHMETOĞLU

ÖZET

Bu çalışmada Mersin Erdemli Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'nden alkali toprak örneklerinden izole edilen, *Bacillus* sp. suşlarından *Bacillus licheniformis* olarak adlandırılan suş seçilmiştir. Seçilen bu suşun pektin liyaz enzimi üretme yeteneği ve saflaştırılacak enzimin özellikleri araştırılarak portakal suyu elde ediminde kullanılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda *Bacillus licheniformis* suşunun tanımlaması The Biolog Gen III Microplate metoduyla yapılmıştır.

Pektin liyaz enzimi DEAE Sephacel İyon Değişim Kolon Kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim SDS-PAGE ve Zimogram ile kontrol edilmiştir. Moleküler ağırlığı 36.5 kDa olan tek bant görülmüştür.

Saflaştırılan Pektin liyaz enziminin optimum şartları (pH ve sıcaklık) araştırılmıştır. Pektin liyaz enziminin optimum pH aralığına bakıldığında (pH 7-10 aralığında) maximum relatif aktivite pH 9'da, enzimin optimum sıcaklık aralığına bakıldığında (sıcaklık 40 - 80 °C aralığında) ise 60 °C'de maksimum aktivite göstermiştir.

Son süreçte saflaştırılan pektin liyaz enzimi portakal suyu üretiminde kullanılmıştır. Saflaştırılmış pektin liyaz ve ham özütten elde edilen portakal suyu miktarları enzimsiz portakal suyuyla karşılaştırılmış ve çalışılan enzimin meyve suyu verimini % 25, ham özütün % 15 oranında arttırdığı bulunmuştur.

Sonuç olarak *Bacillus licheniformis* bakterisinden elde edilen pektin liyaz enzimi meyve suyu endüstrisinde kullanılabilir olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilecek olan veriler; şu ana kadar yapılan ve ileride yapılacak olan araştırmalara veri sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus licheniformis*, Pektin liyaz, saflaştırma

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Temmuz / 2018

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Özlem KIRAN

Sayfa sayısı: 57

**PURIFICATION OF PECTIN LYASE ENZYME FROM ALKALINE BACILLUS
SP. STRAINS AND ITS EFFECT ON ORANGE JUICE
(M.Sc. THESIS)**

HAMDİ GÖKAHMETOĞLU

ABSTRACT

In this study, *Bacillus* sp., isolated from alkali soil in Mersin Erdemli Alata Horticultural Research Institute, strains named *Bacillus licheniformis* selected. This selected strain is intended to be used in the production of orange juice by investigating the pectin lyase enzyme producing ability and the properties of the enzyme to be purified. Identification of *Bacillus licheniformis* strains was by The Biolog Gene III. Microplate method.

The pectin lyase enzyme was purified by DEAE Sephacel Ion Exchange Column Chromatography. The purified enzyme was checked by SDS-PAGE and zymogram. The single band observed was found to have a weight of 36.5 kDa.

The optimum conditions (pH and temperature) of the purified pectin lyase enzyme were investigated. When the pectin lyase enzyme was examined at its optimum pH range (pH 7-10 range), maximum relative activity showed maximum activity at pH 9, while the enzyme had maximum activity at 60 ° C when observed at the optimum temperature range (temperature range 40-80 ° C).

The pectin lyase enzyme purified in the last period was used in the production of orange juice. The amounts of orange juice obtained from the purified pectin lyase and crude extract were compared with the orange juice without enzyme and and it was found that the enzyme studied increased the fruit juice yield by 25% and crude extract by 15% .

As a result, the pectin lyase enzyme obtained from *Bacillus licheniformis* can be used in the orange juice industry. The data obtained in this study will provide data for the research carried out so far and which will be held in the future.

Key words: *Bacillus licheniformis*, Pectin lyase, Purification

University of Kahramanmaraş Sütçü İmam

Graduate School of Natural and Applied Science

Department of Bioengineering and Sciences, July / 2018

Süpervisor: Dr. Öğretim Üyesi Özlem KIRAN

Page Number: 57

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca, tezimin planlanması ve yürütülmesinde zamanını, bilgisini, desteğini ve tecrübesini esirgemeyen, sağladığı katkılardan dolayı danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Özlem KIRAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın başlangıcından bitimine kadar desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmaları aşamalarında yardımlarını gördüğüm bilim insanlarına ve projemi destekleyen K.S.Ü. Fen Bilimleri Enstitü'süne çok teşekkür ederim.

Son olarak, bu günlere gelmemde her türlü maddi ve manevi desteklerini gördüğüm aileme teşekkür ederim.

Hamdi GÖKAHMETOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzim Kaynakları	3
1.1.1. <i>Bacillus</i> cinsi bakteriler	4
1.1.2. <i>Bacillus sp.</i> 'nin enzim üretiminde kullanımı ve bununla ilgili sebepleri	4
1.2. Pektik maddeler	5
1.2.1. Pektinin yapısı ve sınıflandırılması	5
1.2.2. Pektik enzimler	6
1.2.3. Pektin liyaz	7
1.3. Pektinazların endüstriyel uygulamaları	7
1.3.1. Meyve suyu uygulamalarında kullanımı	7
1.3.2. Atık su arıtmasında kullanımı	8
1.3.3. Kahve ve çay fermantasyonunda kullanımı	8
1.3.4. Kağıt ve selüloz endüstrisinde kullanımı	8
1.3.5. Hayvan yeminde kullanımı	8
1.3.6. Bitki virüslerinin saflaştırılmasında kullanımı	8
1.3.7. Yağ çıkarma işleminde kullanımı	8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
3. MATERYAL ve METOD	17
3.1. Materyal	17
3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri	17
3.1.1.1. Adi jelöz besiyeri	17
3.1.1.2. Nütrient broth	17

3.1.1.3. Pektin agarlı katı besi yeri	19
3.1.1.4. Pektinli sıvı besi yeri	19
3.1.2. Kullanılan genel çözeltiler	18
3.1.2.1. CTAB	18
3.1.2.2. 1M HCl ve 1M NaOH çözeltileri	18
3.1.3. Enzim aktivitesi için kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	18
3.1.3.1. % 1.5'lik pektin çözeltisi	18
3.1.3.2. 1N NaOH çözeltisi	19
3.1.3.3. 1N HCl çözeltisi	19
3.1.3.4. 0.04 M Tiyobarbitirik asit çözeltisi	19
3.1.4. Kromotografi tamponları	19
3.1.4.1. 0.01 M sodyum fosfat tamponu	19
3.1.4.2. 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M NaCl tamponu	20
3.1.5. Elektroforez işleminde kullanılan çözeltiler	20
3.1.5.1. 2M Tris-HCl	20
3.1.5.2. 1M Tris-HCl	20
3.1.5.3. SDS % 10	20
3.1.5.4. Gliserol % 50	20
3.1.5.5. Bromfenol mavisi % 1	20
3.1.5.6. Solüsyon A	21
3.1.5.7. Solüsyon B	21
3.1.5.8. Solüsyon C	21
3.1.5.9. AMPS % 10	21
3.1.5.10. Elektroforez tamponu	22
3.1.5.11. Örnek tampon	22
3.1.5.12. Markır hazırlanması	22
3.1.5.13. %13'lük seperating jel (Ayırma jeli)(10 ml)	23
3.1.5.14. %5'lik stacking jel (toplayıcı jel)(10 ml)	23
3.1.5.15. Jel boyama solüsyonu(1 lt)	23
3.1.5.16. Jelden boyayı uzaklaştırma solüsyonu(1lt)	24
3.1.6. Zimogram tesinde kullanılan çözeltiler	24
3.1.6.1. 20 mM Tris-HCl bufferı	24
3.1.6.2. %1'lik Pektin agar çözeltisi	24
3.1.6.3. %5'lik Ruthenium red boyası	24
3.1.7. Enzimin optimum pH'sının saptanması için kullanılan tamponlar	24
3.1.7.1. NaH ₂ PO ₄ tamponu	24
3.1.7.2. NaHCO ₃ tamponu	24
3.2. Metod	25
3.2.1. Bakteri izolasyonu ve tanımlanması	25
3.2.1.1. Toprakтан <i>Bacillus sp.</i> suşlarının izolasyonu	25
3.2.1.2. Pektin liyaz varlığının saptanması	25
3.2.1.3. Bakteri tanımlanmasında (identifikasyonunda) kullanılan testler	26
3.2.2. <i>Bacillus licheniformis</i> bakterisinin üreme aralığı	26

3.2.3. Enzimin aktivitesinin saptanması	26
3.2.4. Saflaştırma	27
3.2.4.1. Enzim izolasyonu	27
3.2.4.2. İzole edilen enzimin saflaştırılması	27
3.2.4.3. Saflaştırılan enzimin aktivite tayini	28
3.2.5. SDS-PAGE ve Zimogram testleri	28
3.2.5.1. Protein örneklerinin SDS-PAGE analizi	28
3.2.5.2. Zimogram analizi.....	29
3.2.6. Enzimin optimum pH'sının saptanması	29
3.2.7. Enzimin optimum sıcaklığının saptanması.....	29
3.2.8. Saflaştırılan pektin liyaz enziminin portakal suyu üzerine etkisi	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1. Topraktan <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu ve pektin liyaz üreten suşların belirlenmesi.....	31
4.2. Bakteri İdentifikasyonu	31
4.3. <i>Bacillus licheniformis</i> bakterisinin üreme aralığına ait bulgular	34
4.4. <i>Bacillus licheniformis</i> 'in pektin liyaz üretme kapasitesi	35
4.5. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktivite sonuçları	36
4.6. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-PAGE ve Zimogram sonuçları	39
4.7. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum pH sonuçları	41
4.8. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları	43
4.9. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enzimiyle yapılan portakal suyu elde etme sonuçları	44
5. SONUÇLAR.....	47
KAYNAKLAR.....	49
ÖZ GEÇMİŞ.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Enzim yapısının görünümü	2
Şekil 1.2. Pektin molekülünün şematik olarak moleküler yapısının görünüşü	6
Şekil 4.1. Pektin liyaz üreten <i>Bacillus sp.</i> suşunun görüntüsü	31
Şekil 4.2. <i>Bacillus licheniformis</i> ' in büyüme eğrisi	34
Şekil 4.3. Supernatantın pektin liyaz aktivitesi ölçümü sonrasında oluşan renk değişimleri..	35
Şekil 4.4. Seyreltilmiş pektin liyaz enziminin aktivite yüzdeleri	36
Şekil 4.5. DEAE- Sephacel iyon değişim kromatografisi kullanarak <i>Bacillus licheniformis</i> ' den üretilip saflaştırılan Pektin Liyaz enziminin NaCl ile gradient elüsyonu	37
Şekil 4.6. <i>Bacillus licheniformis</i> ' den üretilip saflaştırılan Pektin Liyaz enziminin ve supernatantın aktivite değerleri	38
Şekil 4.7. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den izole edilip, üretilen enzimin DEAE-Sephacel iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması.....	39
Şekil 4.8. SDS-PAGE sonrası jelin coomassie blue ile boyamadan elde edilen görüntüsü	40
Şekil 4.9. SDS-PAGE sonrası jelin Ruthenium red ile boyamadan sonra elde edilen zimogram görüntüsü	40
Şekil 4.10. <i>Bacillus licheniformis</i> ' den üretilip saflaştırılan Pektin Liyaz enzimi üzerine pH'nın etkisi	42
Şekil 4.11. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den üretilip saflaştırılan Pektin Liyaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 4.1. <i>Bacillus licheniformis</i> Bakterisinin İdentifikasyonunda Kullanılan Biyokimyasal Testlerin Düzeni ve Pozitif-Negatif sonuçları (The Biolog Gen III Microplate).....	33
Çizelge 4.2. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den elde edilen ham özüt ve saflaştırılmış pektin liyaz ile işlem görmüş portakal suyu miktarının kontrole göre artış miktarı.....	45
Çizelge 4.3. <i>Bacillus licheniformis</i> 'den elde edilen ham özüt ve saflaştırılmış pektin liyaz ile işlem görmüş portakal suyu püresinin kuru maddesindeki yüzde parçalanma oranı	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

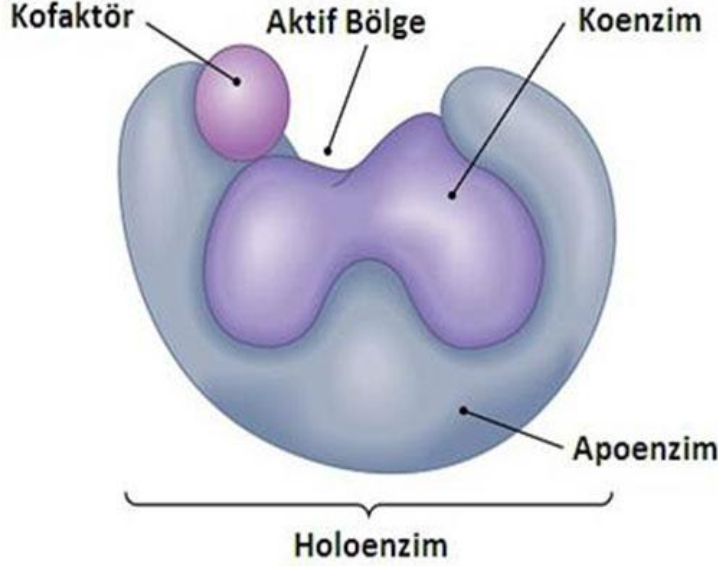
NB	:Nütrient broth
ML	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
GR	: Gram
G	: Times gravity
RPM	:Rotary per minute
NM	: Nanometre
M	: Mol
MG	: Miligram
LT	: Litre
µMOL	: Mikromol
KDA	: Kilodalton
DK	: Dakika
HCl	: Hidrojen klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
TBA	: Tiyobarbütirik asit
CTAB	: Cetyltrimethyl ammonium bromide
NaCl	: Sodyum klorür
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
AMPS	: Amonyun persülfat
TEMED	: Tetrametilendiamin
DEAE	: Dietilaminoetil
SDS-PAGE	: Sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi

1.GİRİŞ

Kimyasal reaksiyonların süratle oluşmasını sağlayan biyolojik katalizörler enzim olarak adlandırılmaktadır. Enzim adı 1878'de alman W.Kühne tarafından konulmuş olup yunanca maya manasına gelmektedir. Canlı hücrelerde meydana gelen en basit reaksiyonlar bile enzimlerle katalize edilmektedir. Özel reaksiyonları katalize ettikleri içinde spesifikler (Atasağungil., 1965). Her hücre kendi enzimini sentezler. Enzim tepkimelerinde bu sürece giren maddelere substrat denir. Enzim bunları farklı moleküllere ve ürünlere dönüştürür. Her katalizör gibi enzimlerde bir tepkimenin aktivasyon enerjisini azaltarak çalışır ve böylece tepkime hızını artırır. Enzimlerin 4000'den fazla biyokimyasal tepkimeyi katalizlediği bilinmektedir (Bairoch, A., 2000). Günümüzde yaklaşık 4000 enzim bilinmektedir ve bunlardan yaklaşık 200 tanesi ticari olarak kullanılmaktadır, bunların çoğu mikrobiyal kökenlidir. Dünya çapında enzim talebi, on iki önemli üretici ve 400 küçük oyuncu tarafından karşılanmaktadır. Enzimlerin yaklaşık % 60'ı Avrupa'da üretilmektedir (Riberio ve ark., 2010).

Çoğunluğu protein tabiatında olan bu enzimler herhangi bir gayri tabilik olmadıkça hücre duvarından dışarı geçemez ve faaliyetini hücre içerisinde sürdürür. Bu tip enzimler intraselüler enzimler ya da endoenzimler olarak adlandırılır. Enzimler protein tabiatlı maddeler olduklarından zaman ile yaşlanabilir ve koloidal şekillerini kaybederek inaktif şekle geçer. Bu sebeple organizmalarda devamlı olarak üretilirler. Çoğunluğu protein olmakla beraber ribozom adlı RNA molekülleri de tepkimeleri katalizleyebilir ki ribozomu oluşturan bazı RNA'lar böyledir (Lilly, D.M.J., 2005). Enzimler uzun aminoasit zincirlerinden oluşur ve etkinliği 3 boyutlu yapıları tarafından belirlenir (Anfinsen, C.B., 1973). Enzimlerin etkinliği başka moleküller tarafından etkilenebilir. İnhibitörler enzim aktivitesini azaltırken, aktivatör adı verilen maddeler aktiviteyi artırır. Bunun dışında sıcaklık, ortamın pH'sı, substrat konsantrasyonu aktiviteyi etkileyen diğer faktörlerdir. Bazı enzimler etki göstermek için ek bir bileşiğe ihtiyaç duymazlar ki pepsin, üreaz gibi basit enzimler böyledir. Bileşik enzim denen enzimler ise aktivite göstermek için kofaktör denen protein olmayan moleküllere ihtiyaç duyar. Örnek olarak metal iyonları, flavin gibi maddeler gösterilebilir. Kofaktörler vitaminler gibi organik bir molekül ise koenzim olarak adlandırılırlar. Birçok protein etkinlik göstermek için apoenzim denen protein kısımla

beraber kofaktör olan protein olmayan kısımlara ihtiyaç duyar. Apoenzim substratı belirlerken koenzim ya da kofaktör esas işi yapan kısımdır.



Şekil 1.1. Enzim yapısının görünümü

Enzimatik reaksiyonlar bilinmemesine rağmen yazının kullanılmasından evvel bile müşahade edilmiştir. Sütün ekşimesi, sirke ve peynirin yapılması, ekmeğin mayalanması gibi reaksiyonlar çok eskiden beri bilinmekte ve kullanılmakta idi.

Yunanlılar şarabın fermantasyonla üretiminin keşfini Baküs'e atfeder. Fakat uzun zaman bu reaksiyonların mikroorganizmaların mevcudiyeti ve canlı halde bulunması ile mümkün olabileceği zannedilmiştir. Payen ve Persoz 1833'de malt ekstarından alkol ile nişastayı sindiren enzimi çöktürmüş ve diastaz adını vermiştir. Beaumont aynı tarihlerde mide suyunun sindirilmesinin kimyasal bir maddeye bağlı olduğunu bulmuş ve 1836'da Schwann bu maddeyi izole ederek pepsin adını vermiştir. 19. yüzyılda Louis Pasteur fermantasyon, pütrifikasyon gibi kimyasal reaksiyonların canlı mikroorganizmalar tarafından oluştuğunu kaydetmiştir. Fakat Pasteur hadiselerin canlı hücreler tarafından hücre içinde oluştuğunu gözlemlemiş, bu sebepten enzimatik reaksiyonlarda canlı hücrenin mutlaka olması gerektiğini belirtmiştir. Büchner ise 1897'de fermantasyon yapan maya hücrelerini kumla ezerek hücreleri parçalamış, karışımı yüksek tazyik altında süzerek elde ettiği hücre içermeyen sıvının glikozu fermente ettiğini göstermiştir. Böylece Pasteur'un aksine canlı hücrenin gerekli olmadığı dolayısıyla maya hücrelerinin bu reaksiyonları

katalize eden enzim karışımına sahip olduğu anlaşılmıştır (Atasağungil., 1965). Enzimlerin hücre dışında da çalıştığının gösterilmesini ardından biyokimyasal özellikleri araştırılmıştır. 1926'da James Sumner üreaz enziminin saf bir protein olduğunu gösterip, kristalleştirmiştir. Saf proteinlerin enzim oldukları Northrop ve Stanley tarafından tripsin ve kemotripsin üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Mikrobiyal enzimler, optimizasyon ve modifikasyon süreçlerindeki kolaylık, uyum ve ekonomik üretimlerden dolayı, bitki ve hayvan enzimlerinden daha kullanışlı ve avantajlıdır. Bu enzimler, bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerden daha dayanıklıdır. Ekstrem koşullarda (pH, sıcaklık, tuzluluk vs.) yüksek katalitik aktivite ve stabilite göstermektedirler. Son yıllarda endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğu mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir (Barredo, J.L., 2005).

Pektik maddeler, hemiselüloz, selüloz, lignin ve nişasta gibi polimerler, polifenoller, proteinler, arabanlar, tanenler ve metaller gibi maddeler meyve suyunda bulanıklığa yol açmaktadır. Berrak ve stabil bir meyve suyu üretimi için bu kolloidler küçük moleküllerine kadar parçalanmalıdır. Bu sayede meyve suyu verimi, presleme ve durultma verimi artmakta, vizkositenin düşmesine bağlı olarak filtrasyon kolaylaşmakta ve daha berrak bir ürün elde edilmektedir (Uçan ve Akyıldız., 2012). Bu molekülleri parçalayan pektinazlardan biri de pektin liyazdır.

Pektin liyaz enzimlerinin, gıda ve tekstil endüstrisinde oldukça geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Lifli ürünlerin işlenme sürecinde, 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 (Hasan ve Ali., 2016).

1.1.Enzim kaynakları

Endüstride kullanılan enzimler bakteri, maya, mantar gibi mikrobiyal kaynaklardan ve böcek, bitki, hayvan gibi organizmalardan da doğal üretilebilirler (Hoondal ve ark., 2002; Yadav ve ark., 2009).

1.1.1. *Bacillus* cinsi bakteriler

Bacillaceae familyasına ait olan *Bacillus* hücreleri çomak şekilli, düz veya düze yakın, tek endospora sahip, filogenetik olarak düşük GC grubuna dahi olup gram pozitif, kamçılı, aerobik ya da fakültatif anaerob bir bakteridir (Kırın, Ö., 2001).

Ferdinand Cohn ısıya dirençli bakteri tipleri ile ilgilenmiştir. Bunun sonucunda *Bacillus* cinsini ve endospor oluşum sürecini keşfetmiştir. *Bacillus*'un bütün yaşam döngüsünü tanımlayarak kaynatma sonucu endosporların değil vejetatif hücrelerin öldüğünü görmüştür. Karbon ya da azot kaynağı kısıtlı hale gelen *Bacillus* hücreleri üremeyi durdurur ve sporulasyona başlar (Brock, 2010). Endospor oluşturan bu bakteriler genellikle toprakta bulunur, buda bir avantajdır çünkü toprak besin değeri, sıcaklık, su aktivitesi bakımından oldukça çeşitlilik gösterir.

1.1.2. *Bacillus* sp.'nin enzim üretiminde kullanımı ve bununla ilgili sebepleri

Mikrobiyal kaynaklı enzimler çeşitli bakteri, maya ve küflerden uygun yöntemler yardımıyla ekonomik olarak endüstriyel boyutlarda elde edilebilir. Enzimlerin sentezlenme miktarları organizmaların türüne göre değişir, bundan dolayı çalışılacak materyalin saptanmasında bol enzim sentezleyen canlı seçilmelidir (Aslan ve Sekin, 1985).

Bacillus bakterileri tarafından üretilen enzimler, antibiyotikler ve bakteriyosinler gibi endüstriyel öneme sahip bileşikler gıda, ilaç, deterjan gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. *Bacillus*'lar amilaz, lipaz, kitinaz, ksilanaz, pektinaz, proteaz ve selülaz gibi farklı ekstrasellüler enzimleri üretme yeteneğine sahiptirler (Kati ve ark., 2016).

Termoalkalifilik suşlar, stabil enzimler üretme yeteneklerinden ötürü endüstriyel amaçlar için büyük ölçüde tercih edilir. *Bacillus licheniformis*'in alkalifilik yapısı, günümüzde deterjanlarda yaygın olarak kullanılan alkali toleranslı proteazların yerine tercih edilmesinde bir etken olmuştur (Sneha ve ark., 2015).

Bacillus suşlarının büyük miktarlarda (20–25 g / L) ekstrasellüler enzimler üretilip salgılama kapasitesi, onları en önemli endüstriyel enzim üreticileri arasına yerleştirmiştir. Farklı türlerin asit, nötr ve alkali pH aralıklarında fermente etme yeteneği, termofil cinsteki *Bacilluslar*'ın varlığı ile birleştiğinde, çeşitli özel ticari uygulamalara hitap etmek için istenen sıcaklık, pH aktivitesi ve stabilite gibi özelliklere sahip *Bacillus* türleri çeşitli yeni ticari enzim ürünlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (Schallmey ve ark., 2004).

1.1. Pektik maddeler

Pektik maddeler genç bitki hücrelerinin bitişik duvarları arasında bulunan, yapıştırıcı extracelular maddenin ince bir tabakası olan orta lamelin ana bileşenini oluşturmaktadır. Bu maddeler bitki hücre duvarının en önemli bileşenidir. Büyük oranda anhidroglakturonik asit birimlerinden oluşan karmaşık, kolloidal karbonhidrat türevlerinden meydana gelen, yüksek su tutma kapasitesine sahip maddelerdir. Pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir grup maddeye pektik maddeler denilmektedir. Pektik maddeler, meyve sularının bulanıklığından ve görünüşünden sorumlu maddelerdir. Amerikan Kimya Derneğine göre pektik maddeler protopektinler, pektik asitler, pektinik asitler ve pektinler olmak üzere dört ana gruba ayrılmaktadır. Bu maddelerden protopektinlerin suda çözünmediği, diğer üçünün kısmen veya tamamen suda çözüldüğü bildirilmiştir (Uçan ve Akyıldız., 2012). Pektik maddeler genel olarak taze materyalin ağırlığının % 0.5-4 'ü kadardır.

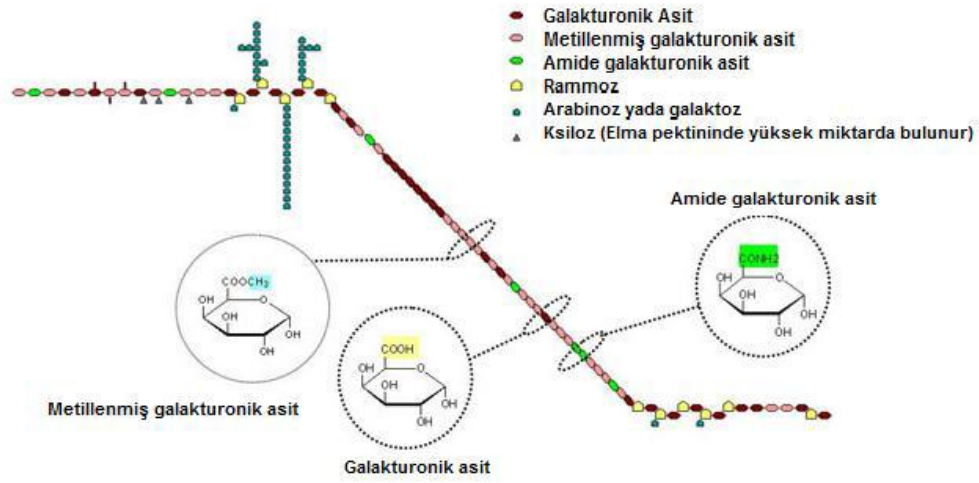
1.1. Pektinin yapısı ve sınıflandırılması

Pektinin bitkilerde büyüme, gelişme, morfogenez, savunma, duvar yapısı, hücre genişmesi, iyonların bağlanması, büyüme faktörü enzimleri, polen tüpü gelişmesi, tohum hidrasyonu, meyve gelişimi gibi olaylarda farklı rollere sahip olduğu bildirilmiştir (Dubey ve ark., 2016).

Pektin yüksek bitkilerin hücre duvarının matriks materyalinin ana bileşenidir. Esas olarak orta lamel ve birincil hücre duvarında bulunur (Albersheim ve ark., 1962). Talmadge ve ark., (1973), pektinin yüksek bitkilerdeki hücre duvarlarındaki rolünü göstermişlerdir. Genel olarak ana bileşen olarak yapısında pektinik asit içeren yapılar pektin olarak tanımlanır. Hücre duvarlarında ve doğal formda bulunur. Diğer yapısal polisakkaritlerle ve proteinlerle çözünmez propektin oluşturmak için parçalanabilir. Olgunlaşmamış bir meyvede hücre duvarlarındaki selülöz mikrofibrillere bağlıdır. Bu şekilde ki pektinler çözünmez ve meyveye sertlik kazandırır fakat pektinin meyvenin olgunlaşma sürecinde meyvede oluşan doğal enzimler tarafından değişikliğe uğratılarak yapısı değişir. Bu değişiklikler pektin zincirlerinin ve bağlı bulunan yan zincirlerin parçalanmasını içerir. Sonuçta pektin çözünerek çevresindeki hücre duvarı gevşer ve bitki yumuşar (Kashyap ve ark., 2000).

Ana bileşeni, α 1,4 glikozidik bağlarla bağlı α -D-Galakturonik asit moleküllerinden oluşur. Galakturonik asitin oluşturduğu linear poligalakturonik asit ana zincirinde α -1-2 glikozidik bağla bağlanmış ramnoz molekülleri yer almaktadır. Ramnoz moleküllerine uzun yan zincirler veya monomerler olarak nötral şekerler (arabinoz, fruktoz, galaktoz, glukoz, mannoz, ksiloz) bağlanmıştır. Pektin molekülleri, linear zincir (düz bölge) ve yan zincirlerinin bulunduğu kısım (saçaklı bölge) olmak üzere özel bir yapıya sahiptir.

Pektin Molekülü



Şekil1.2. Pektin molekülünün şematik olarak moleküler yapısının görünüşü

Galakturonik asit ünitelerinden bir kısmı metanol ile esterleşmiş haldedir. Pektin molekülünde bulunan metanol ile esterleşmiş galakturonik asit miktarının %50'nin altında ve üstünde olmasına göre düşük ve yüksek esterleşme dereceli pektin şeklinde değerlendirme yapılmaktadır. Esterleşme oranı pektinin jelleşme koşulları ve jelleşme hızının bir göstergesidir. Esterleşme oranı arttıkça jelleşme için gerekli şeker miktarı artarken, jelleşme için gerekli optimum pH değeri yükselmekte ve jelleşme süresi kısalmaktadır (Bakan ve ark., 2016).

1.1. Pektik enzimler

Çeşitli yapılarıdaki pektik maddelerin bolluğu, çok sayıda pektini parçalayan enzimlerin varlığına bağlıdır. Bu enzimlerin her biri kendine özgü optimum pH'ya, hareket mekanizmasına, substrat spesifitesine sahiptir (Houdenhoven, 1975). Pektik maddeleri

hidrolize eden enzimler pektik enzimler, pektinolitik enzimler veya pektinazlar olarak bilinir ve temel zincirlerin değişme türüne göre poligalakturonazlar, pektin esterazlar, pektin liyazlar ve pektat liyazlar olarak 4'e ayrılırlar (Hoondal ve ark., 2002).

1.2. Pektin liyaz

Litaratrlerde anlatılan pektin liyazlar kabaca 2'ye ayrılır. Birinci sınıftaki enzimler düşük pH optimumları ile karakterize edilir (5 ila 7) ve pektine mutlak bir özgüllükleri vardır. ikinci sınıftaki enzimler ise çok daha yüksek pH değerlerinde optimum (8'in üzerinde) gösterir. Bunlar Ca^{+2} iyonlarına gereksinim duymalarına göre ayırt edilirler (Houdenhoven, 1975). Pektin liyaz, pektinin tercihen yüksek oranda esterleşmiş pektinin glikozidik bağlarının transeliminasyonu ile doymamış metiloligogalakturonatlarının üretilmesini sağlar, böylece pektinin rastgele bölünmesini katalize eder. Pektin liyazların Ca^{+2} 'ye mutlak bir gereksinimi olmamasına rağmen bu ve diğer katyonlar tarafından uyarılırlar.

Alkali pektin liyazlar mantarlar ve mayalar tarafından üretilmekle beraber bakteriler özellikle de *Bacillus* türleri tarafından da üretilir. Mantarlardan elde edilenler asidik ve nötr ortamlarda optimum aktivite gösterirken, bakterilerden elde edilen pektin liyazlar alkali ortamlarda daha aktiftir (Pedrolli ve ark., 2009).

1.3. Pektinazların endüstriyel uygulamaları

Pektinazlar evlerde kullanılan ilk enzimlerdendir. Ticari uygulamaları ilk olarak şarap ve meyve suyu üretiminde 1930 yılı içerisinde gözlenmiştir. 1960'lı yıllarda bitki dokusunun doğal kimyası bariz şekilde belirginleşince bu bilgilerle birlikte bilim insanları daha verimli şekilde enzimleri kullanmaya başlamıştır (elik., 2007). Tek başına pektik enzimler ele alındığında dünya gıda enzimi üretiminin yaklaşık dörtte birini oluşturular (Alkorta ve ark., 1997).

1.3.1. Meyve suyu uygulamalarında kullanımı

Meyve sularının çıkarılması ve arıtılmasında kullanılırlar. Pektinazlar meyve suyu bulanıklık ve vizkozitesini ayarlarlar. Amilazlarla beraber % 50'ye varacak şekilde filtrasyon süresini indirir ve arıtıma yardımcı olur. Meyvenin etli kısmına etki ederek

meyve suyunun hacmini artırır. Bazen selüloz, arabinaz gibi enzimlerle birlikte kullanılarak meyve suyundaki verimi artırır (Hassan ve Ali., 2016).

1.3.1. Atık su arıtmasında kullanımı

Bitkisel gıdaların işlenmesi sırasında, endüstriyel atık sular pektin içeren bir yan ürün olarak serbest bırakılır. Pektinazlar pektinleri ortamdaki uzaklaştırarak atık suların ön arıtılması için kullanılır (Jayani ve ark., 2005).

1.3.1. Kahve ve çay fermantasyonunda kullanımı

Pektinaz kullanımı çay fermantasyonu hızlandırır, pektinleri uzaklaştırarak bir anda oluşan çay tozu köpük oluşumunu yok eder. Kahve fermantasyonunda ise kahve çekirdeklerinden zank gibi olan yapışkan tabakanın çıkarılması için kullanılır (Jayani ve ark., 2005).

1.3.1. Kağıt ve selüloz endüstrisinde kullanımı

Pektinaz kağıt yapılırken depolimer pektinleri giderir, pektin çözeltilerinin katyon ihtiyacını düşürür, süzölmüş sıvıdaki peroksit ağartmayı azaltır (Richard ve Reid., 2004). Böylece galakturonik asit polimerleri parçalanarak, katyonik polimerlerle kompleks oluşturamazlar, Suyun filtrelenmesi aşamasında dolgu maddeleri ve lifler korunarak daha kaliteli kağıt üretimi sağlanır.

1.3.1. Hayvan yeminde kullanımı

Enzim karışımı içerisinde kullanılarak hayvan yeminin vizkozitesini azaltır. Vizkozitede ki bu azalma ile; besin emilimi, biyobozunur olmayan liflerin hidrolizi ile besinlerin serbest bırakılması artar. Sonuçta aynı yemi tüketen hayvan daha çok kilo alır (Hoondal ve ark., 2002).

1.3.1. Bitki virüslerinin saflaştırılmasında kullanımı

Alkali pektinazlar selülozlarla birlikte kullanılarak bitki sapından virüsü uzaklaştırır. Böylese saf virüs konsantrasyonları elde edilir (Salazar ve Jayasinghe., 1999).

1.3.1. Yağ çıkarma işleminde kullanımı

Kanola tohumundan, hindistan cevizi tohumundan, ayçiçek tohumundan, hurma, çekirdek ve zeytinden elde edilen yağlar genellikle organik çözücüler yardımıyla

üretirler. En yaygın olarak hekzan kullanılır ki kanserojendir. Pektinazlarda dahil olmak üzere hücre duvarını bozan enzimler, yağ içeren ürünün hücre duvarı yapısını sıvılaştırarak bitkisel yağ elde etmede kullanılabilir (Kashyap ve ark., 2001).

Bu çalışmada bu molekülleri parçalamak için *Bacillus*'tan elde edilen pektin liyaz enzimi kullanılmıştır. 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. Bunun yanında meyve suyu endüstrisinde (elma, üzüm, limon, nektar, domates, portakal) kullanılan enzimler genellikle asidik pektinazlardır ve genellikle *Aspergillus niger* adlı mantardan elde edilmektedir.

Yapılan çalışmada toprak örneklerinden bakteri örnekleri izole edilmiş, pektin liyaz üretimi yüksek olan örnekler seçilerek tanımlaması yapılmış ve seçilen bakteri üzerinde çalışmalar devam etmiştir. Alkali pektin liyaz izole edilerek saflaştırılmış, enzimin moleküler ağırlığı, optimum şartları ve portakal suyu üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Brumano ve ark., (1993), *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.

Baracat Pereirave ark., (1994), Doğal liflerin üretiminde kullanmak için *Penicillium griseoroseum*'dan pektin liyaz enziminin üretimine sakkaroz ve maya ekstraktının etkisini araştırmışlardır.. Pektik olmayan karbon kaynağı olan sükroz 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 varmışlardır.

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

Minussi ve ark., (1997), bu çalışmada sükroz içeren besiyerinde üreyen *Penicillium griseoroseum*'dan üretilen pektin liyazın hangi alkoloit indükleyicilerle enzim üretimini arttırdığını araştırmış ve özellikle kafeinin pektin liyaz üretimini uyardığını göstermiştir.

Kim ve ark., (1998) Topraktan izole edilen bir bakteri türü olan PN33'ün oldukça önemli miktarda ekstraselüler pektin liyaz ürettiğini bulmuşlardır. 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.

Optimum kültür şartlarında 37 °C’de ve 32 saat inkübasyon sonucunda kültür süpernatantında 132 EU/mL pektin liyaz aktivitesine ulaşılmıştır.

Kobayashi ve ark., (1998), Alkali *Bacillus KSM-P15* suşundan yüksek oranda alkali olan pektat liyazı saflaştırarak moleküler ağırlığına ve özelliklerine bakmışlardır. Enzimin molekül ağırlığını SDS-PAGE ile yaklaşık 26.000 dalton bulmuşlardır. pH 10.5, sıcaklık ise 50-55 °C aralığında optimum aktivite göstermiştir.

Kapoor ve ark., (2000), *Bacillus sp. MG-cp-2* poligalakturonaz üretilip saflaştırmışlardır. Besi ortamında çeşitli tarımsal yan ürünler deneyerek enzim verimini etkileyip etkilemediğine bakmışlardır. Saf enzimin optimum aktiviteyi 60 °C ve pH 10’da gösterdiğini, 12 saatten fazla bir sürede 50°C’de enzimin % 100 stabil halde olduğunu belirtmişlerdir.

Kashyap ve ark., (2000), *Bacillus sp. DT17* diye tanımladıkları bakterinin önemli miktarda pektinaz ürettiklerini bulmuşlardır. Jel filtrasyonu ve iyon değişim kromorografisi yöntemlerini kullanarak enzimi saflaştırmışlar ve moleküler ağırlığını 106 kDA olarak belirlemişlerdir. Saflaştırılmış enzim, azami aktiviteyi 60 °C’de ve pH 8’de göstermiştir. CaCl₂ ve merkaptoetanol varlığı pektinaz aktivitesini arttırmıştır. Bu enzimin uygulama alanları arasında tekstil endüstrisi, bitki doku çalışmaları, meyve suyu atık su arıtmalarının yer aldığını söylemişlerdir.

Piccoli-Valle ve ark., (2001) *Penicillium griseoroseum*’u sakkaroz ve maya ekstraktı ilave edilen mineral ortamda yetiştirerek havalandırma, pH, karbon kaynağı konsantrasyonu ve mikroorganizma ekim şartlarının pektin liyaz üretimine olan etkisini araştırmışlardır. 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.

Silva ve ark., (2002), endüstriyel ve tarımsal atıklardan üretilen *Penicillium viridicatum*’dan karbon kaynağı olarak portakal küspesi, mısır tohumunun zarı, muz kabuğu, buğday kepeği kullanarak katı hal fermantasyonu ile pektin liyaz ve poligalakturonaz üretmişlerdir. Portakal küspesinde oluşan besi yerinde max. Pektin liyaz

aktivitesini 2000 U.g-1bulmuşlardır. Enzimin optimum pH'sını 10.5, sıcaklığını ise 55 °C tespit etmişlerdir.

Yadav ve Shastri, (2005), mandalina kabuğundan izole edilen *Penicillium oxalicum*'dan katı hal fermantasyonuyla pektin liyaz üreterek amonyum sülfat çökeltmesi ile kısmi saflaştırma yapmışlardır. Enzimin pH 4-8 aralığında stabil iken, pH 8'de ve 40 °C'de optimum değerde olduğunu, enzimin aktivitesinin 50 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda hızlı bir şekilde kaybettiğini göstermişlerdir.

Hamdy, (2005), Portakal kabuğu üzerinde yetişen *Rhizopus oryzae*'den amonyum sülfat çöktürmesi ve kolon kromatografisi kullanarak pektin liyaz enzimini saflaştırmış ve Moleküler ağırlığını 31 kDa bulmuştur. Saflaştırılmış pektin liyaz maximum aktivitesini 50 °C'de ve pH 7.5'de göstermiştir. Ca⁺² varlığı aktiviteyi artırırken Mg, K, Na iyonları uyarıcı etki göstermiş, Zn, Co,Mn, Hg iyonları ise enzim üzerinde inhibitör etkisi göstermiştir. Bu çalışmada ekonomik yönden nispeten düşük maliyetle enzimin üretildiği söylenmiştir.

Li ve ark.; (2005), alkali toprak numunesinden, şeker pancarı posasını karbon kaynağı olarak kullanıp, yüksek alkali koşullar içinde yetişebilen *Bacillus gibsonii* S2 suşunu izole etmişlerdir. Bu gram +, sporlu, aerobik, alkafilik bakterinin büyümesini 7-12 pH aralığı ile 4-44 °C aralığında gözlemlemişlerdir. Katı hal fermantasyonuyla hücre dışı alkalik pektinaz üretmişlerdir. Maximum poligakaturonaz verimini 48 saat inkübasyon süresinden sonra 35 °C'de 3600 U/g ile elde etmişlerdir.

Ramanujam ve ark., (2008), *Aspergillus niger*'den katı hal fermantasyonuyla şeker kamışı küspesini kullanarak pektin liyaz üretmişler. pH, sıcaklık ve fermantasyon süresinin optimum değerlerini araştırmışlardır. % 50 şeker kamışı küspesi olan besi yerinde pektin liyaz aktivitesin 209.07 U/ml ile maximum değer gösterdiğini, optimum şartlar sağlandığında ise 290.88 U/ml'ye ulaşıldığını bulmuşlardır.

Ouattara ve ark., (2008), kakao fermantasyonunda *Bacillus sp.* suşlarının pektinolitik enzim üretmelerini incelemişlerdir. Karbon kaynağı olarak pektini kullanan suşların izole edilen 98'inden 90'ının pektini parçaladığını, parçalayanlarının % 80'inde pektinolitik aktivitelerinin saptanabilir olduğunu göstermişlerdir. 48 suşun poligalakturonaz (pg), 47'sinin pektin liyaz, 23 suşun da her iki enzimi üretmiş olduğunu görmüşlerdir. Pektin liyaz üretiminde şeker kaynağı olarak galaktoz, laktoz, glikoz, nitrojen kaynağı olarak ise arjin, sistin, glutamin ve amonyum sülfatı tercih etmişlerdir.

Bunun yanında düşük konsantrasyonlardaki pektin ve demir iyonunda pektin liyaz üretimini uyardığını görmüşlerdir. Pektin liyaz veriminin anaerobik şartlarda Ph 4'ün altında çok zayıfladığını belirtmişlerdir. Hamurun bozulmasının sadece mayalar tarafından üretilen pektinolitik enzim kaynaklı olmayabileceği bunun hem maya hem *Bacillus* suşları tarafından üretilen enzimlerle olabileceğini söylemişlerdir.

Yadav ve ark., (2008), *Aspergillus flavus*'tan pektin liyaz üretilip, amonyum sülfat çökeltmesi, DEAE selüloz jel ve sephadex G-100 jel iyon değişim kromatografisi yöntemlerini kullanarak saflaştırma yapmışlardır. Enzimin optimum pH'sını 8, sıcaklığını ise 50 °C bulmuşlardır. Enzim pH 4-10 arasında 24 saat stabilken, enzimin 50 °C'nin üstüne 1 saat süreyle maruz kaldığında aktivitesini kaybetmediğini görmüşlerdir. Saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığını 38 kDa bulmuşlardır.

Sukhumsirchart ve ark., (2009), Tayland'daki bir kaplıcadan *Bacillus sp.* RN1 izole ederek termofilik pektat liyaz enzimini katyon değişim kromatografisi ve hidrofobik kolon kromatografisi kullanarak saflaştırıp, SDS-PAGE yaparak enzimin moleküler ağırlığını 33 kDa olduğunu hesaplamışlardır. Enzimin pH 4-10 arasında ve sıcaklığın 70 °C'ye kadar çıktığı durumlarda, kalsiyum ve poligalakturonik asit varlığında stabil olduğunu belirlemişlerdir. Optimum Ph'nın 10, sıcaklığın ise 90 °C olduğunu ve bu pektat liyazın yüksek sıcaklıklarda ki pektin ağlarının bozulmasında kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir.

Damak ve ark., (2010), *Penicillium occitanis*'ten anyon değişim kromatografisi ile termoaktif pektin liyaz saflaştırmışlar, SDS-PAGE ile MA'sını 39 kDa olarak tespit etmişlerdir. Üç farklı karbon kaynağı kullanılarak elma pektini ile desteklenmiş ortamda 434 U/ml ile en yüksek aktiviteye ulaşmışlardır. Optimum sıcaklık 60 °C, pH ise 9 olarak bulunmuş, enzimin 60 °C'de ki yarı ömrü 16.4 dk olarak gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, izole edilen enzimin tarımsal gıda ve pamuk endüstrisi gibi alanlarda kullanılabilirliği belirtilmiştir.

Nadaroglu ve ark., (2010), *Bacillus pumilus*'tan pektin liyaz üretilip, saflaştırmışlar ve çeşitli meyve suları üzerindeki enzimin etkilerine bakarak meyve suyu işlemlerinde kullanılabilirliğini savunmuşlardır.

Ouattara ve ark., (2010), kakao fermantasyonundan *Bacillus* suşlarını izole etmişler, çeşitli büyüme koşullarındaki bakterinin pektin liyaz enzimi üretme yeteneklerini incelemişler ve İzole elektro odaklanma yöntemiyle üretilen moleküler tanımlamasını

yapmışlardır. Kakao fermantasyonundan izole edilen *B.substilis*, *B. pumilus*, *B. fusiformis* en azından 9 U/mg ile aktivite gösterirken, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* ise düşük aktivite göstermiştir. Çalışmalarındaki sonuçlara göre; çalışılan basildeki pektin liyaz üretiminin, bakterinin büyüme evreleri ve ortamda bulunan karbon kaynağı tarafından etkilendiğini göstermişlerdir.

Namasivayam ve ark., (2011), katı atık çöplüğünden izole edilmiş *Bacillus cereus*'tan amnyum sülfat çöktürmesi yöntemiyle kısmen saf pektinaz üretmişlerdir. SDS-PAGE yaparak 30-50 kDa arasında birçok protein bantını görmüşler böylece pektinaz enziminin varlığını doğrulamışlardır. Zimogram yaparak jelde açık sarı bölge görmüşler buda enzimin kısmen saflaştırıldığını göstermiştir. Karbon kaynağı olarak pektin, nitrojen kaynağı olarak ise maya özütü kullanılmıştır. Maksimum enzim üretimine sıcaklık 37°C, pH 8.5 ve inkübasyon süresi 36 saat iken 44U/ml değeri ile ulaşmışlardır. Buna ek olarak buğday kepeği ve magnezyum kloridin de pektin liyaz yapımını arttırdığını belirlemişlerdir. Sonuçta bu çalışmayla bu bakteri ve enziminin meyve suyu imal etme çalışmalarında ve uygun maliyetli pektinaz yapımında kullanılabilceği gösterilmiştir.

Maller ve ark., (2012), *Aspergillus niveus*'u substrat olarak endüstriyel atıklar ve narenciye pektini kullanarak Czapeck besiyerinde, çalkalamaksızın 4 gün 40 °C'de katı hal fermantasyonuyla üretmişlerdir. Farklı karbon kaynaklarını da test etmişler en yüksek pektin liyaz seviyelerinin elma kabuğuyla daha sonra ise portakal kabuğuyla sağlandığını belirtmişlerdir. Tarımsal atıklardan ise en çok pektin liyaz enzimi üretimini arttıranın buğday kepeği olduğunu bulmuşlardır. Enzimin 55 °C'de maksimum aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Tarım endüstrisi faaliyetlerinden kalan atıkları biyoteknolojik yöntemlerle kullanarak düşük maliyetli, doğaya zarar vermeden, yüksek sıcaklıklarda uygulanabilir olan pektin liyaz elde edilebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Li ve ark., (2012), *Bacillus clausii*'den alkali pektin liyazı saflaştırmışlar ve bitki hastalığı direncine karşı uygulanıp uygulanamayacağına bakmışlardır. Karbon kaynağı ne indükleyici olarak şeker pancarı posasını kullanmışlar, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE sepharose ve sephadex G-75 yöntemlerini kullanarak saflaştırma işlemlerini yapmışlardır. SDS-page ile saflaştırılan enzimin tek molekül bir protein olduğunu ve molekül ağırlığının 35 kDa olduğunu belirtmiştir. pH'nın 8-10 aralığında, sıcaklığın ise 40 °C olduğu şartlarda enzimin stabil olduğunu, optimuma ise pH 10 ve sıcaklık 60 °C'de iken ulaştığını söylemişlerdir. Ca⁺² iyonlarının % 410'lara varacak şekilde enzim aktivitesini arttırdığını bulmuşlardır. Bu çalışmada saflaştırılan pektin

liyazın salatalık fidelerinde hastalık direnci oluşturabileceğini bu sayede kimyasal maddelere ihtiyacın azalarak hem çevrenin korunacağını hem de maliyetin düşeceğini ileri sürmüşlerdir.

Yadav ve ark., (2013), *Aspergillus flavus*'tan batık kültür fermantasyonuyla pektin liyazı üretilip, ultrafiltrasyon, DEAE-selülöz anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografilerini yaparak saflaştırıp, karakterizasyonunu yapmışlardır. SDS-PAGE ile yapılan analizlerinde saflaştırılmış enzimde tek protein bandı görerek ağırlığını 50 kDa olarak bulmuşlardır. Optimum pH'sını 8 ve sıcaklığını 55 °C olarak kaydetmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin *Crotalaria juncea* liflerinin hızlı bir şekilde çürümesini sağladığını göstermişlerdir.

Al Balaa ve ark., (2014), *Bacillus subtilis* PBL5Y1 suşundan elde edilen alkali pektat liyazı 3 adımda saflaştırarak, SDS-PAGE ile jelde tek bant görerek moleküler ağırlığını 42 kDa bulmuşlardır. Enzimi 9.86 kat saflaştırıp, aktiviteyi 58.85 U/mg hesaplamışlardır. Enzim 60 °C ve pH 9.5'de ve 0.5 milimolar CaCl₂ varlığında maximum aktivite göstermiştir, ortamda CaCl₂ varlığı enzim aktivitesini önemli biçimde arttırmıştır.

Sneha ve ark., (2015), *Bacillus licheniformis*'in optimum büyüme sıcaklığı ve pH değerlerini sırasıyla 70°C ve 9.5 bulmuşlar, izolatın 1 saatten fazla 100°C'ye tolerans gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Yamancı ve ark., (2016), yeraltı su kaynaklarından izole edilen *Aspergillus fumigatus* 2101 suşundan amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon yöntemlerini kullanarak pektin liyaz saflaştırmışlardır. SDS-PAGE ile molekül ağırlığını 11.5 kDa, Optimum pH'yı 8, sıcaklığı 40 °C bulmuşlardır. En yüksek pektin liyaz aktivitesine karbon kaynağı olarak narenciye pektini kullandıklarında ulaşmışlardır.

Takcı ve Türkmen, (2016), Tarımsal ürün atıkları bulunan topraktan *Bacillus subtilis* izole ederek, hücre içermeyen supernatant, etanol ve amonyum çöktürmesi gibi 3 teknikle kısmen pektinazı saflaştırıp, SDS-PAGE ile 2 protein bandı görüp, ağırlıklarını 60 ve 64 kDa olarak bulmuşlardır. Maximum enzim aktivitesini 217.44 U/mg ile etanol çöktürmesi ile saflaştırılan preparatta gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın tekstil, gıda, meyve suyu üretimi gibi endüstriyel alanlar için kaynak olacağını belirtmişlerdir.

Poturcu ve ark., (2017), *Aspergillus niger* _WHAK1'den buğday kepeği ve narenciye pektini kullanarak batık fermantasyon ile alkali pektin liyaz üretmişlerdir. Enzimi amonyum sülfat çöktürmesi, jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile 76.5

kat saflaştırmışlar, SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 23.3 kDa hesaplamışlardır. Optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 8 ve 40 °C bulmuşlar. Meyve suları ile yaptıkları deneylerde elma suyunun portakal ve nar sular ile karşılaştırıldıklarında daha düşük vizkozite ve daha yüksek geçirgenlik değerlerine sahip olduğunu görmüşlerdir.

Zhou ve ark., (2017), Fırında kurutulmuş tütün yapraklarından izole edilmiş *Bacillus subtilis* PB1'den amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim ve jel filtrasyon kromografileri yaparak alkali pektat liyaz saflaştırmışlar, moleküler ağırlığını SDS-PAGE yaparak 43.1±0.5 kDa bulmuşlardır. Optimum sıcaklığı 50 °C, pH'sını ise 9.5 bulmuşlardır. Pektin tütün yapraklarının hücre duvarında önemli bir bileşen olduğu için bunun parçalanmasıyla tütün endüstrisinin üretim ve kalitesinin artacağını öne sürmüşlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonunda Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. Adi jelöz besiyeri

Bacillus sp. bakterilerinin izolasyon aşamasında üretilmesi amacıyla kullanılmıştır (Çetin, 1968).

Besiyeri Bileşimi (g/Lt)

Et Özütü	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar	15

3.1.1.2. Nütrient broth

Bakterileri üretmek amacıyla kullanılan sıvı besiyeridir (Çetin, 1968). Saf su içerisinde çözülerek hazırlanan bu besiyeri 121 °C'de 15 dk süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri Bileşimi (g/Lt)

Et Özütü	10
Pepton	10
NaCl	5

3.1.1.3. Pektin agarlı katı besiyeri

Bacillus olarak izole edilmiş bakteri suşlarında, pektin liyaz enziminin varlığını görmek amacıyla kullanılmıştır (Li ve ark., 2012).

Besiyeri Bileşimi (g/Lt)

Pektin (elma)	10
Agar	15
Pepton	5
Yeast Extrat	5
K ₂ HPO ₄	1

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Na ₂ CO ₃	6

3.1.1.4. Pektinli sıvı besiyeri

Bacillus olarak izole edilmiş bakteri suşlarında, pektin liyaz enziminin varlığını görmek amacıyla kullanılmıştır.

Besiyeri Bileşimi (g/Lt)

Pektin	10
Pepton	5
Yeast Extrat	5
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Na ₂ CO ₃	6

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)

Pektin agarlı besiyerine ektiğimiz suşların pektin liyaz varlığını tespit amacıyla üzerlerine % 1'lik cetyltrimethyl ammonium bromide CTAB damlatılarak 10 dakika beklenilmiştir (Li ve ark., 2012).

3.1.2.2. 1M HCL VE 1M NAOH çözeltileri

Bu çözeltiler Ph ayarlamada kullanılmıştır.

1M HCL için; 82,81 mL derişik (% 37 lik ve d=1,19) HCl alınıp, 1000 mL'ye seyreltilmiştir.

1M NAOH için; 40,82 g NaOH suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır (Gürdöl, 2014).

3.1.3. Enzim aktivitesi için kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.1 %1.5'lik pektin çözeltisi

0.15 gr pektin 10 ml 0.01M pH'sı 8 olan Sodyum fosfat tamponuna ilave edilerek, çözülmüştür (Çelik, 2007).

3.1.3.2. 1N NAOH çözeltisi

4 gr NAOH distile suda çözüldü, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Çelik, 2007)..

3.1.3.3. 1N HCl çözeltisi

Yoğunluğu 1.12 g/ml olan %36.5'lik HCl'den 13.4 ml alındı ve 150 ml'ye seyreltilmiştir (Çelik, 2007).

3.1.3.4. 0.04M Tiyobarbütirik asit çözeltisi

0.23 gr TBA, 40 ml distile suya ilave edilip çözülmüştür (Çelik, 2007).

3.1.4. Kromotografi tamponları

3.1.4.1. 0.01 M Sodyum Fosfat Tamponu

İyon değişim kromografisinde hazırlanan kolona dökülmüştür.

Bileşimi

A	B		
<u>0.01 M NaH₂PO₄</u>	<u>0.01 M Na₂HPO₄</u>	<u>Distile su</u>	<u>pH</u>
1.5602 gr	1.4196 gr	1000	8

Yukarıda gösterildiği gibi A çözeltisinden 1,5602 gr, B çözeltisinden 1.4196 gr alınmış ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır, çözeltilerin pH'sı karşılarında verilen pH değerlerine göre hazırlanmıştır (Gomori, G., 1955)

3.1.4.2. 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M NaCl tamponu

İyon değişim kromatografisinde kolondan geçirilen enzim örneklerinin yıkanması için kullanılmıştır.

	<i>Bileşimi</i>	
	<u>NaCl</u>	<u>Distile su</u>
0.1 M	1.17 gr	200 ml
0.2 M	2.34 gr	200 ml
0.3 M	3.51 gr	200 ml
0.4 M	4.680 gr	200 ml

1.17 gr NaCl tartılıp ve üzerine 200 ml distile su ilave edilerek 0.1 M NaClLi zeltisi hazırlanmıştır. (Gomori, 1955).

3.1.5. Elektroferez işleminde kullanılan zeltiler

3.1.5.1. 2M Tris-HCl

24.4 gr Tris tartılıp, 50 ml distile suda çözülmüş, hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. pH 8.8'e ayarlanmıştır (Matyar, F., 2002).

3.1.5.2. 1M Tris- HCl

12.1 gr Tris tartılıp, 50 ml distile suda çözülmüş, hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. pH 6.8'e ayarlanmıştır (Matyar, F., 2002).

3.1.5.3. SDS %10

10 gr SDS tartılıp, hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Matyar, F., 2002).

3.1.5.4. Gliserol %50

50 ml %100'lk Gliseroldan alınmış, hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Matyar, F., 2002).

3.1.5.5. Bromfenol Mavisi %1

0,1 gr Bromfenol Mavisi tartılıp, 10 ml distile suda çözülmüştür (Matyar, F., 2002).

3.1.5.6. Solüsyon A

Bileşimi

Akrilamid 29.2 gr

Bisakrilamid 0.8 gr

Distile su 100 ml (Matyar, F., 2002)

Hazırlanan monomer solüsyonu +4 °C de koyu renkli şişede saklanmalıdır.

3.1.5.7. Solüsyon B (4X)

Bileşimi

2M Tris-HCl 75 ml (ph 8.8)

SDS % 10 4 ml

Distile su 21 ml (Matyar, F., 2002)

3.1.5.8. Solüsyon C (4X)

Bileşimi

1M Tris-HCl 50 ml (ph 6.8)

SDS % 10 4 ml

Distile su 46 ml (Matyar, F., 2002)

3.1.5.9. Amonyum Persülfat(AMPS)(%10)

Bileşimi

Amonyum Persülfat 0.5 gr

Distile su 5 ml (Matyar, F., 2002)

3.1.5.10. Elektroforez tamponu

Bileşimi

Tris 3 gr

Glisin 14.4 gr

SDS% 0.1 1 gr

Distile su 1000 ml (ph 8.3) (Matyar, F., 2002)

3.1.5.11. Örnek Tampon

Bileşimi

1M Tris (ph 6.8) 2 ml

Glicerol %50 2 ml

SDS % 10 4 ml

Brom Fenol %1 0.1 ml

Distile su 1 ml (Laemmli, U.K., 1970)

3.1.5.12. Markır hazırlanması

2x buffer ve 8M üre solüsyonu hazırlanmıştır. (Sigma-Aldrich SDS7B2)

Laemmli 2x: 1M ph 6.8 tris den 2 ml, %50 glycerol den 4,6ml, %10 sds den 1.6 ml, %1'lik bromfenol blue' dan 0.2 ml, merkaptto etanol'den 0.4 ml alınıp karıştırılmıştır.

8M üre: 12 gr üre 12,5 ml distile suda tamamen çözülmesi için 37 derecede ısıtılmış, son hacim 25 ml ye tamamlanıp ve filtre kâğıdı ile filtre edilmiştir.

8M üreden 0,5 ml alınıp ve 0,5 ml laemmli ile vortexde karıştırılıp ve -20 de saklanmıştır.

3.1.5.13. %13'lük Sepetaring Jel (Ayırma Jeli) (10 ml)

Bileşimi

Solüsyon A 4.3 ml

Solüsyon B 2,5 ml

ddH₂O 3.1 ml

SDS% 10 0,1 µl

AMPS 60 µl

TEMED 12 µl (Laemmli U.K., 1970)

3.1.5.14. %5'lik Stacking Jel (Toplayıcı Jel) (10ml)

Bileşimi

Solüsyon A 1.7 ml

Solüsyon C 2.5 ml

ddH₂O 5.7 ml

SDS% 10 0.1 µl

AMPS 60 µl

TEMED 20 µl (Laemmli, U.K., 1970)

3.1.5.15. Jel boyama Solüsyonu (1Lt)

Bileşimi

Coomassie blue R250 1 gr

Metanol 450 ml

Asetik Asit 100 ml

Distile su 450 ml (Matyar, F., 2002)

3.1.5.16. Jelden Boyayı Uzaklaştırma Solüsyonu (1Lt)

Bileşimi

Metanol 100 ml

Asetik asit 100 ml

Distile su 800 ml (Matyar, F., 2002)

3.1.6. Zimogram testinde kullanılan çözeltiler

3.1.6.1. 20 mM Tris-HCl bufferı

0,24 gr Tris alınıp, pH HCl ile 9'a ayarlanmış, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Damak ve ark., 2010).

3.1.6.2. %1'lik Pektin-agar çözeltisi

1 gr agar ve 1gr pektin tartılıp, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Damak ve ark., 2010).

3.1.6.3. %5'lik Ruthenium red boyası

5 gr Ruthenium red tartılıp, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır (Damak ve ark., 2010).

3.1.7. Enzimin optimum pH'sının saptanması için kullanılan tamponlar

3.1.7.1. NaH₂PO₄ tamponu

0.70 gr NaH₂PO₄ distile suda çözülüp, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır, pH'ları 7 ve 8'e ayarlanmıştır (Çelik ve ark., 2014).

3.1.7.2. NaHCO₃ tamponu

0.42 gr NaHCO₃ distile suda çözülmüş, son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır, pH'ları 9 ve 10'a ayarlanmıştır (Çelik ve ark., 2014).

3.2. Metod

3.2.1. Bakteri izolasyonu ve tanımlanması

3.2.1.1. Toprakta *Bacillus sp.* suşlarının izolasyonu

Bu çalışmada Mersin Erdemli Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nden alkali olduğu bilinen toprak örnekleri alınmıştır. *Bacillus* türü bakteriler suda da yaşayabilirler fakat endospor olanlar genellikle toprakta olduğundan, toprak örneklerinden izole edilmiştir. 6 farklı toprak örneğinden, 6 farklı tüpe birer çay kasığı koyulup, üzerine 4.5 ml distile su eklenip süspansiyon haline getirilip ve su banyosunda 30 dk 60 °C'de bekletilmiştir. Alkali toprak örnekleri sıcaklık ile muamele edildi, böylece yüksek ısıda vejetatif hücreler ölürken, spor formdakiler canlı kalacağından elimizdeki bakterilerin genellikle *Bacillus* olması sağlanmıştır.

Su banyosundan alınan 6 tüp teker teker 1/10 oranında, son tüp 10^{-6} oluncaya dek seyreltilmiştir. Bunun için ilk tüpten 500 µl alınıp ikinci tüpe konulup, ikinci tüpten 500 µl alınıp üçüncü tüpe konulmuştur. Böylece son tüp 10^{-6} olana dek işleme devam edilmiştir.

Seri sulandırma yapılarak seyreltilen 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} olan tüplerden 100 µl alınarak *Bacillus sp.* kolonilerini tek düşürmek amacıyla steril edilmiş petrilere içindeki adi jelöz besiyerine (Çetin, 1968) dragelski çubuğu ile yayma şeklinde ekim yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra petrilere tek düşen morfolojileri farklı kolonilerden iğne öze ile adi jelöz besi yerine çizgi metodu şeklinde ekim yapılmıştır. Ertesi gün besi yerinde üretilen suşlar streç film ile kapatılıp, petrilere ekim yapılan yüzeyi yukarı gelecek şekilde +4 °C'de saklanmıştır. Böylece bundan sonraki çalışmalar için stoğa alınmıştır.

3.2.1.2. Pektin liyaz varlığının saptanması

Stoğa alınan bakteri örneklerinin pektin liyaz üretilip üretilmediği araştırılmıştır. Bunun için 3.1.1.3'de belirtilen seçici besi yeri hazırlanmıştır. Hazırlanan pektin agarlı katı besi yeri için petrilere 4'e bölünerek 6 toprak örneğinden alınan örnekler iğne öze ile ekilmiş, inkibatörde 3-7 gün arası 37 °C'de üremeye bırakılmıştır (Li ve ark., 2012).

Üretilen bakteriler tek bir petriye ekilerek %1'lik CTAB ile boyanmıştır. Boyanan bakterilerin çevresinde şeffaf zonlar görünmüş ve bunların pektin liyaz enzimi üreten

bakteriler olduğu anlaşılmıştır (Li ve ark., 2012). Bu bakteriler adi jelöz besiyerine ekilerek bakteri tanımlanmasında kullanılmıştır.

3.2.1.3. Bakteri tanımlanmasında (identifikasyonunda) kullanılan testler

Stoktan alınan pektin liyaz pozitif olan 18 adet suşdan en büyük şeffaf zon çapına sahip 6 adet suş seçilmiştir. Seçilen bu suşların 6 tanesi tür tanımlanmasının yapılması için ÜSKİM'e gönderilmiştir. ÜSKİM'de The Biolog Gen III Microplate metoduyla biyokimyasal testler ve gram boyama testleri yapılarak tür teşhis edilmiştir. Kullanılan kitler aerob gelişen bakteriler içindir. Tür teşhisi için 1 gün önceden stoktan alınan bakteriler adi jelöz besi yerine çizgi ekim metoduyla tek tek düşecek şekilde öze ile ekilmiştir. Steril edilmiş kürdanla bakteri alınmış, solüsyonda karıştırılmış, vortexle çalkalanmıştır. Bakteri Türbidimetrede ölçüldükten sonra solüsyon petriye dökülmüş ve 100 µl olacak şekilde platelere koyulmuştur. Bu platelerin 96 kuyucuğu vardır, 2 tanesi – ve + kontrol grubu (içerisinde su var), 94 tanesi ise fenotip test grubudur. Test grubundan 71 tanesi karbon kaynağı kullanım analizleri, 23 tanesi ise kimyasal duyarlılık deneyleri içerir. Bütün kimyasallar ve besiyerleri önceden doldurulmuş ve kurutulmuş hazır biçimdedir. Hazırlanan platerler 32 °C'de 1 gün inkübe edilmiştir. Bu işlem sonucunda platelerde renk değişimleri olmuştur. Bilgisayar programındaki kayıtlı kütüphanede eşleşen bakteriler belirlenmiştir.

3.2.2. *Bacillus licheniformis* bakterisinin üreme aralığı

Nutrient broth besiyerine *Bacillus licheniformis* bakterisi ekilip 150 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. Nutrient broth'dan alınan bakteriler içlerinde pektinli sıvı besiyeri bulunan 10 ml' lik 10 tane erlene konulmuştur. İnkübatörde 37 °C' de 150 rpm'de inkübe edilmiştir. Her günün sonunda erlendeki bakteri spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda substrattan oluşan köre karşı ölçülmüştür (Kashyap ve ark., 2000).

3.2.3. Enzimin aktivitesinin saptanması

Aktivite tayininde elimizde ki bakteri enziminden 0.25 ml çözelti, 0.25 ml substrat (%1.5 lik pektin) çözeltisine ilave edilerek ve 10 dk 37°C'de inkübe edilmiştir. Toplam 0.5 ml olan reaksiyon karışımına 50 µl 1N NaOH ilave edilip ve 80 °C olan su banyosunda 5 dk bekletilip, soğutulmuştur. Bu karışıma 0.6 ml 1N HCl ve 0.5 ml 0.04 M TBA çözeltisi eklenmiş ve bir kez daha 80 °C de 5 dk bekletilip, soğutulmuştur. Elde edilen renkli

çözeltiler 550 nm’de enzim yerine enzimin içinde bulunduğu tampon eklenerek hazırlanan köre karşı okutulmuştur (Çelik, 2007).

3.2.4. Saflastırma

3.2.4.1. Enzim izolasyonu

5. günün sonunda pektinli sıvı besi yerinde üreyen *Bacillus licheniformis* bakterisi santrifüj cihazında 7000 g’de 4°C’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant(ham özüt) enzim çalışmalarında kullanılmıştır (Kashyap ve ark., 2000).

3.2.4.2. İzole edilen enzimin saflaştırılması

Tampon olarak 0.01 M, pH’sı 8 olan sodyum fosfat kullanılmıştır. 1 Lt tampon için 0.01 M NaH_2PO_4 ’den 1.5602 gr, 0.01 M Na_2HPO_4 ’den ise 1.4196 gr alınıp üzeri 1 Lt’ye tamamlanmış, pH 8’e ayarlanmıştır. Santrifüj sonrası elde edilen supernatant diyaliz poşetine konulup 4°C’de 2 saatte bir tampon değiştirilerek 3 kere diyaliz edilmiştir. Son diyaliz 1 gece sürmüştür. Diyalizden sonra enzim pH’sı tekrar 8’e ayarlanıp kromotografiye hazır hale getirilmiştir.

Selüloze yapışan proteinleri kolondan toplamak için molaritesi 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M olan 100 ml’lik NaCl solüsyonları hazırlanmıştır. Elimizdeki diyaliz edilmiş 15 ml enzim 0.01 M sodyumfosfat bufferıyla pH’sı 8 olan DEAE Sephacel kolonuna yüklenmiştir. Tamponu ve herbir konsantrasyondaki NaCl çözeltisini kolondan geçirerek absorbe olan protein içeren fraksiyonlar 5 ml halinde tüplerde toplanmış ve örnekler 280 nm’de taranmıştır (Nadaroglu ve ark., 2010). Aktivite gösteren konsantrasyonu aynı tüpler birleştirilmiş 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 M olacak şekilde 280 nm’de taranmıştır.

3.2.4.3. Saflaştırılan enzimin aktivite tayini

Aktivite gösteren farklı konsantrasyondaki 4 tüp birleştirilerek mix adı verilmiş, milipore 15 ml'lik filtre üniteleri ile 5000 rpm'de 20 dk santrifüj edilip, 1 gece boyunca diyaliz edilmiştir. Bu aşamadan sonra 280 nm'de aktivite tayini yapılmıştır (Çelik, 2007). Bundan sonra çalışmalarımıza bu mix adını verdiğimiz saf enzimle devam edilmiştir.

3.2.5. SDS-PAGE ve Zimogram testleri

3.2.5.1. Protein örneklerinin SDS-PAGE analizi

Elde edilen enzim örnekleri moleküler büyüklüklerinin saptanması ve saflaştırılmış proteinin saflık derecelerinin tayini için SDS-PAGE yapılmıştır.

Elektroforez tankı ve kaset dediğimiz cam plakalar distile su ve alkol ile yıkanmıştır. Hazırlanan %13'lük ayırıcı jel pipet yardımıyla kasete koyulup üzeri su ile tamamlanmıştır. Yarım saat bekleyip donduktan sonra %5'lik toplayıcı jel, ayırıcı jelin üstüne koyulup taraklar takılmıştır (Laemmli, U.K., 1970). Tamamen donduktan sonra taraklar çıkarılmış mix olarak tanımlanan saflaştırılmış enzim, ependorf tüplere sırayla 10 µl enzim, 10 µl örnek tamponu (loading dye) olacak şekilde 1/1 oranında pipet yardımıyla konulmuştur. Bir tane ependorf tüpüne 5 µl moleküler ağırlığı bilinen Sigma- Aldrich SDS7B2 moleküler marker koyulup kaynayan suda enzim örnekleri 5 dk kadar, marker 1 dk kadar ısıtılmıştır. Enzim örnekleri 5 dk buzdolabının dondurucu kısmında bekletilip, marker en başta ki kuyucuğa olmak üzere enzim örnekleri de kuyulara Hamilton şırıngasıyla koyulmuştur. İşlemler sırasında örnekler buz üzerinde bekletilmiştir (Damak ve ark., 2010).

Bu aşamadan sonra hazırlanan kaset, içi elektroforez yürütme tamponuyla dolu olan tanka koyulup ve enzim örnekleri 80 v'de 20 dk, 150 v'de 40 dk koşturulmuştur. Cam plakadaki jeller çıkarılıp, saf sudan geçirildi. 2 saat boyunca çalkalanarak coomasie brilliant blue R250 protein boyası boyasında bekletilip tekrar saf sudan geçirilmiş ve 18 saat kadar da çalkalanarak boyayı geri alma solüsyonunda bekletilmiş, protein bantları dışındaki boyanın uzaklaştırılması ve protein bantlarının belirginleşmesi sağlanmıştır (Damak ve ark., 2010).

3.2.5.2. Zimogram analizi

SDS-PAGE yapmadan önce 5 dk kadar kaynayan suda beklettiğimiz enzim örnekleri bu defa direk hazırladığımız kasetteki kuyulara aynı örnek tamponu (loading dye) ile yüklenmiştir. SDS-PAGE'deki tüm şartlar zimogram testinde de sağlanmıştır. SDS-PAGE jelinde enzim aktivitesinin (zimogram) saptanması için koşturulan jel Ph'sı 9 olan 20 mM TrisHCl bufferında 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra %1'lik pektin agar çözeltisinde 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra jel %0,05'lik ruthenium red boyasıyla 10 dakika muamele edilmiş ve bantlar gözükeneye kadar distile suda yıkanmıştır (Damak ve ark., 2010).

3.2.6. Enzimin optimum pH'sının saptanması

Bacillus licheniformis'den üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enziminin pH'sının 7-10 arasındaki aktif olduğu değer bulunmuştur. Aktivite tayininde kullanılan substrat çözeltisi için pH 7-8'de NaH₂PO₄, pH 9-10'da NaHCO₃ tamponu kullanılmıştır. Her iki tampon için de ayrı substrat çözeltisi hazırlanmış ve 1M NaOH ve 1M HCl ile pH'ları ayarlanmıştır.

pH 7, 8, 9, 10 için bir örnek ve kör hazırlanıp örnek tüplere aynı pH'daki enzim ve substrat konulurken, köre enzimin içinde bulunduğu tampon ve aynı pH'ya sahip substrat konulmuştur (Çelik ve ark., 2014). 37 °C'de 10 dk inkübe edilen tüplerin 3.4.6. anlatıldığı gibi aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.7. Enzimin optimum sıcaklığının saptanması

Bacillus licheniformis'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin 40-70 °C arasında ki aktiviteleri bulunmuştur. Bir örnek ve bir de kör olmak üzere her sıcaklık için 2 tüp hazırlanıp örnek tüpe enzim ve substrat, köre ise tampon ve substrat konulmuş aynı sıcaklıkta 10 dk. inkübe edilmiş, (Çelik ve ark., 2014) ve 3.4.6. anlatıldığı gibi aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.8. Saflaştırılan pektin liyaz enziminin portakal suyu üzerindeki etkisi

Bacillus licheniformis'ten üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enziminin portakal suyu elde etme işleminde kullanarak, portakal suyu verimini etkileyip etkilemediği incelenmiştir.

Marketten Portakal alınarak, yıkanmış, kabukları soyulmuş ve blender yardımıyla homojen bir püre hale getirilmiştir. Yapılan püre 1/1 oranında saf suyla seyreltilip (40 gr portakal, 40 gr su) ve pH'sı 9'a ayarlanmıştır. Bu portakal püresinden 7.5 gram alınarak 50 mL'lik behere konulmuş ve üzerine 1.5 mL saflaştırılmış pektin liyaz, diğer behere ise 7.5 gram püre alınıp 1.5 mL ham özüt (saflastırma işlemlerine tabi tutulmamış supernatant) ilave edilmiştir. Üçüncü ve en son behere ise 7.5 gram portakal püresi ve 1.5 mL saf su ilave edilerek hazırlanan örnek kör olarak kullanılmıştır. Beherler 60°C 'lik bir su banyosunda karıştırılarak 5 saat inkübe edilmiştir. Püreler soğutulduktan sonra portakal suları süzgeç kâğıdından süzölmüştür. Elde edilen portakal suları kontrol (saf su ile yapılan deneme) numune ile karşılaştırılarak portakal suyu elde etme verimi aşağıda verilen şekilde hesaplanmıştır (Çelik., 2007).

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

Meyve suyu alındıktan sonra geriye kalan meyve posası sabit tartıma gelinceye kadar 105°C'de kurutulmuştur. Saf pektin liyaz ve ham ekstrakt kullanılarak elde edilen meyve sularından geriye kalan kuru maddelerdeki ağırlık kaybı saf su ile yapılan deneme (kontrol deneme) ile karşılaştırılarak % parçalanma olarak hesaplanmıştır (Soares ve ark., 2001).

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

Elde edilen portakal suyunun hacmi, içinde enzim yerine su bulunan kontrol'e göre kaç kat arttığı 100 gr portakal için hesaplanmıştır.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1.Topraktan *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve pektin liyaz üreten suşların belirlenmesi

Alkali olduğu bilinen toprak örnekleri laboratuvar koşullarında yapılan işlemlerden sonra adi jelöz besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra üzerinde üreme görülen ve morfolojilerine bakılarak *Bacillus* sp. olduğu düşünülen, toplam 53 bakteri izole edilmiştir.

Elimizdeki 53 bakteri suşundan pektin liyaz pozitif suşlarını bulmak için, pektin agarlı katı besi yerine ekim yapılmış ve 18 suşun ürettiği belirlenmiştir. Bu suşlar adi jelözden izole edilerek tekrar pektin agarlı katı besiyerine ekilmiştir. Petriye CTAB damlatılarak boyanmıştır. En büyük zon çapına sahip 6 adet bakteri seçilmiş ve adi jelöz besi yerine ekim yapılarak tanımlanması için +4 °C’de saklanmıştır.



Şekil 4.1. Pektin liyaz üreten *Bacillus* sp. suşunun görüntüsü

4.2. Bakteri İdentifikasyonu

Pektin liyaz (+) olarak belirlenen 6 örnek tür tanımlanmasının yapılması için ÜSKİM’e gönderilmiştir. ÜSKİM’de The Biolog Gen III Microplate metoduyla tanımlaması yapılan 6 adet suştan daha önce pek çalışılmamış ve programın

kütüphanesindeki 1300 bakteriden en yüksek eşleşme oranına sahip suş çalışmaların diğer basamaklarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Sonuçlar pozitif ve negatif olarak değerlendirilmiştir.

The Biolog Gen III Microplate yöntemiyle tanımlanan bu suş *Bacillus licheniformis* olarak belirlenmiştir. Ekim yapılarak stoğa alınan kültür enzim aktivitesi ve diğer biyokimyasal testler için +4 °C’de saklanmıştır (Telke ve ark., 2011).



Çizelge 4.1. *Bacillus licheniformis* Bakterisinin İdentifikasyonunda Kullanılan Biyokimyasal Testlerin Düzeni ve Pozitif-Negatif sonuçları (The Biolog Gen III Microplate)

A1 Negative Control -	A2 Dextrin +	A3 D-Maltose +	A4 D-Trehalose +	A5 D-Cellobiose +	A6 Gentioblose +	A7 Sucrose +	A8 D-Turanose +
B1 D-Raffinose +	B2 α-D-lactose ∅	B3 D-Mellbiose +	B4 β-Methyl-D- Glucoside +	B5 D-sallicin +	B6 N-Acetyl-D- Glucosamine +	B7 N-Acetyl-8-D- Mannosamin e ∅	B8 N-Acetyl-D- Galactosamin e ∅
C1 α-D-Glucose +	C2 D-Mannose +	C3 D-Fructose +	C4 D-Galactose +	C5 5-Methyl Glucose ∅	C6 D-Fucose ∅	C7 L-Fucose ∅	C8 L-Rhamnose +
D1 D-Sorbitol +	D2 D-Mannitol +	D3 D-Arabitol ∅	D4 Myo-inositol +	D5 Glycerol +	D6 D-Glucose- 6-PO4 ∅	D7 D-Fructose- 6-PO4 ∅	D8 D-Aspartic Acid +
E1 Gelatin +	E2 Glycyl-L- Proline +	E3 L-Alanine +	E4 L-Arginine +	E5 L-Aspartic Acid +	E6 L-Glutamic Acid +	E7 L-Histidine ∅	E8 L- pyroglutamic Acid ∅
F1 Pectin +	F2 D-Galacturoni Acid +	F3 L-Galactonic Acid Lactone ∅	F4 D-Gluconic Acid +	F5 D-Glucuronic Acid +	F6 Glucuronami de ∅	F7 Mucic Acid +	F8 Quinic Acid ∅
G1 P-Hydroxy- Phenylacetic Acid -	G2 Methyl Pyruvate +	G3 D-Lactic Acid Methyl Ester ∅	G4 L-Lactic Acid +	G5 Citric Acid +	G6 α-Keto- Glutaric Acid ∅	G7 D-Mallic Acid ∅	G8 L-Mallic Acid +
H1 Tween 40 +	H2 T-Amino- Butyric Acid ∅	H3 α-Hydroxy- Butyric Acid ∅	H4 β-Hydroxy- D,L Butyric Acid -	H5 α-Keto- Butyric Acid ∅	H6 Acetoacetic Acid +	H7 Proptonic Acid ∅	H8 Acetic Acid +
A9 Stachyose ∅	A10 Positive Control +	A11 PH 6 +	A12 pH5 ∅	B9 N-Acetyl Neuraminic Acid -	B10 1% NaCl ∅	B11 4%NaCl +	B12 8%NaCl +
C9 Inosine ∅	C10 1% Sodium Lactate +	C11 Fusidic Acid -	C12 D-Serine -	D9 D-Serine -	D10 Troleandomy cin ∅	D11 Rifamycin SV ∅	D12 Minocycline -
E9 L-Serine +	E10 Lincomycin +	E11 Guanidine HCl +	E12 Niaproof 4 -	F9 D-Saccharic Acid ∅	F10 Vancomycin ∅	F11 Tetrazollum Violet ∅	F12 Tetrazollum Blue -
G9 Bromo- Succinic Acid +	G10 Nalidixic Acid ∅	G11 Lithium Chloride +	G12 Potassium Tellurite +	H9 Formic Acid ∅	H10 Aztreonam +	H11 Sodium Butyrate +	H12 Sodium Brom -

o : negatif ve pozitif kontrole göre sınırdaki değerleri ifade eder.

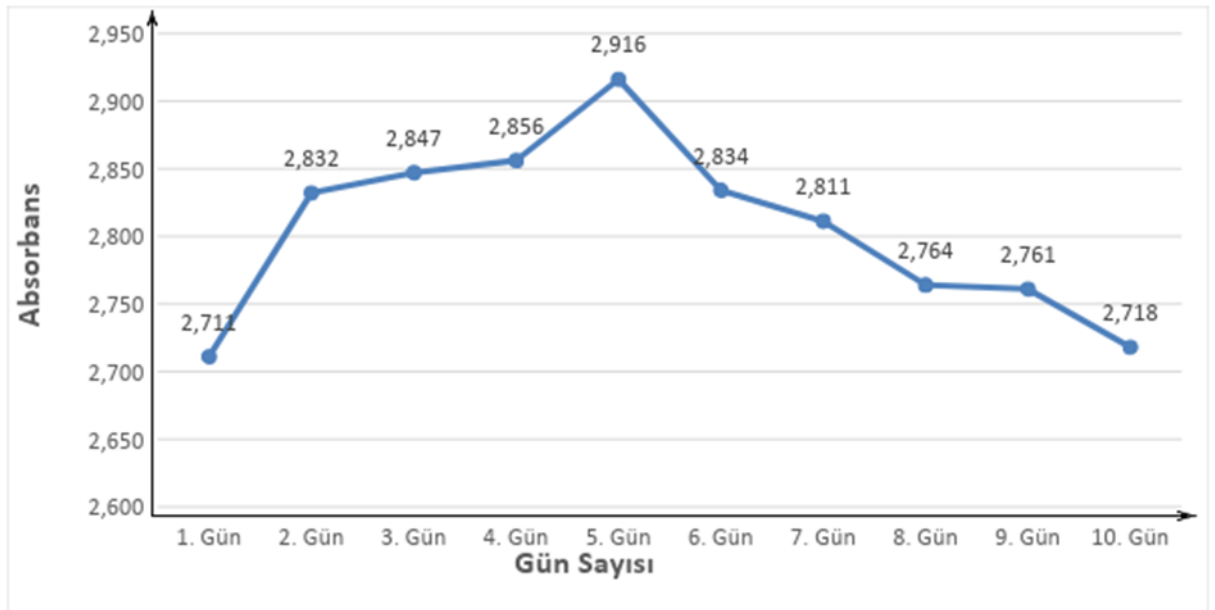
e : positif uyumsuz değerleri gösterir.

ə : negatif uyumsuz değerleri gösterir.

4.3. *Bacillus licheniformis* bakterisinin üreme aralığına ait bulgular

10 gün boyunca pektinli sıvı besiyerine ekimi yapılan bakteriler gözlemlenmiştir. Her 24 saatin sonunda *Bacillus licheniformis* erlendeki şişesinden alınarak spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda okunmuştur.

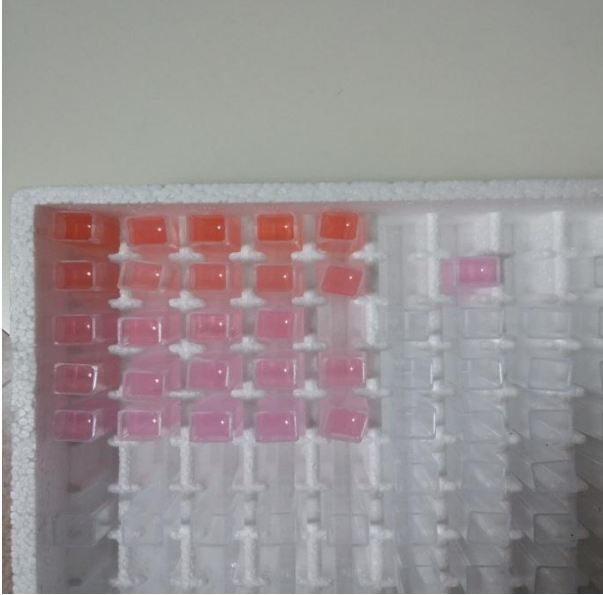
Çalışmalar sırasında *Bacillus licheniformis* bakterisinin 1. ve 10. Günler arasındaki büyümesi gözlenmiştir. 1. gün başlangıç dönemidir, çoğalma için hazırlıklarını yapan bakteri, metabolizmasını arttırarak, hacmini büyütüştür. 1. ve 5. günler arası logaritmik dönemde bakteri sayısı hızla artmış bunun yanında bakterilerin hacmi küçülmüştür. Bakteri en iyi değeri 5. günde göstermiştir, 5. günden sonra büyüme hızı azalarak, ölüm dönemine girmiştir. 10. günde 1. günden sonra ki en düşük değeri göstermiştir. Dyk ve ark., (2010) çalışmalarında *Bacillus licheniformis* bakterisini 3. gün (72. Saat) sonunda, Sneha ve ark., (2015) 3. günden sonra, ellerindeki bakterilerin büyüme değerlerini göz önüne bulundurarak deneylerine devam etmişlerdir. Sonuçların grafik olarak değerleri şekil 2 de gösterilmiştir.



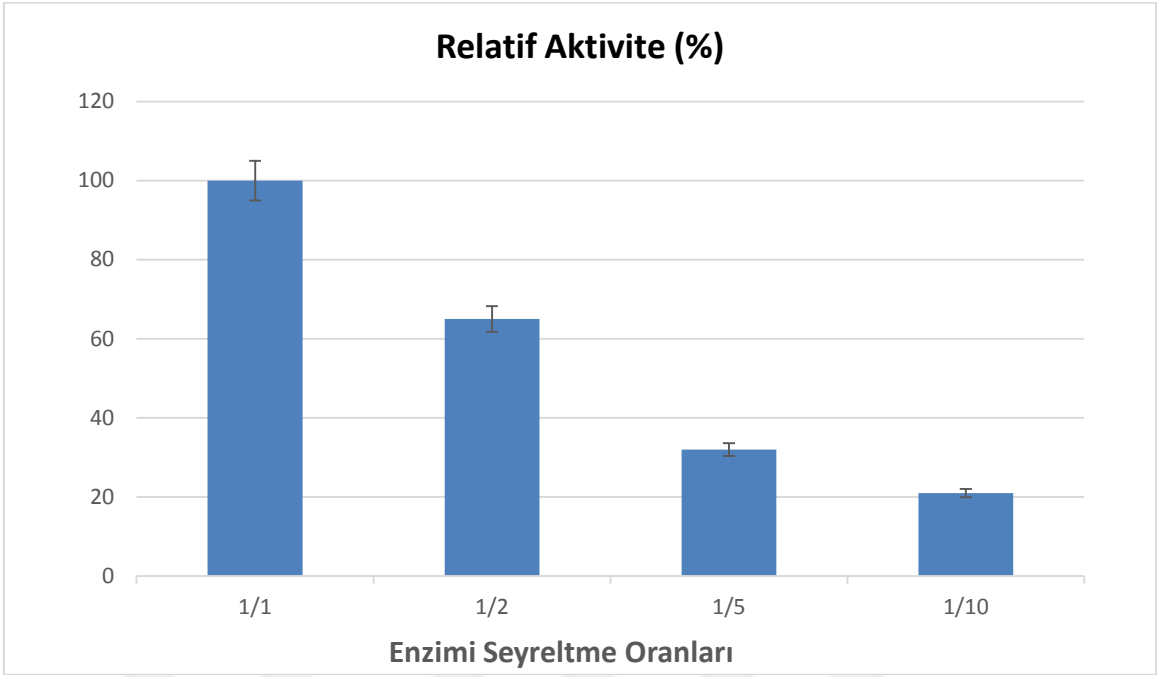
Şekil 4.2. *Bacillus licheniformis*' in büyüme eğrisi

4.4. *Bacillus licheniformis*'in pektin liyaz üretme kapasitesi

10 ml Nutrient broth sıvı besiyerine *Bacillus licheniformis* bakterisi ekilip 150 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün üreyen bakteriden 5 ml alınıp ve 50 ml pektinli sıvı besiyerine ekilmiştir. Üremesinin 5. gününde bakteri inkübatörden alınmış ve 7000 g'de 10 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant 1/1, 1/2, 1/5, 1/10 oranlarında seyreltilmiş bu aşamadan sonra 3.4.6. daki aktivite tayinine geçilmiştir. Örnekler 550 nm'de okunarak supernatantta pektin liyaz aktivitesi tespit edilmiş böylece *Bacillus licheniformis*'in pektin liyaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Aktivite sonrası renk değişimleri şekil 4.3'de, verilerle ilgili grafik gösterimi şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Supernatantın Pektin liyaz aktivitesi ölçümü sonrasında oluşan renk değişimleri

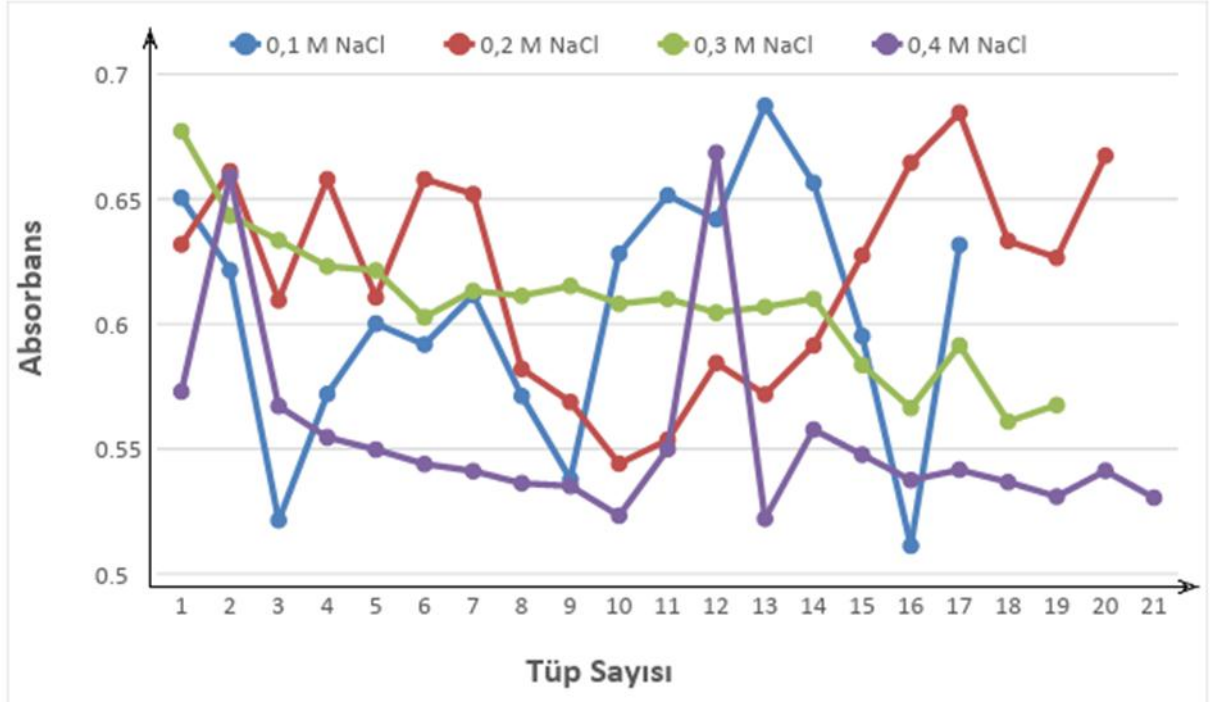


Şekil 4.4. Seyreltilmiş pektin liyaz enziminin aktivite yüzdeleri

Pektin liyaz enziminin supernatantta çalışılmış seyreltme oranlarına göre; 1/1 oranında ki enzimde maximum relatif aktivite görülmüştür. Enzim seyreltikçe aktivite düşmüş, 1/2' de % 65, 1/5 ' de % 35, 1/10 oranında ise % 21 ile en düşük seviyesine gelmiştir.

4.5. *Bacillus licheniformis*'den üretilip saflaştırılan pektin liyaz enzimlerinin aktivite sonuçları

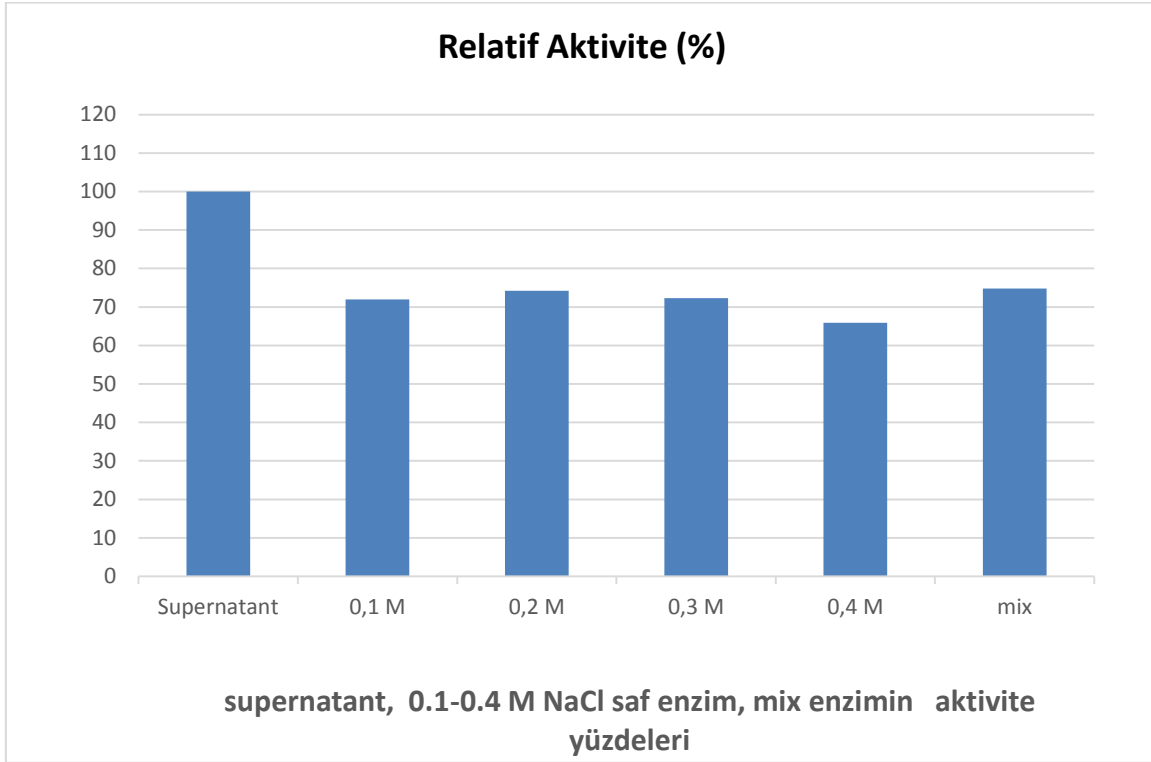
Saflaştırma işlemi için DEAE-Sephacel iyon değişim kromatografisi kullanılmıştır. *Bacillus licheniformis*'den elde edilen supernatant 4°C'de 2 saatte bir diyaliz edildikten sonra kolona yüklenmiştir. Tampon ve herbir konsantrasyondaki NaCl çözeltisi kolondan geçirilerek fraksiyonlar 5 ml halinde tüplerde toplanmış ve örnekler 280 nm'de okunarak aktivite tayini yapılmış, elde edilen bulgular şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. DEAE- Sephacel iyon değişim kromatografisi kullanarak *Bacillus licheniformis*' den üretilip saflaştırılan Pektin Liyaz enziminin NaCl ile gradient elüsyonu

Düşük aktivite gösteren tüplerden; 0.1 M konsantrasyondan 3,8,9,16 numaralı, 0.2 M konsantrasyondan 8,9,10,11,13 numaralı, 0.3 M konsantrasyondan 16,17,18,19 numaralı tüpler elenmiş, 0.4 M konsantrasyondan ise 2 ve 12 numaralı tüpler hariç diğer tüpler elenmiş, kalan yüksek aktivite gösteren tüpler birleştirilmiş ve mix adı verilmiştir.

Supernatant, 0.1M-0.4 M konsantrasyon aralığındaki ki tüpler 280 nm'de okunmuş sonuçlar grafikte gösterilmiştir. Mix olarak adlandırılan tüp, konsantrasyon tüplerinde 5000 rpm'de 20 dk santrifüj edilip 1 gece boyunca diyaliz edilmiştir. Bu aşamadan sonra da 280 nm'de aktivite tayini yapılmıştır. Aktivite sonuçlarının grafiği şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *Bacillus licheniformis*' den üretilip saflaştırılan Pektin Lyaz enziminin ve supernatantın aktivite değerleri

Bacillus licheniformis'den elde edilen enzimin supernatantı, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M konsantrasyonlu saf enzimleri ve yüksek aktivite gösteren tüplerin içinde bulunduğu mix adını verdiğimiz saf enzimin relatif aktivitelerini karşılaştırdığımızda maximum aktivite % 100 ile supernatantta bulunmuştur. 0.1 M'de relatif aktivite % 72 iken, 0.2 M'de % 74'de, 0.3 M'de % 72'de, 0.4 M'de % 65', mix'de ise %74 olarak ölçülmüştür.

Madu, J.O., (2016)'nun yapmış olduğu çalışmada çöp atıklarından izole ettiği *Bacillus licheniformis*'den DEAE-sephadex kromatografisi ile pektinazı saflaştırmış ham enzimin yani supernatantın aktivite verimi % 100 iken ve saf enzimin aktivite verim yüzdesini % 39.15 olarak bulmuştur. Kobayashi ve ark., (1998) ise *Bacillus* suşlarından elde ettikleri pektat liyazda kültür supernatantının verimi % 100 iken, amonyum sülfat çökelmesi ile verimin % 80'e, superQ-toyopearl kromatografisi ile % 67'ye, biocad-hs kromatografisi ile de % 55'e düştüğünü göstermiştir. Bununla beraber toplam protein miktarı da gittikçe azalmış fakat saflık derecesi de giderek artmıştır. Hamdy, H., (2005) *Rhizopus oryzae*'den saflaştırdığı pektin liyazın ham özütünün verimi % 100 iken, amonyum sülfat çökelmesi, jel fitrasyonu, iyon değişim kromatografisi ile sırasıyla %

70.29, 53.32, 42.96 olarak bulmuştur. Toplam aktivite ve protein miktarı azalırken saflık derecesi ve spesifik aktivite artmıştır.

Relatif aktivitenin supernatantta yüksek olup saflaştırıldıktan sonra düşmesinin nedeni bekleme süresinin uzamasıyla beraber sonuçta aktivitenin korunamaması olarak yorumlanabilmektedir. Bunun yanında saflaştırma basamaklarının artmasıyla her adımda aktivite kaybında artış olduğu söylenebilir.

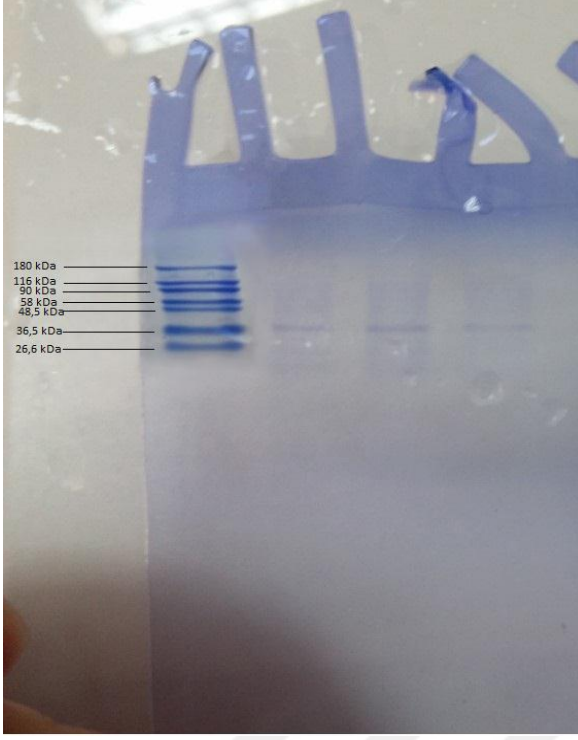


Şekil 4.7. *Bacillus licheniformis*'den izole edilip, üretilen enzimin DEAE-Sephacel iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması

4.6. *Bacillus licheniformis*'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enziminin SDS-PAGE ve Zimogram sonuçları

Bacillus licheniformis'den üretilip DEAE-Sephacel iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan pektin liyaz enziminin saflığını kontrol etmek ve molekül ağırlığını saptamak amacıyla 3.4.8.1. ve 3.4.8.2.'de anlatıldığı gibi SDS-PAGE ve Zimogram yapılmıştır. Jel formülasyonları Laemmli U.K. (1970)'e göre uyarlanmıştır. Standart protein olarak Sigma-Aldrich SDS7B2 markeri 180, 116, 90, 58, 48.5, 36.5, 26.6 kDa ağırlığa sahip 7 farklı proteinin karışımından oluşmaktadır. Elektroforez işleminden sonra jel comassie blue ile boyanmış, boya geri alınmıştır. Görülen protein bandının fotoğrafı çekilmiştir. Elde edilen görüntü şekil 4.8'de verilmiştir. Zimogram testinde ise jel

TrisHCl bufferında, pektin agar çözeltisinde bekletilmiş ve ruthenium red ile boyanmıştır, boya geri alındıktan sonra elde edilen görüntü şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.8. SDS-PAGE sonrası jelin coomassie blue ile boyamadan elde edilen görüntüsü



Şekil 4.9.SDS-PAGE sonrası jelin Ruthenium red ile boyamadan sonra elde edilen zimogram görüntüsü

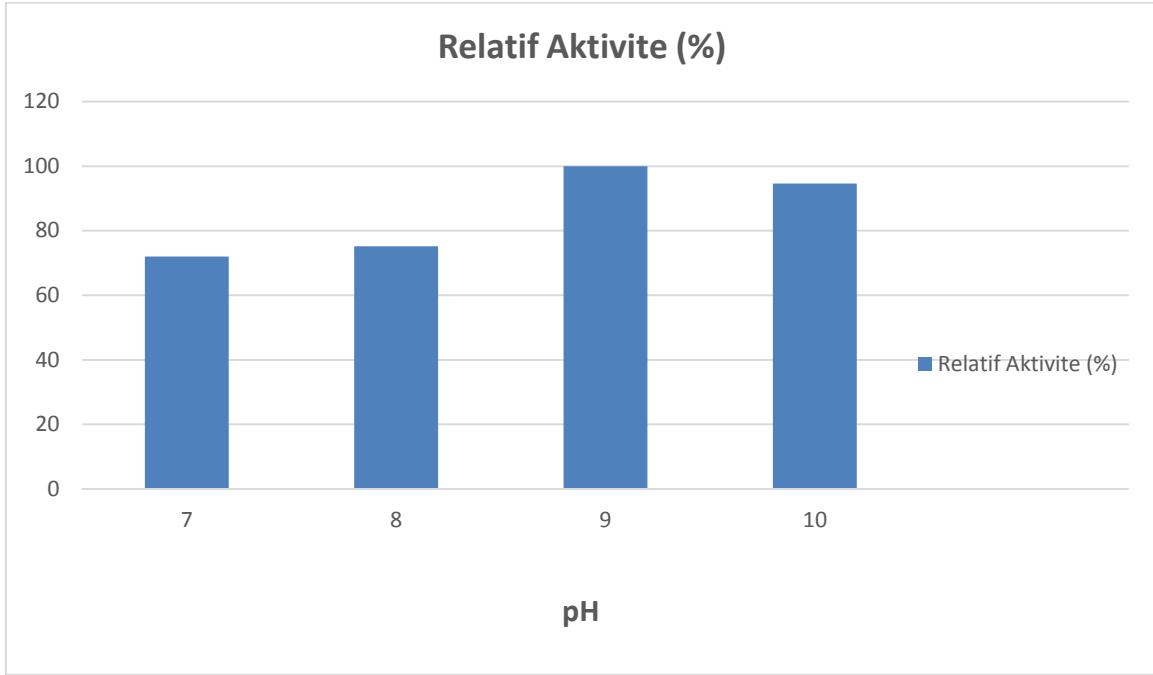
Enzimin zimogram görüntülerinde tek bant görülmüştür. Bu bant 36.5 kDa ağırlığa sahiptir. Şekil 4.9'daki sarı bölge saflaştırılmış pektin liyaz varlığını göstermektedir. Madu ve ark., (2016)'nın *Bacillus licheniformis* ile yaptığı çalışmada Pektinaz enziminin 38 kDa büyüklüğe sahip tek bant şeklinde gördüğünü bildirmiştir. Payasi ve ark., (2006) muzdan pektat liyaz enzimini izole edip, saflaştırarak enzimin molekül ağırlığını 43 kDa olarak bulmuşlardır. Demir ve ark., (2011) *Geobacillus stearothermophilus* Ah22'den ürettikleri pektin liyazın 36 kDa ağırlığa sahip tek bant içerdiğini belirtmiştir. Gang ve ark., (2010) *Bacillus* sp. N16-5'dan saflaştırdıkları pektat liyazda 42 kDa ağırlığa sahip tek polipeptit zinciri görmüşlerdir. Schlemmer ve ark., (1987) ise *Pseudomonas fluorescens* W51'den saflaştırdıkları pektin liyazın ağırlığını 32 ± 1 kDa bulmuşlardır. Semenova ve ark., (2006) *Penicillium canescens*'den saflaştırdıkları pektin liyaz enziminin 38 kDa ağırlığında tek banta sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Genellikle mikroorganizmalardan elde edilen pektinazın moleküler ağırlığının 30-70 kDa aralığında olduğu bildirilmiştir (Klug-Santner ve ark., 2006, Banu ve ark., 2010). Bununla birlikte, moleküler ağırlığı 70 kDa'dan daha büyük olan mikrobik kaynaklardan pektinazlar hakkında raporlar bulunmaktadır (Kashyap ve ark., 2000, Kobayashi ve ark., 2001). Önceki çalışmalarda gerek bitkiyle, gerek mantar çeşitleriyle, gerekse *Bacillus* suşlarıyla yapılan enzim deneylerinde elde edilen sonuçlar çalışmamızın sonuçlarını desteklemektedir.

4.7. *Bacillus licheniformis*'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum pH sonuçları

Materyal ve metod bölümünde belirtildiği gibi Nadaroğlu ve ark., (2010)'larının yapmış oldukları çalışmalar doğrultusunda; elde edilen enzimin, pektin liyaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi pH 6, 7, 8, 9 değerleri için belirlenmiştir. Buna göre;

Bacillus licheniformis'den elde edilen enzimin pH'sını belirlemek için 3.4.9.'da anlatıldığı şekilde deneyler yapıp, aktivitesine bakılmıştır. Elde edilen absorbans değerlerine göre % relatif aktivite bulunmuştur. Sonuçların grafiği Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Saflaştırılan enzimin maximum relatif aktivitesi % 100 ile pH'sının 9 olduğu tüpte görülmüştür. Yüksek aktivite gösterdiği aralık 9-10 olarak bulunmuştur. Aktivitesi pH 9'dan pH 7'ye kadar giderek düşmüştür. En düşük relatif aktivite ise % 72 ile pH 7'de görülmüştür.



Şekil 4.10. *Bacillus licheniformis*' den üretilip saflaştırılan Pektin Liyaz enzimi üzerine pH'nın etkisi

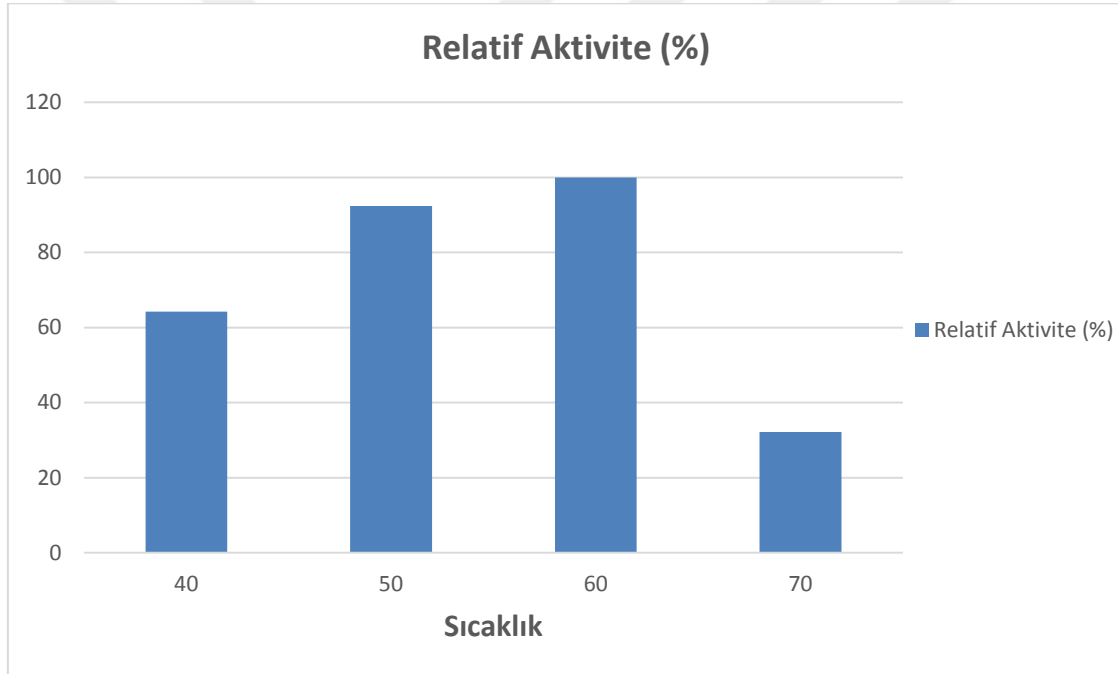
Embaby ve ark., (2014) *Bacillus licheniformis* SHG10'den izole edilen poligalakturonaz enziminin pH 3-11 aralığında aktivite gösterdiğini söylemiştir. Ramanujam ve ark., (2008) *Aspergillus niger*'den ürettikleri pektin liyazın pH 4-8 aralığını çalışmış, enzimin maximum aktivite gösterdiği değeri pH 6 olarak bulmuşlardır. Hamdy ve ark., (2005) *Rhizopus oryzae*'den saflaştırdıkları pektin liyazın pH'sını 7.5, Namasivayam ve ark., (2011) *Bacillus cereus*'dan kısmi saflaştırmayla ürettikleri pektinazın yapımının arttığı optimum değeri 8.5, Yadav ve ark., (2008) *Aspergillus flavus*'dan saflaştırdıkları pektin liyazın pH 6-9 aralığında %50 ile maximum aktivite gösterirken, enzimin optimum değerinin 8 olduğunu göstermişlerdir. Sukhumsirchart ve ark., (2014) *Bacillus sp.* RN1'den saflaştırdıkları pektat liyazın pH 10'da yüksek aktivite sergilediğini, aktiviteyi pH 4-10 arasında nispeten stabil olarak bulmuşlardır. Al balaa ve ark., (2014) *Bacillus subtilis* BPLSY1'den saflaştırdıkları pektat liyazı pH 7-11 arasında çalışmış ve maximum aktiviteyi ise 9.5 gözlemlemişlerdir.

Mantarlarla yapılan önceki çalışmalarda çalışmalarda pH değerleri asidiğe yakınken, *Bacillus* bakterisi ile yapılan çalışmalarda pH değerleri alkali değerler göstermiştir. İzole ettiğimiz enzimin alkalifilik olduğu görülmektedir. *Bacillus* suşlarının çoğu pH 7-9 arasında yüksek miktarlarda pektinaz üretirler (Kobayashi ve ark., 1998). Bu sonuçlara göre alkali toprak örneklerinden izole ettiğimiz *Bacillus licheniformis*' den

ürettilip saflaştırılan pektin liyaz enziminin pH'sı optimal değer olan 9'un üzerinde veya aşağısında değiştiğinde enzim aktivitesinin de azaldığı görülmüştür. Enzim aktivitesinin optimumdan uzaklaşması pH değerinin enzimin stabilitesi üzerindeki etkisine bağlı olabileceği belirtilmektedir (Dixon ve ark., 1979).

4.8. *Bacillus licheniformis*'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enziminin optimum sıcaklık sonuçları

Bacillus licheniformis'den elde edilen enzimin optimum sıcaklıklarını belirlemek için 3.4.10'da anlatıldığı şekilde deneyler yapıp, aktivitesine bakılmıştır. Şekil 4.11'deki Aktivite-sıcaklık grafikleri çizilmiştir.



Şekil 4.11. *Bacillus licheniformis*'den üretilip saflaştırılan Pektin Liyaz enzimi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekilde de görüldüğü gibi enzim maximum aktiviteyi 60 °C'de göstermektedir. Enzim 50 °C'de aktivitesini % 92 ile korurken, 40°C'de % 64'e, 70 °C'de ise % 32'ye düşmüştür. Birçok ticari uygulamada kullanılan pektinaz (Pectinex 3XL) bile, 50 °C veya daha yüksek sıcaklıklarda uzun süreli maruz kalmalarda inaktive olabilmektedir (Ortega ve ark., 2004). Enzimin ısı ile denatürasyonu ve bunu takiben yüksek sıcaklıklardaki uzun süreli maruz kalma nedeniyle inaktivasyonun, pektinaz aktivitesindeki bu düşüşten sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda, Embaby ve ark., (2014) *Bacillus licheniformis* SHG10'den izole edilen poligalakturonaz enziminin 50 °C'de optimum aktiviteye ulaştığını belirtmişlerdir. Chiliveri ve ark., (2014) *Bacillus tequilensis* SV11' den saflaştırdıkları pektin liyazın optimal aktivite gösterdiği sıcaklığı 60 °C, Rehman ve ark., (2015) *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21'den kısmi saflaştırdıkları poligalakturonazın 40 °C'de stabil olduğunu, Poturcu ve ark., (2017) *Aspergillus niger*_WHAK1'den alkalik termostabil pektin liyaz saflaştırıp 40-80 °C arasında çalışarak optimum sıcaklığı tespit etmeye çalışmış ve 40-70 °C aralığında farklı zamanlarda yeterli aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. En yüksek aktivite değerine ise 40 °C'de 60 dk ile ulaşmıştır. Maller ve ark., (2012) *Aspergillus niveus*'tan ürettikleri pektin liyazın optimal sıcaklığını ise 55 °C olarak tespit etmişlerdir.

Mikroorganizmalar genel olarak psikrofil, mezofil ve termofil olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olup kendi aralarında ılımlı termofiller (45-65 °C) ve hipertermofiller (85 °C) şeklinde ayrılırlar (Güven, R.G., 2011). Bu sonuçlara göre izole ettiğimiz enzimin ılımlı termofil özellikte olduğunu söyleyebiliriz.

4.9. *Bacillus licheniformis*'den üretilen, saflaştırılan pektin liyaz enzimiyle yapılan portakal suyu elde etme sonuçları

Pektin liyaz enzimini portakal suyu üretiminde kullanarak meyve suyu verimini etkileyip etkilemediği incelenmiştir. Bunun için saflaştırılmış enzim ile beraber, ham özüt (supernatant) bu işlemlerde kullanılmıştır.

100 gr portakal için portakal suyunun hacminin kontrole göre kaç kat arttığı ve yüzde kaç oranında parçalandığı hesaplanmıştır. Bulunan sonuçlar çizelge 4.3. ve 4.4.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Bacillus licheniformis*'den elde edilen ham özüt ve saflaştırılmış pektin liyaz ile işlem görmüş portakal suyu miktarının kontrole göre artış miktarı

Portakal (100gr)	Su (kontrol)	Hamözüt (saflaşmamış pektin liyaz)	Saf pektin liyaz
Hacim (ml)	70	82	88
Verim %		16	25

Çizelge 4.3. *Bacillus licheniformis*'den elde edilen ham özüt ve saflaştırılmış pektin liyaz ile işlem görmüş portakal suyu püresinin kuru maddesindeki yüzde parçalanma oranı

Portakal (100gr)	Su (kontrol)	Hamözüt(saflaşmamış pektin liyaz)	Saf pektin liyaz
Kuru madde (gr)	6.7	3.5	1.9
Azalma %		47	71

Saf pektin liyaz enzimi ile elde edilen meyve suyu miktarı, ham özüt ile elde edilenden daha büyük olduğu ortaya çıkmıştır. 100 gr portakal ile işlem gören saf pektin liyaz enziminden 88 ml, ham özütten 80 ml portakal suyu elde edilmiştir. *Bacillus licheniformis*'den üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimi ile işlem gören portakal püresinden elde edilen meyve suyunun kontrole göre % 25 oranında arttığı, ham özütün ise % 16 oranında arttığı görülmektedir.

Çelik ve ark., (2014) *Geobacillus pallidus* p26'dan pektin liyaz saflaştırmış ve elma, şeftali, havuç ve muz üzerinde denemişlerdir. Saf pektin liyaz ve enzimin ham özütü verim yüzdesi olarak sırayla elma için %, 7 ve 20, şeftalide 9 ve 22, havuçta 9 ve 12 oranında bulunmuştur. En yüksek verim ise muzda % 1020 ve 400 olarak gerçekleşmiştir. Singh ve ark., (2012) *Aspergillus niger*'den pektinaz enzimi izole edip, bel (Aegle

marmelos Correa) meyvesi üzerinde deneyerek meyve suyu verimini incelemişler. Muamele edilmemiş numunenin verimi % 69 iken, enzimin veriminin % 72.5-82.6 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Nadaroglu ve ark., (2010) *Bacillus pumilus*'dan saflaştırdıkları pektin liyazın kaç kat verim verdiğini elma, muz, havuç ve portakal üzerinde denemiş sırasıyla kontrole göre ham özüt ve pektin liyazın elmada, % 9.5 ve 13, muzda 118.8 ve 162.5, havuçta 108.7 ve 108.7, portakalda ise 116.8 ve 117.8 olarak arttığını bulmuşlardır.

Bacillus licheniformis'den üretilen ve saflaştırılan pektin liyaz enzimi ve ham özüt ile muamele edilmiş portakal suyu miktarı ile % parçalanma oranı, doğru oranda artmıştır. Dolayısıyla katı miktarı azalmış ve parçalanma miktarı artmıştır. Yapılan portakal püresi sahip olduğu pulp miktarı, yani meyve suyu dışındaki katı parçacık miktarının fazla olmasıyla vizkoz olduğundan, enzimlerle işlem gördükten sonra görülür oranda vizkozitesi azalmıştır. Vizkozitesinin çok azalmasının nedeni pektinlerin % 71 oranında parçalanmasından doğmaktadır. Sonuçta elde edilen meyve suyunun kontrole göre arttığı bulunmuştur.

5. SONUÇLAR

Çalışmada Mersin Erdemli Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nden alınan alkali toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* suşlarından pektin liyaz üreten mikroorganizmalar izole edilmiş, pektin liyaz üretimi yüksek olan mikroorganizmalar içinden birer izolat seçilmiş, en iyi üretici olan izolat üzerinde yapılan biyokimyasal analizler sonucunda daha önce üzerinde çok az çalışılan *Bacillus licheniformis* suşu ile çalışılmaya karar verilmiştir.

Bacillus licheniformis pektinli katı besiyerinde en iyi üreme gösterdiği gün olan 5. günde alınarak pektin liyaz enzimini izole etmek için santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elimizde bulunan supernatant DEAE-sephacel iyon değişim kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. Saf enzimin relatif aktivitesine bakılarak % 74 relatif aktivite gösterdiği bulunmuştur. Saflaştırılan pektin liyaz %13'lük ayırıcı jel ve %5'lik toplayıcı jel formülasyonlarıyla SDS-PAGE tekniği kullanılarak test edilmiştir. Zimogram analizinden sonra moleküler ağırlığı 36.5 kDa olan tek bant görülmüştür.

Saflaştırılan pektin liyaz enziminin karakterizasyonu yapılarak optimum pH'sı pH 7-10 arasında çalışılarak maximum aktivite 9'da, optimum sıcaklığı ise sıcaklık 40-70 °C arasında çalışılarak maximum aktivite 60 °C'de bulunmuştur. Saflaştırılan pektin liyazın pH profili, sıcak alkali pH aralığında gerçekleştirilebilen olası endüstriyel proseslerin kriterlerini karşıladığından bu alanlarda kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Saflaştırılan enzim portakal üzerinde denenmiştir. %30-40 ile kuru ağırlığındaki pektin miktarı, farklı materyallere göre (elmada % 15-18, limonda 30-35, pancarda 25-30, havuçta 7) daha fazladır (Whitaker, 1984). *Bacillus licheniformis*'den saflaştırılan pektin liyaz enzimi portakal suyu ile muamele edilerek meyve suyu elde etme veriminin etkisine bakılmış ve ham özütün % 16, saflaştırılan pektin liyazın ise % 25 oranında meyve suyu oranını arttırdığı saptanmıştır. Saflaştırılan pektin liyaz portakal püresinde bulunan pektinleri % 71'e varan oranlarda parçalamıştır.

Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbohidrazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Ağırlıklı olarak çalışılan biyoteknolojik açıdan öneme sahip enzimler şunlardır; galaktozidaz, amilaz, pullulanaz, selüloz, kitinaz, ksilinaz ve pektinaz. Bu enzimler besin, kimyasal ve farmasötik

endüstrileri ile çevre biyoteknolojisinde potansiyel kullanım alanına sahiptirler (Güven, R.G., 2011).

Pektin parçacıkları portakal suyunu bulanık hale getirir. Ürünü pazarlanabilir hale getirmek için pektinaz kullanılarak durultma yapılır. Portakal suyunun klasik işlenmesinde, ısıtma aromayı bozar ve donma pahalıdır. Dolayısıyla enzimler kullanılır ve meyve sularının stabilitesi korunurken, bulanıklık giderilir (Prathyusha ve Suneetha, 2011).

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır (Wiseman, A., 1987).

Daha önceki çalışmalarda pektinazlar içerisinden poligalakturonaz, pektin esteraz, pektat liyaz ve pektin liyazlarla ilgili araştırmalar yapılmıştır. Enzim kaynakları olarak çoğunlukla mantarlar kullanılmıştır. Pektin liyazlar esas olarak mantar cinsi olan *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* tarafından üretilir, ancak bakteri ve maya pektin liyazları hakkında bazı raporlar vardır (Yadav ve ark., 2009). Bakteri kullanılan çalışmalarda ise genelde *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii* gibi türler kullanılmıştır. Bu çalışmada ise pektin liyaz enzimleriyle ilgili üzerinde neredeyse çalışılmamış olunan *Bacillus licheniformis* seçilmiş ve çalışılmış böylece bundan sonraki çalışmalara veri sağlanarak kaynak oluşturulması düşünülmüştür.

Bacillus licheniformis'in kolayca kültüre alınabilmesi, besin isteğinin az olması, istenmeyen toksik yan ürün oluşturmaması, düşük maliyetle fazla miktarda elde edilmesi, elde edilen enzimin meyve suyu endüstrisinde, atık su arıtma sistemlerinde, kahve ve çay fermantasyonunda, kağıt ve selüloz endüstrisinde, hayvan yeminde, bitki virüslerinin saflaştırılmasında, yağ çıkarma işlemleri gibi alanlarda kullanılabilmesi nedeniyle ekonomik değerinin olması bu sayede izole edip, saflaştırdığımız enzimin ve üreten bakterinin ülkemiz ekonomisinde büyük önemi olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Al Balaa, B., Esmail, R., Yazaji, S., 2014. Purification and characterization of an extracellular alkaline pectate lyase from *Bacillus subtilis* BPLSY 1. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20 (No 1), 193-198.
- Albersheim, P., Killias, U., 1962 Studies Relating to The Purification and Properties of Pectin Transeliminase. Archives of Biochemistry and Biophysics 97, 1, 107-115
- Alkorta, I., Garbisu, C., Liama, M.J., Serra, J.L., 1997. Industrial applications of pectic enzymes: a review.
- Anfinsen, C.B., 1973. Principles That Govern The Folding of Protein Chains. Science, 181, 4096
- Aslan, A., Sekin, Y., 1985. Besin Endüstrisinde Kullanılan Mikrobiyal Kaynaklı Enzimler. Gıda The Journal of Food, Yıl:10, 2
- Atasağungil, M., 1965. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları sayı 8
- Bairoch, A., 2000. The Enzyme database in 2000. Nucleic Acids Research, 28, 1, 304–305
- Banu, A.R., Devi, M.K., Gnanaprabhal, G.R., Pradeep, B.V., Palaniswamy, M., 2010. Production and Characterization of Pectinase Enzyme from *Penicillium Chrysogenum*. Indian Journal of Science and Technology 3, 4
- Bakan, A., Muslu, A., Aslan, Ö., Bahar, B., Ozcan, N., 2016. Şeker Pancarı Küspesinden Pektin Elde Edilmesi ve Gıdalarda Katkı Maddesi Olarak Kullanılması, Türkiye12. Gıda Kongresi, Edirne
- Baracat-Pereria, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O., 1994. Production of Pectin Lyase by *Penicillium griseoroseum* Cultured on Sucrose and Yeast Extract for Degumming of Natural Fibres. Letters in Applied Microbiology Vol. 18, Issue 3
- Barredo, J.L., 2005. Microbial Enzymes ve Biotransformations. Humana Pres, Totowa, New Jersey.
- Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, 11. Baskı sy. 10, 2010.
- Brumano, M. H. N., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F., Silva, D. O., 1993. Production of Pectin Lyase by *Penicillium griseoroseum* as a Function of the Inoculum and Culture Conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.9, Issue 2, pp 225–228
- Chiliveri, S.R., Linga, V.R., 2014. A Novel Thermostable, Alkaline Pectate Lyase From *Bacillus tequilensis* SV11 With Potential in Textile Industry. Carbohydrate Polymers 111, 264–272.

- Çelik, S.Y., 2007. Meyve Suyu Üretiminde Kullanım Amaçlı, Pektin Liyaz Üreten Yeni Mikroorganizmaların Aranması ve Bulunan Türlerden Enzim Saflaştırılıp Karakterize Edilmesi. Doktora Tezi.
- Çelik, S.Y., Demir, N., Demir, Y., Adıgüzel, A., Güllüce, M., 2014. Production of Pectin Lyase From *Geobacillus pallidus* p26, Purification, Characterization and Fruit Juice Application. *Acta Chimica Slovaca*, Vol. 7, No. 1, pp. 57—63.
- Çetin, E.T., 1968. Pratik Mikrobiyoloji. İstanbul Üniversitesi, 2. Baskı, Mentis Matb. İstanbul 645 s. Dermatological Preparation Containing Copperbindingproteins for Skin Lightening. Int. Pat. Appl. WO2004017931.
- Damak, N., Hadj-Taieb, N., Bonnin, E., Bacha, A.B., Gargouri, A., 2010. Purification and biochemical characterization of a novel thermoactive fungal pectate lyase from *Penicillium occitanis*.
- Demir, N., Nadaroglu, H., Tasgin, E., Adıgüzel, A., Güllüce, M., 2011. Purification and Characterization of a Pectin Lyase Produced by *Geobacillus stearothermophilus* Ah22 and Its Application in Fruit Juice Production. *Ann Microbiol*, 61: 939–946.
- Dixon, M., Webb, E. C., 1979. Enzyme kinetics, In: *Enzymes*, 3d. Academic Press. New York, San Francisco, A subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, Longman Group, p. 47
- Dubey, A.K., Yadav, S., Kumar, M., Anand, G., Yadav, D., 2016. Molecular Biology of Microbial Pectate Lyase: A Review. *British Biotechnology Journal* 13(1): 1-26.
- Dyk, J.S.V., Sakka, M., Sakka, K., Pletschke, B.I., 2010. Identification of Endoglucanases, Xylanases, Pectinases and Mannanases in The Multi-Enzyme Complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme and Microbial Technology* 47, 112–118.
- Embaby, A.M., Masoud, A.A., Marey, H.S., Shaban, N.Z., Ghonaim, T.M., 2014. Raw agro-industrial orange peel waste as a low cost effective inducer for alkaline polygalacturonase production from *Bacillus licheniformis* SHG10. *SpringerPlus*, 3: 327.
- Gang, L., Rao, L., Xue, Y., Zhou, C., Zhang, Y., Ma, Y., 2010. Cloning, Expression, and Characterization of a Highly Active Alkaline Pectate Lyase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *J. Microbiol. Biotechnol*, 20(4), 670–677.
- Gürdöl, F., 2014. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvar Uygulamaları. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı.

- Güven, R.G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) Yıl: 2011 Cilt: 09, 1, 1-10.
- Gomori, G., 1955. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. Mechanisation and Automation in Dairy Technology, 1. cilt
- Hamdy, H., 2005. Purification and Characterization of The Pectin Lyase Produced by *Rhizopus oryzae* Grown on Orange Pells. Annals of Microbiology, 55 (2) 205-211.
- Hassan, B., Ali, S., 2016. a Review on Biotechnological Impact of Pectinases in Industries. Journal of Scientific Research in Pharmaceutical, chemical & Biological Sciences (1) ,(2)
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K., 2002. Microbial Alkaline Pectinases and Their Industrial Applications: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol 59: 409-418.
- Houdenhoven, F.E.A., 1975. Studies on Pectin Lyase.
- Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochemistry 40, 2931–2944.
- Kashyap, D.R., Chandra. S., Kaul. A., Tewari, R., 2000. Production, purification and Characterization of Pectinase from a *Bacillus sp.* World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 277-282.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R., 2001. Applications of Pectinases in The Commercial Sector: a Review. Bioresource Technology 77, 215-227.
- Kapoor, M., Beg, Q.K., Bhushan, B., Dadhich, K.S., Hoondal, G.S., 2000. Production and Partial purification and Characterization of a Thermo-alkali Stable Polygalacturonase from *Bacillus sp. MG-cp-2*
- Katı, H., Karaca, B., Gülşen, Ş.H., 2016. Toraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması Ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması. SAÜ Fen Bil Der 20. Cilt, 2, s. 281-290.
- Kıran, Ö., 2001. Doğal ortamdan izole edilen alkalifilik *Bacillus sp.* suşlarında α -amilaz üretimi, enzimin pH ve sıcaklık stabilitesinin araştırılması. Doktora Tezi.
- Kim, J.C., Kim, H.Y., Choi, Y.J., 1998. Production and Characterization of Acid-stable Pectin Lyase from *Bacillus sp. PN33*. Journal of Microbiology and Biotechnology 8, 4, pp.353-360

- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T., Hatada, Y., Ito, S., 1998. Purification and Properties of a Low-molecularweight, High-alkaline Pectate Lyase from an Alkaliphilic Strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63: 1, 65-72.
- Kobayashi, T., Higaki, N., Yajima, N., 2001. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 65(4): 842-847
- Klug-Santner, B.G., Schnitzhofer, W., Vrsanska, M., Weber, J., Agrawal, P.B., Nierstrasz, V.A., Guebitz, G.M., 2006. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *Journal of Biotechnology* 121: 390-401.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of The Head of Bacteriophage. *Nature* 22: 680–685
- Lilly D.M.J., 2005. Structure, Folding and Mechanisms of Ribozymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 15: 313–323
- Li, Z., Bai, Zhihui., Zang, B., LI, Baojv., Bo, J., Zhang, M., Lin, F., Zhang, H., 2012. Purification and Characterization of Alkaline Pectin Lyase from a Newly Isolated *Bacillus clausii* and Its Application in Elicitation of Plant Disease Resistance. *Appl Biochem Biotechnol* 167: 2241–2256.
- Li, Z., Bai, Z., Zhang, B., Xie, H., Hu, Q., Hao, C., Xue, W., Zhang, H., 2005. Newly isolated *Bacillus gibsonii* S-2 capable of using sugar beet pulp for alkaline pectinase production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21: 1483–1486.
- Madu, J.O., Okonji, R.E., Torimiro, N., Agboola, F.K., 2016. Purification and Characterization of Pectinase from *Bacillus licheniformis* obtained from a Cassava Waste Dump. *Journal: Journal of Advances in Biology* Vol. 8, No. 3
- Maller, A., Silva, T.M., Damasio, A.R.L., Reis, V.R.A., Jorge, J.A., Polizeli, M.L.T.M., 2012. Production of Pectin Lyase by *Aspergillus niveus* under Submerged and Solid State Fermentations Using Agro-Industrial Residues as Carbon Sources. *International Research Journal of Microbiology (IRJM)* (ISSN: 2141-5463) Vol. 3(1) pp. 029-035.
- Matyar, F., 2002. Anaerobik Ortamlardan İzole Edilen Bakteri Gruplarında Amilaz ve Selülaz Aktivitelerinin Araştırılması ve Yapılabilecek Genetik Manipülasyonlar, Doktora Tezi, 2002.

- Minussi, R.C., Baracat-Pereria, M.C., Coelho, J.L.C., Silva, D.O., 1997. Methylxanthines as Inducers of Pectin Lyase in *Penicillium griseoroseum* Cultured on Sucrose. Letters in applied Microbiology, 24, 369-372.
- Nadaroglu, H., Taşkın, E., Adıgüzel, A., Güllüce, M., Demir, N., 2010. Production of a Novel Pectin Lyase From *Bacillus pumilus* (P9), Purification and Characterisation and Fruit Juice Application. Romanian Biotechnological Letters Vol. 15, No.2,
- Namasivayam, E., Ranindar, J., Mariappan, K., Alil, J., Kumar, M., Layaraj, R.L., 2011. Production of Extracellular Pectinase by *Bacillus cereus* Isolated from Market Solid Waste. Process biochemistry 46, 888-893.
- Nikaidou, N., Naganuma, T., Kamio, Y., Izaki, K., 1995. Production, Purification, and Properties of a Pectin Lyase from *Pseudomonas marginalis* N6301, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 59, 2, 323-324,
- Ortega, N., Diego, S., Perez-Mateos, M., & Busto, MD., 2004. Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. Food Chemistry 88: 209–217.
- Ouattara, H.G., Reverchon, S., Niamke, S.L., Nasser, W., 2010. Molecular Identification and Pectate Lyase Production by Bacillus Strains Involved in Cocoa Fermentation. Food Microbiology 28, 1-8.
- Ouattara, H., Koffi, B.L., Karou, G.T., Sangare, A., Niamke, S.L., Diopoh, J.K., 2008. Implication of *Bacillus sp.* in The Production of Pectinolytic Enzymes During Cocoa Fermentation. World J Microbiol Biotechnol 24: 1753–1760.
- Prathyusha, K., Suneetha, V., 2011. Bacterial Pectinases and their Potent Biotechnological Application in Fruit Processing/Juice Production Industry: A Review. Journal of Phytology 3(6): 16-19
- Payasi, A., Misra, P.C., Sanwal, G.G., 2006. Purification and Characterization of Pectate Lyase From Banana (*Musa acuminata*) Fruits. Phytochemistry 67, 861-869.
- Piccoli-Vale, R.H., Brandi, I.V., Silva, D.O., Passos F.J.V., 2001. Pectin Lyase Production by *Penicillium griseoroseum* Grown in Sugar Cane Juice in Repeated Batch Cultures. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17, 5, pp 433–437.
- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona E.C., 2009. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. The Open Biotechnology Journal, 3, 9-18.

- Poturcu, K., Özmen, İ., Bıyık, H.H., 2017. Characterization of an Alkaline Thermostable Pectin Lyase from Newly Isolated *Aspergillus niger*_WHAK1 and Its Application on Fruit Juice Clarification. Arab J Sci Eng, 42: 19–29.
- Ramanujam, P.K., Saritha, N., Palani, S., 2008. Production of Pectin Lyase by Solid State Fermentation of Sugarcane Bagasse Using *Aspergillus niger*.
- Riberio, D.S., Henrique, S.M.B., Oliviera, L.S., Macedo, G.A., Fleuri, L.F., 2010. Enzymes in Juice Processing: a Review. International journal of food science and technology. 45, 4, 635-641
- Ricard, M. and I.D. Reid. 2004. Purified Pectinase Lowers Cationic Demand in Peroxide-Bleached Mechanical Pulp. Enzyme Microb. Tech., 34(5): 499-504.
- Rehman, H.U., Aman, A., Nawaz, M.A., Qader, S.A.U., 2015. Characterization of pectin degrading polygalacturonase produced by *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21. Food Hydrocolloids 43, 819-824.
- Salazar, L. and U. Jayasinghe. 1999. Fundamentals of purification of plant viruses. Tech. Plant virol., CIP, Training man., JO, Virus Purifi., Inter. l Potato Centre, Peru. pp.,: 1-10.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P., 2004. Developments in The Use of *Bacillus* species for Industrial Production. Can. J. Microbiol. Vol. 50,
- Schlemmer, A.F., Ware, C.F., Keen, N.T., 1987. Purification and Characterization of a Pectin Lyase Produced by *Pseudomonas fluorescens* W51. Journal of Bacteriology, p. 4493-4498.
- Semenova, M.V., Sinitsyna, O.A., Morozova, V.V., Federova, E.A., Gusakov, A.V., Okunev, O.V., Sokolova, L.M., Koshelev, A.V., Bubnova, T.V., Vinetskii, Y.P., Sĭnitsyn, A.P., 2006. Use of a Preparation from Fungal Pectin Lyase in the Food Industry.
- Silva, D., Martins, E.D.S., Silva, R., 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: 318-324.
- Singh, A., Kumar, S., Sharma, H.K., 2012. Effect of Enzymatic Hydrolysis on the Juice Yield from Bael Fruit (*Aegle marmelos* Correa) Pulp. American Journal of Food Technology 7 (2): 62-72.

- Sneha, A., Sagar, S., Meenakshi, C., Rashmi, R., 2015. Optimized Production of Pectate Lyase by a Thermoalkaliphilic Strain of *Bacillus licheniformis*. *Adv. Biores.*, 6 (2) 2015: 65-71.
- Soares, M.M.C.N., Da Silva, R., Carmona, E.C., Gomes, E., 2001. Pectinolytic Enzyme Production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 79-82,
- Sukhumsirchart, W., Kawanishi, S., Deesukon, W., Chansiri, K., Kawasaki, H., Sakamoto, T., 2009. Purification, Characterization, and Overexpression of Thermophilic Pectate Lyase of *Bacillus sp. RNI* Isolated from a Hot Spring in Thailand. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73 (2), 268–273
- Takcı, H.A.M., Turkmen, F.U., 2016. Extracellular Pectinase Production and Purification from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* Strain. *International Journal of Food Properties*, 19:11, 2443-2450.
- Talmadge, K.W., Keegstra, K., Bauer, W.D., Albersihem, P., 1973. The Macromolecular Components of The Walls of Suspension Cultured Sycamore Cells With a Detailed Analysis of The Pectin Polysaccharides. *Plant Physiology*, 51, 158-173
- Telke, A.A., Ghodake, G.S., Kalyanid, C., Dhanve, R.S., ve Govindwar, S.P., 2011. Biochemical Characteristics of A Textile Dye Degrading Extracellular Laccase from A *Bacillus sp.ADR*. *Bioresource Technology*. 102, 1752-1756.
- Uçan, F., Akyıldız, A., 2012. Meyve Suyu Sanayiinde Enzimatik Uygulamalar. *Gıda* 37 (6): 363-370.
- Wiseman, A., 1987. *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.
- Whitaker, J.R., 1984. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microb. Technol.*, 1984, Sayı 6, 341-349.
- Yadav, S., Dubey, A.K., Yadav, D., 2013. Purification and Characterization of Pectin Lyase Secreted by *Aspergillus flavus* MTCC 109381. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol. 49, No. 4, pp. 400–405.
- Yadav, S., Shastri, N.V., 2005. Partial Purification and Characterization of a Pectin Lyase Produced by *Penicillium oxalicum* in Solid State Fermentation (SSF). *Indian Journal of Biotechnology* vol 4, pp 501-505.

- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S., 2008. Purification and Characterization of An Alkaline Pectin Lyase from *Aspergillus flavus*. *Process Biochemistry* 43, 547–552.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S., 2009. Pectin Lyase: A Review. *Process Biochemistry* 44, 1–10.
- Yamancı, H., Poturcu, K., Özmen, İ., Bıyık, H.H., 2016. Pectinase Production with Waste Materials by Local Water Isolate of *Aspergillus fumigatus* Strain 2101 and Purification and Characterization of the Enzyme. *Hacettepe J. Biol. & Chem.* 44 (1), 65–75.
- Zhou, M., Wu, J., Wng, T., Gao, L., Yin, H., Lü, X., 2017. The purification and characterization of a novel alkali-stable pectate lyase produced by *Bacillus subtilis* PBI. *World J Microbiol Biotechnol*, 33: 190.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Hamdi GÖKAHMETOĞLU
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 22.09.1986 / KAHRAMANMARAŞ
e-posta : hamdigokahmetoglu@hotmail.com

Eğitim

<i>Derece</i>	<i>Eğitim Birimi</i>	<i>Mezuniyet tarihi</i>
Yüksek lisans	KSÜ/ Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı	2018
Lisans	Antalya Akdeniz Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Alanya Ayşe Melahat Erkin Anadolu Lisesi	2004

Yabancı Dil

İngilizce