

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İlker KAYA**

***Bacillus* spp.'den PULLULANAZ ÜRETİMİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA-2022**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus spp.*'den PULLULANAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

**İlker KAYA**

**YÜKSEK LİSAN TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 28/05/2022 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği /  
Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....  
Prof. Dr. Hatice KORMAZ GÜVENMEZ  
DANIŞMAN

.....  
Prof. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL  
ÜYE

.....  
Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ  
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.  
**Kod No:**

**Prof. Dr. Sadık DİNÇER**  
**Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.**  
**Proje No: FYL-2019-11606**

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

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Bacillus* spp.'den PULLULANAZ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

**İlker KAYA**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
Yıl: 2022, Sayfa: 41  
Jüri : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
: Prof. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL  
: Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ

Günümüzde mikrobiyal enzimler kimyasal üretimin yerini almış ve endüstrinin pek çok alanında kullanıma girmiştir.

Pullulanazlar  $\alpha$ -amilaz ailesi şeklinde adlandırılan bir sınıfta yer alır.  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarına sahip polisakkaritleri monomerlerine parçalar. Endüstriyel olarak; nişasta hidrolizi, kâğıt, tekstil, deterjan ve bira üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, doğal izolat iki *Bacillus* spp. suşundan laboratuvar ölçeğinde pullulanaz üretilmiş ve kültür süpernatantı enzim preparasyonu olarak kullanılmıştır. Pullulanaz üretiminde optimum pH, optimum sıcaklık, en uygun inkübasyon süresi ve iki farklı substrat etkisi araştırılmıştır. İki izolattan üretilen enzimin aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Ayrıca enzim kararlılığına sıcaklık, pH ve çeşitli kimyasalların etkisi de araştırılmıştır.

Bu araştırmaya göre, 50°C ve pH 9.0 pullulanaz üretimi için en uygun koşullar olarak saptanmıştır. Ayrıca optimum inkübasyon süresinin 48 saat ve üretim için en iyi substratın nişasta olduğu gözlenmiştir. Üretilmiş enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C, pH 9.0 olarak saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  iyonlarının 5 mM'lık derişimleri enzim aktivitesini sırasıyla %10 ve %21 oranında artırdığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus* sp., Pullulanaz, Karakterizasyon

## ABSTRACT

### MSc THESIS

# PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PULLULANASE FROM *Bacillus* spp.

İlker KAYA

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
Year: 2022, Pages: 41  
Jury : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ  
: Prof. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL  
: Assoc. Dr. Dilek ALAGÖZ

Today, microbial production has gained great importance in the production of enzymes.

Pullulanases belong to a class called the  $\alpha$ -amylase family. It cleaves polysaccharides with  $\alpha$ -1,6 glycosidic bonds into monomers. Industrially, It is used in many fields such as starch hydrolysis, paper, textile, detergent and beer production.

In this study, pullulanase was produced and partially purified from *Bacillus* spp. The optimum pH and temperature in the production of pullulanase, and the optimum pH and temperature at which the produced enzyme works were determined. At the same time, the characterization studies of the produced enzyme and the effect of various heavy metals on the enzyme stability were investigated.

According to this study, 50°C and pH 9.0 were determined as the most suitable conditions for pullulanase production. It was also observed that the optimum incubation time was 48 hours and the best substrate for production was starch. The temperature at which the produced enzyme showed the highest activity was calculated as 50°C and the pH value was calculated as 9.0.

Studies have shown that 5 mM concentrations of Co<sup>+2</sup> and Mn<sup>+2</sup> ions increase enzyme activity by 10% and 21%, respectively.

**Key Words:** *Bacillus* spp., Pullulanase, Enzyme Production, Characterization

## GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Enzimler, canlı hücrelerde biyolojik olarak üretilen katalizörlerdir. Pek çok enzim sentetik olarak üretilmekte ve birçok sanayi dalında kullanılmaktadır. Günümüzde enzimlerin üretiminde mikrobiyal üretim büyük ölçüde önem kazanmış durumdadır. Pullulanazlar  $\alpha$ -amilaz ailesi şeklinde adlandırılan bir sınıfta yer alır.  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarına sahip polisakkaritleri monomerlerine parçalarlar. Endüstriyel olarak; nişasta hidrolizi, kâğıt, tekstil, deterjan ve bira üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, *Bacillus* spp. ile pullulanaz üretimi yapılmıştır. Pullulanaz üretiminde optimum pH, optimum sıcaklık, en uygun inkübasyon süresi ve iki farklı substrat etkisi araştırılmıştır. İki izolattan üretilen enzimin aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Ayrıca enzim kararlılığına sıcaklık, pH ve çeşitli kimyasalların etkisi de araştırılmıştır.

Doğal çevreden *Bacillus* spp. şuşlarının izole edilmesi amacıyla alınan toprak örnekleri ön inkübasyona bırakılıp 80°C'de 15 dakika ısı şokuna maruz bırakılmış ve böylece vejetatif formdaki bakteriler elimine edilmiştir. Ardından spor oluşturan bakteriler aerobik şartlarda inkübasyona bırakılarak, *Bacillus* cinsine ait bakteriler saf kültür olarak elde edilmiştir. İzole edilen 118 izolat, pH 7.0 ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş, 46 izolatta pullulanaz aktivitesi gözlenmiştir. Pullulanaz üreten izolatlar stok kültüre alınarak geçici olarak +4°C'de saklanmıştır. En berrak ve geniş hidroliz zonu veren 4 suş sıvı besiyerinde üretilerek, pullulanaz elde edilmiş, kısmi olarak saflaştırılmış ve aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu suşlardan izole edilen enzimin aynı zamanda nişastayı da hidroliz ettiği belirlenmiştir. Kısmi saflaştırma sonucunda aktivitede azalma tespit edildiğinden kısmi saflaştırma işlemi uygulamadan çıkarılmıştır. Bundan sonraki işlemler için bakterilerin santrifüj ile çöktürülmesi ile elde edilen süpernatant materyali kullanılmıştır. Seçilen 4 izolat için gliserol stok hazırlanarak -80°C'de saklanmıştır.

Üretimde kullanılmak üzere 2 suş seçilmiş ve bu suşlar koloni morfolojisi, gram boyama ve mikroskopik incelemelerle Gram pozitif ve basil olarak tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerin, ürettiği oldukları enzimleri hücre dışına serbest halde salgılayabilmeleri avantajlı bir durum olarak kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda optimum üretim sıcaklığı ve pH'sı belirlenmiştir. Enzim üretimi için optimum sıcaklık 50°C ve pH 9.0 olarak belirlenmiştir. En iyi substratın belirlenmesi amacıyla pullulan ve nişasta ile ayrı ayrı üretim yapılmış, en iyi üretimin nişasta kullanımında olduğu gözlenmiştir. Optimum enzim üretim zamanının belirlenmesinde 12- 72 saat aralığında üretim yapılmıştır. Her 12 saat sonunda örneklemeler yapılarak aktivite tayini yapıldığında, en iyi üretim zamanının 48. saat olduğu tespit edilmiştir. Üretilmiş enzim için optimum çalışma koşullarının belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda üretilmiş ve bakterilerden izole edilmiş enzim için optimum çalışma koşulları 50°C ve pH 9.0 olarak belirlenmiştir.

Enzim aktivitesine metal iyonlarının etkisi incelendiğinde KY-41 izolatında  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  iyonlarının 1 mM ve 5 mM derişimlerinde,  $\text{Co}^{+2}$  varlığında %4 (1 mM) ve %10 (5 mM) oranında artış görülürken,  $\text{Mn}^{+2}$  iyonu varlığında %18 (1 mM) ve %21 (5 mM) oranında enzim aktivitesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Buna ek olarak 1 mM ve 5 mM derişimler için sırasıyla  $\text{Na}^+$  varlığında %1 ve %17,  $\text{Ca}^{+2}$  varlığında %6 ve %11,  $\text{Mg}^{+2}$  varlığında %4 ve %26,  $\text{Zn}^{+2}$  varlığında %2 ve %17,  $\text{Cu}^{+2}$  varlığında %3 ve %28,  $\text{Fe}^{+2}$  varlığında %2 ve %22 oranlarında enzim aktivitesi üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Kimyasalların enzim aktivitesine etkisi incelenmesi amacıyla TEMED, EDTA, Triton X-100 ve Tween-80 kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu kimyasallar %1 ve %5 derişimlerde kullanılmıştır. TEMED ve Triton X-100'ün %5'lik derişimlerinde enzim aktivitesinde %18 oranında azalma görülmüştür. EDTA ve Tween-80'de ise %1'lik derişimlerde sırasıyla %22 ve %18 azalma gözlemlenirken, %5'lik derişimlerde sırasıyla %29 ve %23 oranında azalma gözlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Uzun yıllar süren yüksek lisans deneyimim boyunca bıkmadan usanmadan yanımda olan, ilgi, alakası ve destekleriyle her zaman arkamda olan, yeri geldiğinde annem gibi dertlerime ortak olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ’e, sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hem eğitim hem de sosyal hayatımda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Aydın MIZRAK, Damla SİHAY ve Mete KARABOYUN’a dostlukları ve destekleri için teşekkür ederim.

Her türlü desteğiyle yanımda olan bilim doktoru, ablam Sayın Dr. Seçil Berna KUZU HOŞSÖZ’e sevgilerimi sunarım.

Maddi manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İyi ki varsınız.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| ÖZ .....                                                     | I    |
| ABSTRACT.....                                                | II   |
| GENİŞLETİLMİŞ ÖZET .....                                     | III  |
| TEŞEKKÜR.....                                                | V    |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                      | VIII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                        | X    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                 | XII  |
| 1. GİRİŞ .....                                               | 1    |
| 1.1. Enzimler .....                                          | 1    |
| 1.2. Pullulanaz.....                                         | 2    |
| 1.1.1. Enzimin endüstriyel uygulama alanları .....           | 3    |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....                                    | 5    |
| 3. MATERYAL VE METOD .....                                   | 7    |
| 3.1. Materyal .....                                          | 7    |
| 3.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....                           | 7    |
| 3.1.2. Kullanılan Çözeltiler .....                           | 9    |
| 3.2. Metod .....                                             | 11   |
| 3.2.1. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının İzolasyonu.....       | 11   |
| 3.2.2. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesi .....          | 11   |
| 3.2.3. Pullulanazın Kısmi Saflaştırılması .....              | 11   |
| 3.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....                | 12   |
| 3.2.5. Enzim Üretiminde İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi ..... | 12   |
| 3.2.7. Enzim Üretimine pH'nın Etkisi.....                    | 13   |
| 3.2.8. Substrat Spesifitesi .....                            | 13   |
| 3.2.9. Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi.....            | 13   |
| 3.2.10. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi.....       | 13   |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                | 15   |

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1. <i>Bacillus</i> spp. Suşlarının İzolasyonu .....             | 15 |
| 4.2. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesi .....                 | 15 |
| 4.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....                       | 15 |
| 4.4. Enzim Üretiminde İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi .....        | 16 |
| 4.5. Enzim Üretimine pH'nın Etkisi .....                          | 17 |
| 4.6. Enzimin Optimum Sıcaklık ve pH'sının Belirlenmesi.....       | 19 |
| 4.7. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi .....                  | 22 |
| 4.8. Enzim Üretimi İçin Optimum İnkübasyon Zamanının Etkisi ..... | 24 |
| 4.9. Enzim Kararlılığına pH'nın Etkisi .....                      | 25 |
| 4.10. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi .....           | 28 |
| 4.11. Diğer Kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkisi.....          | 29 |
| 4.12. Substrat Spesifitesi .....                                  | 30 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                     | 33 |
| 5.1. Sonuçlar .....                                               | 33 |
| 5.2. Öneriler .....                                               | 34 |
| KAYNAKLAR .....                                                   | 35 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                    | 41 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. Sodyum Asetat Tamponun Hazırlanması ..... | 9  |
| Çizelge 3.2. Fosfat Tamponunun Hazırlanması.....       | 10 |
| Çizelge 3.3. Glisin-NaOH Tamponunun Hazırlanması ..... | 10 |





## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.1. KY-41 Suşunun Katı Besiyerindeki Aktivite Zonu .....                | 15 |
| Şekil 4.2. Üretim Sıcaklığının KY4 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi .....     | 16 |
| Şekil 4.3. Üretim Sıcaklığının KY41 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi .....    | 17 |
| Şekil 4.4. Üretim pH'sının KY4 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi .....         | 18 |
| Şekil 4.5. Üretim pH'sının KY41 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi .....        | 18 |
| Şekil 4.6. Sıcaklığın (KY-4 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi .....            | 20 |
| Şekil 4.7. pH'nın (KY-4enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi .....                 | 20 |
| Şekil 4.8. Sıcaklığın (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi .....           | 21 |
| Şekil 4.9. pH'nın (KY-41enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi .....                | 21 |
| Şekil 4.10. Sıcaklığın (KY-4 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi .....          | 23 |
| Şekil 4.11. Sıcaklığın (KY-41 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi .....         | 24 |
| Şekil 4.12. Üretim Süresinin (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi .....    | 25 |
| Şekil 4.13. pH'nın (KY-4 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi .....              | 26 |
| Şekil 4.14. pH'nın (KY-41 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi .....             | 27 |
| Şekil 4.15. Metal İyonlarının (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi.....    | 28 |
| Şekil 4.16. Bazı Kimyasalların (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi. | 30 |
| Şekil 4.17. Kullanılan Substratın (KY-41 enzimi) Enzim Üretimine Etkisi.....   | 31 |



## SİMGELER ve KISALTMALAR

|                   |                         |
|-------------------|-------------------------|
| g                 | : Gram                  |
| L                 | : Litre                 |
| mg                | : Miligram              |
| nm                | : Nanometre             |
| DNSa              | : Dinitrosalisilik Asit |
| CaCl <sub>2</sub> | : Kalsiyum Klorür       |
| MgCl <sub>2</sub> | : Magnezyum Klorür      |
| CoCl <sub>2</sub> | : Kobalt Klorür         |
| °C                | : Santigrat derece      |
| µL                | : Mikrolitre            |
| µm                | : Mikrometre            |
| mM                | : Milimolar             |
| rpm               | : Dakikada devir sayısı |
| spp.              | : Türler                |



## 1. GİRİŞ

### 1.1. Enzimler

Enzimler, canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında biyolojik katalizörlerdir. Binlerce yıldır içecek, ekmek, peynir yapımı gibi işlemlerde, isimleri ve işlevleri bilinmemesine rağmen enzimler kullanılmıştır. İlk bulgular antik Mısır'a kadar dayanmaktadır. Yakın tarihte yapılan araştırmalarda ise çok eski yıllardan beri Ortadoğu ülkelerinde, birçok gıda fermentasyonunda ipliksi mantarların, enzim kaynağı olarak kullanılmış olduğu belirlenmiştir (Uhlir, 1998).

Enzim teknolojisindeki gelişmeler, kullanım alanlarının fazla olması ve ekonomik değerinden dolayı mikrobiyal enzim üretimi üzerine yapılacak çalışmalar önem kazanmıştır. Biyoteknoloji alanındaki çalışmalarla enzim üretimi ve üretim proseslerinin geliştirilmesi, çeşitli sanayi üretim atıklarının değerlendirilerek önemli bir gelir kaynağı elde edilmesinde ve katma değer oluşturulmasında ülkeler için önemli bir kazanç kaynağı olabilir.

Günümüzdeki bilimsel gelişmelerle birlikte enzimlerin kullanım alanları artmaya başlamıştır. Dolayısıyla dünya genelindeki enzim üretim firmaları da bu büyük potansiyeli değerlendirmeye ve yatırımlarını artırmaya başlamışlardır (Pandey ve ark., 1999; Seren, 2013'ten).

### 1.1. Pullulan

Pullulan, esas olarak *Aureobasidium pullulans* mantarının suşları tarafından salgılanan, genellikle  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinden oluşan bir homopolisakkaritidir (Lathers, 2003).

*Aureobasidium pullulans*'tan pullulan sentezinde birçok şeker (D-ksilaz, D,L-arabinoz, L-ramnoz, L-sorboz, D-galaktoz, sakkaroz, maltoz, sellobioz, trehaloz, laktoz, inülin ve çözünebilir nişasta), karbon kaynağı olarak kullanılır. Bununla birlikte bu şekerler; hücre gelişimi ve polisakkarit üretimi için kullanılabilir.

Pullulan üretim sonunda hücre dışına salınmaktadır (İtik ve Sıdal, 2013).

## 1.2. Pullulanaz

Pullulanaz ilk defa Bender ve Wallenfels tarafından 1966'da fakültatif aerob bir bakteri olan *Klebsiella pneumoniae*'den üretilmiştir (Murooka ve ark., 1989).

Pullulanaz (Pullulan  $\alpha$ -glukanohidrolaz; EC 3.2.1.41), pullulan içerisinde yer alan  $\alpha$ -(1,6) bağlarını hidroliz eden, aynı zamanda glikoamilaz tarafından açığa çıkarılmış olan dekstrinlerin yıkımını sağlayan bir enzimdir. Pullulanazın, yoğun kullanımda nişasta ve amilopektinde bulunan  $\alpha$ -(1,6) bağlarını kırabildiği de görülmektedir (Aehle, 2007).

Son yıllarda yapılan biyokimyasal çalışmalar pullulanı parçalayan enzimlerin hepsinin pullulanın yanı sıra nişasta, amilopektin gibi bazı polisakkaritleri de parçalayabileceğini göstermiştir. Pullulanazlar; nişasta, amilopektin ve benzer oligosakkaritlerdeki  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağlarını hidroliz etme yeteneğine göre tip I veya tip II (amilopullulanaz) olarak sınıflandırılmıştır. Tip I ve tip II pullulanazların her ikisi de pullulandaki  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlarını kırar ve maltotrioz birimlerinin açığa çıkmasına sebep olur. Tip II pullulanazların aksine tip I pullulanazlar  $\alpha$ -(1,4) glikozidik bağlarını parçalayamazlar. Ayrıca pullulanazların siklodekstrinleri parçalamakta yetersiz olduğu da bilinmektedir (Kang ve ark., 2011; Orhan, 2012'den).

Tip I pullulanaz; gerçek pullulanaz, limit dekstrinaz, dallanmayı bozucu enzim, amilopektin-6-glukanohidrolaz veya  $\alpha$ -dekstrin 6-glukanohidrolaz olarak da adlandırılır. Tip I pullulanaz, pullulan, nişasta, amilopektin veya benzer polisakkaritlerdeki özellikle  $\alpha$ -(1,6) glikozidik bağlarını hidrolizleyen dallanmayı bozucu bir enzimdir ve hidroliz ürünleri sırasıyla lineer oligosakkaritler ve maltotriozdur. Bu enzim ne amilozdaki  $\alpha$ -(1,4) bağlarını ne de glikojen ve panozdaki  $\alpha$ -(1,6) bağlarını hidrolizler.

Tip II pullulanaz; pullulan veya dallanmış oligosakkaritlerdeki  $\alpha$ -(1,4)

glikozidik bağlarına ek olarak  $\alpha$ -(1,6) bağlarını da hidrolizler. Tip II pullulanaz, protein içindeki aktif bölgelerinin sayısına dayanarak iki alt gruba bölünebilir. Termofilik anaeroblardan elde edilen amilopullulanazların çoğu tek bir aktif bölgeye sahiptir. Diğer yandan aerobik mikroorganizmalardan elde edilenler ise bir veya iki aktif bölgeye sahiptir (Orhan, 2012).

### **1.1.1. Enzimin endüstriyel uygulama alanları**

#### **1.1.1.1. Nişasta İşleme Endüstrisi**

Pullulanazlar şeker şurubu endüstrisinde  $\alpha$ -amilazı parçalayarak nişastanın hidrolizinin tamamlanmasında; glukoz ve maltoz şurubu üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Pullulanazlar, amilolitik enzimlerle birlikte kullanıldığında şeker şuruplarının kalitesini arttırdığı görülmüştür. Pullulanazlar, nişastanın sakkarifikasyonunda amilazla birlikte kullanıldığında verimliliği arttırmaktadır. Maltoz üretimi için  $\alpha$ -amilaz ile nişastadan glukoz üretmek içinse glucoamilaz ile birlikte kullanılmaktadır (Malakar ve ark., 2010).

#### **1.1.1.2. Deterjan Endüstrisi**

Çamaşır ve bulaşık deterjanlarına eklenen pullulanazlar, nişasta içeren lekelerin temizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Batum, 1997 ve Gupta, 2003; Ulutürk, 2012'den).

#### **1.1.1.3. Tekstil Endüstrisi**

Pullulanazlar kirlenmiş nişastayı kısa sürede parçalamaktadır. Pamuklu ipliklerin dokuma işlemi sırasında tarazlanarak kopmasını önlemek için iplikler nişasta bazlı bir haşıl banyosundan geçirilip sağlamlaştırılmaktadır. Ham bezin, dokumadan sonra diğer işlemlere hazırlanması için bu nişasta kolasının uzaklaştırılmasında pullulanazlar haşıl sökücü olarak kullanılmaktadır (Ulutürk, 2012).

**1.1.1.4. Kâğıt Endüstrisi**

Kâğıdın işlenmesinde, kâğıt kalitesini arttırmak amacıyla, kâğıt hamurunun nişasta ile kirlenmesi gerekmektedir. Bu işlem ile kâğıda sertlik ve dayanıklılık kazandırmakla birlikte kâğıdın tabaklanmasını ve daha iyi silinebilir olmasını sağlar. Kâğıdın kirlenme işlemi sonucunda kâğıt üzerindeki nişasta kalıntıları pullulanaz kullanılarak ortamdan uzaklaştırılır (Gupta, 2003; Ulutürk, 2012'den).



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Saha ve ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum* üzerinde yaptıkları çalışmalarda optimum çalışma sıcaklığı 90°C bulunmuş, termal stabiliteyi incelediklerinde ise enzimin 95°C'ye kadar kararlılığını koruduğunu belirlemişlerdir. Optimum enzim aktivitesini pH 5.0- pH 5.5 aralığında belirlemişler ve pH 3.0-5.0 aralığında enzimin kararlılığını koruduğunu ve pH arttıkça kararlılığın logaritmik olarak düştüğünü gözlemlemişlerdir. Metal iyonlarının ve bazı kimyasalların enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> ve CoCl<sub>2</sub>'de %5-22 oranında artış olduğu tespit edilmiştir. ZnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> ve EDTA'da %39-66 aralığında enzim aktivitesinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Lonsane ve ark. (1990), enzim üretiminde inkübasyon süresi arttıkça üretilen enzim miktarında 48 saate kadar artış olduğunu gözlemlemişlerdir. 48 saatten sonra ise enzim aktivitesinde zaman geçtikçe düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

Swamy ve Seenayya (1996), *Clostridium thermosulfogenes*'den amilopullulanaz üretiminde optimum sıcaklığın 60°C'de olduğunu bildirmişlerdir.

Messaoud ve ark. (2002), Tunus kaplıcalarından aldıkları toprak örneklerinden izole ettikleri termofilik suşlardan US105 olarak adlandırdıkları suş üzerinde yaptıkları çalışmalarda, bu suşun 45–70°C aralığında üreyebildiğini ve katı besiyerinde en yüksek pullulanaz aktivitesini 55°C'de gösterdiğini bildirmişlerdir.

Nair ve ark. (2006), *Bacillus cereus* FDTA-13 ile yaptıkları çalışmalarda, pH 6.8'de pullulanazın termal stabilitesini incelediklerinde, 75°C'de %89 aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Malakar ve ark. (2010), pullulanaz üretiminin özellikle nişasta varlığında önemli ölçüde arttığını; glukoz, amilaz ve glikojen varlığında ise pullulanaz üretimini %70-80 oranında baskıladığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte pullulanaz aktivitesinin Co<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup> Zn<sup>+2</sup> ve Mg<sup>+2</sup> iyonları tarafından yüksek

oranda inhibe edildiğini ancak  $Ca^{+2}$  varlığında enzim aktivitesinde %179'luk bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Waleed ve ark. (2015), *Bacillus cereus* ile ürettikleri enzimde inkübasyon süresinin üretime etkisini incelediklerinde maksimum enzim aktivitesinin 48. saatte görüldüğünü ve ardından aktivitenin azalmaya başladığını tespit etmişlerdir. Üretim sıcaklığı incelendiğinde, 37°C'de maksimum üretimin sağlandığı ve sıcaklığın artışı ile enzim aktivitesinde kademeli bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Pullulanaz üretimi üzerindeki pH etkisini belirlemek için mikroorganizmalar, pH 5.0-10.0 aralığında farklı pH'larda inkübasyona bırakıldığında enzim üretiminin pH 7'de en yüksek olduğunu belirlemişlerdir. pH'daki artışla birlikte enzim aktivitesinin büyük ölçüde azaldığını bildirmişlerdir.

Duan ve Wu, (2015), ürettikleri pullulanaz için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla pH 4.5 ve 60°C olarak belirlemişlerdir. 60°C'de üretim yaptıklarında 160 saat sonunda başlangıç aktivitesinin %50'sini korunduğunu, dolayısıyla üretilen enzimin termal kararlılığının yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Prabnu ve ark. (2017), *Klebsiella aerogenes* üzerinde yaptıkları çalışmada optimum üretim koşullarını incelemişler ve pH 7.0 ve 37°C'de en iyi enzim üretiminin gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Enzim üretimine zamanın etkisini tespit etmek için 24-72 saat aralığında enzim üretimi yapmış, en yüksek enzim üretiminin 48. saatte elde edildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca enzim üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisi araştırılmış ve en iyi sonucun nişasta ile alındığını bildirmişlerdir.

Sihay (2019), *Fontibacillus pullulanilyticus*'tan kısmi saflaştırdığı pullulanazın optimum aktivitesini pH 8.0 ve 30°C'de belirlemiştir. Enzimin 5.0-7.0 pH aralığında ortalama %87 aktivite gösterdiği, bu sebeple asidik ortamda çalışmaya uygun olduğunu, ayrıca 30°C-50°C aralığında ortalama %95 aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Materyal

Bu çalışmada doğal çevreden izole edilen *Bacillus* spp. suşları, su banyosu, soğutmalı santrifüj, spektrofotometre, çalkalamalı inkübatör, otoklav, hassas terazi, etüv, steril hava akışlı kabin kullanılmıştır. Aynı zamanda izolasyon, enzim üretimi ve karakterizasyonu için çeşitli besiyerleri ve kimyasallar kullanılmıştır.

##### 3.1.1. Kullanılan Besiyerleri

###### 3.1.1.1. LB (Luria-Bertani) Agar

Topraktan bakterilerin izolasyonu, saf kültür eldesi, stoklanması gibi aşamalarda kullanılmıştır.

| Bileşim | g/L |
|---------|-----|
| Tripton | 10  |
| NaCl    | 10  |
| Maya    | 5   |
| Agar    | 15  |

###### 3.1.1.2. Nişastalı Besiyeri

İzole edilen suşların nişastayı parçalama yeteneklerinin gözlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Sihay, 2019).

| Bileşimi                                        | g/L   |
|-------------------------------------------------|-------|
| Nişasta                                         | 10    |
| Maya Özütü                                      | 5     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 0,3   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,2   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1     |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O            | 0,2   |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,01  |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O            | 0,001 |
| Agar                                            | 15    |

### 3.1.1.3. Pullulanlı Besiyeri

İzole edilen suşların pullulanaz aktivitelerinin gözlenmesi amacıyla kullanılmıştır (Khalaf ve Aldeen, 2013; Sihay, 2019).

| Bileşimi                                        | g/L   |
|-------------------------------------------------|-------|
| Pullulan                                        | 10    |
| Maya Özütü                                      | 5     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 0,3   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,2   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 1     |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O            | 0,2   |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O            | 0,01  |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O            | 0,001 |
| Agar                                            | 15    |

### 3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.1.2.1. Lugol Çözeltisi

Pullulanazın katı besiyerinde pullulan ve nişasta üzerindeki hidrolizini tespit etmek için kullanılmıştır (Çetin, 1968).

| Bileşimi        | g/100 mL |
|-----------------|----------|
| İyot            | 7        |
| Potasyum İyodür | 3        |

Elde edilen çözelti amber şişelerde stok olarak saklanmıştır. Çözelti kullanılmadan önce 1:20 oranında seyreltilmiştir.

#### 3.1.2.2. Sodyum Asetat Tamponu

Enzimlerin pH 4.0 ve 5.0'te aktivitesinin araştırılmasında kullanılmıştır. Çizelgede verilen oranlar karıştırılarak istenilen pH'da 0.1 M derişimde sodyum asetat tamponu elde edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.1. Sodyum Asetat Tamponun Hazırlanması

| pH  | 0.2 M Asetik Asit (mL) | 0.2 M Sodyum Asetat (mL) | Distile Su (mL) | Toplam Hacim (mL) |
|-----|------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------|
| 4.0 | 82,0                   | 18,0                     | 100             | 200               |
| 5.0 | 29,6                   | 70,4                     | 100             | 200               |

#### 3.1.2.3. Fosfat Tamponu

Enzimlerin pH 6.0, 7.0 ve 8.0'de aktivitesinin araştırılmasında kullanılmıştır. Çizelgede verilen oranlar karıştırılarak istenilen pH'da 0.1 M derişimde fosfat tamponu elde edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.2. Fosfat Tamponunun Hazırlanması

| <b>pH</b> | <b>0.2 M<br/>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><br/>(mL)</b> | <b>0.2 M<br/>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><br/>(mL)</b> | <b>Distile Su<br/>(mL)</b> | <b>Toplam<br/>Hacim (mL)</b> |
|-----------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 6.0       | 87,7                                                   | 12,3                                                   | 100                        | 200                          |
| 7.0       | 39,0                                                   | 61,0                                                   | 100                        | 200                          |
| 8.0       | 5,3                                                    | 94,7                                                   | 100                        | 200                          |

**3.1.2.4. Glisin-NaOH Tamponu**

Enzimlerin pH 9.0 ve 10.0’da aktivitesinin araştırılmasında kullanılmıştır. Çizelgede verilen oranlar karıştırılarak istenilen pH’da 0.1 M glisin-NaOH tamponu elde edilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.3. Glisin-NaOH Tamponunun Hazırlanması

| <b>pH</b> | <b>0.2 M Glisin<br/>(mL)</b> | <b>0.2 M NaOH<br/>(mL)</b> | <b>Distile Su<br/>(mL)</b> | <b>Toplam<br/>Hacim (mL)</b> |
|-----------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 9.0       | 50                           | 8,8                        | 141,2                      | 200                          |
| 10.0      | 50                           | 32                         | 118                        | 200                          |

**3.1.2.5. Dinitro Salisilik Asit (DNSa) Çözeltisi**

Pullulan ve nişastanın pullulanaz etkisiyle parçalanması sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. 1 g DNSa 50 mL distile suda çözülerek üzerine yavaş yavaş Na-K-Tartarat eklenmiştir (30 g). Üzerine 20 mL 2 N NaOH eklenerek son hacim 100 mL’ye tamamlanmıştır (Mulimani ve ark., 2000).

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. *Bacillus* spp. Suşlarının İzolasyonu

Mısır ve patates tarımı yapılan bölgelerden 6 farklı alan seçilerek örnekleme yapılmıştır. *Bacillus* spp. izolasyonu için 1 g toprak tartılarak 9 mL distile su içerisinde karıştırılıp 80°C'de 1 dakika ısı şoku uygulaması gerçekleştirilmiştir. Tek koloni elde etmek amacı ile steril distile su ile seri sulandırmalar yapılarak %10 NaCl içeren ve pH'sı 10.00 olan LB agar besiyerine yayma ekim yapılarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyerinde tek koloni şeklinde üreyen *Bacillus* görünümünde olan koloniler LB agar besiyerine çizgi ekim yöntemi ile ekilerek 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. LB agarda üreyen suşlar Gram boyama yöntemiyle boyanarak Gram pozitif, çubuk şekilli, endospor oluşumu gözlenen 118 suş seçilmiş ve stok kültürleri hazırlanarak, +4°C'de saklanmıştır.

#### 3.2.2. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesi

Katı besiyerinde pullulanaz aktivitesinin saptanması için; %1 pullulan, %0.5 maya özütü, %0.03 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, %0.02 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, %0.1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0.02 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, %0.001 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, %0.0001 MNCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O ve %1.5 Agar içeren besiyeri hazırlandı, pH 7.0'ye ayarlandı, 121°C'de 15 dakika steril edildi. Besiyerine ekilen suşlar 48 saat inkübasyona bırakıldı (Khalaf, 2013). 12 saat aralıklarla kontrol edilerek, ekim çizgisi etrafında oluşacak şeffaf hidroliz zonları saptandı. Üreme alanlarının çevresinde şeffaf zon oluşturanlar ve bunların arasında en yüksek zonlu veren suşlar belirlendi (Wei ve ark., 2014). İzole edilen suşlardan en geniş ve berrak zona sahip suşlar seçilerek üretici suş olarak belirlendi.

#### 3.2.3. Pullulanazın Kısmi Saflaştırılması

Substratlı sıvı besiyerinde 48 saatlik inkübasyon ile elde edilen kültür 6500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant alınmıştır. Süpernatant üzerine hacminin yaklaşık 2 katı soğuk aseton (-20°C) eklenerek proteinlerin çöktürülmesi aşamasına

geçilmiştir. Bir gece -20°C’de bekletilen süpernatant-aseton karışımı 12000 rpm’de çöktürülerek pellet kısmı alınmıştır. Üzerine steril, pH 7.0 fosfat tamponu eklenerek tampon içerisinde çözülmüş ve aktivite tayini için 4°C’de saklanmıştır (Odibo ve Obi, 1988).

#### 3.2.4. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Pullulanın parçalanması ile açığa çıkan indirgen şekerin ölçülmesine dayanan bir yöntem olan DNS (dinitrosalisilik asit) yöntemi kullanıldı (Miller, 1959; Uyar, 2017’den).

Reaksiyon için 250 µl enzim çözeltisi ve 250 µl substrat çözeltisi karıştırıldı. Karışım 37°C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesini sonlandırmak amacıyla reaksiyon tüpüne 500 µl DNS (3.5-Dinitrosalisilik asit) çözeltisi eklendi. Bu işlemi takiben enzim, 100°C’de 10 dakika inkübe edilerek renk değişimi sağlandı. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Okuma işlemi sırasında kör olarak 0. dakikada DNS solüsyonu eklenerek aktivitesi durdurulmuş olan aynı reaksiyon karışımı kullanıldı (Çınar, 2007). Yapılan aktivite belirleme çalışmalarında en yüksek aktivite gösteren suşlar arasından üretici suş seçimi yapıldı.

#### 3.2.5. Enzim Üretiminde İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

En yüksek pullulanaz aktivitesini gösteren iki suş (KY-4, KY-41), pullulan içeren sıvı besiyerine inoküle edilip pullulanaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için 20, 30, 37, 40, 50 ve 60°C’lerde 48 saat inkübe edilerek üretilmiş, süpernatant alınarak, standart enzim aktivitesi saptanmış, optimum enzim üretim sıcaklığı belirlenmiştir.

**3.2.6. Optimum Üretim Süresinin Belirlenmesi**

Enzim üretimi için en uygun üretim zamanının belirlenmesi amacıyla 12-72 saat aralığında üretim yapılmış, her 12 saat sonunda standart enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

**3.2.7. Enzim Üretimine pH'nın Etkisi**

Pullulanaz üretiminde kullanılan substratlı sıvı besiyeri farklı pH'larda hazırlanmıştır (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0). Her pH aralığındaki besiyerine inoküle edilen bakteri süşları optimum inkübasyon sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde 48 saat üretilmiş ve optimum enzim üretim pH'sı belirlenmiştir.

**3.2.8. Substrat Spesifitesi**

Enzim üretimine, pullulan dışında nişastanın etkisi de araştırılmıştır (Hii ve ark., 2009).

Enzim Karakterizasyonu: Üretim koşullarının optimizasyonundan üretici süş olarak kullanılan iki farklı süşa ait enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu denemeler için kültür süpernatantı enzim olarak test edilmiştir.

**3.2.9. Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi**

Üretilmiş enzim aktivitesine pH'nın etkisini saptamak amacıyla pH 4.0-10.0 aralığında standart aktivite tayini ile aktivite belirlenmiştir.,

**3.2.10. Enzimin Optimum Sıcaklığının Belirlenmesi**

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin araştırılması amacıyla, enzim preparasyonu 20, 30, 37, 50 ve 60°C sıcaklıklarda 20 dakika inkübe edilmiş ve aktivite tayini yapılmıştır (Uyar, 2017).

**3.2.11. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi**

Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisinin araştırılması amacıyla 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda enzim çözeltisi 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Herhangi bir ön işlem uygulanmayan enzim çözeltisine ait aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve ön inkübasyona tabi tutulmuş olan enzimlerde aktivite tayini yapılmıştır (Sihay, 2019).

**3.2.12. pH'nın Enzim Kararlılığına Etkisi**

pH'nın enzim kararlılığına etkisinin araştırılması amacıyla pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 değerlerinde tamponlar kullanılarak enzim çözeltisi 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Herhangi bir ön işleme tabi tutulmayan enzim çözeltisine ait aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve ön inkübasyona tabi tutulmuş olan enzimlerde aktivite tayini yapılmıştır (Sihay, 2019).

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

##### 4.1. *Bacillus* spp. Suşlarının İzolasyonu

Farklı bölgelerden alınan topraklardan, LB agarda tek koloni olarak üreyen, koloni morfolojisi *Bacillus* görünümlü 118 suş izole edilmiş ve saf kültürleri hazırlanmıştır. Her bir izolat Gram boyama ile boyanmış, mikroskopik inceleme ile Gram pozitif, endospor oluşturan, çubuk şekilli bakteriler olduğu doğrulanmıştır. BioMerieux bakteri tanılama sistemi ile seçilen izolatların *Bacillus* olduğu doğrulanmıştır (Lennette ve ark., 1985; Venkateswaran ve ark., 2003).

##### 4.2. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesi

Pullulanaz aktivitesini saptamak amacıyla 118 izolat pullulanlı katı besiyerine ekilmiş, 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Khalaf, 2013). 48 saat sonra lügol ile boyamada üreme alanlarının çevresinde en yüksek pullulanolitik aktivite gösteren beş izolat (KY-4, KY-8, KY-13, KY-41 ve KY-95) belirlenmiştir.



Şekil 4.1. KY-41 Suşunun Katı Besiyerindeki Aktivite Zonu

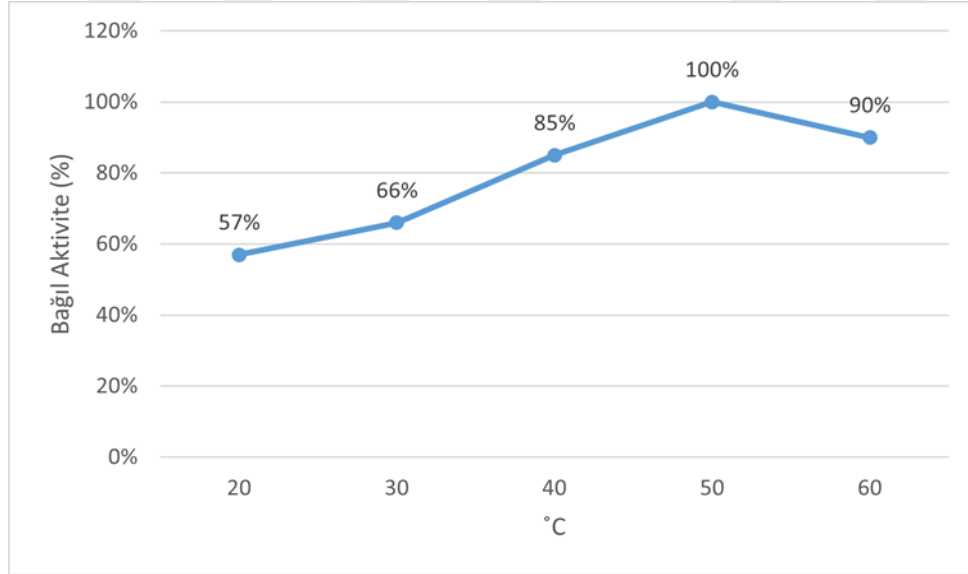
##### 4.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Pullulanın parçalanması ile açığa çıkan indirgen şekerin ölçülmesine dayanan bir yöntem olan DNSa (dinitrosalisilik asit) yöntemi kullanılmıştır (Miller, 1959; Uyar, 2017’den).

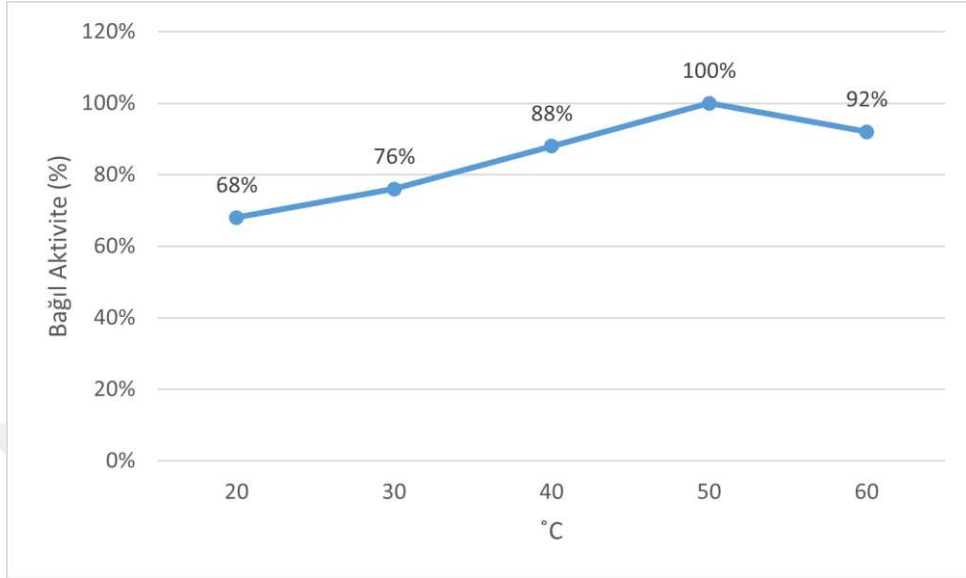
Reaksiyon için 250 µl enzim çözeltisi ve 250 µl substrat çözeltisi karıştırıldı. Karışım 37°C’de 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 500 µl DNSa çözeltisi eklenerek enzim aktivitesi sonlandırıldı. Ardından 100°C’de 10 dakika inkübe edilerek renk değişimi gözlemlendi ve spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Okuma işlemi sırasında kör olarak 0. dakikada DNSa solüsyonu eklenerek aktivitesi durdurulmuş olan aynı reaksiyon karışımı kullanıldı (Çınar, 2007). Yapılan okumalarda en yüksek aktivite KY-4 ve KY-41 numaralı suşlarda tespit edilmiştir.

#### 4.4. Enzim Üretiminde İnkübasyon Sıcaklığının Etkisi

En yüksek pullulanaz aktivitesi gösteren KY-4 ve KY-41 numaralı suşlar, pullulanlı besiyerinde 20, 30, 37, 50, 60°C’lerde 48 saat üretilmiş ve kültür süpernatantı aktivite tayini için kullanılmıştır. Bu araştırmada her iki suş için **optimum aktivite 50°C’de gözlenmiştir**. Bu sonuçlar Şekil 4.2 ve 4.3’te verilmiştir.



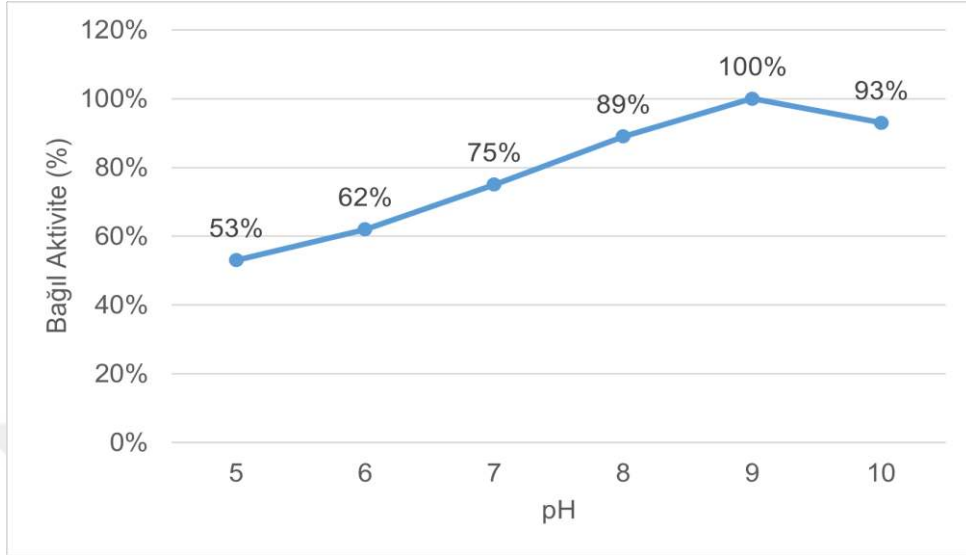
Şekil 4.2. Üretim Sıcaklığının KY4 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi



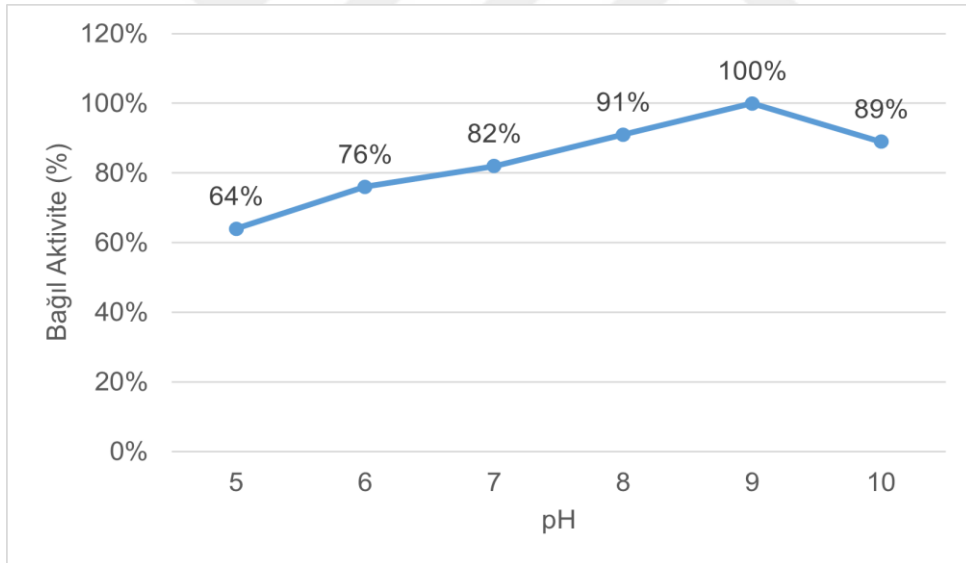
Şekil 4.3. Üretim Sıcaklığının KY41 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi

#### 4.5. Enzim Üretimine pH'nın Etkisi

KY-4 ve KY-41 numaralı izolatlarda enzim üretimine pH'nın etkisinin araştırılması amacıyla farklı pH'larda (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) besiyerleri hazırlanarak, optimum sıcaklık değeri olan 50°C'de enzim üretimi yapıldı. DNSa metodu ile aktivite tayini yapıldı. KY-4 ve KY-41 numaralı suşlar için pH 9,0 en iyi üretim pH'sı olarak belirlendi. pH'nın enzim üretimine etkisi ile ilgili sonuçlar Şekil 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.4. Üretim pH'sının KY4 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi



Şekil 4.5. Üretim pH'sının KY41 Suşunun Enzim Aktivitesine Etkisi

Saha ve ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum* ile yaptıkları çalışmalarda, pullulanaz enziminin optimum 5.0-5.5 pH aralığında çalıştığını bildirmiştir.

Duan ve Wu (2015), ise yaptıkları çalışmalarda optimum üretim pH'sını 4.5 olarak belirlemişlerdir.

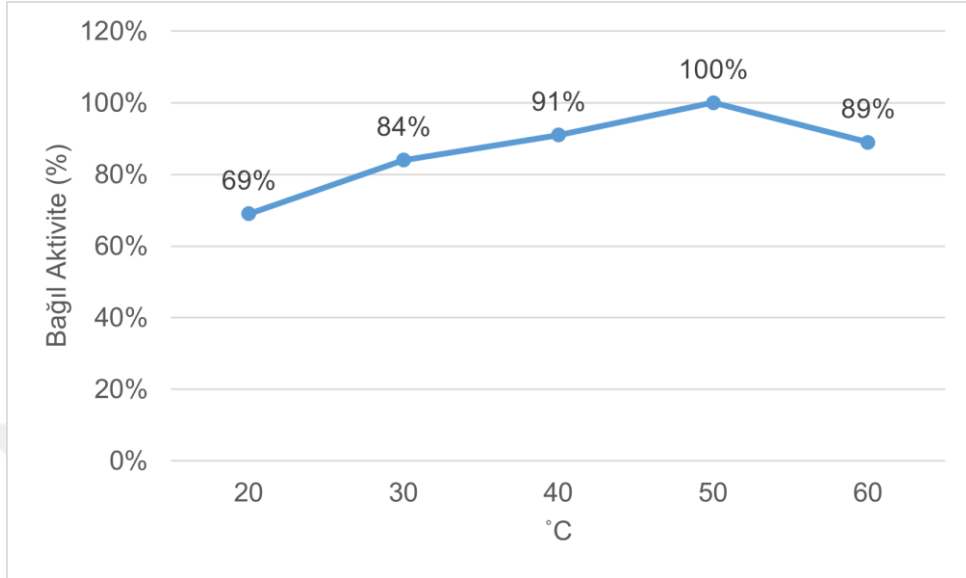
Waleed ve ark. (2015), enzim üretiminde optimum pH değerini belirlemek için yaptıkları denemelerde, en yüksek üretimi pH 7.0'de elde etmişlerdir.

#### **Enzim Karakterizasyonu ile İlgili Bulgular**

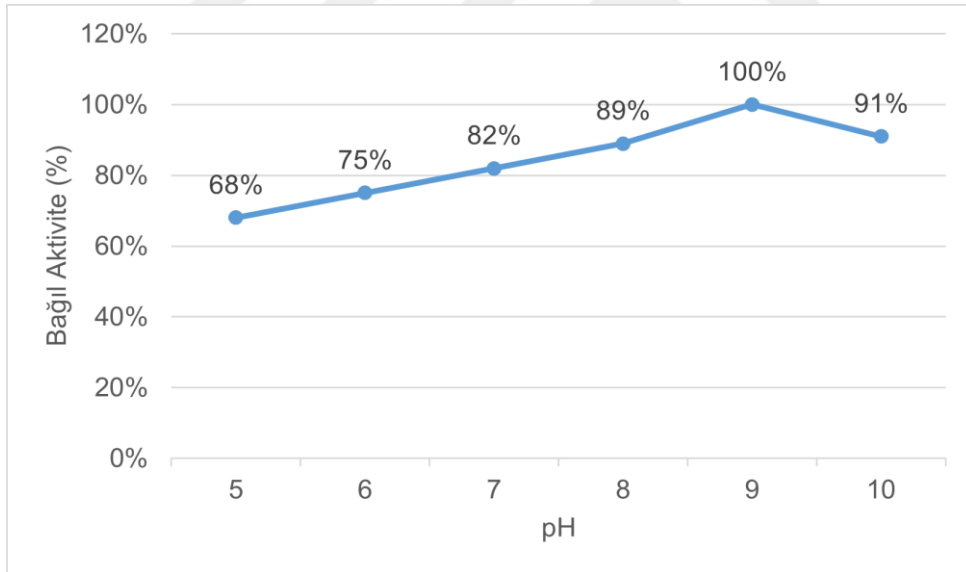
KY-4 ve KY-41 nolu izolatlardan pullulanaz üretimi için optimize edilmiş koşullarda üretilen bakteri kültürleri santrifüjleme ile çöktürülerek, üst faz enzim preparatı olarak enzim karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır.

#### **4.6. Enzimin Optimum Sıcaklık ve pH'sının Belirlenmesi**

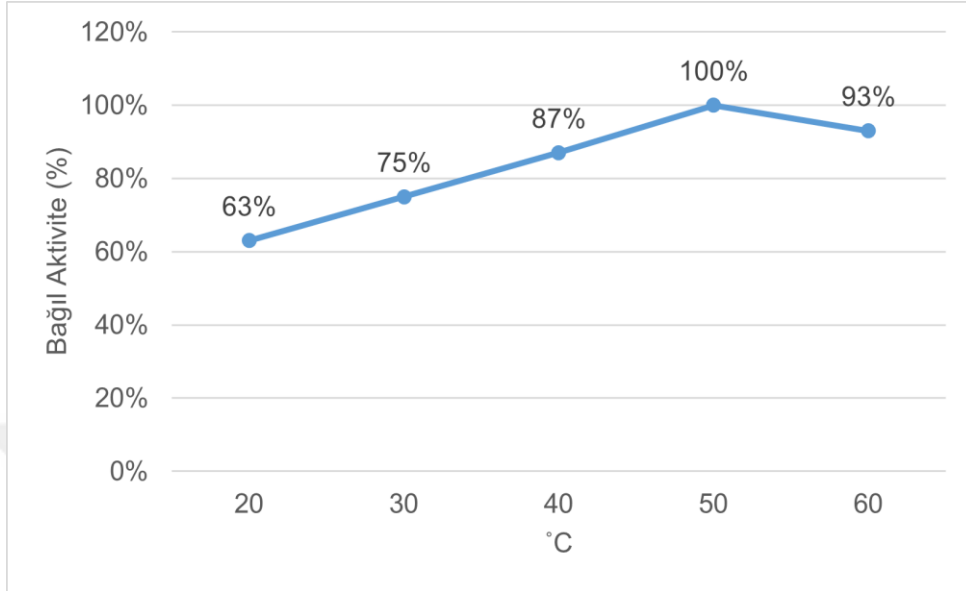
Bu amaçla pH 7.0 fosfat tamponu içerisinde saklanan enzim ve pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 aralığında hazırlanmış tamponlar kullanılmıştır. Her pH'da 20, 30, 37, 50 ve 60°C sıcaklıklarda 20 dakika inkübasyondan sonra DNSa metodu ile aktivite tayini yapıldı. KY-4 ve KY-41 enzimleri için optimum sıcaklık 50°C ve optimum pH 9.0 olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık ve pH için elde edilen sonuçlar Şekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4. 8'de grafiklerle verilmiştir.



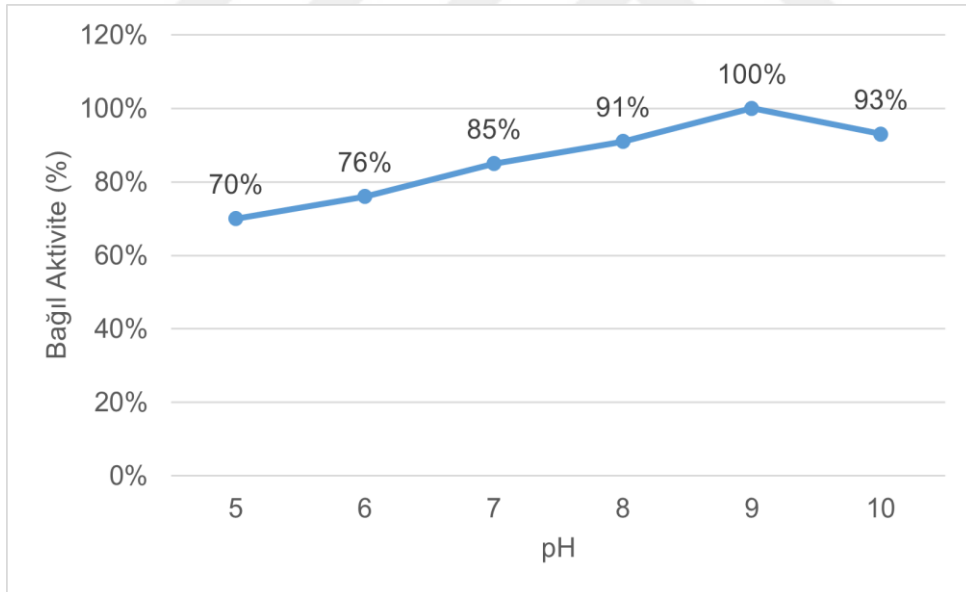
Şekil 4.6. Sıcaklığın (KY-4 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi



Şekil 4.7. pH'nın (KY-4enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi



Şekil 4.8. Sıcaklığın (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi



Şekil 4.9. pH'nın (KY-41enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi

Saha ver ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum*'dan pullulanaz enzimi üretmişler ve enzimin 90°C ve pH 5.5'te en yüksek aktivite gösterdiğini

bildirmişlerdir.

Kimura ve ark. (1989), optimum enzim aktivitesi için uygun koşulların pH 7.0 ve 50°C olduğunu bildirmişlerdir.

Bertoldo ve ark. (2004), pullulanazın pH 8.0 ve 65°C’de en yüksek aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

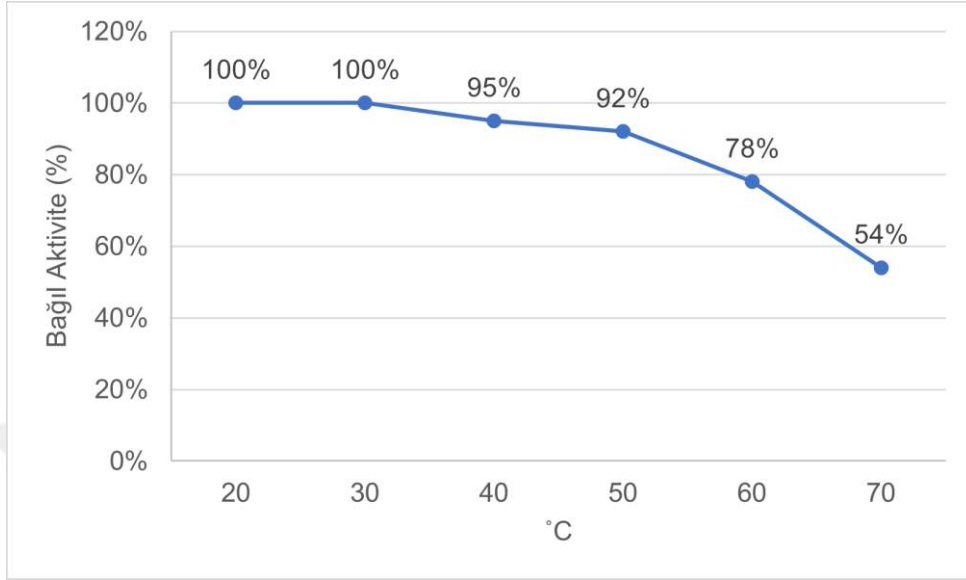
Nair ve ark. (2006), optimum aktiviteyi pH 6.8’de saptamışlardır.

Duan ve Wu (2015), optimum enzim aktivitesini pH 4.5 ve 60°C olarak belirlemişlerdir.

#### **4.7. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi**

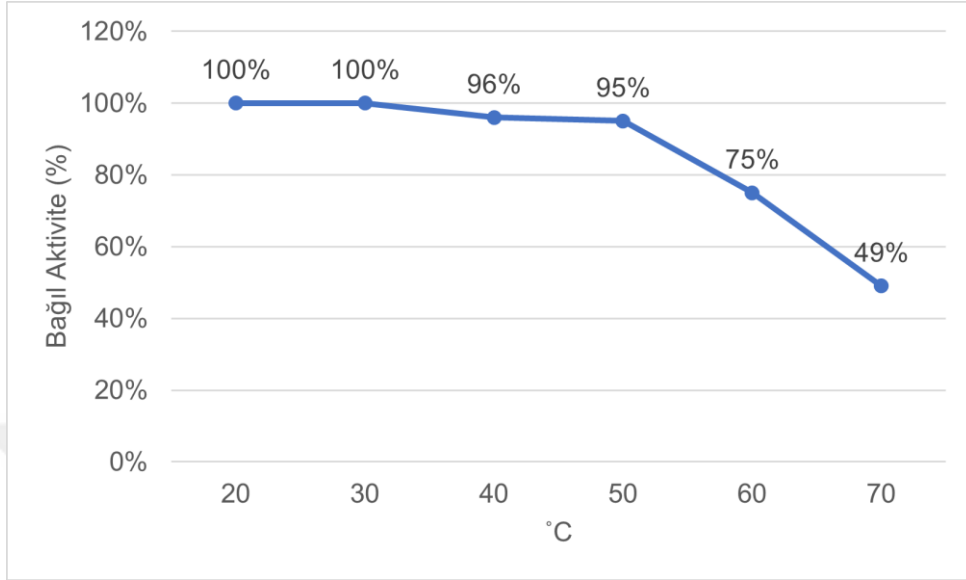
Sıcaklığın enzim kararlılığına etkisinin araştırılması amacıyla 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda enzim çözeltisi 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Herhangi bir ön işleme tabi tutulmayan enzim çözeltisine ait aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiş ve ön inkübasyona tabi tutulmuş olan enzimler aktivite tayini için kullanılmıştır.

KY-4 numaralı suş, 20 ve 30°C sıcaklıklarda aktivite kaybı göstermezken, 40°C’de %5, 50°C’de %8, 60°C’de %22 ve 70°C’de %46 aktivite kaybı göstermiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.10. Sıcaklığın (KY-4 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi

KY41 numaralı suşun kararlılığı incelendiğinde 20 ve 30°C'de herhangi bir aktivite kaybı görülmezken, 40°C'de %4, 50°C'de %5, 60°C'de %75 ve 70°C'de %51 oranında aktivite kaybı göstermiştir.



Şekil 4.11. Sıcaklığın (KY-41 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi

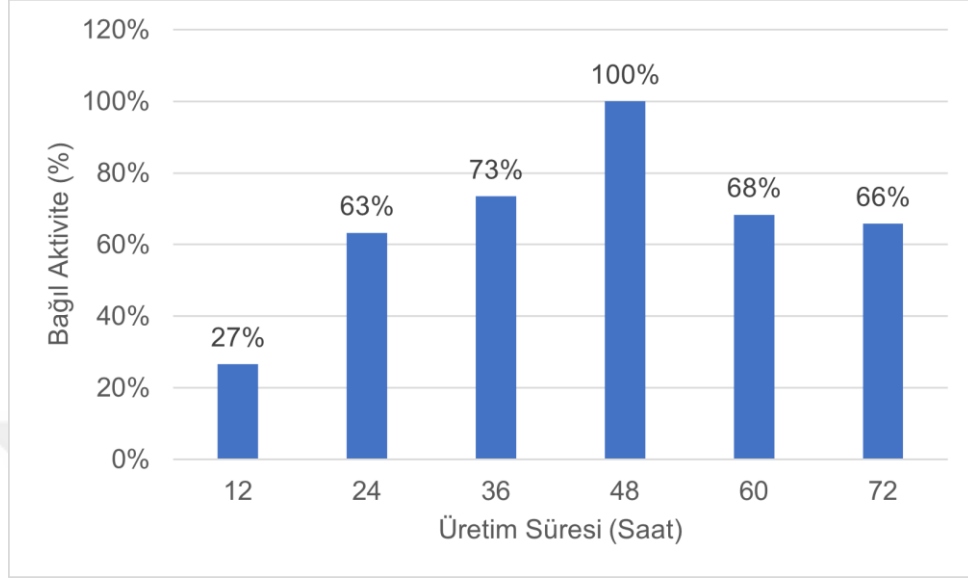
Saha ve ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum* pullulanazı için enzimin 95°C'ye kadar kararlı olduğunu bildirmişlerdir.

Nair ve ark. (2006), pH 6.8'de 10 dakika farklı sıcaklıklarda enzimi ön inkübasyona tabi tutmuş ve bağlı aktiviteyi saptamışlardır. Enzimin 75°C'de %89 oranında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir.

Duan ve Wu (2015), 60°C'de optimum aktivite gösteren enzimin 60°C'de 160 saat beklettiklerinde bile aktivitenin %50 korunduğunu bildirmişlerdir.

#### 4.8. Enzim Üretimi İçin Optimum İnkübasyon Zamanının Etkisi

Bu amaçla enzim üretici suşlar üretim besiyerinde 12-72 saat inkübe edilmiş ve en yüksek üretimin 48. saatte gerçekleştiği belirlenmiştir. 48. saatten sonra aktivitenin düşmeye başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.12. Üretim Süresinin (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi

Lonsane ve ark. (1990), enzim üretiminde inkübasyon süresinin en iyi 48. saatte olduğunu, 48 saatten sonra enzim miktarı ya da enzim aktivitesinde bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

Waleed ve ark. (2015), 12 saatten 72 saate kadar üretim yaptıklarını ve en yüksek enzim aktivitesini 48 saat sonunda gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

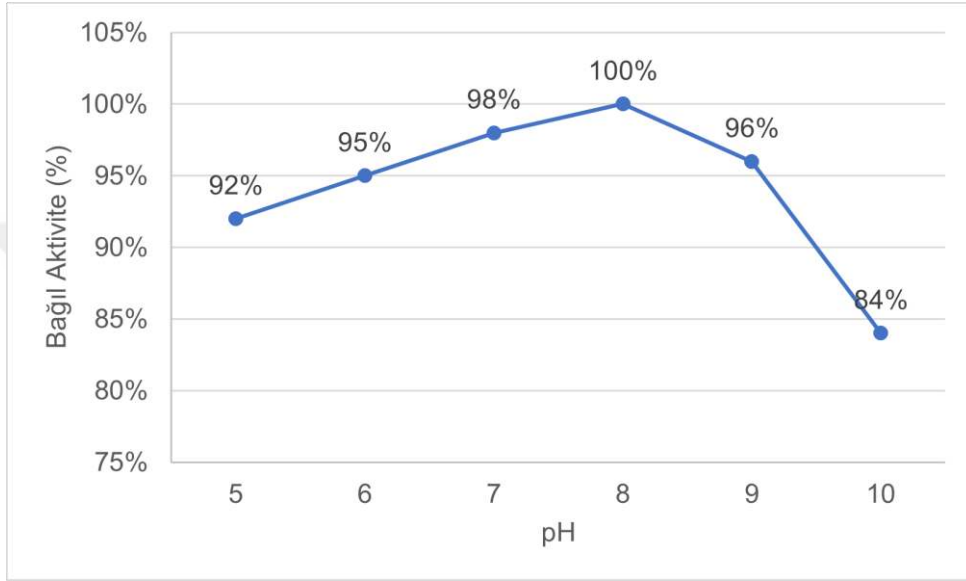
Prabnu ve ark. (2017), enzim üretimi amacıyla 24-72 saat aralığında inkübasyon yapmışlar ve en yüksek enzim üretiminin 48. saatte gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

#### 4.9. Enzim Kararlılığına pH'nın Etkisi

Bu amaçla pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 değerlerinde tamponlar içerisinde enzim çözeltisi 2 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Herhangi bir ön işleme tabi tutulmayan enzim çözeltisine ait absorbans değeri %100 kabul edilmiş ve farklı pH'larda elde edilen absorbans değerleri grafiklendirilmiştir.

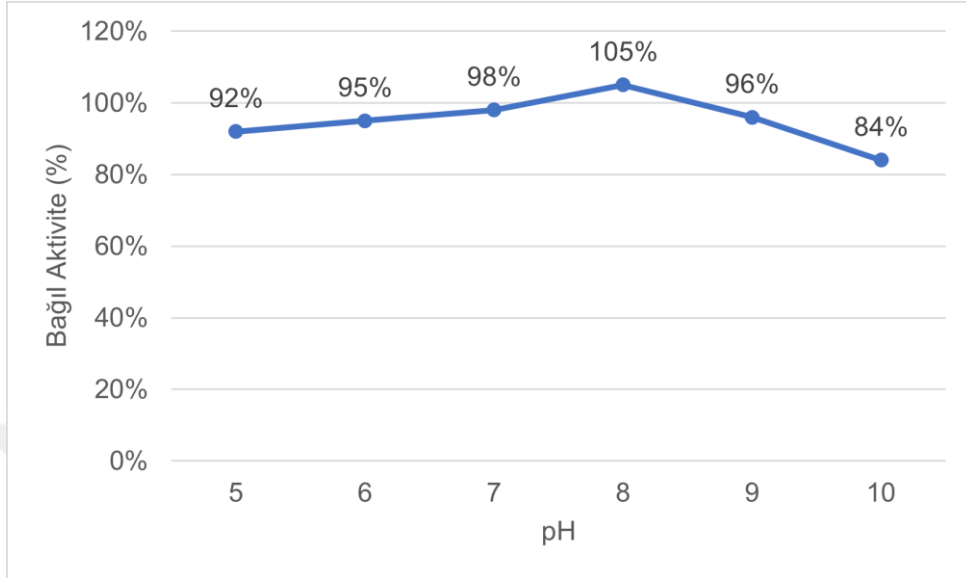
KY-4 nolu izolatin enzimi pH kararlılığı açısından değerlendirildiğinde; pH

5.0'da %8, pH 6.0'da %5, pH 7.0'da %2, pH 9.0'da %4, pH 10.0'da %16 oranında aktivite kaybı gözlenmiş, pH 8.0'da herhangi bir aktivite kaybı görülmemiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



Şekil 4.13. pH'nın (KY-4 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi

Bu denemeler sonucunda; pH 5.0'da %12, pH 6.0'da %8, pH 7.0'da %2, pH 9.0'da %6, pH 10.0'da %15 oranında aktivite kaybı gözlenmiştir. KY-4 enziminde olduğu gibi KY-41 enziminde de pH 8.0'da herhangi bir aktivite kaybı tespit edilmemiştir.



Şekil 4.14. pH'nın (KY-41 enzimi) Enzim Kararlılığına Etkisi

Saha ve ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum*'a ait pullulanazın pH 5.5'te hiç aktivite kaybına uğramadığını bildirmişlerdir.

Kuroiwa ve ark. (2004), pullulanaz kararlılığına pH etkisini incelediklerinde, pH 3.0-8.0 aralığında yalnızca pH 6.0'da enzimin tam kararlılıkta çalıştığını bildirmişlerdir.

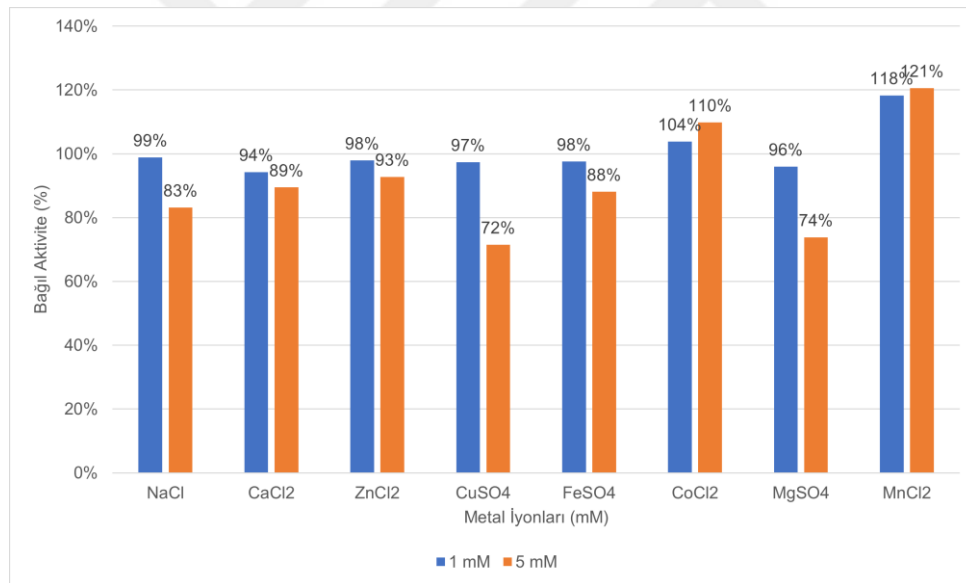
Zhang ve ark. (2009), pH 5.5-6.0 aralığında kararlı olarak çalışmasını sürdürdüğünü ancak pH daha alkali ya da asidik olduğunda aktivitede hızlı bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

Chen ve ark. (2015), pullulanaz kararlılığı üzerine yaptıkları çalışmalarda pH 4.5-6.5 aralığında enzim aktivitesinde bir kayıp olmadığını bildirmişlerdir.

Alagöz ve ark. (2016), serbest pullulanaz ve immobilize pullulanaz ile yaptıkları çalışmalarında, serbest haldeki pullulanaz enzimi için pH 6.0 ve immobilize pullulanaz için pH 5.0'da %100 aktivitenin korunduğunu bildirmişlerdir.

#### 4.10. Metal İyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

Metal iyonlarının KY-41 izolatından üretilen enzim aktivitesine etkisini saptamak amacıyla enzim 10 dakika NaCl, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> ve MnCl<sub>2</sub> ile (1 mM ve 5 mM konsantrasyonlarda) karıştırılarak ön inkübasyona bırakılmıştır. Grafikte görüldüğü üzere NaCl, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> ve MgSO<sub>4</sub> 1 mM konsantrasyonda %1-6 oranlarında aktivite kaybına neden olmuştur. Aynı kimyasalların 5 mM konsantrasyonu kullanıldığında; NaCl %17, CaCl<sub>2</sub> %11, ZnCl<sub>2</sub> %7, CuSO<sub>4</sub> %28, FeSO<sub>4</sub> %12 ve MgSO<sub>4</sub> %26 oranında aktivite kaybına neden olmuştur. Bununla birlikte CoCl<sub>2</sub> ve MnCl<sub>2</sub> 1 mM ve 5 mM'lık konsantrasyonlarda aktivite artışına sebep olmuştur (CoCl<sub>2</sub> %4 ve %10, MnCl<sub>2</sub> %18 ve %21).



Şekil 4.15. Metal İyonlarının (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesine Etkisi

Saha ve ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum* pullulanazı için CaCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub>'de %5, MnCl<sub>2</sub>'de %10 ve CoCl<sub>2</sub>'de %22 aktivite artışı saptamışlardır. Bununla birlikte ZnCl<sub>2</sub>'de %66 ve FeCl<sub>2</sub>'de %58 aktivite kaybı

bildirmişlerdir.

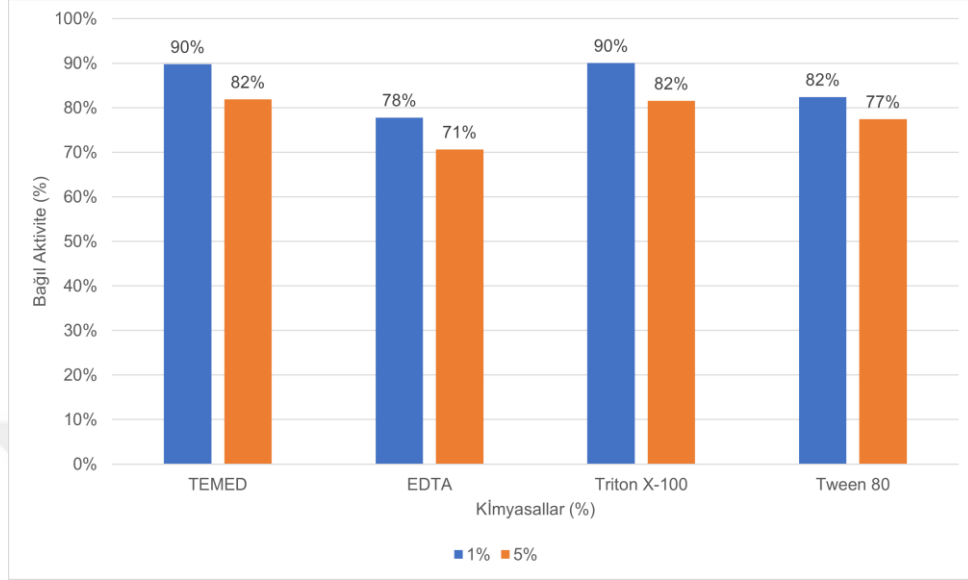
Kimura ve ark. (1989),  $\text{CaCl}_2$ 'de %1,  $\text{CaCl}_2$ 'de %4 ve  $\text{FeCl}_3$ 'te %11 enzim aktivitesinde artışla birlikte  $\text{CuCl}_2$ 'de %90,  $\text{FeSO}_4$ 'ta %6,  $\text{MgCl}_2$ 'de %10,  $\text{MnCl}_2$ 'de %42 ve  $\text{ZnCl}_2$ 'de %12 aktivite kaybı görüldüğünü bildirmişlerdir.

Ling ve ark. (2009), 0.2 mM konsantrasyonda  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  tarafından pullulanaz aktivitesinin güçlü bir şekilde inhibe edildiğini bildirmiştir. Ancak  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun pullulanaz aktivitesini %179 civarında artıran güçlü bir uyarıcı olduğunu bildirmişlerdir.

Orhan ve ark. (2014), 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NiCl}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{LiSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$  ve KI etkisinde  $\text{CaCl}_2$  dışındaki metal iyonlarında aktivite artışı saptamışlardır ( $\text{FeCl}_2$  %4,  $\text{FeCl}_3$  %10,  $\text{MgSO}_4$  %23,  $\text{CoCl}_2$  %27,  $\text{NiCl}_2$  %24,  $\text{NaCl}$  %23,  $\text{CuSO}_4$  %4,  $\text{LiSO}_4$  %22,  $\text{AgSO}_4$  %15 ve KI %24).  $\text{CaCl}_2$  etkisinde %2 oranında aktivite kaybı olduğu ve bulgular karşılaştırıldığında  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  ve  $\text{NaCl}$  için benzer sonuçlar elde edildiğini bildirmişlerdir.

#### 4.11. Diğer Kimyasalların Enzim Aktivitesine Etkisi

KY-41 izolatına ait enzim 10 dakika %1 ve %5 konsantrasyonlarda TEMED, EDTA, Triton X-100 ve Tween 80 ile ön inkübasyona bırakılmış ve ön inkübasyondan sonra DNSa metodu ile aktivite tayini yapılmış, ön işlem uygulanmamış örnek kontrol (%100) olarak kabul edilmiştir. TEMED %10 ve %18, EDTA %22 ve %29, Triton X-100 %10 ve %18, Tween 80 ise %12 ve %23 oranında aktivite azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.14).



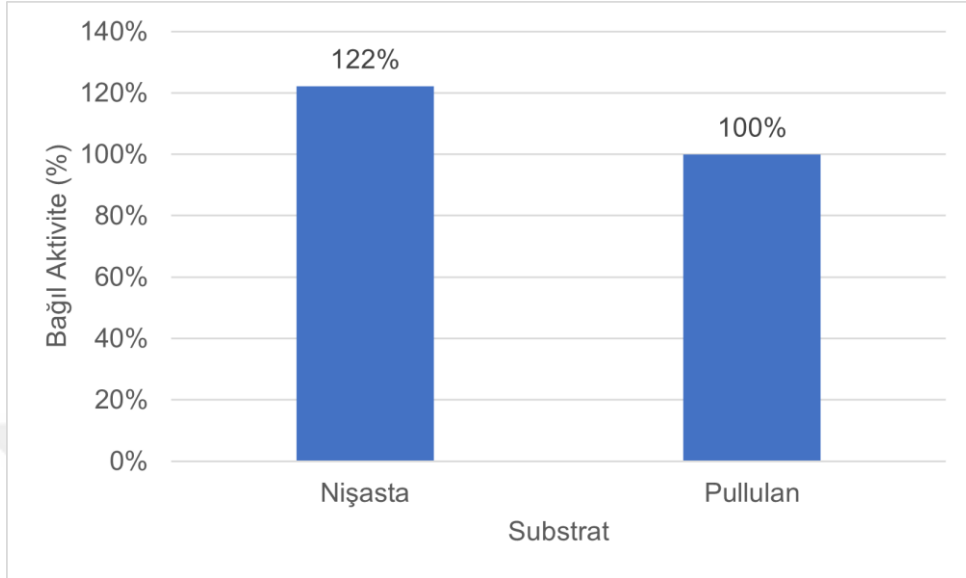
Şekil 4.16. Bazı Kimyasalların (KY-41 enzimi) Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Saha ve ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum*'dan üretilen pullunazda EDTA'nın enzim aktivitesini %39 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Orhun ve ark. (2014), EDTA'nın enzim aktivitesini %2 oranında artırdığını, Tween 80 ve Triton X-100 varlığında ise kalan aktivitenin %1.40 ve %11.50 olduğunu bildirmişlerdir.

#### 4.12. Substrat Spesifitesi

Enzim üretiminde nişastanın substrat olarak kullanılabilirliği test edilmiştir (Hii ve ark., 2009). Bu amaçla pullulan ve nişasta substrat olarak kullanılarak enzim üretilmiş ve standart aktivite tayininde pullulan kullanılmıştır. Enzim üretiminde nişastanın pullulana alternatif substrat olarak kullanılabileceği ve enzim üretimi sırasında pullulandan daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.17. Kullanılan Substratın (KY-41 enzimi) Enzim Üretimine Etkisi

Prabnu ve ark. (2017), enzim üretimi için nişastanın pullulandan daha iyi bir karbon kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Sihay (2019), üretim için kullanılan besiyerinde pullulan yerine %1 oranında kullanılan nişastanın enzim üretiminde en etkili karbon kaynağı ve konsantrasyonu olduğunu belirtmiştir.



## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Doğal çevreden *Bacillus* spp. şuşlarının izole edilmesi amacıyla alınan toprak örnekleri ön inkübasyona bırakılıp 80°C’de 15 dakika ısı şoku uygulaması yapılarak vejetatif formdaki bakterilerin elimine edilmesi ve spor oluşturan bakterilerin izole edilme işlemleri yapılmıştır. Aerobik şartlarda inkübasyon yapılarak *Bacillus* cinsine ait bakteriler saf kültür olarak elde edilmiştir. İzole edilen 118 suş pH 7.0 ve 37°C’de 48 saat inkübe edilmiş, 46 suшта pullulanaz aktivitesi gözlenmiştir. Pullulanaz üreten suşlar stok kültüre alınarak geçici olarak +4°C’de saklanmıştır. En berrak ve geniş hidroliz zonu veren 4 suş sıvı besiyerinde üretilerek, kısmi saflaştırılmış enzimde aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda bu suşlardan izole edilen enzimin aynı zamanda nişastayı da hidroliz ettiği belirlenmiştir.

Üretimde kullanılmak üzere 2 suş seçilmiş ve bu suşlar koloni morfolojisi, gram boyama ve mikroskopik incelemelerle Gram pozitif ve basil olarak tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerin ürettiği oldukları enzimleri hücre dışına serbest halde salgılayabilmeleri avantajlı bir durum olarak kullanılmaktadır.

Üretici olarak belirlenen suşların optimum enzim üretim sıcaklığı ve pH’sı belirlenmiştir. Sonraki aşama olarak optimum pH ve sıcaklıkta, sıvı besiyerinde üretimi gerçekleştirilerek, kısmi enzim saflaştırılması yapılmıştır. Kısmi saflaştırılmış enzimin optimum çalışma pH ve sıcaklığı tespit edilmiştir.

Optimum enzim üretim zamanının tespiti amacıyla, optimum üretim pH ve sıcaklığında üretim gerçekleştirilmiş, 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, ve 96. saatlerde örneklemeler yapılarak en iyi üretim zamanının 48. saat olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda optimum üretim sıcaklığı 50°C ve optimum üretim pH’sı 10.0, kısmi saflaştırılmış enzim için optimum aktivite sıcaklığı 50°C ve optimum aktivite pH’sı 9.0 olarak tespit edilmiştir.

Bu veriler ışığında, üretici suşumuz ve ürettiği enzim için, **alkali ve termofilik** denilmesi uygundur.

### 5.2. Öneriler

Doğal ve yerli gen kaynaklarının, sanayide kullanıma uygun olanlarının belirlenerek ekonomiye kazandırılması, bu bağlamda dışa bağımlılığın azaltılarak bitmesi açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla araştırmacıların doğal enzim üreticisi mikroorganizmalar üzerinde çalışmalarına devam etmeleri ve araştırmacıların bu yolda teşvik edilmeleri ve desteklenmeleri önemli bir konudur. Bu genetik kaynakların kültür koleksiyonları oluşturularak saklanması ülkemiz açısından çok önemli bir adım olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2007. Enzymes in Industry. Wiley-WCH, Almanya
- Akan, A, 2011. *Aspergillus niger*'de Pullulanaz İndüksiyonu ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Alagöz, D., Yildirim, D., Güvenmez, H. K., Sihay, D., & Tükel, S. S. (2016). Covalent immobilization and characterization of a novel pullulanase from *Fontibacillus* sp. strain DSHK 107 onto Florisil® and nano-silica for pullulan hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 179(7), 1262-1274.
- Bektas, K. I., Belduz, A. O., Guvenmez, H. K., & Sihay, D. (2016). *Fontibacillus pullulanilyticus* sp. nov. isolated from soil. *Journal of Basic Microbiology*, 56(8), 857-863.
- Bertoldo, C., Armbrrecht, M., Becker, F., Schäfer, T., Antranikian, G., & Liebl, W. (2004). Cloning, sequencing, and characterization of a heat-and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3407-3416.
- Chen, A., Li, Y., Nie, J., McNeil, B., Jeffrey, L., Yang, Y., & Bai, Z. (2015). Protein engineering of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase for enhanced thermostability using in silico data driven rational design methods. *Enzyme and microbial technology*, 78, 74-83.
- Chul Shin, Y., Kim, Y. H., Lee, H. S., Cho, S. J. and Byun, S. M., 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33: 129-133.

- Çınar, E., 2007. İnek Sütünden İzole edilen *Bacillus* sp.'den Pullulanaz ve Amilaz Enzimlerinin Üretimi, Bu Enzimlerin Optimizasyon Koşullarının Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır
- Dağbağlı S., Güvenç U., Göksungur Y., 2008. Mikrobiyal bir polisakkarit: pullulan. Akademik Gıda, 6(3): 42-48.
- Duan, X., & Wu, J. (2015). Enhancing the secretion efficiency and thermostability of a *Bacillus deramificans* pullulanase mutant (D437H/D503Y) by N-terminal domain truncation. Applied and environmental microbiology, Waleed, M., Faiza, A. A., & Nizar, I. (2015). Production optimization of pullulanase enzyme produced by *Bacillus cereus* isolated from Syrian sources. International Food Research Journal, 22(5).Hii, S., Tan, J. and Ariff A., 2012. Pullulanase: Role in Starsh Hydrolysis and Potential Industrial Applications. Enzyme Research 2012, 5-14.
- Hyun, H. H., & Zeikus, J. G. (1985). Regulation and genetic enhancement of glucoamylase and pullulanase production in *Clostridium thermohydrosulfuricum*. Journal of bacteriology, 164(3), 1146-1152.
- İtik, D., ve Sıdal, U. 2013. Co-Culture Yöntemi ile Pullulan Eldesi. Celal Bayer Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi. 9.1 (2013) 21-29.
- Kimura, T., Yoshida, M., Oishi, K., Ogata, M., & Nakakuki, T. (1989). Immobilization of exo-maltotetraohydrolase and pullulanase. Agricultural and biological chemistry, 53(7), 1843-1848.
- Kuroiwa, T., Shoda, H., Ichikawa, S., Sato, S., & Mukataka, S. (2005). Immobilization and stabilization of pullulanase from *Klebsiella pneumoniae* by a multipoint attachment method using activated agar gel supports. Process Biochemistry, 40(8), 2637-2642.
- Lacroix, C., LeDuy, A., Noel, G. and Choplin, L., 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. Biotechnology and

- Bioengineerin, 27: 202-207.
- Leathers, T. D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(5), 468-473.
- Ling, H., Ling, T.C., Rosfarizan and Ariff. A. B., 2009. Characterization of Pullulanase type II from *Bacillus cereus* H1.5, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, Vol. no. 5, pp.170-179.
- Lonsane, B. K., Ghildyal, N. P., Budiatman, S., & Ramakrishna, S. V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(6), 258-265.
- Malakar, r., Tiwari, A. ve Malviya, S., 2010. Pullulanase: A Potantial Enzyme For Industrial Application. *International Journal of Biomedical Research* 1, 10-20.
- Messaoud, E. B., Ammar, Y. B., Mellouli, L., & Bejar, S. (2002). Thermostable pullulanase type I from new isolated *Bacillus thermoleovorans* US105: cloning, sequencing and expression of the gene in *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 827-832.
- Murooka, Y., & Ikeda, R. (1989). Biosynthesis and secretion of pullulanase, a lipoprotein from *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17524-17531.
- Nair, S. U., Singhal, R. S., & Kamat, M. Y. (2007). Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA-13. *Bioresource technology*, 98(4), 856-859.
- Odibo, F. J. C., & Obi, S. K. C. (1988). Purification and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermoactinomyces thalpophilus*. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 3(6), 343-350.
- Orhan, N., 2012. *Hypocrea jecorina* QM9414'den Pullulanazın Saflaştırılması, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Orhan, N., Kiymaz, N. A., & Peksel, A. (2014). A novel pullulanase from a fungus

- Hypocrea jecorina* QM9414: production and biochemical characterization.
- Özcan, B. D., & Özcan, N. (2001). *Bacillus subtilis* RSKK243'e Ait Bifonksiyonel Ksilanaz Geninin *E. coli* ve *B. subtilis*' te Klonlanması ve Enzim Karakterizasyonu. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 881-885.
- Özkan, G., & Başbülbul, G. (2021). Diversity of thermophilic archaea and their biotechnological uses. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14(1), 155-166.
- Saha, B. C., Mathupala, S. P., & Zeikus, J. G. (1988). Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biochemical Journal*, 252(2), 343-348.
- Singh, R.S., Saini, G.K. and Kennedy, J.F., 2008. Pullulan: Microbial Sources Production and Applications. *Carbohydrate Polymers* 73, 515-531.
- Swamy, M. V., & Seenayya, G. (1996). Thermostable pullulanase and  $\alpha$ -amylase activity from *Clostridium thermosulfurogenes* SV9—Optimization of culture conditions for enzyme production. *Process Biochemistry*, 31(2), 157-162.
- Turkenburg, J. P., Brzozowski, A. M., Svendsen, A., Borchert, T. V., Davies, G. J., & Wilson, K. S. (2009). Structure of a pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 76(2), 516-519.
- Uhlig, H. 1998. Industrial enzymes and their applications. John Wiley&Sons, inc. New York.
- Ulutürk, C., 2012. Pullulanazın Farklı Taşıyıcılarda İmmobilizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- Xu, P., Zhang, S. Y., Luo, Z. G., Zong, M. H., Li, X. X., & Lou, W. Y. (2021). Biotechnology and bioengineering of pullulanase: state of the art and perspectives. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(3), 1-10.
- Zhang, L., Zhu, X., Zheng, S., & Sun, H. (2009). Photochemical preparation of

magnetic chitosan beads for immobilization of pullulanase. *Biochemical Engineering Journal*, 46(1), 83-87.





## ÖZGEÇMİŞ

İlker KAYA. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamlamıştır. 2014 yılında başladığı Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü 2017 yılında tamamlamıştır. 2018 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde lisans öğrenimine başlamış olup 2022 yılı haziran ayı itibari ile bu bölümden mezun olmuştur. Çeşitli ulusal ve uluslararası bilim kongre ve çalıştaylarında poster sunumu yapmış ve katılımcı olarak bulunmuştur.

