

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



**PEKTİNAZ ENZİMİNİN HİDROFOBİK ETKİLEŞİM
KROMATOĞRAFİSİ İLE SAFLAŞTIRILMASI**

TUNAHAN FERHAT HASDAĞLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Oktay ARSLAN

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Nahit GENÇER

Doç. Dr. Mahmut ERZENGİN

BALIKESİR, EYLÜL - 2020

ETİK BEYAN

Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak tarafımdan hazırlanan “**Pektinaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi İle Saflaştırılması**” başlıklı tezde;

- Tüm bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Kullanılan veriler ve sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tüm bilgi ve sonuçları bilimsel araştırma ve etik ilkelere uygun şekilde sunduğumu,
- Yararlandığım eserlere atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

beyan eder, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Tunahan Ferhat HASDAĞLI

Bu tez çalışması Destekleyen kuruluğu buraya yazınız tarafından (Proje numarasını buraya yazınız) nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**PEKTİNAZ ENZİMİNİN HİDROFOBİK ETKİLEŞİM KROMATOĞRAFİS İLE
SAFLAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TUNAHAN FERHAT HASDAĞLI
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF.DR. OKTAY ARSLAN)
(EŞ DANIŞMAN: DR. ADEM ERGÜN)
BALIKESİR, EYLÜL - 2020**

Pektinazlar, bitkisel hücrelerde bulunan ve bitki dokularının bütünlüğünün korunmasında sorumlu olan pektinlerin hidrolizini katalizleyen heterojen bir enzim ailesidir. Pektinazlar, meyve sularının berraklaştırılması, yağ ekstraksiyonu iyileştirilmesi ve tekstil endüstrisi gibi birçok proseste sıklıkla kullanılmaktadır. Pektinazlar, *Bacillus sp*, *Aspergillus indicus*, *Aspergillus iluvus*, *Aspergillus niveus*, *Pencilium sp.*, *Penicilium chrysogenum*, *Aspergillus sojae*, *Byssochlamys fulva*, *Neurospora crassa*, *Fusarium Oxysporum*, *Bacillus subtilis* gibi birçok mikroorganizmadan saflaştırılmıştır. Bu çalışmada ise *Aspergillus niger*'den pektin liyaz enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi ilk olarak amonyum sülfat çöktürmesi kullanılarak daha sonra ise hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim amonyum sülfat çöktürmesi kullanılarak 6,05 kat, hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılarak ise 11,75 kat saflaştırma elde edilmiştir. Enzimim optimum pektin miktarının belirlenmesi için 0,9, 1,2, 1,5, 1,9 gram pektin içeriklerine sahip farklı sıvı besiyerleri hazırlanmış ve bu inceleme sonucundan optimum pektin miktarının 1.2 gram pektin'de olduğu tespit edilmiştir. Optimum pektin miktarı belirlendikten sonra her 24 saat'te bir aktivite tayinleri yapıldı ve 72 saat süre sonunda maksimum aktivite gözlemlendi.

ANAHTAR KELİMELELER: Pektin liyaz, *Aspergillus niger*, Saflaştırma, Hidrofobik etkileşim kromatografisi.

ABSTRACT

PURIFICATION OF PECTINASE ENZYME BY HYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY

MSC THESIS

TUNAHAN FERHAT HASDAĞLI

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF.DR. OKTAY ARSLAN)

(CO-SUPERVISOR: UZM.DR. ADEM ERGÜN)

BALIKESİR, SEPTEMBER- 2020

Pectinases are a heterogeneous family of enzymes that catalyze the hydrolysis of pectins which are found in plant cells and responsible for maintaining the integrity of plant tissues. Pectinases are frequently used in many processes such as clarifying fruit juices, improving oil extraction and textile industry. Pectinases are purified from many microbial sources such as *Bacillus sp*, *Aspergillus indicus*, *Aspergillus iluvus*, *Aspergillus niveus*, *Pencilium sp.*, *Penicilium chrysogenum*, *Aspergillus sojae*, *Byssochlamys fulva*, *Neurosporacrssa*, *Fusairum Oxysporum*, *Bacillus subtilis*. In this study, pectin lyase enzyme was purified from *Aspergillus niger*. The purification process was first carried out by ammonium sulfate precipitation and then following by hydrophobic interaction chromatography. 6,05-fold purification was obtained using ammonium sulfate precipitation and 11,75-fold purification using hydrophobic interaction chromatography. In order to determine the enzyme optimum pectin amount, different liquid media with pectin contents of 0,9, 1,2, 1,5, 1,9 grams were prepared and it was determined that the optimum pectin amount was in 1,2 gram from this examination. After determining the optimum amount of pectin, activity was determined every 24 hours and maximum activity was observed at the end of 72 hours.

KEY WORDS: Pectin lyase, *Aspergillus niger*, purification, hydrophobic interaction chromatography.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Endüstride Kullanım İçin Enzimler	1
1.2 Pektinler	3
1.2.1 Pektik Maddeler	4
1.2.2 Protopektin	4
1.2.3 Pektik asitler.....	5
1.2.4 Pektinik asitler.....	5
1.2.5 Pektin	5
1.2.6 Homogalakturonan (HG)	6
1.2.7 Ramnogalakturonan-I (RG I)	6
1.2.8 Ramnogalakturonan-II (RG-II)	6
1.3 Pektinaz Enzimleri.....	7
1.3.1 Pektin Esterazlar.....	8
1.3.2 Depolimerize Edici Enzimler	8
1.3.3 Polimetil Galakturonazlar	8
1.3.4 Poligalakturonazlar	9
1.3.5 Pektin Liyaz	9
1.3.6 Protopektinazlar	9
1.4 Pektinazların Ticari Uygulamaları.....	10
1.4.1 Alkalın Pektinazlar.....	10
1.4.2 Meyve Suyunun Berraklaştırılması.....	11
1.4.3 Pektinazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı	12
1.4.4 Kahve ve Çay fermantasyonu	13
1.4.5 Kâğıt ve Kâğıt hamuru endüstrisi	13
1.4.6 Tavuk Yemi.....	13
1.4.7 Bitki Virüslerinin Saflaştırılması	14
1.4.8 Yağ Ekstraksiyonu	14
1.4.9 Pektik Atık Suyun Ön Arıtımı	14
1.5 Pektinaz İle İlgili Çalışmaların Özeti	15
2. MATERYAL VE YÖNTEMLER	21
2.1 Materyaller	21
2.1.1 Araştırmada Kullanılan Kimyasallar.....	21
2.1.2 Araştırma Kullanılan Cihazlar Ve Aletler	21
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	21
2.2 Yöntemler	25
2.2.1 Mikroorganizmaların Büyütülmesi	25

2.2.2 Amonyum sülfat ((NH ₄)SO ₄) ile kısmi saflaştırma	29
2.2.3 Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırılmasında Kullanılan Hidrofobik Jelin Sentezi	29
2.2.4 Sentezlenen HEK Kolonu ile Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırılması	31
2.2.5 Pektin liyaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü	32
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	34
3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik	34
3.2 Aspergillus Niger'den Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırma Kademeleri ..	34
3.3 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	34
3.4 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	34
3.5 Pektinaz Enziminin Saflaştırılması İçin Optimum Pektin Miktarının Belirlenmesi	35
3.6 Pektinaz Enziminin Aktivitesinin Haftalara Göre Değişiminin Belirlenmesi	38
3.7 Pektinaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü	38
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	39
5. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Pektinin basit yapısı.	4
Şekil 1.2: Bitki hücre duvarı.	4
Şekil 1.3: Pektinin yapısındaki dört ana polisakkarit.	5
Şekil 1.4: Pektin liyaz mekanizması.	9
Şekil 1.5: Pektinazların etki şekli.	10
Şekil 1.6: Pektinazların meyve suyu endüstrisinde kullanımı.	12
Şekil 1.7: Pektinazların uygulama alanları.	15
Şekil 2.1: <i>Aspergillus niger</i> katı besi yeri ilk ekim günü.	26
Şekil 2.2: <i>Aspergillus niger</i> petri kabı katı besiyeri 7.gün.	27
Şekil 2.3: <i>Aspergillus niger</i> tüp katı besi yeri 7.gün.	27
Şekil 2.4: <i>Aspergillus niger</i> sıvı besi yeri 0.gün.	28
Şekil 2.5: <i>Aspergillus niger</i> sıvı besi yeri 2.gün.	28
Şekil 2.6: Pektinaz enzimi sıvı besi yeri 3.gün.	28
Şekil 2.7: Pektinaz enzimi sıvı besi yeri 4.gün.	29
Şekil 2.8: Sepharoz-4B'nin aktivasyonu.	30
Şekil 2.9: L-Tirozin bağlanması.	30
Şekil 2.10: 1-Naftilamin bağlanması.	31
Şekil 3.1: CBB ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan grafik.	34
Şekil 3.2: HEK kolonu ile saflaştırılan pektin liyaz elüsyon grafiği.	35
Şekil 3.3: 0,9 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.	36
Şekil 3.4: 1,2 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.	36
Şekil 3.5: 1,5 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.	37
Şekil 3.6: 1,7 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.	37
Şekil 3.7: 1,9 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.	37
Şekil 3.8: Pektinaz enziminin haftalık aktivite değişimi.	38
Şekil 3.9: Pektin liyaz enziminin elektroforez görünümü (I=Bovın serum albümin, II=Laktoferrin, III= Pektin liyaz.).	38

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Bazı taze meyve ve kurumuş bitki parçalarının pektin içerikleri (%).....	6
Tablo 2.1: Araştırmamızda kullanılan cihazlar ve aletler.....	21
Tablo 2.2: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu miktarları.....	23
Tablo 2.3: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu miktarları.....	23
Tablo 2.4: SDS-PAGE'de kullanılan jel karışımlarının miktarları.....	24
Tablo 2.5: Pektinaz'ın aktivite tayini için kullanılan miktarlar.....	26
Tablo 3.1: Aspergillus niger'den elde edilen pektin liyaz'ın saflaştırma basamakları.....	35

SEMBOL LİSTESİ

EC	: Enzim kodu
EU	: Enzim ünitesi
HCl	: Hidroklorik asit
kDa	: Kilodalton
PL	: Pektin liyaz
PG	: Poligalakturonaz
PMG	: Polimetil galakturonaz
PME	: Pektin metil esteraz
PE	: Pektin esteraz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TEMED	: N, N, N, N, -tetrametil etilendiamin
V_{max}	: En yüksek reaksiyon hızı
K_m	: V _{max} 'ın yarısındaki substrat konsantrasyonu
HEK	: Hidrofobik etkileşim kromatografisi
CBB	: Coomassie Brilliant Blue

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans öğrenimlerim süresince beni yönlendiren, bilgi ve tecrübeleriyle beni destekleyen ve her konuda desteğini esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Danışman hocamın yanında biyokimya anabilim dalında beni destekleyen Prof. Dr. Nahit GENÇER, Doç. Dr. Semra IŞIK, Uzm. Dr. Adem ERGÜN'e de teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım süresince ürettiğimiz enzimin kaynağı olan *Aspergillus Niger*' i bize sağladığı içinde Yıldız Teknik Üniversitesinde öğretim üyesi olan sayın Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, her konuda bana yardımcı olan ve bana güvenmekten hiç bir zaman vazgeçmeyen çok değerli ailem Babam Yaman HASDAĞLI ve Annem Sevim HASDAĞLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Balıkesir, 2020

Tunahan Ferhat HASDAĞLI

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik katalizör olarak rol oynayan proteinlerdir. Enzimlerin üzerinde etkili oldukları moleküllere substrat denilmektedir [1,2,3]. Bu moleküller, enzimlerin spesifik etkisi sonucu ürünler olarak bilinen farklı bileşiklere dönüştürürler. Hücredeki neredeyse tüm metabolik süreçler, yaşamı sürdürecekt kadar hızlı oranlarda gerçekleşmek için enzim katalizine ihtiyaç duyar. Enzimlerin, 5000'den fazla biyokimyasal reaksiyon tiplerini katalize ettiği bilinmektedir. Diğer biyokatalizörler olan ribozimler, spesifik katalitik RNA molekülleridir. Enzimlerin spesifikliği, harikulade tasarlanmış üç boyutlu yapılarının sonucu olduğu bilinmektedir [2,3,4]. Tüm katalizörler gibi, enzimlerde aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını arttırmırlar. Bazı enzimler, substratın ürüne dönüşümünü milyonlarca kez daha hızlı gerçekleştirirler. Örnek olarak; orotidin 5'- fosfat dekarboksilaz verilebilir [5,6,7]. Normalde milyonlarca yıl sürebilecek bir reaksiyon enzim sayesinde saniyeler içinde gerçekleşme imkânına sahiptir. Kimyasal olarak, enzimler herhangi bir katalizör gibidir ve kimyasal reaksiyonlarda tüketilmezler ve bir reaksiyon dengesini değıştirmezler [5,8,9].

1.1 Endüstride Kullanım İçin Enzimler

Endüstriyel enzimler; farmasotikler, kimyasal üretim, biyo-yakıtlar, yiyecek ve içecek gibi çeşitli endüstrilerde ticari olarak kullanılan biyokatalizörlerdir [5,6]. Son yıllarda kaydedilen ilerlemeler nedeniyle, izole edilen enzimler yardımıyla biyokataliz, çoğu reaksiyonun olması gerekenden daha hızlı gerçekleşmesine ve ekonomik olmasından dolayı tercih edilmektedir. Enzimler tekstil, gıda, atık su arıtma, ilaç sektörü gibi çeşitli uygulama alanlarına sahip biyomoleküllerdir [10,11].

Enzimler, arzu edilen bir ürünü üretmek için bir işlem içinde kullanılabilir. Enzimler ile endüstriyel biyokataliz, ılımlı koşullarda çalışma kabiliyetleri nedeniyle hızla ilgi odağı olmuştur. İzole enzimler genel olarak hidrolitik ve izomerizasyon reaksiyonlarında kullanılır. Enzimlerin endüstride kullanılmasındaki avantajları aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür [8,9,10].

- **Kontrol edilebilirlik**

Enzimleri herhangi bir endüstride kullanmanın en iyi yanı, bizlere süreç içerisinde verdikleri kontrol derecesidir, çünkü aktiviteleri ve verimlilikleri optimum koşullara bağlıdır. Böylece kontrol edilebilir bir dış atmosfer oluşturarak enzimlerin aktiviteleri kolayca düzenlenebilir.

- **Reaksiyon hızı**

Enzimler kimyasal aktivitesi ile herhangi bir reaksiyonun aktivasyon enerjisini azaltır ve bu da işlemin daha hızlı başlatılmasına neden olur. Ürün ve süreçlerin günler hatta haftalar alabileceği tekstil ve tıp gibi endüstriler, bu enzimleri üretim zamanlamalarını hızlandırmak için kullanırlar.

- **Daha uygun koşullarda çalışma**

Enzimler, önceden tanımlanmış bir pH'a ve optimum sıcaklığa sahiptir. Belirli bir enzim için bu koşulları oluşturarak, bunların istenilen ölçüde verimli çalışması sağlanabilir.

- **Kirletici maddeler için iyi bir alternatif**

Günümüz dünyasında atılan her adımın çevre için önemini biliyoruz. Her insan kendi üzerlerine düşeni yapmalı ve tekstil gibi endüstriler için enzimler kullandığında çevreyi kirleten tonlarca tehlikeli kimyasalları uzaklaştırılmaktadır. Enzimlerin birçok endüstride kullanımı, kanserojen maddelerin bile tüketimini azaltmıştır. Bu durum, enzimi endüstriyel ortamımızın daha da önemli bir parçası haline getirir.

- **Spesifiklik**

Enzimler esas olarak diğer bileşenlerle süper spesifik reaksiyonları nedeniyle endüstride kullanılır. Yüksek derecede özgüllüğe sahip olduğundan, bir enzim sadece istediğimiz şekilde tepki verir. Sadece varsayılan reaksiyonları katalize eder ve süreçteki diğer elementlerle reaksiyona girmez.

- **Geri dönüşümlü**

Enzimler biyolojik olarak parçalanabilirler ve doğayı kirletmezler. Enzimlerin günlük hayatta kullanılma olgusu çok eski yıllara dayanmaktadır. Farkında olmadan insanlar, ekmek, peynir gibi birçok işlem için enzimleri kullanmışlardır. Günümüzde enzimlerin birçok endüstriyel alanda kullanılması çok ilginç bir konu haline gelmiştir [11,12]. Bugün dünyada milyar dolarlar ile ifade edilen büyük bir enzim pazarı oluşmuştur.

Pektinazlar, endüstride kullanım alanı bulmuş en yaygın enzimlerden birisidir. Enzimlerin dünya genelinde kullanılmasından dolayı bu enzimler için harcanan para milyarlarca dolar

değerinde ve her geçen yıl bu pazar payı artmaya devam etmektedir [12,13,14]. Bu evrensel enzimlerin arasında pektinaz enzimi özellikle gıda endüstrisinde çok önemli bir konuma sahiptir. Pektinazlar, pektinin yapısında bulunan α -1,4 glikozit bağlarla bağlanmış poligalakturonik asit birimlerini parçalarlar [15,16].

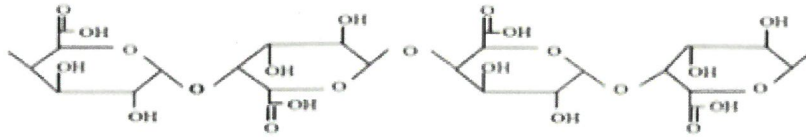
Pektin meyve suyu ekstraksiyonu sırasında bulanıklığa ve verimin düşmesine neden olur. Tekstil endüstrisinde ise hidrofobikliğinden dolayı boyama işleminde sorun oluşturur [10,15]. Genel olarak pektinin uzaklaştırılması zor bir işlemdir ve endüstriyel işlemlerde kimyasal maddeler ve yüksek sıcaklık gerektirir. Yapılan araştırmalara göre pektin liyaz'ın kaynakları arasında literatürde bakteriyel kaynakların yanı sıra mikrobiyel kaynaklarıda bulunmaktadır [16,17].

Enzimlerin miktarlarının canlı dokularda az bulunması, saflaştırılması zor ve kullanılan kromatografi kolonlarının maliyetli olması, enzimlerin yüksek maliyetli olmasına neden olmaktadır. Özellikle tüm enzimlerde olduğu gibi pektinaz enzimleri de büyük paralar ödenerek yurt dışından temin edilmektedir. Araştırmamızın en temel gayesi, tarafımızca dizayn edilecek yeni bir kolon ile daha ucuza ve tamamen yerli bir enzim üretilip yukarıda belirtilen endüstriyel alanlardaki sanayicilerin hizmetine sunmaktır.

1.2 Pektinler

Doğada pektin temelli maddeler α -1,4 glikozit bağı ile bağlanmış kompleks polisakkarit karışımlarıdır [11,17]. Pektik maddeler, orta lamella ve yüksek bitkilerin birincil hücre duvarlarında bulunur ve bitki dokusuna sağlamlık kazandırır [11,18]. Pektik maddeler, bitkilerde bulunan yüksek moleküler ağırlığına sahip, negatif yüklü, asidik, kompleks polisakkaritlerdir. Bu maddeler kalsiyum pektat ve magnezyum pektat formundaki hücreler arasındaki orta lamellerin ana bileşenleri olarak bulunurlar [18,19].

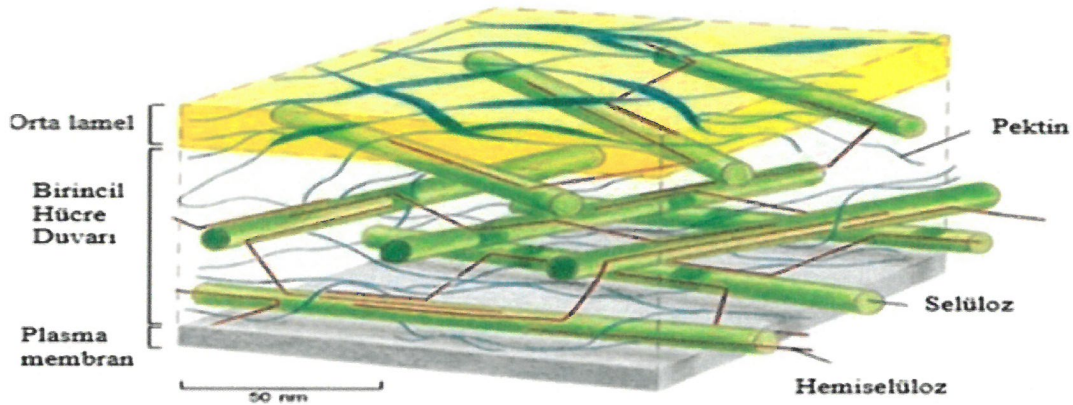
Pektin ve diğer birçok pektin yapısına sahip pektik maddeler bitki dokularında çok önemli bir rol oynamaktadır [20,21,22]. Şekil 1,1'de pektinin basit yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.1: Pektinin basit yapısı [20,21,22].

1.2.1 Pektik Maddeler

Pektik maddeler orta lamella ve yüksek bitkilerin birincil hücre duvarlarında bulunur ve bitki dokusuna yapı ve sağlamlık kazandırır [23,24,25]. Pektik maddeleri protopektin, pektik asit pektinik asit ve pektin olarak sınıflandırmak mümkündür.



Şekil 1.2: Bitki hücre duvarı [23,24,25].

1.2.2 Protopektin

Protopektin temel bir pektik maddedir ve sınırlı bir miktarda pektin veya pektinik asit'e parçalanır. Protopektin bazen bitki dokularında bulunan ve çözünür pektik maddelerin üretildiği, suda çözünmeyen pektik maddeleri tarif etmek için kullanılan temel bir terimdir [25,26,27].

1.2.3 Pektik asitler

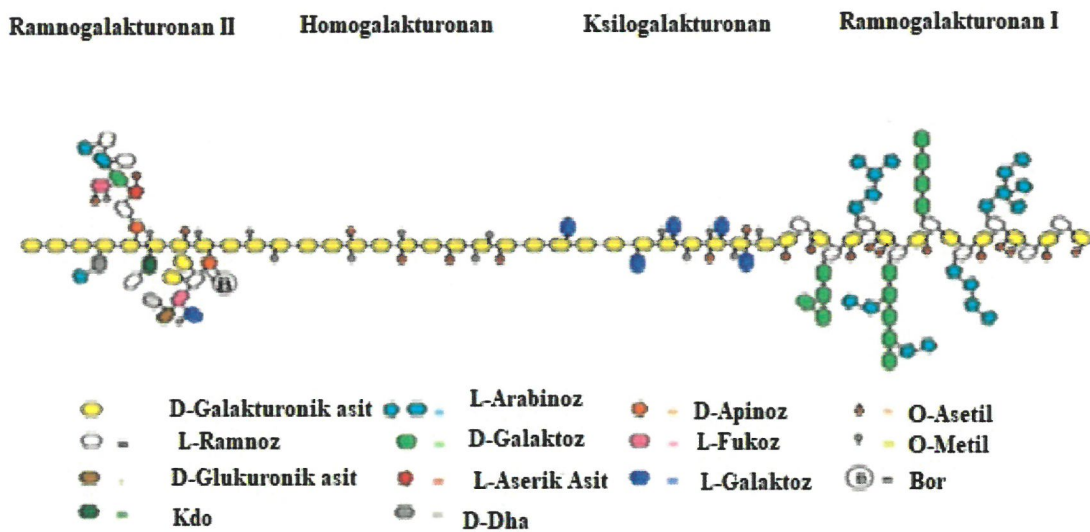
Pektik asitler, koloidal poligalakturonik asitten oluşan pektik maddelere uygulanan isimdir. Bu moleküller esasen metil ester gruplarından bağımsızdır. Pektik asidin normal veya asit tuzlarına pektat adı verilir [28,29].

1.2.4 Pektinik asitler

Pektinik asitler, çeşitli miktarlarda metil ester grupları içeren koloidal poligalakturonik asitlerdir [30].

1.2.5 Pektin

Pektin α -1,4 galakturonat zincirleriyle bağlı ve yüksek oranda metil esterleştirmeye sahip heteropolisakkarit molekülüdür. Stabilitesi ve bütünlüğü ile bilinen pektin bitkilerinin birincil hücre duvarında ve orta tabakalarında bulunur [30,31,32]. Hemen hemen bütün bitki dokularında pektik maddeler çözünmüş halde bulunur. Pektin bitkisel kaynaklı bir stabilizör olup, her meyve ve sebzede farklı nitelik ve miktarda bulunabilir. Pektin 17 farklı monosakkarit'ten oluşur. Pektinin temel yapısı dört ana polisakkaritten oluşur, Homogalakturonan, Ramnogalakturonan-I, Ramnogalakturonan-II ve ksilogalakturonan [30,31,32].



Şekil 1.3: Pektinin yapısındaki dört ana polisakkarit [35].

1.2.6 Homogalakturnan (HG)

Pektinin yapısında bulunan en bol pektik polisakkarittir. Esterlenmiş C-6 metil ve C-2 veya C-3 asetile D-galakturnonik asidin doğrusal bir zinciridir. D birimleri α -1,4 glikozidik bağ ile birbirine bağlıdır ve pektinin pürüzsüz bölgesini oluşturur [32].

1.2.7 Ramnogalakturnan-I (RG I)

Ramnogalakturnan, bitkilerin birincil duvarının karmaşık, heterojen ve dallı bileşenleridir [32,33,34].

1.2.8 Ramnogalakturnan-II (RG-II)

RG-II, HG ve RG-I ile karşılaştırıldığında oldukça korunmuş bir yapıya sahiptir. Dört farklı yan zincire sahip α -1,4 bağlantılı homogalakturnan omurgasından oluşan karmaşık bir polisakkarittir [33,34]. Bitki hücre duvarında, bir borat diester ile çapraz bağlanmış bir dimer olarak bulunur. Bitkiler için önemli olmasına rağmen pektin, meyve suyu, tekstil endüstrisi ve kâğıt endüstrisi için sorun oluşturur. Pektinler doğada yaygın bir şekilde farklı oranlarda bulunmaktadır. Bazı taze meyve ve kurumuş bitki parçalarının pektin içerikleri Tablo 1.1'de sunulmuştur.

Tablo 1.1: Bazı taze meyve ve kurumuş bitki parçalarının pektin içerikleri (%).

Kaynak	Taze Meyve	Kurumuş Meyve
Elma	0.5-1.6	-----
Kayısı	0.7-1.3	-----
Muz	0.7-1.2	-----
Kuş üzümü	0.9-1.5	-----
Guava	0.7-1.5	-----

Tablo 1.1: (Devam).

Üzüm	0.2-1.0	-----
Limon kabuğu	-----	35.5
Limon hamuru	-----	32.0
Ananas	-----	20.0
Bezelye	0.3-0.6	-----
Şeftali	0.3-1.2	-----
Patates	-----	2.5
Çilek	0.6-0.7	-----
Şeker pancarı	-----	20-30
Domates	0.2-0.5	-----

1.3 Pektinaz Enzimleri

Pektinler meyve suyundan bulanıklık ve acılık problemi, tekstil endüstrisi için ise kompozit boyama işlemlerinde sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle pektinaz, pektinlerin yukarıda bahsedildiği yan etkilerinden kurtulmak için en önemli çözüm yoludur. Pektinaz, pektin liyaz, pektin metilesteraz ve poligalakturonaz gibi bir grup enzim için kullanılan genel bir terimdir [35,36,37].

Bitkilerde pektinaz, hücre uzaması, büyümesi ve meyve olgunlaşmasında önemli rol oynarken, mikrobiyel pektinaz bitki tortularının ayrıştırılmasıyla besinlerin geri dönüşümünde önemlidir [38,39,40].

Mikrobiyel olarak üretilen pektinaz, ucuz üretim, genom manipülasyon kolaylığı, daha hızlı ürün geri kazanımı ve zararlı maddelerden arındırılmış olması nedeniyle bitki ve hayvan kaynaklı pektinazlara göre daha uygun görünmektedir. Pektinaz üretimi, enzim preparatlarının genel imalatının yaklaşık %10'dur. Mikrobiyel pektinaz, küresel gıda enzimleri satışlarının yaklaşık %25'ini oluşturur [41,42].

Pektinazlar, pektinin yıkılmasında görev alan enzimler grubudur. Pektinaz enzimleri, substrat spesifikliğı ve etki tarzlarına göre 2 şekilde sınıflandırmak mümkündür. Bunlar; esterleri parçalayan enzimler (pektin estera) ve de-polimerize enzimlerdir. Ayrıca bu sınıflandırma liyazlar ve hidrolazlar şeklinde yapılmıştır [43,44,45].

Bunlar arasında pektin liyaz, β -eliminasyon ile yüksek esterleşmiş oranına sahip pektini parçalar. Pektin liyaz'ın elde edilmesinde birçok fungi kullanılabilir.

1.3.1 Pektin Esterazlar

Pektin metil hidrolaz olarak da bilinen pektin estera, pektin oluşturan pektik metoksil grubunun esterleşmesine katalize eder. Enzim tercihen esterleşmemiş bir galakturonat biriminin yanında, galakturonat biriminin bir metil ester grubu üzerinde etki eder [46].

1.3.2 Depolimerize Edici Enzimler

Depolimerazlar pektik maddelerin D-galakturonik asit gruplarındaki α -1,4 glikozit bağlarını hidrolitik olarak parçalanmasını katalizler [47].

1.3.3 Polimetil Galakturonazlar

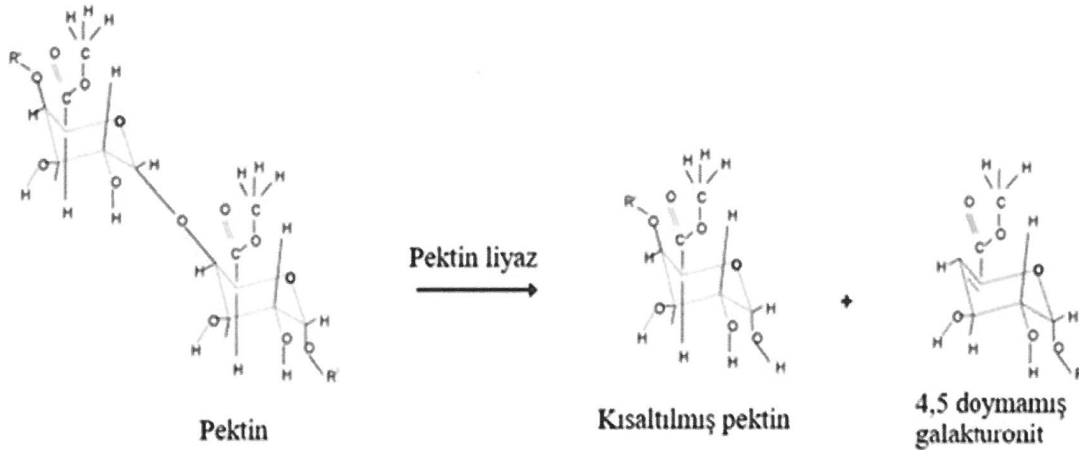
Polimetil galakturonazlar da yine α -1,4 glikozit bağı ile bağlanmış poligalakturonik asit birimlerini parçalar. Bu parçalama işlemi *endo*-PMG ve *ekzo*-PMG olmak üzere 2 şekilde gerçekleşebilir [48]. *Endo*-PMG, α -1,4 glikozit bağı ile bağlanmış pektin yapısını rastgele bir uçtan parçalar. *Ekzo*-PMG ise α -1,4 glikozit bağı ile bağlanmış pektin yapısını ise indirgen olmayan bir uç olan pektinin son zincirinden parçalar [49].

1.3.4 Poligalakturonazlar

Poligalakturonazlar pektinin yapısındaki poligalakturonik asit birimlerini parçalar. Poligalakturonazlar da 2 çeşittir. *Endo*-PG ve *Ekzo*-PG olarak 2'ye ayrılır. *Endo*-PG yine aynı şekilde pektin üzerinde rastgele olarak etki eder [50,51]. *Ekzo*-PG ise pektik asit üzerindeki α -1,4 glikozit bağlarını sıralı bir şekilde hidrolizini katalize eder [51,52].

1.3.5 Pektin Liyaz

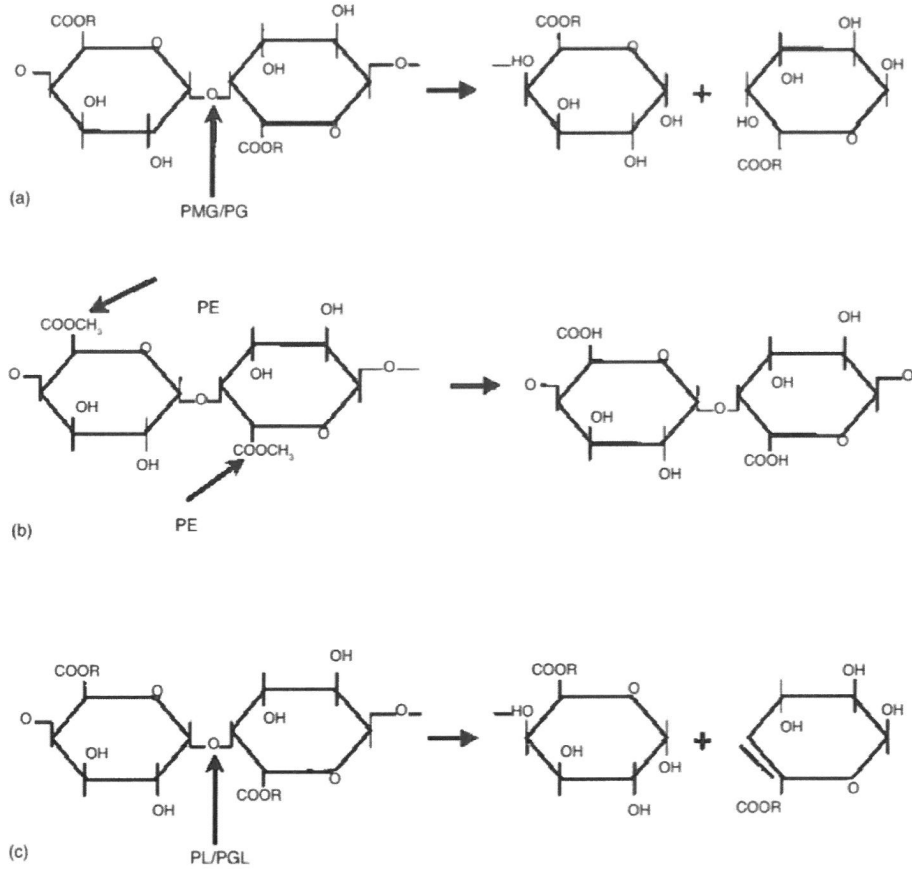
Pektin liyazlar, α -1,4 glikozit bağlarını elimine ederek oluşan ürünün indirgeyici olmayan ucundan etki ederek pektini α -4,5 doymamış oligosakkaritler'e parçalar. Bu eliminasyon işlemi susuz ortamda gerçekleşir. Söz konusu enzim pektinin yapısındaki metil esterli kısımlardan etki ettiği için metil esterli bir pektine ihtiyaç duyar. Pektin liyaz, ayrıca çoğu *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium*'un mikrobiyel cinsi tarafından üretilen, indüklenebilir enzimlerden biridir [52,53,54].



Şekil 1.4: Pektin liyaz mekanizması [54].

1.3.6 Protopektinazlar

Bu enzim, yüksek oranda polimerleşmiş çözünür pektin oluşturan protopektini çözündürür. Söz konusu pektinazlar, uygulama alanlarına göre asidik pektinazlar ve alkalın pektinazlar olarak sınıflandırılabilir [55,56,57].



Şekil 1.5: Pektinazların etki şekli [58,59,60,61].

1.4 Pektinazların Ticari Uygulamaları

1.4.1 Alkalın Pektinazlar

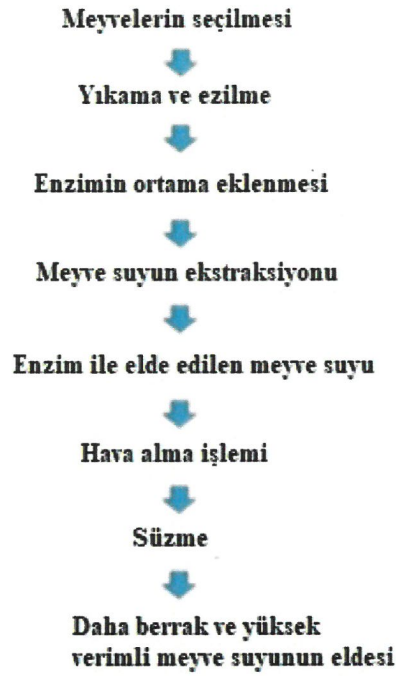
Alkalın pektinazlar, esas olarak lifli ürünlerin reçinelerinin giderilmesi ve geri çekilmesinde, meyve suyu endüstrisinden gelen pektik atık suyun ön arıtımında, kâğıt ve kâğıt hamuru üretiminde, yağ ekstraksiyonunda ve kahve çayı fermantasyonunda kullanılır [62,63]. Pektik enzimleri ahşabın korunmasında da önemli rol oynar. Bunun gibi asidik ve alkalın pektinazların çeşitli uygulamaları göz önüne alındığında, söz konusu enzimler biyoteknoloji endüstrisinin omurgasını oluşturur. Bu konuda devam eden çeşitli araştırmaların, bu son derece önemli enzimlerin uygulanmasını daha da yaygın hale getireceği düşünülmektedir.

Söz konusu pektik maddeleri hidrolize eden enzimler yaygın olarak pektinazlar olarak bilinir ve bunların etki biçimlerine bağlı olarak poligalakturonazlar, pektin esterazlar, pektin liyazlar ve pektat liyazlar şeklinde sınıflandırılır. Mikrobiyel pektinazlar kullanıldıkları endüstrilerde muazzam bir potansiyele sahiptirler [64,65].

Asidoliflik pektinazlar, meyve suları ve şarabın ekstraksiyonu ve arıtılmasında kapsamlı uygulamalara sahiptir. Asidik pektinazların aksine, alkalın pektinazların kullanımı ile ilgili çalışmalar, son derece sınırlıdır. Bu nedenle bu enzimlerin uygulamaları hakkında sadece birkaç çalışmaya rastlamak mümkündür [66,67]. Alkali pektinazlar, pektin içeren ürünün işlenmesi sonucu atık suyun ön arıtımı, keten gibi bitki liflerinin işlenmesi ve reçinelerinin giderilmesi için kullanılmaktadır [68,69]. Bitki lifleri gelişmekte olan ülkelerde halat, çanta ve ağ yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Alkalın pektik enzimin, çevre dostu endüstriyel uygulamalarının teknolojik yenilikleri ve faydaları hakkında detaylı literatür bilgilere rastlamak mümkündür [69]. Yıllar boyunca alkalın pektinazlar, tekstil ve bitki lifi işleme, kahve ve çay fermentasyonu, yağ çıkarma ve pektinli malzeme içeren endüstriyel atık suların arıtılması gibi çeşitli geleneksel endüstriyel işlemlerde kullanılmıştır [70].

1.4.2 Meyve Suyunun Berraklaştırılması

Söz konusu enzimler, ham ürün ile etkileşmesi sonucu meyve de bulunan pektinin yapısal bütünlüğü bozulur. Bunun sonucu viskozite azalır ve meyve suyu kolayca işlenebilir hale gelir. Bu nedenle pektinazlar, meyve hamurlarının çözündürülmesinde ve arıtılmasında önemli rol oynamaktadır [71].



Şekil 1.6: Pektinazların meyve suyu endüstrisinde kullanımı [71,72].

1.4.3 Pektinazların Tekstil Endüstrisinde Kullanımı

Tekstil endüstrisinde enzimlerin kullanımı hem çevresel hem de ürün kalitesi yönünden büyük fayda sağlamıştır. İpliğin kumaşa dokunmasından önce, çözgü iplikleri dokuma sırasında ipliği yağlamak ve aşınmaya karşı korumak için haşılama sürecinden geçer. Tarihsel olarak, pamuklu kumaşlar için kullanılan ana haşıl maddesi, mükemmel film oluşturma kapasitesi, kullanılabilirliği ve gerçekliği düşük döküm nedeniyle nişasta olmuştur [73].

Kumaşın boyanabilmesi için, uygulanan haşıl maddesi ve pamukta bulunan doğal selülozik olmayan malzemeler uzaklaştırılmalıdır. Amilaz enzimlerinin keşfinden önce, nişasta bazlı haşılamanın giderilmesinin tek yolu, yüksek sıcaklıkta döküm soda ile uzun süreli inkübasyonu yolu ile gerçekleştirilmekteydi. Kimyasal işlem nişastanın çıkarılmasında tam olarak etkili değildi ve aynı zamanda pamuk lifinin bozulmasına yol açarak pamuğun doğal yumuşak hissinin dağılmasına neden olmaktaydı [73]. Haşıl maddeleri uzaklaştırmak için amilazlar, lipazlar, selülazlar ve diğer hemiselülitik enzimlerle birlikte pektinaz gibi enzim kullanımı, kimyasal endüstride sert kimyasalların kullanımını azaltmış ve böylece kimyasal

atıkların çevreye daha az zarar vermesinin yanı sıra çalışanlar için güvenlik hem de kaliteli ürün elde edilmesini sağlamıştır [74].

1.4.4 Kahve ve Çay fermantasyonu

Pektinazlar aynı zamanda çay fermantasyonunu hızlandırır ve ayrıca pektinleri parçalayarak, çay tozlarının köpük oluşturma özelliğini yok eder. Pektinolitik mikroorganizmalar, kahvenin fermantasyonunda, müsli tabakayı kahve çekirdeklerinden çıkarmak için kullanılır. Müsli tabakası ise kahvenin dış tabakası aşıldıktan sonraki tabakaya verilen addır. Bu tabaka kahve tohumlarına yapışkan ve şekerli bir madde ile çevreler. Pektik maddelerden oluşan müsli tabakasını çıkarmak için bazen pektinazlar eklenir [74].

1.4.5 Kâğıt ve Kâğıt hamuru endüstrisi

Biyoteknolojinin ilerlemesi, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinin biyo-ağartma ve kâğıt yapımı için mikroorganizmaların ve enzimlerinin kullanımına olan güvenin artmasıyla, ksilanazlar ve ligninazlar dışındaki mannanaz, pektinazlar ve α -galaktosidaz gibi enzimlerin kullanımı artmaktadır [75].

Kâğıt yapımı sırasında pektinaz, galakturonik asit polimerlerini depolimerize edebilir ve daha sonra pektin çözeltilerinin katyonik ağartmadan gelen süzöntüyü azaltabilmektedir. *Streptomyces sp.* ' den alkaline pektinaz elde edildiğinde genel bir ağartma takviye edici okaliptüs türünden elde edilen okaliptüs hamuru elde edilebilir. Biyo-ağartma için aynı organizmadan gelen ksilanaz ile kombinasyon halinde kullanılır [75].

1.4.6 Tavuk Yemi

Hayvan ve kümes hayvanı yemlerinde çeşitli enzimlerin kullanımına yönelik yoğun araştırmalar 1980'lerin başında başlamıştır. İlk ticari başarı arpa temelli yem diyetlerine β -glukanaz eklenmesi olmuştur. Daha sonra enzimler, buğday temelli diyetlerde de test edilmeye başlanmıştır. Ksilanaz enzimlerinin bu durumda en etkili olduğu bulunmuştur. Yemdeki enzim kullanımının net etkisi, aynı miktarda arpa ile artan hayvan ağırlığı kazandırır ve sonuçta yem dönüşüm oranı da artar. Genellikle bir yem enzimi preparatı, glukanazlar, ksilanazlar, proteinazlar, pektinazlar ve amilazlar içeren oldukça zengin bir karışımdır [73,74].

Enzim ilavesi, viskoziteyi azaltarak besinlerin emilimini arttırır, parçalanamayan liflerin hidrolizi ile veya bu lifler tarafından bloke edilen besinleri serbest bırakır ve böylece dışkı miktarını da azaltır [74,75].

1.4.7 Bitki Virüslerinin Saflaştırılması

Kimyasal ve fiziksel ve diğer biyolojik çalışmalar yürütmek için çok saf virüs preparatları gereklidir. Bitkileri enfekte eden virüslerin çoğuna uyarlanabilen çok sayıda saflaştırma prosedürü vardır. Bununla birlikte, virüs tipine göre kullanılmak üzere seçilebilen birkaç farklı saflaştırma sistemi vardır. Virüsün floem ile sınırlı olduğu durumlarda, virüsü dokulardan kurtarmak için alkalik pektinazlar ve selülozlar gibi bazı enzimler kullanılabilir [74,75].

1.4.8 Yağ Ekstraksiyonu

Limon yağı gibi narenciye yağları pektinazlarla ekstrakte edilebilir. Çünkü bu enzimler narenciye kabuğu ekstraktlarından yağ toplanmasını engelleyen pektinin parçalanmasını sağlar. Bitki hücresi duvarını parçalayan enzim preparatı, zeytinyağı hazırlanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Enzim, sonraki ayırma prosedürlerinde yağın kolayca çıkarılmasını sağlayan zeytin öğütme işlemi sırasında ilave edilir [75].

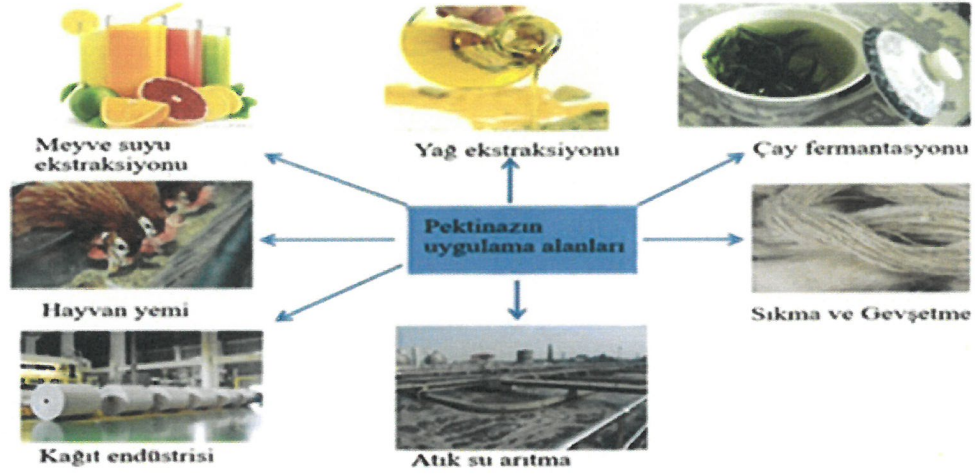
1.4.9 Pektik Atık Suyun Ön Arıtımı

Çevresel olarak, pektik maddeler içeren narenciye işleme endüstrilerinden gelen suyun arıtılması, metan oluşumuna yol açan fiziksel susuzlaştırma, kimyasal pıhtılaşma, doğrudan aktif çamur arıtımı ve kimyasal hidroliz dâhil olmak üzere birçok adımda gerçekleştirilir [75,76].

Bunlar, kimyasalların kullanımından kaynaklanan çevre kirliliğine ek olarak, yüksek işlem maliyeti ve daha uzun işlem süreleri gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, alternatif, uygun maliyetli ve çevre dostu bir yöntem pektik maddeleri atık sudan seçici bir şekilde uzaklaştıran mikroorganizmalardan pektinazların kullanılmasıdır [75,76].

Bitkisel gıda işleme endüstrilerinden pektik atık suyunun alkalik pektinaz ve alkalofilik pektinolitik mikroplarla ön arıtımı, kalıcı malzemenin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır ve

aktif çamur arıtımı ile ayırmaya uygun hale getirir [75,76,77]. Aşağıda Şekil 1.7’ de ise pektinaz enzimlerin uygulamalarının genel gösterimi gösterilmiştir.



Şekil 1.7: Pektinazların uygulama alanları [75,76].

1.5 Pektinaz ile İlgili Çalışmaların Özeti

D.R. Kashyap ve ark. (2000) *Bacillus sp.*'in pektin liyaz olarak karakterize edilen önemli miktarlarda hücre dışı bir pektinaz ürettiğini bulmuşlardır. Büyüme koşulları optimize ederek *Bacillus sp.*'nin literatürde bildirilenden daha fazla miktarda pektin liyaz (53 U/ml) ürettiğini tespit etmişlerdir. Jel filtrasyonu ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak bu enzimi saflaştırarak 106 kDa'lık bir moleküler kütleyle sahip olduğunu yaptıkları işlemler sonrasında tespit etmişlerdir. Saflaştırılmış enzimin, 60° C ve pH 8.0'de sıcaklıkta maksimum aktivite sergilediğini gözlemlemişlerdir. 100 mM konsantrasyonda CaCl₂ ve merkaptto etanol'un ortamda bulunması saflaştırılmış enzimin aktivitesinin önemli ölçüde arttığını rapor etmişlerdir [52].

Aparna Sharma ve ark. (2001) amonyum sülfat varlığında ter-bütanol ilavesiyle pektinazların *Aspergillus Niger* ve domatesten saflaştırılması için 3 fazlı bölme kullanmışlar ve *Aspergillus Niger*'den %76 verimle domatesten ise %183 verimle pektinaz enzimini saflaştırmışlardır. Pektinaz enzimi *Aspergillus Niger* ve domatesten sırasıyla 10 ve 9 kat

olarak saflaştırılmıştır. Domates'ten elde edilen saflaştırılmış enzime SDS-PAGE yapılmış ve 46 kDa molekül ağırlığına sahip ve tek bant elde etmişlerdir [41].

Jayaraman Angayarkanni ve ark. (2002) çay yapraklarının fermantasyonu için *Aspergillus spp.*, *Aspergillus indicus*, *Aspergillus jluvus*, *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus niveus* 'tan izole edilen pektinaz enzimlerini kullanarak çalışmalar yapmışlardır. Hem ham enzim preparatı hem de saflaştırılmış pektinaz enzimlerinin çay yaprağı fermantasyonunun iyileştirilmesi üzerindeki etkisi, yüksek polimerize maddeler, kuru madde içeriği ve çayın toplam çözünür katı maddeleri açısından belirlenmiştir. Etanol çökeltmesinden elde edilen ham enzim preparatlarının, çay yaprağı fermantasyonunun arttırılmasında saflaştırılmış pektinaz enzimlerinden daha etkili olduğu yaptıkları çalışmalar sonucunda tespit etmişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda ise *A.indicus*'un saflaştırılmış enzim aktivitesi için optimum pH 6 ve sıcaklığı 50 °C olarak tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesinin 37 °C'de 2 gün ve 50 °C'de 60 dakika stabil olduğu bulunmuştur. Vmax ve Km değerleri sırasıyla 10.02 IU/mg ve 10 mg/ml olarak hesaplamışlardır. Enzimin molekül ağırlığı ise 28.5 kDa olarak bulunmuştur. *A.flavus* enziminin optimum pH'ı 5 ve sıcaklığı 50 °C olarak bulunmuştur. Enzim 37 °C'de 3 gün ve 50 °C'de 60 dakika stabil olduğu bulunmuştur. Vmax ve Km değerlerini ise 33.42 IU/mg ve 6,28 mg/ml ve enzimin molekül ağırlığı 22 kDa olarak hesaplanmıştır. *A. Niveus* pektinaz için optimum pH 6 ve optimum sıcaklık 50 °C olarak bildirilmektedir. Enzim aktivitesinin 37 °C'de 3 gün ve 50 °C'de 60 dakika stabil olduğu bildirilmiştir. Vmax ve Km değerleri ise 12,37 IU/mg ve 9,54 mg/mL ve molekül ağırlığı 23 kDa olarak tespit edilmiştir[58].

Patil, N.P., ve ark. (2010) pektinaz üreten mikroorganizmaları, seçici izolasyon tekniği kullanarak pektin endüstrisi atıklarından izole etmişlerdir. Bunlar arasında, potansiyel bir kültür morfolojik olarak *Penicillium sp.*'in batık fermantasyon işlemi altında önemli miktarda hücre dışı pektinaz ürettiğini tespit etmişlerdir. Üretilen enzim tipini daha sonra poligalakturonaz olarak rapor etmişlerdir. Kısmi optimizasyonda kültür, 72 saatlik inkübasyonda %1,5 pektin içeren pH 6.0'a sahip bir ortamda 35 °C'de maksimum enzim üretimi gösterdiği bildirilmiştir. İzolat tarafından üretilen PG ayrıca amonyum sülfat çöktürme, boyut dışlama ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığının SDS-PAGE ile 35 kDa olduğu belirlenmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında saflaştırılmış PG, ham dan neredeyse 12 kat daha yüksek olan 98,66 U / ml aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Uygun maliyetli pektinaz üretimi göz önüne

alındığından, katı hal fermantasyonu kullanılarak substrat optimizasyonu gerçekleştirilmişlerdir [59].

Banu, A. R., ve ark. (2010) belediye atık toprağından izole ettikleri on kalıp pektin içeren katı ortam üzerinde *Penicillium chrysogenum* yetiştirmişler ve pektinaz enzimi üretimini araştırmışlardır. *Penicillium chrysogenum* tarafından enzim üretimi, karbon ve azot kaynağı olarak süroz ve amonyum persulfat kullanılarak pH 6,5'te ve 35 °C'lik bir sıcaklıkta yüksek olduğunu bulmuşlardır. *P. Chrysogenum* pektinazın maksimum aktivitesi 50 °C ve pH 6,5 olarak bulmuşlardır. MgCl₂ ve CaCl₂ iyonlarının pektinaz aktivitesi üzerinde çok az etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Km ve Vmax değerleri sırasıyla 1 mg/ml ve 85 U/mg protein ve SDS-PAGE sonucunda ise 31 kDa'lık bir molekül ağırlığı tespit etmişlerdir [60].

VK Joshi ve ark. (2011) pektin metil esterazı *Aspergillus Niger* 'den elma püresini kullanarak katı hal fermantasyonu yöntemiyle üretmişlerdir. Bunun için %20-80 amonyum sülfat çöktürmesi kullanarak kısmen saflaştırmışlardır. Saflaştırılmış enzimin 60 güne kadar kararlı olduğunu tespit etmişlerdir. 50 °C'ye kadar ısıya dayanıklı ve 90 °C'de ise inaktif olduğunu bulmuşlardır. Kısmen saflaştırılmış enzim, pH 3.5'te en yüksek aktiviteyi gösterdiği bulmuşlardır. Enzimatik olarak işlenmiş meyve suyu geri kazanımı, erik içinde %52 ila 78, şeftali içinde %38 ila 63, armutta %60 ila 72 ve kayısıda %50 ila 80 oranında önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Pektinaz ilavesi, enzimatik olarak ekstrakte edilmiş meyve sularındaki rengi, toplam çözünür katıları ve toplam şekerleri önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır. Ekstrakte edilen meyve sularında viskozitenin azaldığı gözlemlenmiştir. Yapılan işlemler sonrasında meyve suyunun genel tat değerlendirilmesi, renk ve berraklık oranlarında önemli ölçüde artış sağlandığı gözlemlenmiştir. Meyve suyunun ekstraksiyonu için, %2,5 enzim konsantrasyonunun en iyi olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte, elma ve armut suyunun arıtılması için sırasıyla %1 ve %0,5 konsantrasyonun optimum sonuçlar verdiği bulunmuştur. Elma püresinden üretilen pektin esteraz enziminin arzu edilen aktiviteye sahip olduğu ve değerlendirilen meyve suyunun kalitesini geliştirdiği sonucuna yaptıkları çalışmalar neticesinde belirlemişlerdir [54].

Hande Demir (2012), yaptığı çalışmalar ile katı kültür fermantasyonu yöntemi kullanarak *Aspergillus sojae*'den poligalakturonaz elde etmiştir. Enzimin üretilmesinde çeşitli inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları, sırasıyla 4 gün ve 37 °C olarak yaptığı çalışmada

belirlemiştir. Yapılan çalışmada poligalakturonaz aktivitesi 534.4 U/g substrat olarak belirlemiştir [40].

Márcia M. Santin Trentini ve ark. (2015) *Aspergillus Niger*'den exo-poligalakturonaz, pektin metilesteraz ve pektin liyazı etanol çöktürmesiyle elde etmişlerdir. Etanol konsantrasyonunun ve ham ekstrakta etanol ilave etme oranının saflaştırma verimi ve saflaştırma faktörü üzerindeki etkileri incelenmiştir. Saflaştırma faktörlerini, exo-poligalakturonaz, pektin metilesteraz ve pektin liyaz için sırasıyla, 1,3, 2,3 ve 4,8 kat olarak bulmuşlardır ve etanol kullanılan çöktürme yönteminin pektinazların geri kazanılmasında ve fraksiyonasyonunda etkili olduğunu kanıtlamışlardır [53].

Lakhanpal ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada pektin liyazı *Byssoschlamys fulva*'dan amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanarak homojen olarak saflaştırmışlardır. Pektin liyazın molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 29 kDa olarak tespit etmişlerdir [43].

Yapılan çalışmalar sonucunda enzimin optimum pH 4.5, sıcaklığı 25 °C ve inkübasyon süresi ise 60 dakika olarak bulunmuştur. Pektin liyaz'ı Ca^{+2} , Mg^{+2} , sodyum arsenat, L-sistein, askorbik asit ve β -merkaptöetanol'in aktive ettiği, Zn^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+3} , sodyum dodesilsülfat (SDS), Civa (II) klorür'in ise inhibe ettiği yapılan çalışmada belirlenmiştir. Saflaştırılmış enzimi elma suyu fermantasyonu ve şarabın kuruması için yapılan çalışmalardan kullanmışlardır. Fermantasyon 30 gün boyunca gerçekleştirilmiş, karbohidrat miktarının 160'dan 142.28 $\mu\text{g/mL}$ 'ye düştüğünü yaptıkları çalışmalar sonucunda hesaplamışlardır. Meyve suyuna pektin liyaz eklenmesi durumunda fenoliklerin miktarı sırasıyla, 0.42'den 1,02 mg/mL 'ye ve etanolden %6,6'dan 9.01'e yükseldiği yapılan çalışmada bulunmuştur [43].

Ishtiaq Ahmed ve ark. (2016) *Aspergillus Niger* 'den batık fermantasyon işlemi altında karbon kaynağı olarak portakal kabuğu kullanarak pektinaz enzimini saflaştırmışlardır. Bu ortamda pH 5.5 ve 30 °C'de maksimum enzim verimi ($117.1 \pm 3.4 \mu\text{M} / \text{mL} / \text{dak}$) tespit etmişlerdir. Üretilen enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırmışlardır. Jel filtrasyonkromatografisi kullanarak da yaptıkları çalışmadan sonra ise saflaştırma kat sayısı 5.59 ve spesifik aktivite ise 97.2 U/mg ve geri kazanımı ise %12,96 olarak elde etmişlerdir. SDS-PAGE ile yapılan çalışma sonucunda ise

pektinaz enziminin molekül ağırlığını 30 kDa olarak bulunmuştur. Saflaştırılmış enzimin aktivitesi ise pH: 7 ve 55 ° C’de optimum koşullar olarak tespit etmişlerdir [45].

Fouzia Bibi ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada poligalakturonaz ve pektin liyaz’ı *Neurospora crassa*’nın farklı fraksiyonlarından fermante edilmiş narenciye kabuğu atıklarından ekstrakte etmişlerdir. Aktif PG ve PL fraksiyonları homojenliğe kadar saflaştırılmış ve çapraz bağlama maddesi olarak çeşitli konstrasyonlardaki tosan ve glutaraldehit kullanılarak enzimi immobilize etmişlerdir [42].

PG ve PL’ nin spesifik aktivitesini Sephadex-G100 kolonu kullanılarak 12,3 kat ve 6,52 kat saflaştırma yaptıkları çalışma sonucunda elde etmişlerdir. Ve PL aktivitesi 377.1 U/mg olarak yapılan çalışmada bulunmuştur. İmmobilize edilmiş fraksiyonlar için optimum pH 4 ve sıcaklığı ise 45-85 °C arasında bulmuşlardır.

S. Yadav ve ark. (2017) bir mantar olan *Fusarium Oxysporum* MTCC 1755’den katı hal fermentasyonu kullanılarak endüstriyel öneme sahip pektin liyazı yapılan çalışmalar sonucundan üretmişlerdir. Enzim saflaştırılmasını 3 adımda gerçekleştirmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Bu saflaştırma işlemleri ile enzimi 16 kat saflaştırmayı başarmışlardır. Enzim verimini %31,2 ve spesifik aktivite 3.2 U/mg bulmuşlardır [45].

Saflaştırılmış enzimin optimum pH 5.0-7,0 olarak bulmuşlardır. Saflaştırılmış enzimin optimum sıcaklığı 10- 50 °C aralığında denenmiş ve uygun sıcaklık 30 dakika için 40 °C olarak tespit edilmiştir. Saflaştırılmış enzim mannitol ve sorbitol gibi şekerlerde bulunan Ca^{+2} tarafından uyarıldığı ve NaCl ve $CaCl_2$ gibi tuzların ise termostabiliteyi arttırdığı yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir.

Ritu Saharan ve ark. (2019) yaptığı çalışmalar doğrultusunda *Bacillus subtilis*’ten pektin liyaz enziminin saflaştırılması için, substrat ve K_2HPO_4 konsantrasyonu, ortamın pH’ı, azot kaynağı gibi parametreleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada enzimin aktivitesinin en yüksek olduğu süre 21. saat’te olduğu bulunmuştur. Elde edilen optimum konsantrasyon, üretim ortamında %1.5w/v pektin olarak bulmuşlardır. Pektin liyaz üretiminin çeşitli azot kaynakları üzerinde etkisi her biri için %0,2 konsantrasyon olarak yaptıkları çalışmada

belirlemişlerdir. Pektin liyaz enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu pH 9,0 olarak yapılan çalışmada bulunmuştur. Bu çalışmada %0-30 ve %30-60 amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve enzim varlığına %30-60 da yaptıkları çalışmada rastlamışlardır. Yapılan çalışmada enzim Jel filtrasyon kromatografisi ile 291.4(U/g) bulunmuştur. Enzim 0.4294 verim ile 205,2 kat saflaştırıldığı ve molekül ağırlığının ise 38 kDa olarak tespit etmişlerdir [41].

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2.1 Materyaller

2.1.1 Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar, malt-agar, pektin, HCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, TEMED, β -Merkaptoetanol, CNBr, NaOH, Tris-HCl, Tris-Baz, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, SDS, Gliserol, Glisin, Akrilamid-bisakrilamid, NaHCO_3 , H_2SO_4 , Na_2CO_3 , Sephadex-G75 gibi kimyasallar Merck veya Sigma'dan tedarik edilmiştir.

2.1.2 Araştırma Kullanılan Cihazlar Ve Aletler

Tablo 2.1: Araştırmamızda kullanılan cihazlar ve aletler.

• Hassas Terazî	WeightLab WL-603 Hassas Terazî
• Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standart Isıtcılı
• UV/VIS Spektrofotometresi	HACH DR 6000
• pH Metre	MettlerToledo
• Otomatik Pipetler	Eppendorf
• Soğutmalı Santrifuj	SIGMA 2-16PK
• Elektroforez Sistemi	BIORAD
• Kromatografi kolonu	Sigma (1,5x10 cm)
• Vorteks	HEIDOLPH Reax Control Vortex
• Otoklav	HİRAYAMA

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

0,1 M NaHCO_3 Tamponu (pH 10.0): 8,401 g (0,1 mol) NaHCO_3 950 mL distile su içerisinde çözülerek, 1M NaOH ile pH 10.00'a getirildi ve son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

0,2 M NaHCO_3 Tamponu (pH: 8.8): 8,401 g (0,1 mol) NaHCO_3 450 mL distile su içerisinde çözülerek, 1M NaOH ile pH 8.8'e getirildi ve son hacim 500 mL'ye tamamlandı.

0,01 M Na₂HPO₄ Tamponu (pH: 6.0): 1,7799 g (0,01 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile su içerisinde çözülerek, 1M HCl ile pH 6.0'a getirildi ve son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Hidrofobik jelin dengelenmesi için kullanılan tampon: 1M (NH₄)₂SO₄ içeren 0,1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8.0); 7,098 g (0,05 mol) Na₂HPO₄ ve 66,07 g (1 mol) (NH₄)₂SO₄ 450 mL distile suda çözülerek 1M HCl ile pH 8.0'e getirildi ve son olarak hacim 500 mL'ye tamamlandı.

Hidrofobik jele bağlanmış pektinaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon: 0,1 M Na₂HPO₄ tamponu (pH 8.0); 14,2 g (0,1 mol) Na₂HPO₄ 950 mL distile su ile çözülerek 1M HCl ile pH 8.0'e getirildi ve son hacim 1 L'ye tamamlandı.

Amonyum sülfat çöktürülmesi sonucu oluşan çökeleğin alındığı tampon: 0.1 M fosfat tamponu içeren (pH 5.2); 1,7418 g (0,01 mol) K₂HPO₄ ve 0.1 M sitrik asit (pH 5.2); 3,57 g (0,01 mol) C₆H₈O₇ 90 mL distile su içerisinde çözüldü ve pH:5.2'e getirildi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

Kantitatif protein tayini için kullanılan çözelti: Coomassie brilliant blue çözeltisi; 40 mg Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi 25 mL %95'lik etanol içerisinde çözüldü. Çözeltiye 50 mL %95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi distile su ile 100 mL'te tamamlandı.

Pektinaz enziminin aktivite tayininde kullanılan çözeltiler: 0,1 M fosfat tamponu içeren (pH: 5.2); 17,418 g (0,1 mol) K₂HPO₄ ve 0,1 M sitrik asit (pH 5.2); 35,7 g (0.1 mol) C₆H₈O₇ 950 mL distile su içerisinde çözüldü ve pH 5.2'e getirildi ve en son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

%5'lik pektin çözeltisinin hazırlanışı: 0,12 g pektin saf suda iyice çözüldükten sonra son hacmi distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

0,5 M HCl çözeltisi hazırlanışı: 0,5 M (0,125 mol) HCl'den 200 mL saf su üzerine 10,44 mL eklenip son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

1 M NaOH çözeltisinin hazırlanışı: 1 M (0,25 mol) NaOH'dan 10 g alınıp distile su ile çözüldü ve son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

Malt-Agar hazırlanışı: %3'lük malt ve %2'lik malt-agar karışımı 100 mL saf suda çözöldü.

Tablo 2.2: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan numune tamponu miktarları.

Madde	Miktar
• Gliserol	2,0 mL
• %10'luk SDS	4,0 mL
• Bromofenol mavisi	0,01 mL
• B-merkaptöetanol	1 mL
• Distile su	0,5 mL
• 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2,5 mL

Tablo 2.3: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu miktarları.

Madde	Miktar
• Tris-Baz	3 g
• Glisin	14,4 g
• SDS	10 g

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan ayırma ve yığılma jellerinin hazırlanışı: SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan jel karışımlarının miktarları Tablo 2.2'de verilmiştir.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renklendirme çözeltisi: 0,4 g Coomassiebrilliantblue G-250, 72,72 mL metanol de çözöldü. Bu çözeltiye 14,54 mL saf asetik asit ve 72,72 saf su ilave edildi.

SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan renk açma çözeltisi: %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 saf sudan oluşmaktadır. Bu amaçla 18,75 mL asetik asit, 12,5 mL metanol ve 218,75 mL saf su ile birleştirildi.

Tablo 2.4: SDS-PAGE'de kullanılan jel karışımlarının miktarları.

	Ayırma Jeli	Yığılma Jeli
	(%10)	(%3)
Akrilamid/Bis(%30)	3,5 mL	0,54 µL
Distile su	4 mL	2,5 mL
1.5 M Tris-HCl(pH 8.8)	2,5 mL	-
%10'luk SDS	100 µL	40 µL
TEMED	5 µL	4 µL
%10'luk amonyum persülfat	500 µL	266 µL

Amonyum sülfat çözeltisinin hazırlanışı (NH_4SO_4): 2,8 g amonyum sülfat saf suda çözüldü ve son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4): 4 g potasyum dihidrojen fosfat tartılıp saf suda çözüldü ve daha sonra son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

Magnezyum sülfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 0.6 g magnezyum sülfat heptahidrat saf suda çözüldü ve son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

Kalsiyum klorür (CaCl_2): 0.3 g kalsiyum klorür saf suda çözüldü ve son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

Üre ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$): 0.3 g üre saf suda çözüldü ve son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

TW20: 0.5 g TW20 ve saf suda çözüldü ve son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

Pepton: 1.5 g pepton saf suda çözüldü ve son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Eser element çözeltilerinin hazırlanması (Yukarıdaki kimyasallar 1000 mL' de birleştirilip hazırlandı.)

Demir (II) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 0.25 g demir (II) sülfat saf suda çözöldü ve son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Manganez (II) sülfat heptahidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): 0.08 g manganez sülfat heptahidrat saf suda çözöldü ve son hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Çinko sülfat monohidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$): 0.07 g çinko sülfat monohidrat tartılıp saf suda çözöldü ve son hacim 1000 mL olacak şekilde tamamlandı.

2.2 Yöntemler

2.2.1 Mikroorganizmaların Büyütölmesi

Bu çalışmamızda, pektin liyaz enzimini doğal kaynaklardan elde edilen patojen olmayan *Aspergillus niger*'den elde edilmiştir. *Aspergillus niger* Yıldız Teknik Üniversitesi (YTÜ) Fen-Edebiyat Faköltesi Kimya bölümü Biyokimya Anabilim Dalında görev yapan Prof. Dr. Ayşegöl PEKSEL'den temin edilmiştir.

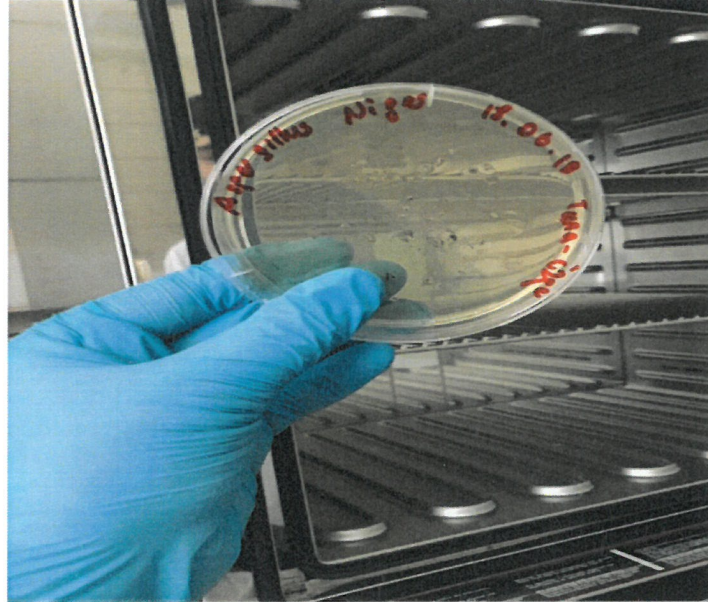
Aspergillus niger'in büyütölmesi için malt-agar katı besiyeri kullanıldı. %3'lük malt ve %2'lik agar 100 mL'lik erlen içerisinde saf su ile çözölerek katı besi ortamı hazırlandı. Hazırladığımız bu besiyeri ortamı 121 ° C'de 15 dk sterilizasyona bırakıldı. Sterilize işlemi tamamlandıktan sonra katı besiyeri daha önceden sterilize olmuş bir alana getirilerek soğuması beklendi ve katı besiyerin donmaya başlamadan hemen önce *Aspergillus niger* kaynağından alınarak katı besiyerine ekim işlemi gerçekleştirildi. Ekim işlemi gerçekleştirildikten sonra 1 hafta boyunca 30 ° C'de çoğalmaya bırakıldı. Daha sonra 1 hafta geçtikten ve küfler katı besiyerinde çoğaltıldıktan sonra önceden hazırlanan sıvı besiyeri yine katı besiyerdeki gibi 121 ° C'de 15 dakika sterilize işlemi yapıldı ve katı besiyerindeki küfler sıvı besiyerine aktarıldı. Ekim işlemi yapıldıktan sonra 24 saat'te bir olacak şekilde 5 gün boyunca her gün aktiviteleri ölçöldü. Sıvı besiyerinden enzim aktivite ölçümü yapılırken, ilk olarak erlenden 50 mL'lik örnek alındı ve 10000 rpm'de 10 dakika santriföljenerek süpernatant ve çökelek ayrıldı. Süpernatant da enzim aktivitesine bakıldı. Yapılan aktivite ölçümü sonucunda *Aspergillus niger*'in pektinaz enzimini ürettiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda elde ettiğimiz aktivite değerleri belirlendi ve enzimin aktivite tayini Albersheim methodu [78] kullanılarak yapıldı. Söz konusu aktivite tayininde kullanılan miktarlar Tablo 2.5'te verilmiştir.

Tablo 2.5: Pektinaz'ın aktivite tayini için kullanılan miktarlar.

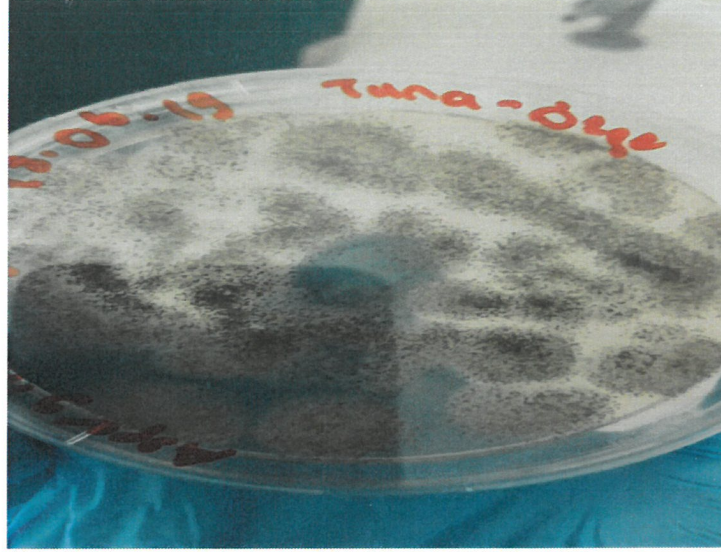
Kullanılan çözeltiler	Numune	Kör
Pektin çözeltisi	1 mL	1 mL
Enzim	0.05 mL	-
Saf su	-	0.05 mL
0.5 M HCl	3.6 mL	3.6 mL
Saf su ekledikten sonra 40° C'de 50 dakika inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonlandıktan sonra 0.5 M HCl eklenip 235 nm'de ölçümü yapıldı.		

Pektin liyaz aktivitesinin belirlenmesi, pektinin parçalanmasıyla oluşan α -4,5 doymamış oligogalakturonidin 235 nm'de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

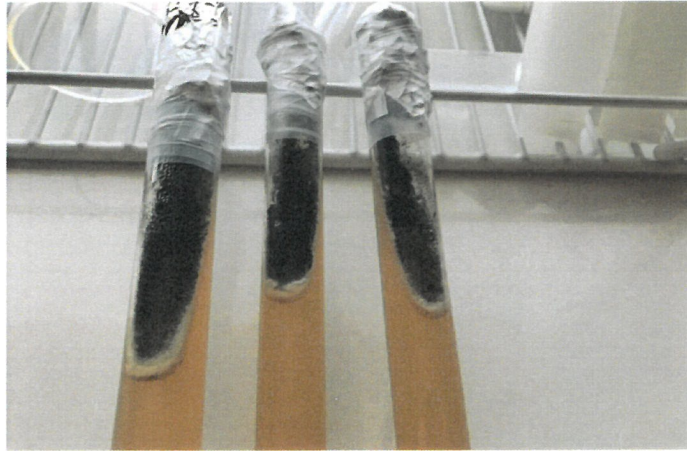
Sıvı besiyerine ekilen *Aspergillus niger*'lerin katı besi yerindeki değişimleri şekilde 2.1 ve şekil 2.2 ve şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: *Aspergillus niger* katı besi yeri ilk ekim günü.

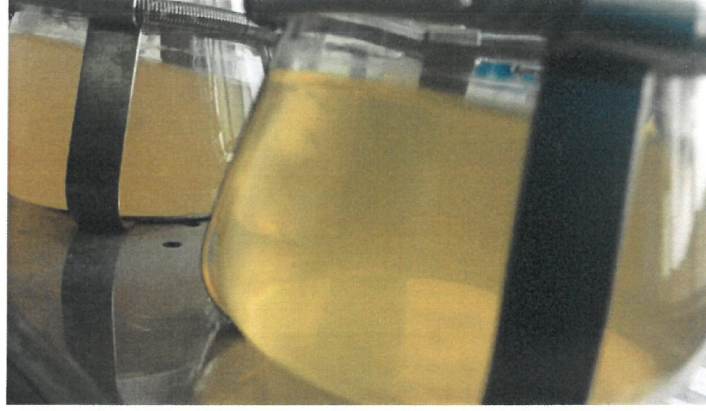


Şekil 2.2: *Aspergillus niger* petri kabı katı besiyeri 7.gün.

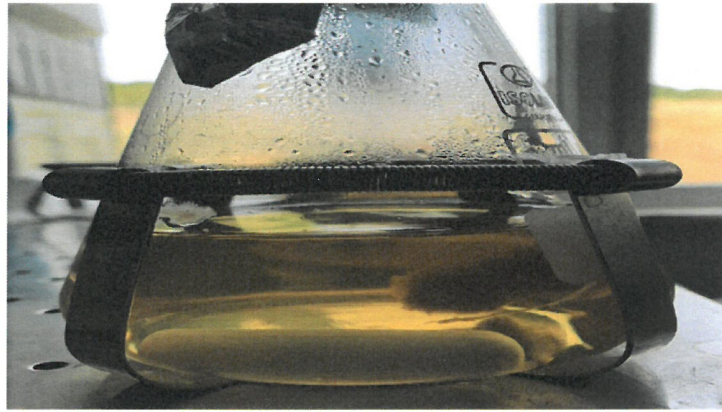


Şekil 2.3: *Aspergillus niger* tüp katı besi yeri 7.gün.

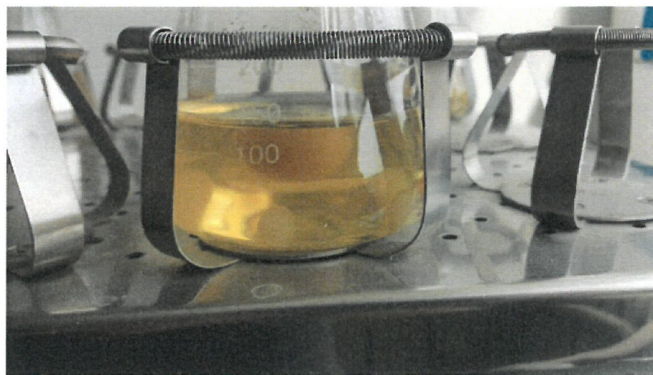
Pektinaz enziminin sıvı besiyerindeki gelişme süreçleri şekil 2.4, 2.5, 2.6 ve 2.7’de verilmiştir.



Şekil 2.4: *Aspergillus niger* sıvı besi yeri 0.gün.



Şekil 2.5: *Aspergillus niger* sıvı besi yeri 2.gün.



Şekil 2.6: Pektinaz enzimi sıvı besi yeri 3.gün.



Şekil 2.7: Pektinaz enzimi sıvı besi yeri 4.gün.

2.2.2 Amonyum sülfat ((NH₄)SO₄) ile kısmi saflaştırma

Sıvı besi ortamından alınan belirli bir miktarın santrifüjlenmesiyle ayrılan süpernatanta pektin liyazın çöktürme aralığının bulunması için 10'ar birimler olacak şekilde %0 ve %100 arasında çöktürmeler uygulandı. Her kademedede 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulandı. İşlem sonrasında süpernatant ve çökelekler birbirlerinden ayrıldı. Ayrılan süpernatantlar üzerinde daha önce bahsedilen şekilde aktivite ölçüm yöntemi kullanıldı. Elde edilen çökelekler sitrat tamponunda çözüldü ve bu çökeleklerde aktivite tayinleri yapıldı. Örneklere yapılan çalışmalar sonucunda uygun çöktürme aralığı %40- %90 olarak bulundu. Söz konusu hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{gr}_{(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4} = \frac{1.77 \times V \times (S_2 - S_1)}{3.54 - S_2}$$

V: Amonyum sülfat çöktürmesi için alınan örnek miktarı

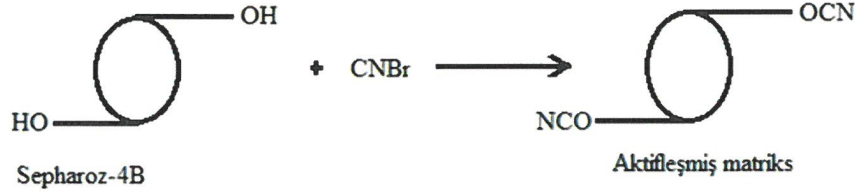
S₁: Amonyum sülfat doygunluğu (İlk)

S₂: Amonyum sülfat doygunluğu (Son)

2.2.3 Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırılmasında Kullanılan Hidrofobik Jelin Sentezi

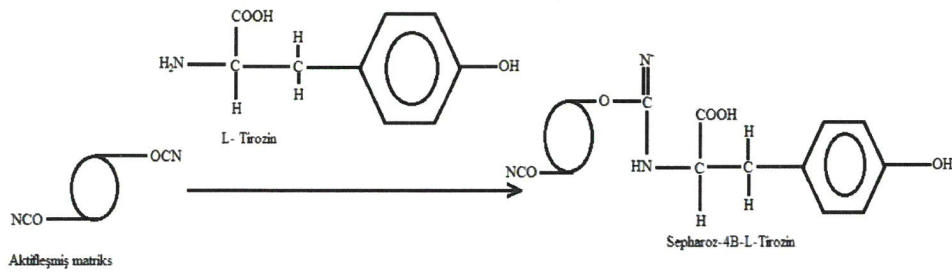
Jelin sentezlenmesi işlemi ilk olarak Sepharoz 4B'nin CNBR ile aktifleştirilmesi ile gerçekleştirildi. 25 mL Sepharoz 4B, saf su ile iyice yıkanarak dekantasyon işlemi yapıldı. Bu işlem için 25 mL saf suyun Sepharoz-4B'nin üzerine eklenmesiyle ile gerçekleştirildi. Dekantasyon işlemi bittikten sonra jelin aktifleştirilmesi 40 mL CNBr karışıma ilave edildi.

Karışımın pH'ı 11'e derişik NaOH kullanılarak ayarlandı ve süzülen jel süspansiyonu ilk olarak saf su ile sonrasında ise 0.1 M NaHCO₃ (pH 10.00) ile yıkandı.



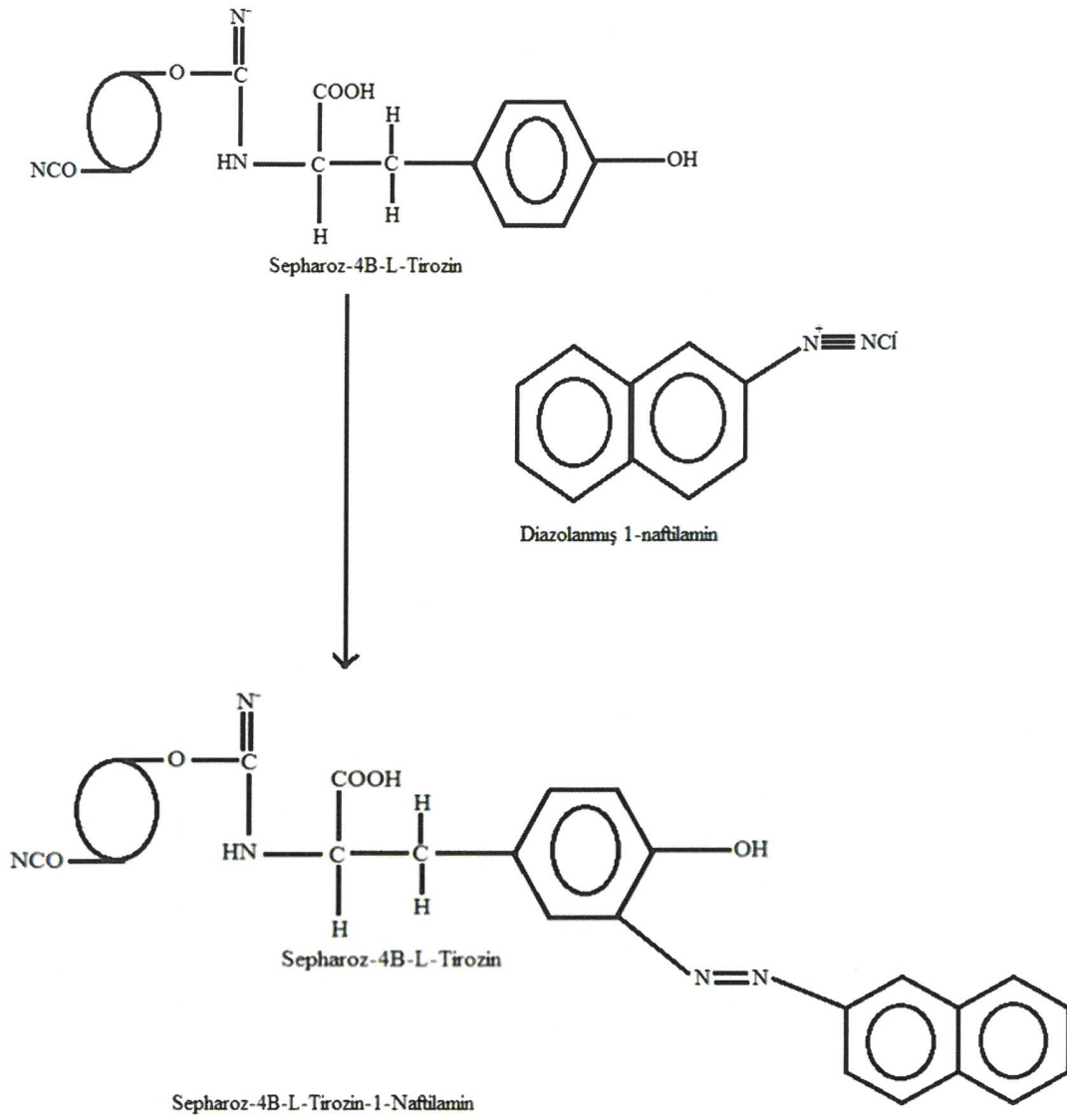
Şekil 2.8: Sepharoz-4B'nin aktivasyonu.

Daha sonra aktifleştirilmiş matriks üzerine, 25 mL 0,01875 g tirozin 0,1 M NaHCO₃ pH 10.00 tamponu içerisinde çözülmüş tirozin eklendi ve 90 dakika boyunca karıştırılmaya bırakıldı. Bu işlem tamamlandıktan sonra jel 1 gün boyunca bekletildi. Bekletme süresi tamamlandıktan sonra jel karışımı bol su ile yıkandı. Bu işlem yıkama suyu 280 nm'de absorbans gözlemlenmeyinceye kadar devam etti. Yıkama işlemindeki temel amaç ise reaksiyona girmemiş olan L-tirozini uzaklaştırılmış olmasıdır. Yıkama işlemi saf su ile iyice gerçekleştirildikten sonra bu işlem 0,2 M NaHCO₃ pH 8.8 tamponu ile devam ettirildi. Uzantı kolu bağlanmış matriks 0,2 M NaHCO₃ pH 8.8 tamponuna aktarıldı.



Şekil 2.9: L-Tirozin bağlanması.

L-Tirozinin bağlanmasından sonra ise 1-naftilaminin bağlanması için diazotlama işlemi yapıldı. Bu amaçla 0,06 g 1- Naftilamin yaklaşık 0 °C civarlarında 20 mL 1 M HCl içerisinde çözüldü. Bu işlem gerçekleşirken pH 9.5'de sabit tutuldu ve 3-4 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Diazotlanma reaksiyonu (10-12) kısa sürede tamamlandı. Yine daha önceki işlemlerde de yapıldığı gibi öncelikle saf su ile daha sonra ise 0,01 M Na₂HPO₄ pH 6.0 tamponunda yıkandı.



Şekil 2.10: 1-Naftilamin bağlanması.

2.2.4 Sentezlenen HEK Kolonu ile Pektin Liyaz Enziminin Safılaştırılması

Çalışmamızda araştırma ekibimiz tarafından daha önceden sentezlenen HEK jeli, aynı yöntemle göre tarafımızca sentezlenmiştir [57]. HEK jeli 1.5-10 cm boyutundaki kolona gerekli koşullar içerisinde paketlenmiştir. 1 M (NH₄)₂SO₄ içeren 0.1 M Na₂HPO₄ içeren (pH 8.0) tamponu ile dengelenmiştir. %40 ve daha sonra %90 amonyum sülfat çöktürmesi yapılan

örnek santrifüj edilerek süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra çökelek sitrat tamponun da (pH 5.2) çözöldü ve daha önceden hazırlanmış kolona yüklendi. Örnek yüklendikten sonra bir süre dengeleme tamponu ilave edilerek kolon yıkandı. Elüsyon tamponu olarak, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0) içeren çözelti ve içerisinde tuz bulunmayan 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 8.0) gradienti kullanılarak gerçekleştirildi. Eluatlar 2 mL’lik fraksiyon halinde toplandı. Toplanan fraksiyon örneklerine 280 nm’de kalitatif protein tayini ve daha önceden tablo 2.3’de bahsedilen aktivite tayini yapıldı. Yapılan aktivite tayinleri sonucunda dikkate değır düzeyde aktiviteye sahip fraksiyonlar birleştirildi.

2.2.5 Pektin liyaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

Enzim saflaştırıldıktan sonra kesikli SDS-PAGE jel elektroforezi ile (derişimleri %3 ve %10 olacak şekilde akrilamid-bisakrilamid) kullanılarak enzimin saflık kontrolü ve molekül ağırlığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Elektroforez işlemine başlamadan önce kullanılan plakalar önce saf su ile daha sonrada alkol ile iyice yıkandı. Yıkama işleminden sonra cam plakalar birleştirildi ve jel hazırlama cihazına yerleştirildi. %10’luk derişime sahip ayırma jeli hazırlanır ve plakalara arasına bir otomatik pipet yardımıyla dököldü. Bu işlem yapılırken plakalar arasında baloncuk oluşmamasına dikkat edildi ve jelleşmenin düzgün olması için jel üzerine bir miktar saf su eklendi. Polimerleşme yaklaşık olarak 45 dakika içerisinde tamamlandıktan sonra üzerine %3’lük yığma jeli üst yüzeye gelene kadar eklendi. Üzerine dikkatli bir şekilde kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildi. Polimerizasyon işleminin tamamlanması için yaklaşık 1 saat beklendi. Polimerleşme işlemi tamamlandıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Daha sonra plakalar elektroforez tankına yerleştirildi ve yürütme tamponu ilave edildi [27].

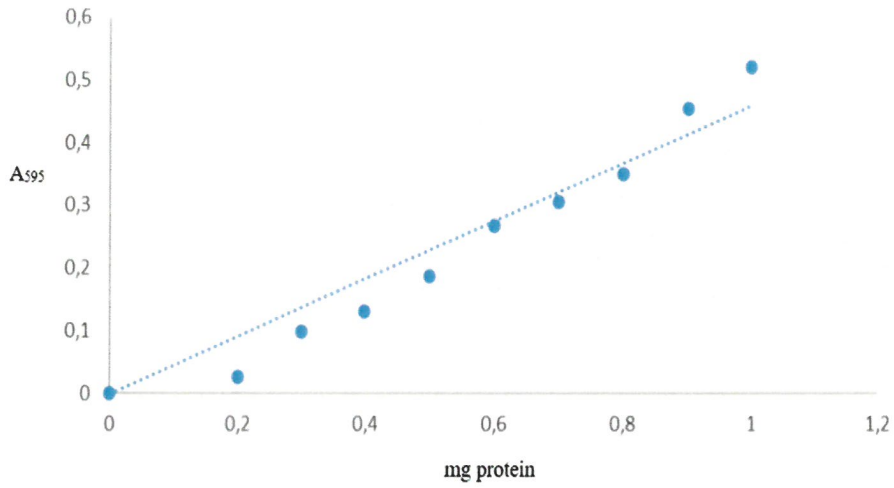
Enzim örneğı ile daha önceden hazırlanan proteinleri denatüre etmek için kullanılan çözelti ile 1’e 1 oranında eppendorfta birleştirildi. Daha sonra hazırlanan örnekler 90 °C ‘de 3-4 dakika ısıtılmaya bırakıldı. Isıtma işlemi tamamlandıktan sonra örneklerin birkaç dakika soğuması beklendi ve daha sonra hazırlanan kuyucuklara örnekler yüklendi. Tank kapağı uygun şekilde yerleştirildi ve yürütme jelinde 80 V’da 1 saat yürütme yapıldı ve proteinler yığma jelinin sonuna geldikten sonra akım 120 V’a çıkarılarak 2 saat daha yürütme işlemi gerçekleştirildi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra dikkatlice cam plakalar ayrılarak jel boyama çözeltisinin içine alındı. 1 saat boyunca boyama işlemi gerçekleştirildikten sonra renk

açma çözeltilisine alındı ve rengi açılana kadar çalkalandı. Elde edilen sonuç görüntülendi ve saf su içerisinde saklandı.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1 Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Grafik

Kantitatif analiz için Bradford yöntemi kullanıldı. Bu amaçla farklı ise farklı derişimlere sahip Bovin serum albumin çözeltisi hazırlandı ve konsantrasyona karşı absorbans grafiğı çizildi. Bu grafik yardımıyla elde edilen enzim ekstraktları ve saflaştırılan enzim çözeltilerinin içerlerinde bulunan protein miktarları bu yöntem ile tayin edildi. Hazırlanan standart çözeltiler ve absorbans değeri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: CBB ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan grafik.

3.2 Aspergillus Niger’den Elde Edilen Pektin Liyaz Enziminin Saflaştırma Kademeleri

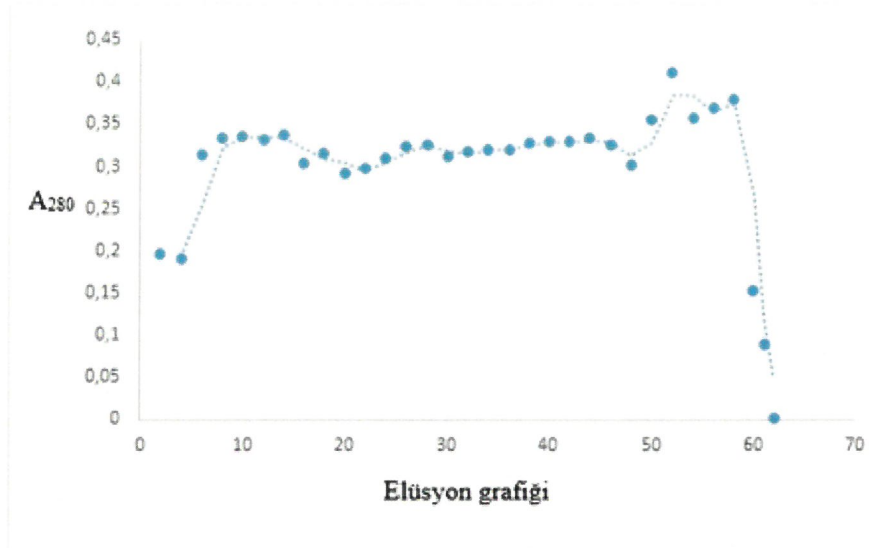
3.3 Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Sıvı besi yeri ortamında üretilen pektin liyaz enzimi amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırıldı. Hangi oranlarda saflaştırılacağına belirlenmesi için %0 ile %100 arasında çeşitli çöktürme işlemleri uygulandı. Yapılan çalışmalar sonucunda en uygun saflaştırma aralığı %40 ile %90 olarak tespit edildi. Yapılan hesaplamalarda ise amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen kısmi saflaştırma 6,05 kat olarak bulundu.

3.4 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Kısmi olarak saflaştırılan enzim, hidrofobik etkileşim kolonuna yüklenerek 11,75 kat saflaştırma kat sayısı elde edildi. Yapılan bu çalışmalarda her adımda örneklerin aktiviteleri

incelenmiş ve aktiviteleri en yüksek olan tüpler birleştirilmiştir. Aktivite tayinleri sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçların genel gösterimi tablo 3.1’de gösterilmiştir.



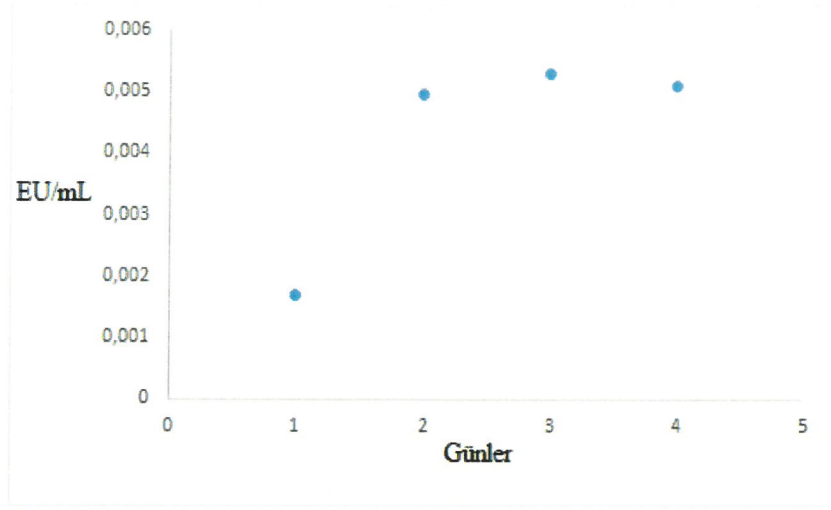
Şekil 3.2: HEK kolonu ile saflaştırılan pektin liyaz elüsyon grafiği.

Tablo 3.1: *Aspergillus niger*’den elde edilen pektin liyaz’ın saflaştırma basamakları.

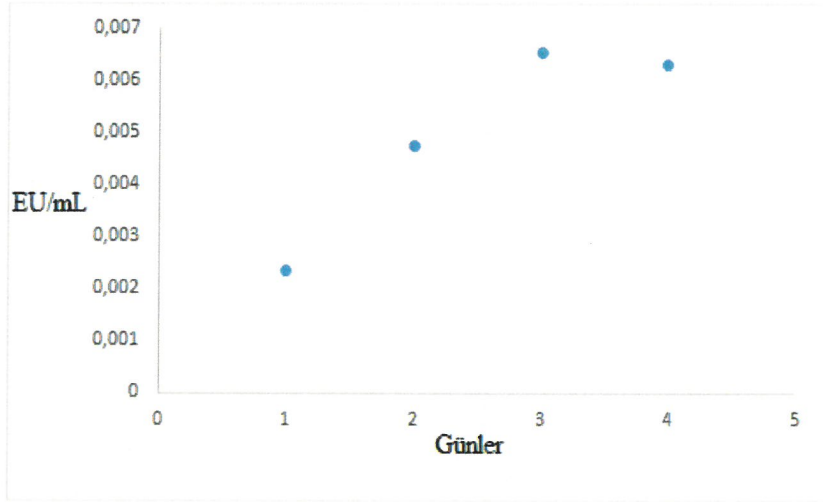
Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (U/mL)	Toplam Aktivite	Protein (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Derecesi
Ham Ekstrakt	28	3,20E-03	0,0896	3,03	84,87	0,001	100	-
Amonyum sülfat	5	5,90E-03	0,0295	0,92	4,61	0,006	32,92	6,05
Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi	2	6,90E-03	0,0138	0,56	1,11	0,012	15,40	12,00

3.5 Pektinaz Enziminin Saflaştırılması İçin Optimum Pektin Miktarının Belirlenmesi

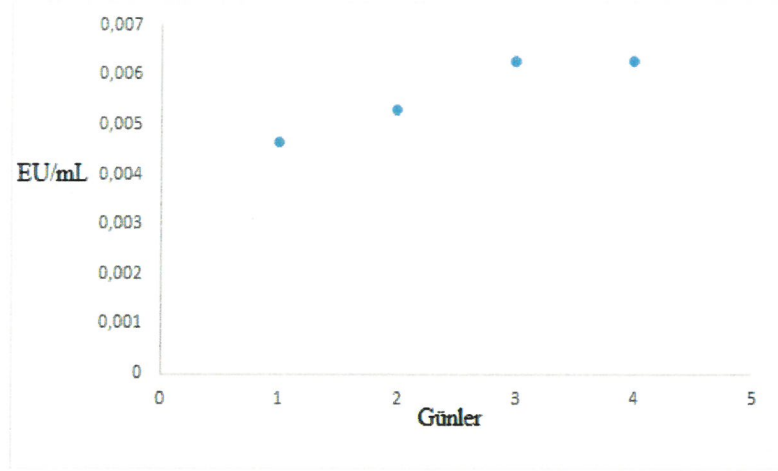
Pektinaz enziminin saflaştırılmasında kullanılacak optimum pektin miktarının belirlenmesi için aynı hacimlerde farklı pektin miktarlarına sahip sıvı besi yerleri hazırlandı. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen grafikler Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7’te gösterilmiştir.



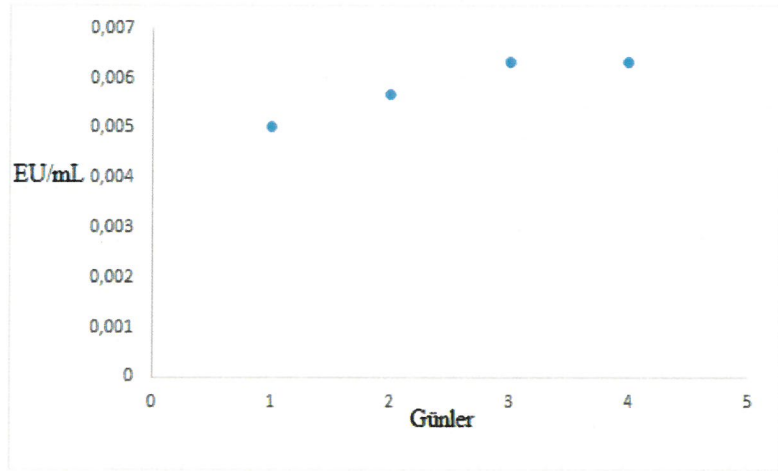
Şekil 3.3: 0,9 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.



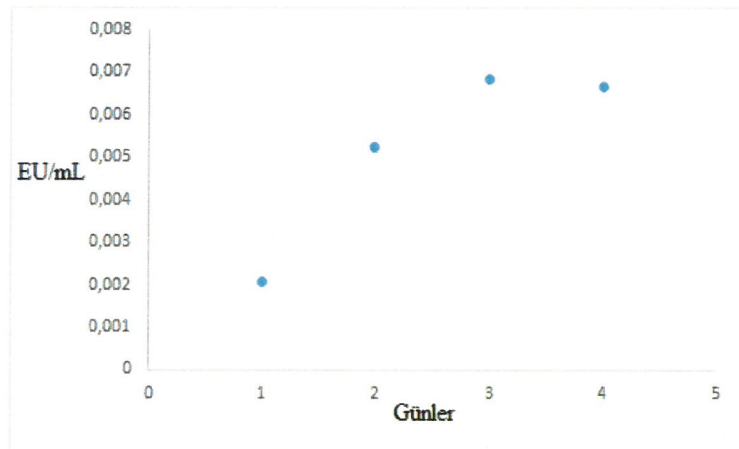
Şekil 3.4: 1,2 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.



Şekil 3.5: 1,5 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.



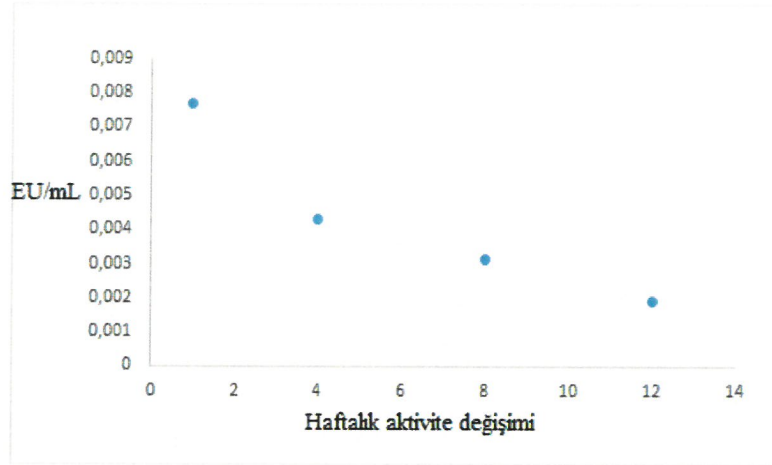
Şekil 3.6: 1,7 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.



Şekil 3.7: 1,9 gram pektin içeren sıvı besi yeri için günlük aktivite ölçümleri.

3.6 Pektinaz Enziminin Aktivitesinin Haftalara Göre Değişiminin Belirlenmesi

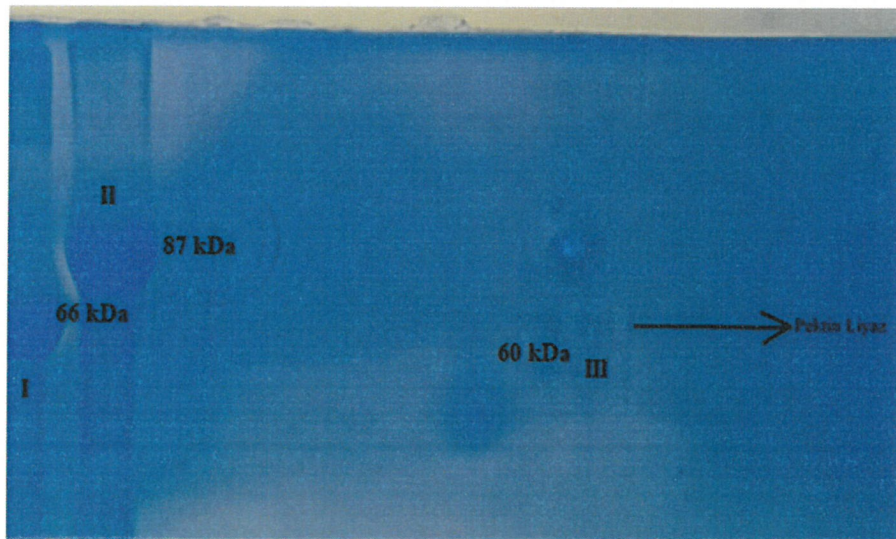
Pektinaz enziminin haftalara göre aktivite değişiminin belirlenmesi için çeşitli periyotlarda sıvı besi yerinden alınan pektinaz örneklerine aktivite tayinler yapılmış ve haftalara göre pektinaz enziminin aktivitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.8’da gösterilmiştir.



Şekil 3.8: Pektinaz enziminin haftalık aktivite değişimi

3.7 Pektinaz Enziminin SDS-PAGE ile Saflığının Kontrolü

Pektinaz enziminin saflık kontrolü bölüm 2.2.5’te bahsedildiği gibi yapılmış, saflaştırılan enzim SDS-PAGE’e yüklenmiş ve elde edilen sonuç Şekil 3.9’da gösterilmiştir.



Şekil 3.9: Pektin liyaz enziminin elektroforez görünümü (I=Bovin serum albümin, II=Laktoferrin, III= Pektin liyaz.)

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada *Aspergillus Niger*'den pektin liyaz enziminin üretimi hedeflenmiştir. Pektin liyaz daha önce *Bacillus sp*, *Aspergillus indicus*, *Aspergillus iluvus*, *Aspergillus niveus*, *Pencilium sp.*, *Penicilium chrysogenum*, *Aspergillus sojæ*, *Byssochlamys fulva*, *Neurosporacrssa*, *Fusairum Oxysporum*, *Bacillus subtilis* gibi kaynaklardan bu enzim saflaştırılmıştır.

Aspergillus Niger toksik olmaması, patojen olmaması en önemli tercih sebebi olmuştur. Bu amaçla YTÜ Kimya Bölümü'nden *Aspergillus Niger* temin edilerek ekstraselüler pektin liyaz üretimi laboratuvarımızda başarıyla yapılmıştır.

Amonyum sülfat yöntemiyle 6,05 kat saflaştırma elde edilmiştir. Enzim saflaştırma için birçok teknik kullanılmıştır. Pektin liyaz enziminin ileri derece saflaştırılması için afinite, jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişim kromatografisi gibi teknikler kullanılarak enzim saflaştırılmıştır. Araştırmamızda hidrofobik etkileşim kromatografisi tercih edilmiştir. Bu tekniğin amonyum sülfat tekniğinden sonra uyumlu olması, ayrıca kullanılan jelin birçok enzimi saflaştırmak içinde kullanılacak olması diğer tekniklere kıyasla hidrofobik etkileşim kromatografisini daha ekonomik hale getirmektedir. Tüm bunların dışında uygulanmasının kolay ve nispeten hedef moleküle daha az hasar vermesi bu tekniğin kullanılmasında başlıca tercih sebebi olmuştur. Pektin liyaz enziminin saflaştırılmasında kullanılan jel araştırma grubumuz tarafından sentezlenmiş ve paraoksonaz, glutatyon S-transferaz gibi birçok enzimin saflaştırılmasında başarıyla kullanılmıştır. Hidrofobik etkileşim kolonu kullanılması sonucu 12 kat saflaştırma elde edilmiştir. Pektin liyaz enzimi çeşitli kaynaklardan da saflaştırılmış ve belirli saflaştırma kat sayılarında elde edilmiştir. Hande Demir (2012), yaptığı çalışmalar ile katı kültür fermantasyonu yöntemi kullanarak *Aspergillus sojæ*'den poligalakturonaz elde etmiştir. Enzimin üretilmesinde çeşitli inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları ve sırasıyla 4 gün ve 37 °C olarak yaptığı çalışmada belirlemiştir. Yapılan çalışmada poligalakturonaz aktivitesi 534.4 U/g substrat olarak belirlemiştir [40].

Ritu Saharan ve ark. (2019) yaptığı çalışmalar doğrultusunda pektin liyaz üretimi substrat ve K₂HPO₄ konsantrasyonu, ortam pH'ı azot kaynağı ve *Bacillus subtilis*'ten maksimum pektin salgılanması için gerekli parametreleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada enzimin aktivitesinin

en yüksek olduğu süre 21. Saat'te olduğunu yaptıkları çalışmada bulmuşlardır. Elde edilen optimum konsantrasyon, üretim ortamında %1,5 w/v pektin olarak bulmuşlardır. Pektin liyaz üretiminin çeşitli azot kaynakları üzerinde etkisi her biri için %0,2 konsantrasyon olarak yaptıkları çalışmada belirlemişlerdir. Pektin liyaz enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu pH 9.0 olarak yapılan çalışmada bulunmuştur. Bu çalışmada %0-30 ve %30-60 amonyum sülfat çöktürmesi yapılmış ve enzim varlığına %30-60 da enzim varlığına yaptıkları çalışmada rastlamamışlardır. Yapılan çalışmada enzim Jel filtrasyon kromatografisi ile 291.4(U/g) olarak bulunmuştur. Enzim 0.4294 verim ile 205,2 kat saflaştırıldığı ve molekül ağırlığını 38 kDa olarak bulmuşlardır [41].

S. Yadav ve ark. (2017) bir mantar olan *Fusarium Oxysporum* MTCC 1755'den katı hal fermantasyonu kullanılarak endüstriyel öneme sahip pektin liyaz yapılan çalışmalar sonucundan üretmişlerdir. Enzim saflaştırılmasını 3 adımda gerçekleştirmişlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemlerini yapılan çalışmalar sonucundan gerçekleştirmişlerdir. Bu saflaştırma işlemlerinden sonra yapılan hesaplamalar ile enzimi 16 kat saflaştırmayı başarmışlardır. Enzim verimini %31,2 ve spesifik aktivite 3,2 U/mg olarak yaptıkları çalışmada bulmuşlardır [46].

Amonyum sülfat çöktürmesi ve hidrofobik etkileşim kromatografisi ile saflaştırılan enzim örnekleri 280 nm'de absorbanları ölçülmüş ve protein miktarları tayin edilmiştir. Bu yöntemin temeli proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan aminoasitlerinin 280 nm'de maksimum absorban vermesi prensibine dayanmaktadır [78]. Saflaştırılmış enzim örneklerinin protein miktarlarının tayini için Bradford yöntemi kullanılmıştır.

Pektin liyaz aktivitesi, α -4,5 doymamış oligogalakturnonidin oluşum hızına ve bu ürünün 235 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır [78]. Oluşan ürünün molar ekstinksiyon kat sayısı 5550 M⁻¹. cm⁻¹'dir. Enzim aktivitesi dakikada salınan doymamış ürünün mikromol miktarı olarak tanımlanmıştır.

Pektinaz enziminin tayininde kullanılacak optimum pektin miktarının belirlenmesi için 0,9, 1,2, 1,5, 1,7, 1,9 gram pektin içeriklerine sahip erlenler hazırlandı. 4 gün boyunca takip edilen sıvı besi yerleri üzerinden belirli bir miktar örnekler alınarak günlük olarak enzim tayini yapıldı. 4 gün boyunca takip edildikten sonra maksimum aktivite 3.günde 1,2 gram pektin içeren sıvı besi yerinde tespit edildi.

Yapılan aktivite ölçümleri sonucunda da görüldüğü gibi 1,2 gram pektin içeren sıvı besi yerinde aktivitede diğerlerine kıyasla bir artış söz konusu olduğu için uygun pektin miktarı 1,2 gram ve 3.gün olarak tercih edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda saflaştırılan pektin liyaz'ın saflaştırma kademeleri hesaplanmıştır. Amonyum sülfat 6,05 kat; hidrofobik etkileşim kromatografisi 12 kat saflaştırma elde edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda pektinaz enziminin aktivitesinin korunabileceği sürenin belirlenmesi için haftalık aktivite ölçümleri yapılmış ve az da olsa bir aktivitenin varlığının 90. güne kadar korunduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan aktivite tayinleri sonucunda literatür taramasında 106 kDa, 45 kDa, 38 kDa, 30 kDa, 29 kDa gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen molekül ağırlığından farklı olarak çalışmamızda 60 kDa olarak hesaplandı.

Elde edilen saflaştırılmış pektin liyaz enzimi ülkemizde çeşitli sektörlerde kullanılarak ülkemizin dışa bağımlılığının azaltılması hedeflenmiştir. Bu enzimin ülkemizde, meyve suyu endüstrisi, kahve ve çay fermantasyonu, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, tavuk yemi, bitki virüslerin saflaştırılması, yağ ekstraksiyonu, pektik atık suyun ön arıtımı gibi çeşitli alanlardan kullanılmasının olması söz konusu pektin liyaz enzimi oldukça önemli yapmaktadır. Ülkemiz çoğu enzim gibi bazı önemli enzimler konusunda da dışa bağımlıdır. Çalışmamızdaki temel amaçta bu enzim sektöründeki dışa bağımlılığın mümkün oldukça azaltılmasıdır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Ö. Gürses, Gıda ve Enzim. Gıda, 2 (3), 2019.
- [2] H. Brockerhoff, Lipolytic enzymes, 1974.
- [3] M. A. Tabatabai, Soil enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties, 9, 903-947, Feb. 1983.
- [4] P. D. Boyer, and E. G. Krebs, The enzymes. Academic Press, 1986.
- [5] B. S. Hartley, Proteolytic enzymes. Annual review of biochemistry, 29(1), 45-72, Jul. 1960.
- [6] T. Godfrey, and J. Reichelt, Industrial enzymology: the application of enzymes in industry, 1982.
- [7] W. Aehle, Enzymes in industry: production and applications, 2007.
- [8] W. Gerhartz, Enzymes in industry: production and applications. VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1990.
- [9] H. Breithaupt, The hunt for living gold: the search for organisms in extreme environments yields useful enzymes for industry. EMBO reports, 2(11), 968-971, 2001.
- [10] B. Saha, R. Bothast, and D. Jordan, Enzymes, Industrial. Encyclopedia of Microbiology, 281-294, Feb. 2009.
- [11] X. Liu, and C. Kokare, Microbial enzymes of use in industry. In Biotechnology of microbial enzymes pp. 267-298, Academic Press, 2017.
- [12] B. L. Ridley, M. A. O'Neill, and D. Mohnen, Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry, 57(6), 929-967, Jul. 2001.
- [13] C. D. May, Industrial pectins: sources, production and applications. Carbohydrate polymers, 1990.
- [14] J. A. De Vries, F. M. Rombouts, A. G. J. Voragen, and W. Pilnik, Enzymic degradation of apple pectins. Carbohydrate Polymers, 2(1), 25-33, 1983.
- [15] C. D. May, Pectins. In Thickening and gelling agents for food pp. 230-261, 1997, Springer, Boston, MA.
- [16] H. A. Schols, and A. G. J. Voragen, Complex pectins: structure elucidation using enzymes. In Progress in biotechnology Vol. 14, pp. 3-19, 1996, Elsevier.
- [17] H. U. Endress, and S. H. Christensen, Pectins. In Handbook of hydrocolloids, 274-297, 2009.
- [18] J. Visser, and A. G. J. Voragen, Pectins and pectinases. Elsevier, 1996.

- [19] E. A. McComb, and R. McCready, Colorimetric determination of pectic substances. *Analytical Chemistry*, 1952.
- [20] A. J. Barrett, and D. H. Northcote, Apple fruit pectic, Substances. *Biochemical journal*, 94(3), 617-627, Mar. 1965.
- [21] F. M. Rombouts, and J. F. Thibault, Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*, 154(1), 177-187, 1986.
- [22] J. R. Whitaker, Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme and Microbial Technology*, 6(8), 341-349, Oct. 1984.
- [23] B. M. Yapo, Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 373-385, Aug. 2011.
- [24] J. J. Doesburg, Pectic substances in fresh and preserved fruits and vegetables, 1965.
- [25] M. P. Starr, and F. Moran, Eliminative split of pectic substances by phytopathogenic soft-rot bacteria. *Science*, 135(3507), 920-921, Mar. 1962.
- [26] J. A. De Vries, C. H. Den Uijl, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, and W. Pilnik, Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances. *Carbohydrate polymers*, 3(3), 193-205, 1983.
- [27] L. Saulnier, J. M. Brillouet, and J. P. Joseleau, Structural studies of pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydrate Research*, 182(1), 63-78, Oct. 1988.
- [28] J. A. De Vries, F. M. Rombouts, A. G. J. Voragen, and W. Pilnik, Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances. *Carbohydrate polymers*, 3(4), 245-258, 1983.
- [29] R. Speiser, C. H. Hills, and C. R. Eddy, The acid behavior of pectinic acids. *The Journal of Physical Chemistry*, 49(4), 328-343, Apr. 1945.
- [30] M. D. Walkinshaw, and S. Arnott, Conformations and interactions of pectins: II. Models for junction zones in pectinic acid and calcium pectate gels. *Journal of molecular biology*, 153(4), 1075-1085, Dec. 1981.
- [31] A. Katchalsky, and J. Feitelson, Kinetics of alkaline hydrolysis of pectinic acids. *Journal of Polymer Science*, 13(70), 385-392, Apr. 1954.
- [32] Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227, May. 2001.

- [33] I. G. Sandri, R. C. Fontana, D. M. Barfknecht, and M. M. da Silveira, Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT-food Science and Technology*, 44(10), 2217-2222, Dec. 2011.
- [34] M. V. Semenova, S. G. Grishutin, A. V. Gusakov, O. N. Okunev, and A. P. Sinitsyn, Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry (Moscow)*, 68(5), 559-569, May. 2003.
- [35] P. D. Boyer, and E. G. Krebs, *The enzymes*. Academic Press, 1986.
- [36] D. B. Pedrolli, A. C. Monteiro, E. Gomes, and E. C. Carmona, Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*, 9-18, Jul. 2009.
- [37] G. Hoondal, R. Tiwari, R. Tewari, N. B. Q. K. Dahiya, and Q. Beg, Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), 409-418, Jan. 2002.
- [38] V. Bhardwaj, G. Degrassi, and R. K. Bhardwaj, Microbial pectinases and their applications in industries: A review polymer, 4(08), Aug. 2017.
- [39] F. Bingly, Seven Advantages of Enzymes from Industrial Enzyme Suppliers, 2019.
- [40] H. Demir, Production of pectinase from *aspergillus sojae* by solid-state fermentation, 2012.
- [41] R. Saharan, and K. P. Sharma, Production, purification and characterization of pectin lyase from *Bacillus subtilis* isolated from moong beans leaves (*Vigna radiata*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101306, Sep. 2019.
- [42] F. Bibi, M. Irshad, Z. Anwar, K. H. Bhatti, and A. Raza, Improved catalytic functionalities of purified pristine and chitosan-immobilized polygalacturonase, and pectin lyase. *Chemical Engineering Research and Design*, 128, 146-154, Dec. 2017.
- [43] A. Lakhanpal, A. Devi, and R. Gupta, Purification of Pectin Lyase from *Byssoschlamys fulva*: Its Application in Wine Fermentation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(4), 615-623, Nov. 2016.
- [44] A. R. Tapre, and R. K. Jain, Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, 21(2), Nov. 2014.
- [45] S. Yadav, S. K. Maurya, G. Anand, R. Dwivedi, and D. Yadav, Purification, characterization and retting of *Crotolaria juncea* fibres by an alkaline pectin lyase from *Fusarium oxysporum* MTCC 1755. *3 Biotech*, 7(2), 136, Jun. 2017.
- [46] Y. Sangeeta, P. K. Yadav, Y. Dinesh, and K. D. S. Yadav, Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*, 44(1), 1-10, 2009.

- [47] A. Sharma, A. Shrivastava, S. Sharma, R. Gupta, and R. C. Kuhad, Microbial pectinases and their applications. In *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery* (pp. 107-124), Feb. 2013.
- [48] M. Khan, N. Bibi, and A. Zeb, Optimization of process conditions for pectin extraction from citrus peel. *Sci Tech Dev*, 34(1), 9-15, 2015.
- [49] J. Harholt, Suttangkakul, A., and H. V. Scheller, Biosynthesis of pectin. *Plant physiology*, 153(2), 384-395, Jun. 2010.
- [50] R. S. Jayani, S. Saxena, and R. Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944, Sep. 2005.
- [51] A. Sharma, and M. N. Gupta, Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnology Letters*, 23(19), 1625-1627, Oct. 2001.
- [52] D. R. Kashyap, S. Chandra, A. Kaul, and R. Tewari, Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 277-282, Apr. 2000.
- [53] M. M. S. Trentini, G. Toniazzo, J. Zeni, J. Pili, M. Di Luccio, and E. Valduga, Purification of pectinases from *Aspergillus niger* ATCC 9642 by ethanol precipitation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3), 315-320, Jul. 2015.
- [54] V. K. Joshi, M. Parmar, and N. Rana, Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification, Jun. 2011.
- [55] I. Ahmed, M. A. Zia, M.A. Hussain, Z. Akram, M. T. Naveed, and A. Nowrouzi, Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 148-154, Aug. 2016.
- [56] P. Kohli, and R. Gupta, Alkaline pectinases: a review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(3), 279-285, Jul. 2015.
- [57] Selma S. , Feray K., & Oktay A., Novel purification strategy for human PON1 and inhibition of the activity by cephalosporin and aminoglikozide derived antibiotics. *Biochimie*, 88(5), 565-574, 2006.
- [58] J. Angayarkanni, M. Palaniswamy, S. Murugesan, and K. Swaminathan, Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus* spp. Pectinase. *Journal of bioscience and bioengineering*, 94(4), 299-303, Oct. 2002.

- [59] N. P. Patil, and B. L. Chaudhari, Production and purification of pectinase by soil isolate *Penicillium* sp and search for better agro-residue for its SSF. *Recent Research in Science and Technology*, 2(7), 2010.
- [60] A. R. Banu, M. K. Devi, G. R. Gnanaprabhal, B. V. Pradeep, and M. Palaniswamy, Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. *Indian Journal of Science and Technology*, 3(4), 377-381, 2010.
- [61] A. Aitken, and M. P. Learmonth, Protein determination by UV absorption. In *The protein protocols handbook* (pp. 3-6). Humana Press, Totowa, NJ, 2009.
- [62] W. H. Fogarty, and C. T. Kelly, *Microbial enzymes and biotechnology*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [63] P. Bajpai, Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology progress*, 15(2), 147-157, Sep. 1999.
- [64] M. Choct, Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Science Journal*, 62(1), 5-16, Aug. 2006.
- [65] A. Schmid, F. Hollmann, J. B. Park, and B. Bühler, The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 359-366, Aug. 2002.
- [66] C. J. Yeoman, Y. Han, D. Dodd, C. M. Schroeder, R. I. Mackie, and I. K. Cann, Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 70, pp. 1-55). Academic Press, 2010.
- [67] F. Shahidi, and Y. J. Kamil, Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 12(12), 435-464, Dec. 2001.
- [68] G. A. Walsh, R. F. Power, and D. R. Headon, Enzymes in the animal-feed industry. *Trends in biotechnology*, 11(10), 424-430, Oct. 1993.
- [69] A. R. Tapre, and R. K. Jain, Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, 21(2), Nov. 2014.
- [70] Y. Lequette, G. Boels, M. Clarisse, and C. Faille, Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4), 421-431, Oct. 2010.
- [71] N. F. Haard, A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1(1), 17-35, May. 1992.

- [72] Y. M. Galante, A. De Conti, and R. Monteverdi, Application of Trichoderma enzymes in the textile industry. *Trichoderma & Gliocladium*, 2, 311-325, 1998.
- [73] S. Sanchez, and A. L. Demain, Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 224-230, Dec. 2011.
- [74] R. J. Hamer, Enzymes in the baking industry. In *Enzymes in food processing* (pp. 190-222), 1995, Springer, Boston, MA.
- [75] S. C. Spohner, H. Müller, H. Quitmann, and P. Czermak, Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*, 202, 118-134, May. 2015.
- [76] D. R. Berry, and A. Paterson, Enzymes in the food industry. In *Enzyme Chemistry* (pp. 306-351), 1990. Springer, Dordrecht.
- [77] J. Takamine, Enzymes of *Aspergillus Oryzae* and the Application of Its Amylolytic Enzyme to the Fermentation Industry. *Industrial & Engineering Chemistry*, 6(10), 824-828, Oct. 1914.
- [78] P. Albersheim, Pectin lyase from fungi. In *Methods in enzymology* (Vol. 8, pp. 628-631), 1966. Academic Press.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Tunahan Ferhat HASDAĞLI

Doğum yeri ve tarihi : 16.09.1994 / İzmit

e-posta : tunahanhsdgli@gmail.com

Öğrenim Bilgileri

Derece	Okul/Program	Yıl
Yüksek Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Kimya bölümü	2018-2020
Lisans	Balıkesir Üniversitesi/Kimya bölümü	2014-2018
Lise	Albay Cafer Tayyar Nuran Oğuz Anadolu Lisesi	2010-2014