

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *BACILLUS* İZOLATLARININ POLİGALAKTURONAZ
ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kudret BULUT

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ŞUBAT 2024

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *BACILLUS* İZOLATLARININ POLİGALAKTURONAZ
ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kudret BULUT

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe AVCI

ŞUBAT 2024

Kudret BULUT tarafından hazırlanan “Bazı *Bacillus* İzolatlarının Poligalakturonaz Üretimlerinin Araştırılması” adlı tez çalışması 02.02.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Jüri Başkanı : **Doç. Dr. Ayşe AVCI (Danışman)**
Sakarya Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Doç. Dr. Aybike KAMILOĞLU**
Bayburt Üniversitesi

Jüri Üyesi : **Dr. Öğr. Üyesi Semra YILMAZER KESKİN**
Sakarya Üniversitesi



ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğine ve Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesine uygun olarak hazırlamış olduğum “Bazı *Bacillus* İzolatlarının Poligalakturonaz Üretimlerinin Araştırılması” başlıklı tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın tüm aşamalarında yukarıda belirtilen yönetmelik ve yönergeye uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, bu tezi başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve 20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince Sakarya Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Enstitü tarafından belirlenmiş ölçütlere uygun rapor alındığını, etik kurul onay belgesi aldığımı çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun ortaya çıkması halinde doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi beyan ederim.

(02/02/2024).

(imza)

Kudret BULUT





Anneme ve babama



TEŞEKKÜR

Tez sürecimin tüm aşamalarında yanımda olan, tez konusu seçiminden başlayarak tüm laboratuvar çalışmalarında bana yol gösteren, plan ve program konusunda desteklerini esirgemeyen, eksiklerimi tamamlamamda engin bilgilerini paylaşmaktan kaçınmayan, tez yazım aşamasında da beni yalnız bırakmayarak her konuda beni yönlendiren, uzmanlığı, tecrübeleri ve profesyonelliğiyle yüksek lisans sürecim boyunca bana karşılaştığım her zorlukta yardımcı olan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında uygulamalardaki yardımları ile bana katkıda bulunan ve ihtiyaç duyduğumda desteklerini esirgemeyen sayın Dr. Mohammed HAMK'a teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan pozitif enerjileriyle ve destekleriyle hayatıma neşe katan dostlarım Dilek ALKAN, Gamze DÜZGÜN, Fatmanur UÇAR, İrem Melda KARACA ve tüm sevdiklerime sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, bana her zaman güvenen ve destekleyen aileme; babam Sunay BULUT, annem Filiz BULUT ve yüksek lisans yapmamın en büyük destekçisi dayım CebraİL KOÇ'a teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Kudret BULUT



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SİMGELER	xv
TABLO LİSTESİ	xvii
ŞEKİL LİSTESİ	xix
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Kapsamı	1
1.2. Tezin Amacı	3
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Enzimler	5
2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması	5
2.2. Pektik Maddeler ve Moleküler Yapıları	8
2.3. Pektinazlar (EC 3.2.1.15) ve Etki Mekanizmaları	9
2.4. Pektinazların Sınıflandırılması	10
2.4.1. Poligalakturonaz (PG)	11
2.4.2. Pektin metilesteraz (PE)	11
2.4.3. Pektat liyaz (PEL)	11
2.4.4. Pektin liyaz (PNL)	11
2.4.5. Mikrobiyal pektinazların üretimi ve kullanılan mikroorganizmalar	13
2.4.6. Poligalakturonazın kullanım alanları	17
2.4.6.1. Meyve suyu ekstraksiyonu	19
2.4.6.2. Kahve ve çay fermentasyonu	20
2.4.6.3. Yağ ekstraksiyonu	20
2.4.6.4. Biyoetanol üretimi	20
2.4.6.5. Biracılık endüstrisi	21
2.4.6.6. Bitki virüslerinin saflaştırılması	21
2.4.6.7. Hayvan yemi	22
2.4.6.8. Kağıt yapımı ve pulp endüstrisi	22
2.4.6.9. Atık su arıtımı	23
2.4.6.10. Bitki liflerinin zamkının giderilmesi	23
2.4.6.11. Tekstil endüstrisi	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Mikroorganizmalar	25
3.1.2. Kullanılan cihazlar	26
3.1.3. Besiyeriler	26
3.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler	27

3.2. Yöntem	28
3.2.1. Tarama Çalışması	28
3.3. Poligalakturonaz Enzimi Üretimi	29
3.3.1. İnokulum hazırlama ve inokülasyon	29
3.4. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 İzolatının Tanımlanması	29
3.5. Poligalakturonaz Aktivitesi Tayini	31
3.5.1. D-galakturonikasit-Monohidrat standart grafiğinin hazırlanması	32
3.6. Enzim Üretimi Koşullarının Belirlenmesi	34
3.6.1. Enzim üretimine pH'nın etkisinin belirlenmesi	34
3.6.2. Enzim üretimine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi	34
3.6.3. Enzim üretimine pektin konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi	34
3.6.4. Enzim üretimine karbon kaynaklarının etkisinin belirlenmesi	34
3.6.5. Enzim üretimine azot kaynaklarının etkisinin belirlenmesi	35
3.7. Poligalakturonaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklığının Belirlenmesi ...	35
3.7.1. Poligalakturonaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	35
3.7.2. Poligalakturonaz enziminin optimum pH'nın belirlenmesi	35
3.8. İstatistik Analiz	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	37
4.1. Tarama Çalışması Bulguları	37
4.1.1. Poligalakturonaz üreten suşların taranması ve poligalakturonaz aktivitesi	37
4.1.2. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 suşunun enzim üretiminin optimizasyonu	39
4.1.2.1. Poligalakturonaz enzim üretimine ortam pH'ın etkisi	39
4.1.2.2. Poligalakturonaz enzim üretimine ortam sıcaklığının etkisi	42
4.1.2.3. Poligalakturonaz enzim üretimine pektin konsantrasyonunun etkisi	44
4.1.2.4. Poligalakturonaz enzim üretimine karbon kaynaklarının etkisi	46
4.1.2.5. Poligalakturonaz enzim üretimine azot kaynaklarının etkisi	48
4.1.3. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 suşundan elde edilen poligalakturonaz enziminin birtakım özelliklerinin incelenmesi	51
4.1.3.1. Poligalakturonaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi	51
4.1.3.2. Poligalakturonaz enziminin optimum pH'nın belirlenmesi	52
4.2. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 İzolatının Tanımlanması	53
5. SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	65

KISALTMALAR

DNS	: Dinitrosalisilik asit
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
EC	: Enzim komisyonu
GA	: Galakturonikasit
GRASS	: Genel olarak güvenli kabul edilir
HG	: Homogalakturnan
IU	: Uluslararası birim
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient broth
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	: Pektin metilesteraz
PEL	: Pektat liyaz
PNL	: Pektin liyaz
PG	: Poligalakturnaz
PGA	: Poligalakturnik asit
RG I	: Rhamnogalakturnan I
RG II	: Rhamnogalakturnan II
UV-VIS	: Morötesi-Görünür bölge
YST	: Yağsız süttozu



SİMGELER

dk	: Dakika
g	: Gram
h	: Hacim
L	: Litre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1. Pektinolitik enzimlerin ayrıntılı sınıflandırılması.	12
Tablo 2.2. Farklı fermantasyon koşullarında pektinaz üretimleri.	14
Tablo 2.3. Bazı termoalkalifil ve alkalifillerin ürettiği ekstremofilik enzimler.	17
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan Van Gölü numunelerinden elde edilmiş izolatlar..	25
Tablo 3.2. Kullanılan Araç-Gereçler ile Markaları ve Modeller.....	26
Tablo 4.1. Pektin katkılı katı besiyerinde 33°C’de 24 saat inkübe edilen 25 izolatın gelişimleri ve zon çapları.	39
Tablo 4.2. VGA7 izolatının <i>Bacillus</i> sp. türleri ile 16s rDNA benzerlik oranı.....	54



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. EC kodlardaki rakamların temsil ettiği gruplar.	6
Şekil 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması ve EC kodları.	7
Şekil 2.3. Pektik maddelerin temel yapısı.....	9
Şekil 2.4. Pektinazların etki mekanizması (a) PG için R=H ve PMG için R=CH ₃ ; (b) PE; (c) PGL için R=H ve PL için R=CH ₃ . Oklar enzimlerin etki ettiği yeri göstermektedir. PMG, polimetilgalakturonaz; PG, poligalakturonaz (EC. 3.2.1.15); PE, pektinesteraz (EC. 3.1.1.11).....	10
Şekil 2.5. Poligalakturonaz enziminin kullanım alanları.	19
Şekil 3.1. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 izolatı; a) Eppendorf tüplerinde muhafazası, b) NA besiyerinde gelişimi, c) NB besiyerinde gelişimi.	29
Şekil 3.2. Standart eğri için yapılan analizinde deney türlerindeki renk oluşumu. ...	33
Şekil 3.3. D-galakturonikasit-Monohidrat standart eğrisi.....	33
Şekil 4.1. 24 saatlik süre sonunda pektin içeren katı besiyerinde geliştirilen izolatlarının görünümü.	37
Şekil 4.2. 24 saat sonunda gelişen izolatların iyot çözeltisi ile oluşturdukları zon yapısı.	38
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine pH'ın etkisi.....	41
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine sıcaklığın etkisi.	43
Şekil 4.5. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine pektin konsantrasyonunun etkisi.	45
Şekil 4.6. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine karbon kaynaklarının etkisi.	46
Şekil 4.7. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine azot kaynaklarının etkisi.	49
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 suşunun optimum sıcaklığının belirlenmesi.	51
Şekil 4.9. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 suşunun optimum pH çalışması.....	52
Şekil 4.10. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 izolatına ait 100x objektifle elde edilen mikroskop görüntüsü.....	53
Şekil 4.11. <i>Bacillus</i> sp. VGA7 bakterisine ait 16S rDNA gen dizisi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç.	54



İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN POLİGALAKTURONAZ ENZİMİ ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada, Van Gölü'nden izole edilen alkali özellikteki *Bacillus* izolatlarının poligalakturonaz enzim üretimleri araştırılarak en iyi enzim üreticisi izolat seçilmiş ve bu izolatin enzim üretim koşulları optimize edilmiştir. Çalışmada 25 izolat kullanılmış ve enzim üretimleri pektinaz içeren besiyeri ortamında geliştirilen bakterilerin üzerine iyot çözeltisi damlatılarak kolonilerin etrafında oluşan şeffaf zon belirlenmiştir. En büyük zon çapının görüldüğü VGA7 izolatı en iyi üretici bakteri olarak seçilmiş ve bununla enzim üretim çalışmaları yapılmıştır. İzolatin muhafazası %25 gliserol içeren nutrient broth içerisinde yapılmış olup aktifleştirme işlemi önce nutrient agar ardından nutrient broth içerisinde 33 °C'de 24 saatte yapılmıştır. Aktif kültürden üretim ortamına %5 oranında aşılama yapılmıştır. Enzim üretiminde pektin içeren bazal bir besiyeri (10 g/L maya özütü, 10 g/L pektin, 1,5 g/L NaCl, 2 g/L K₂HPO₄, 0,1 g/L MgSO₄.7H₂O) hazırlanmıştır. Enzim üretimine sıcaklık, pH, pektin konsantrasyonu, karbon ve azot kaynaklarının etkisi belirlenmiştir. Sıcaklığın belirlenmesi için 25, 30, 33, 37 ve 40 °C'de inkübasyonlar yapılmıştır. pH etkisinin belirlenmesi için bazal besiyerinin başlangıç pH'sı, 7, 8, 9, 10 ve 11'e ayarlanarak 33 °C'de 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Pektin konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi için besiyerine 2, 5, 10, 15 ve 20 g/L oranlarında pektin eklenmiştir. Besiyerinde kullanılan pektin yerine gam arabik, sakkaroz, glukoz, früktoz, nişasta ve laktoz eklenerek üretimler gerçekleştirilerek karbon kaynaklarının etkisi belirlenmiştir. Farklı azot kaynaklarının etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmada ise maya özütü yerine aynı oranda yağsız süt tozu, sarı mercimek unu, soya unu, pepton, kazein ve amonyum sülfat eklenmiştir. Inkübasyonlar sonrasında alınan örnekler 10000 rpm'de santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüş ve süpernatantta enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Enzim aktivitesi tayini için pektin içeren tampon çözeltisinde enzim eklenerek 50 °C'de 30 dakika inkübe edilmiş süre sonunda oluşan indirgen şeker miktarı DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enzim üretiminin en yüksek olduğu sıcaklık 33 °C, pH 9, 20 g/L pektin varlığında olmuştur. Karbon kaynaklarında en iyi olanın pektin olduğu belirlenmiş olup bunu laktoz takip etmiştir. Azot kaynaklarından ise en etkili olanın maya özütü olduğu belirlenmiştir. Ayrıca enzimin optimum sıcaklığı ve pH'ı da belirlenmiştir. Enzimin optimum pH'ı 12, sıcaklığı ise 70 °C olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile Van Gölü'nden izole edilen ve pH 12 gibi ekstrem koşullarda aktivite gösteren poligalakturonaz enzimi üretimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında enzimin uygulama alanları ile ilgili çalışmalar ileride gerçekleştirilebilir.



INVESTIGATION OF POLYGALACTURONASE ENZYME PRODUCTION BY *BACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES

SUMMARY

Pectic substances, together with other structural components, are found in the cell wall of the plant and are among the basic compounds that give rigidity to tissues. The function of pectic substances is to provide structural integrity to the cell and make them cohesive. They are mainly composed of D-galacturonic acid units bound by $\alpha(1-4)$ glycosidic bonds in which some hydroxyl groups are methylated. These molecules are classified based on their esterification levels or carboxylic groups. If 75% of the carboxylic acids are methylated, it is called pectin, if less than 75% is methylated, it is called pectic acid, and if there is no methyl esterification, it is called polygalacturonic acid. Pectin is the general name of these groups.

Pectinases are generally the name given to a group of enzymes that have the ability to catalyze pectic compounds through depolymerization (hydrolases and lyases) and deesterification (esterases) reactions. Pectinases are classified according to the substrate they act on, the way they break down the substrate they act on, and whether the enzyme breaks down sequentially or randomly. Polygalacturonases are enzymes belonging to the pectinase family and catalyze the breakdown of polygalacturonic acid into monomers or dimers. Pectinases, which have a 25% share in the global enzyme market, have an important place in the food industry. Areas of use include clarification of fruit juices, tea and coffee fermentation, textile and paper industry. Although many plants are sources of polygalacturonase, microbial-derived enzymes are preferred in industry today due to their ease of production, economical and sustainable nature. Molds, yeast and bacteria can be used in the production of polygalacturonase, and mold-based enzymes are mostly produced. In recent years, there has been a trend towards bacterial enzymes due to their superior properties such as high temperature application and resistance to alkaline and acid conditions.

In this study, the polygalacturonase enzyme production from alkaline *Bacillus* isolates isolated from Lake Van was investigated and the best enzyme producer isolate was selected for further studies at which the enzyme production conditions of this isolate were optimized. A total of 25 isolates were tested in the study. They were grown on agar medium containing pectin at 33 °C for 24. At the end of the incubation period, Petri dishes were covered with Iodine solution and they were observed for the formation of transparent zones around the colonies. The isolate having the highest zone that was coded as VGA7, was selected for further studies. The isolate was maintained in nutrient broth containing 25% glycerol, and the activation of the bacterium was performed on nutrient agar plates followed by nutrient broth at 33 °C for 24 hours. Volume of inoculation was 5% made from the active culture into the production medium. In the enzyme production studies, a basal medium containing 10 g/L yeast extract, 10 g/L pectin, 1.5 g/L NaCl, 2 g/L K₂HPO₄, 0.1 g/L MgSO₄·7H₂O was used. The subsequent tests were performed by making slight modification on that medium. The effects of temperature, pH, pectin concentration, carbon and nitrogen sources on

the enzyme production were determined. In order to determine the effect of temperature on the enzyme production, incubations were carried out at 25, 30, 33, 37 and 40 °C for 24 hours. The effect of pH on the enzyme production was performed by adjusting the initial pH of the basal medium to 7, 8, 9, 10 and 11 by using 2 N HCl or 2 N NaCl and incubation was carried out for 24 hours at 33 °C. To determine the effect of pectin concentration, pectin was added to the basal medium at rates of 2, 5, 10, 15 and 20 g/L and incubations were performed at 33 °C for 24 hours. The effect of carbon sources was determined by adding pectin with gum arabic, sucrose, glucose, fructose, starch and lactose instead of pectin used in the basal medium. In the study conducted to determine the effect of different nitrogen sources, the same amount of skim milk powder, yellow lentil flour, soy flour, peptone, casein and ammonium sulfate was added instead of yeast extract. The samples taken after the incubations were centrifuged at 10000 rpm to precipitate the cells and enzyme activity was determined in the supernatant. For enzyme activity determination, enzyme was added to the glycylglycyl-NaOH buffer solution (pH 10) containing pectin and incubations were performed at 50 °C for 30 minutes. At the end of the incubation 2 mL DNS solution was added to stop the reaction and also to apply DNS reducing sugar determination method to detect the amount of reducing sugars generated by the enzyme. The reducing sugar amount was determined as galacturonic acid and for this a standard curve was constructed using galacturonic acid.

According to the results, enzymatic activity was observed at the the temperatures studied, however the highest activity (1.95 U/mL) was detected when the temperature was 33 °C, and the lowest (1.61 U/mL) was at 25 °C. At the higher temperatures the the activity was high enough which was 1.89 U/mL at 40 °C. The pH studies showed that the enzyme was highly alkaline which had lower activity at pH 7 and it increased significantly with increasing pH. The highest enzyme activity was obtained when the initial pH of the medium was 9 (1.93 U/mL), while the minimum was at pH 7 (1.33 U/mL). Effect of pectin concentration studies showed that enzyme activity increased with the increasing pectin concentration and the highest activity was observed at 20 g/l pectin concentration, however, the increase in the activity with concentration was not statistically significant. Regarding the effects of various carbon sources on the enzyme production, all the tested carbon sources led to enzyme production in a range between 1.52 and 1.95 U/mL. The highest enzyme activity was detected with pectin. In addition, enzymatic activity with lactose as substrate was also high and those with glucose, sucrose, fructose and starch were statistically similar. Among the nitrogen sources tested yeast extract was found to be the best one for the production of enzyme and the lowest enzyme activity were obtained with pepton. Natural nitrogen sources including skim milk powder, soy bean flour and lentil flour had also promising enzymatic activities that had 75.3 to 81% relative activity compared to yeast extract. These results indicated that natural nitrogen sources which cheaper and easily available can be evaluated in future studies. Ammonium sulfate was tested as inorganic nitrogen source and it had 67.1% relative activity compared to yeast extract.

Additionally, optimum temperature and pH of the enzyme were also determined. To determine the optimum temperature enzymatic activities were determined at 30, 40, 50, 60, 70, and 80 °C. The lowest activity was found at 30 °C and it increased as the temperature was increased up to 70 °C which was determined as the optimum. On the other hand at 80 °C, the activity started to decrease. The optimum pH of the enzyme was determined by preparing the substrate (pectin) in various buffer solutions [Citrate buffer (pH 4, 5, 6), Tris-HCl buffer (pH 7, 8, 9), and glycylglycyl-NaOH buffer (pH 10, 11,

12)]. Enzymatic activity analysis were performed using the mentioned buffer at 50 °C for 30 minutes and reducing sugars generated by the enzyme was determined with DNS method. The activity was lowest at pH 4 and it increased with increasing pH values. The highest enzymatic activity was obtained at pH 12. This study showed that the enzyme is extremely alkaline. As a result, it was shown that a novel *Bacillus* sp. VGA7 isolated from Lave Van was a good source of extremely alkaline polygalacturonase enzyme. In the light of the information obtained, studies on the application areas of the enzyme can be carried out in the future.





1. GİRİŞ

1.1. Tezin Kapsamı

Enzimler canlı organizmaların hücrelerinde bulunan son derece verimli aynı zamanda da çevre dostu protein katalizörlerdir. Girdikleri reaksiyonları hızlandırırken bu reaksiyonlar sonucunda kendileri değişmeden çıkabilmektedirler (Haile ve Ayele, 2022). Endüstrinin birçok alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Tanımlanan 2000'den fazla enzimin 100'ü ticari olarak kullanılmaya uygun bulunmuştur. Ancak günümüzde bunların yalnızca 18'i endüstriyel çalışmalarda kullanılmak amacıyla üretilmektedir (Uzuner ve Çekmecelioğlu, 2016). Kimyasal katalizörlerle karşılaştırıldıklarında öne çıkan avantajları bulunmaktadır. Enzimlerin yüksek katalitik etkinliği, ayarlanabilir aktivite özelliği ve yüksek özgüllükleri büyük avantaj sağlamaktadır. Bu da enzimlerin farmasötik, kimya ve gıda endüstrisinde kullanımlarını önemli ölçüde teşvik etmektedir (Bashir ve ark., 2018; Haile ve Ayele, 2022).

Enzimler 19. yy'ın ortalarında keşfedilmiş ve endüstriyel uygulamalarda ilk olarak Dr. Jokichi Tokomire (1894-1914) tarafından tanıtılmıştır. Başlangıçta fungal enzimler tanıtılmış ve bundan ancak 20 yıl sonra Boidin ve Effrant bakteriyel enzimleri endüstriye sunmuşlardır. Endüstriyel süreçlerde kullanılan kimyasalların çevre kirliliğinin önemli sebepleri arasında yer almaları çevre dostu alternatif arayışlarına hız kazandırmıştır. Birçok hücre dışı mikrobiyal enzimin çevre dostu oluşu ve endüstriyel alanlarda kullanıma uygun olmaları enzimleri ön plana çıkarmıştır (Tabssum ve Ali, 2018). Endüstriyel bağlamda, enzimlerin kullanım alanları yiyecek, içecek, tekstil, deterjan, hayvan yemi üretimi, kozmetik, kâğıt endüstrisi ve tıp olarak sıralanabilir (Saha ve ark., 2009). Lakkaz, glukoamilaz, rennin, alfa amilaz, selüloz, ksilanaz, proteaz, lipaz ve pektinazlar biyoteknolojik öneme sahip enzimlerdir (Polaina ve MacCabe, 2007). Endüstriyel enzim pazarının yaklaşık olarak %50'sini gıda ve içecek sektöründe kullanılan enzimler oluşturmaktadır (Alkorta, Garbisu ve ark., 1998).

Enzimler hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilmektedir. Ancak günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır (Doğan, 2008). Endüstriyel enzim taleplerine bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerin yetersiz kalması, bu alandaki ilginin giderek mikrobiyal enzimlere doğru kaymasına neden olmuştur. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilik ve genetik adaptasyon kabiliyetleri açısından mükemmel birer enzim kaynağı olarak göz önünde bulundurulmaktadır (Rao ve ark., 1998). Endüstriyel kullanım için üretilen enzimlerin büyük çoğunluğu, mikroorganizmalardan elde edilmektedir; bu oran yaklaşık %90'dır (Gözükara, 2009). Mikrobiyal enzimlerin tercih edilmesinin sebepleri arasında, diğer enzimlere göre daha yüksek katalitik aktiviteye sahip olmaları, daha dayanıklı ve maliyet açısından avantajlı olmaları, istenmeyen yan ürünleri ortaya çıkarmamaları ve yüksek miktarlarda üretilibilmeleri bulunmaktadır (Horikoshi, 1999; Nameed ve ark., 2007). Endüstride geniş bir kullanım alanına sahip olan enzimler arasında, *Bacillus* cinsine ait tür ve alt türler tarafından üretilen ondan fazla enzim bulunmaktadır (Lin ve ark., 1998; Kumar ve Takagi, 1999).

Pektik maddeler, bitkinin hücre çeperinde diğer yapı bileşenleriyle birlikte bulunur ve temel birleşiklerdendir; bu bileşikler, dokulara sertlik sağlar (Jayani ve ark., 2005). Pektik maddelerin görevi hücreye yapısal bütünlük kazandırmak ve onları kohezyonlu hale getirmektir (Tabssum ve Ali, 2018). Genel olarak, farklı nötralizasyon derecelerine sahip olan, su içinde çözünebilen, farklı metil ester oranlarına sahip ve uygun koşullarda jelimsi bir yapı oluşturan pektin, bitkisel kaynaklı bir stabilizatördür. Bu madde, tüm meyve ve sebzelerde çeşitli miktarlarda ve özelliklerde bulunabilir. Özellikle tarımsal endüstri atıkları (domates kabuğu, muz kabuğu, mango kabuğu, ayçiçeği tablası, turuncgil kabuğu, elma posası, şeker pancarı küspesi) yüksek oranda pektik maddeler içermektedir (Gee ve ark., 1958; akt. Arslan, 1994). Endüstriyel işlemlerde meyve sebze suyu eldesinde, kahve fermanstasyonu gibi işlemler sırasında açığa çıkan pektinin oluşturduğu jelimsi yapı, bulanıklık istenmeyen durumlardandır. Bu sebeple pektinin parçalanması ve jelimsi yapının giderilmesi pektini parçalayan poligalakturonaz enzimi ile mümkün olmaktadır.

Poligalakturonazlar endüstriyel işlemlerin vazgeçilmez parçalarındandır. İlk kez 1930 yılında alkol ve içecek endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır (Oslen, 2000; Majumder ve ark., 2020). Mikrobiyal kökenli pektinolitik enzimler, küresel gıda enzimleri piyasasında %25'lik bir pazar payına sahiptir (Alkorta, Garbisu ve ark.,

1998). Meyve sularının özütlenmesi ve saflaştırılması, çay ve kahve fermentasyonu, tekstil ve kâğıt endüstrisinde uygulama alanı bulmaktadır (Amin ve ark., 2021). Pektinazlar alkali ve asidik olabilirler. Alkali pektinazlar pektin içeren sebzelerin işlendiğı atık su arıtımında kullanılırken; asidik pektinazlar, meyve suyu ve içecek endüstrisinde saflaştırma ve berraklaştırma amacıyla kullanılmaktadır.

1.2. Tezin Amacı

Başta gıda endüstrisi olmak üzere birçok endüstriyel süreçte kullanım olanağı olan ve endüstriyel enzim pazarında yüksek bir paya sahip olan poligalakturonaz enziminin yerel kaynaklardan izole edilen *Bacillus* izolatları tarafından elde edilmesini incelemek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda Van Gölü'nden izole edilmiş olan 25 adet izolatın poligalakturonaz üretimleri araştırılarak en iyi üretici izolat (*Bacillus* sp. VGA7) seçilmiş ve üretim koşullarının (sıcaklık, pH, besiyeri kompozisyonu) optimizasyonu yapılmıştır.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Enzimler

Enzimler, diğer adıyla biyokatalizörler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ve (katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu dışında) kimyasal reaksiyonların başlamasını, hızlanmasını ve yan ürün oluşturmada %100 verimle çalışabilen protein yapısındaki moleküllerdir. Ayrıca, girdikleri reaksiyondan yapısı bozulmadan çıkabilirler (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Bülbül, 2014; Kuddus, 2019). Normalde yavaş ilerleyen bir kimyasal reaksiyonu hızlandırmak amacıyla enzimler, 100 milyon ile 10 milyar kat arasında bir hız artışı sağlayabilir (Gurung ve ark., 2013). Enzimler, literatüre göre 5000'den fazla biyokimyasal reaksiyonu katalize etmektedir. Kimyasal katalizörler gibi, enzimler de aktivasyon enerjisini azaltarak reaksiyon hızını artırırlar, bu da ürünlerin daha hızlı oluşmasına ve reaksiyonların daha hızlı bir şekilde kısa sürede denge durumuna ulaşmasına neden olur (Kuddus, 2019). Katalizör kullanmadan normal şartlarda yüzyıllar boyunca sürececek olan reaksiyonlar enzim kullanımıyla dakikalar içinde gerçekleştirilebilmektedir. Canlı hücrelerde sentezlenmeleri ve aktivite göstermelerinin yanı sıra invitro koşullarda çalışabilmeleri enzimlerin endüstriyel süreçlerde kullanımını kolaylaştırmıştır (Wiseman, 1987; Cornish-Bowden, 2014).

Enzimlerin eldesi için uzun bir süre bitki ve hayvan kaynakları kullanılmış olmasına rağmen, günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan ticari enzim preparatlarının çoğunluğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bu sayede daha büyük ölçekte, daha düşük maliyetli ve verimli enzim üretimi sağlanmaktadır. Enzim endüstrisinin %90'ı bakteri, küf ve mayaların yer aldığı üretilere dayanmaktadır (Patel ve ark., 2017; Guerrand, 2018). Küresel enzim pazarında endüstriyel enzimler 2018 yılında 9,3\$'lık bir pazar hacmine sahipken bu miktarın 2025 yılına kadar her yıl %7,1'lik bir artış sağlayacağı düşünülmektedir (Liu ve Kokare, 2017).

2.1.1. Enzimlerin sınıflandırılması

Enzim substratın ürüne dönüşüm oranını hızlandırmaktadır. Enzimlerin molekül ağırlığı 10 kDa ile 2000 kDa arasında değişen makromoleküllerdir. Peptit bağları ile

birbirlerine bağlanmış aminoasitlerden oluşmaktadır (Okpara, 2022). Enzimlerin aktif bölgeleri bir enzimin substrat için özgülüğünü belirleyen bölgedir ve belirli bir enzimi diğerlerinden benzersiz kılar. Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB)'nin oluşturduğu Enzim Komisyonu (EC) tarafından 3000'den fazla tanımlanmış enzimin adlandırılması, sınıflandırılması ve numaralandırılmasının temelleri oluşturulmuştur (Doja ve Treska, 2015). Tüm enzimlere bir EC numarası verilmektedir (Okafor, 2007). Her enzimin bir numarası vardır ve her numara 4 rakamdan oluşmaktadır (Şekil 2.1). Bu da enzim tarafından katalizlenen tepkimeyi temsil etmektedir (Cox ve Nelson, 2005).

EC	A	B	C	D
Enzim komisyonu	Esas sınıf	Alt sınıf	Grup	Enzimin kendine özgü sıra numarası

Şekil 2.1. EC kodlardaki rakamların temsil ettiği gruplar.

Katalize ettikleri reaksiyonların türüne göre sınıflandırma yapıldığında bugün itibariyle 7 enzim sınıfı bulunmaktadır.

Oksidoredüktazlar (EC1): Substratın oksidasyonunu veya indirgenmesini katalize eden gruptur. Örnekleri redüktaz, oksidaz, peroksidaz enzimleridir.

Transferazlar (EC2): Belirli bir fonksiyonel grubun bir molekülünden başka bir moleküle transferini katalize eden gruptur. Örnekleri peptidiltransferaz, transaminaz, asetiltransferaz enzimleridir.

Hidrolazlar (EC3): Suyu kullanarak büyük moleküllerin parçalanmasını katalize eden gruptur. Örnekleri proteaz, peptidaz, amilaz enzimleridir.

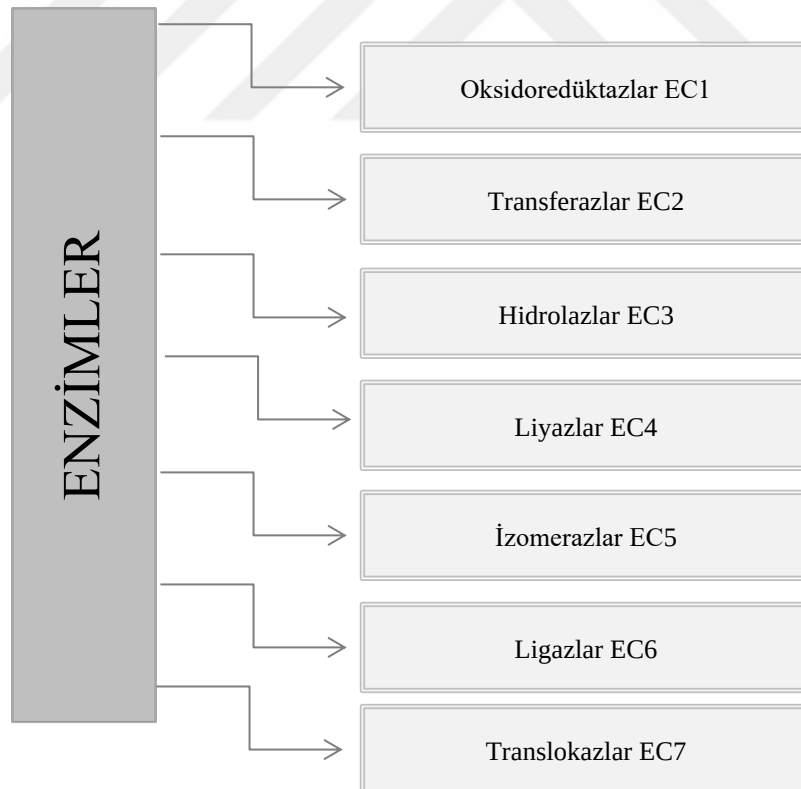
Liyazlar (EC4): Eliminasyon reaksiyonlarını katalize etmek için hidroliz veya oksidasyon gerektirmeyen enzim grubudur. Örnekleri dekarboksilaz, aldehit liyaz, pektoliyaz enzimleridir.

İzomerazlar (EC5): Molekül içi kırılmayı ve bağ oluşumunu katalize eden grup, ana molekülü izomerik formuna dönüştüren gruptur. Örnekleri rasemaz, epimeraz, cis-trans izomeraz enzimleridir.

Ligazlar (EC6): enerji bakımından zengin herhangi bir fosfat bağından elde edilen enerjiyle yeni kimyasal bağlar veya yeni moleküller oluşturmak için moleküllerin birleşmesini katalize eden gruptur. Örnekleri sentetaz, şelat, DNA ligaz enzimleridir.

Translokazlar (EC7): EC tarafından 2018'de sınıflandırılmış yeni bir gruptur. İyonların veya moleküllerin zarlar boyunca translokasyonunun katalize eden gruptur. Örnekleri kanitin-açil karnitin translokaz, ADP/ATP translokaz enzimleridir (Okpara, 2022).

Şekil 2.2.'de enzim sınıfları ve EC kodlarının beraber gösterildiği şekil verilmiştir.

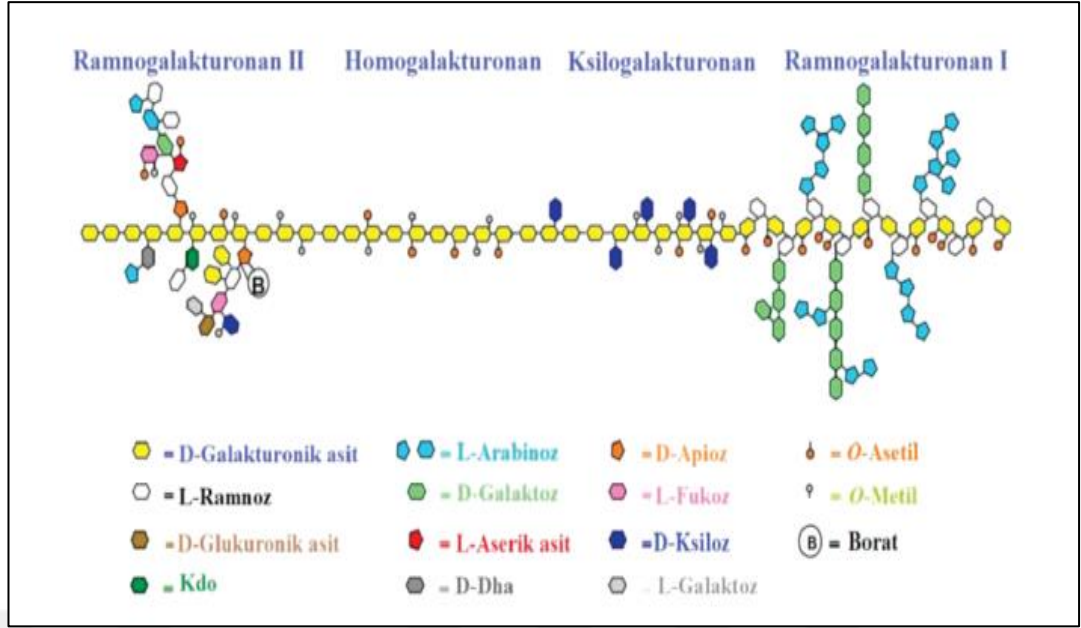


Şekil 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması ve EC kodları.

2.2. Pektik Maddeler ve Moleküler Yapıları

Pektin birkaç hidroksil grubunun metillendiği $\alpha(1-4)$ glikosidik bağlarıyla bağlanan D-galakturonik asitlerden oluşmaktadır (Patidar ve ark., 2020). Pektin bitkilerin hücre duvarında ve orta lamelinde yer alan moleküler ağırlığı yüksek olan biyomoleküllerdir (Amin ve ark., 2021). Mangin (1888), bitki hücrelerinin orta lamelinde pektin varlığını ilk keşfeden bilim insanıdır (Bonner 1936). Pektik maddelerin araştırılması için yapılan ilk çalışmalar, rutenyum kırmızısı ile boyama yöntemine dayanmaktadır; bu boya, pektik maddelere ve proteinlere karşı dirençli katyonik bir boyadır. Buna ek olarak, bitkilerde pektinin yerini belirlemek için in situ hidroksamik asit testi de yaygın olarak kullanılan yöntemler arasındadır (McCready ve Reeve 1955). Yine de hücre duvarının ince yapısının detaylı olarak incelenmesi, ancak elektron mikroskobu çalışmalarıyla mümkün olmuştur (Frey-Wyssling, 1948).

Pektin yapısı üç ana pektik grubundan oluşmaktadır. Pektinin yaklaşık %65'i, Homogalakturonan (HG) olarak bilinen $\alpha(1,4)$ bağlı D-galakturonik asitlerin homopolimeridir. Kısmi metil esterifikasyonun altıncı konumda gerçekleşmesi, O_2 ve O_3 konumlarından daha az asetillenmiş Homogalakturonan (HG) meydana getirir. Rhamnogalacturonan–II, (RG-II) bir oktasakaritin yan zinciri ile değiştirilmiş bir HG temel yapısına sahiptir. Bu temel yapı üzerinde O_3 'e bağlı bir O_2 veya bir disakkarit tarafından bağlanmış bir monosakarit bulunmaktadır. RG-II, pektinin %10'unu oluşturur ve RG-I ile kıyaslandığında yapısal olarak daha karmaşık ve korunmuş bir yapıya sahiptir (Mohnen, 2008). RG-I ise pektinin %20-25'ini temsil eder. RG-I, yüksek asetillenmiş (O_2 veya O_3) galakturonik asit kalıntılarını tekrarlayan bir yapıya sahiptir. Yapısal veriler, HG, RG-I ve RG-II'nin hücre duvarında bir araya gelerek kovalent bağlarla birbirine bağlı bir pektin yapısı oluşturduğunu göstermektedir (Venkatanagaraju ve Divakar, 2017). Homogalakturonanlar, metil esterlenmiş ve/veya açillenmiş D-galakturonik asit monomerlerinden oluşan pektinlerin lineer polimerlerdir. Ayrıca bu moleküller esterleşme seviyeleri ya da karboksilik gruplar temel alınarak sınıflandırılmaktadır. Pektin karboksilik asitlerin %75'inin metillenmiş haline verilen isimdir. Karboksilik asitlerin %75'ten azı metillenmişse pektik asit, metil esterleşmesi yoksa poligalakturonik asit olarak adlandırma yapılmaktadır (Namasivayon ve ark., 2011). Şekil 2.3.'te pektik maddelerin temel yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Pektik maddelerin temel yapısı (Venkatanagaraju ve Divakar, 2017).

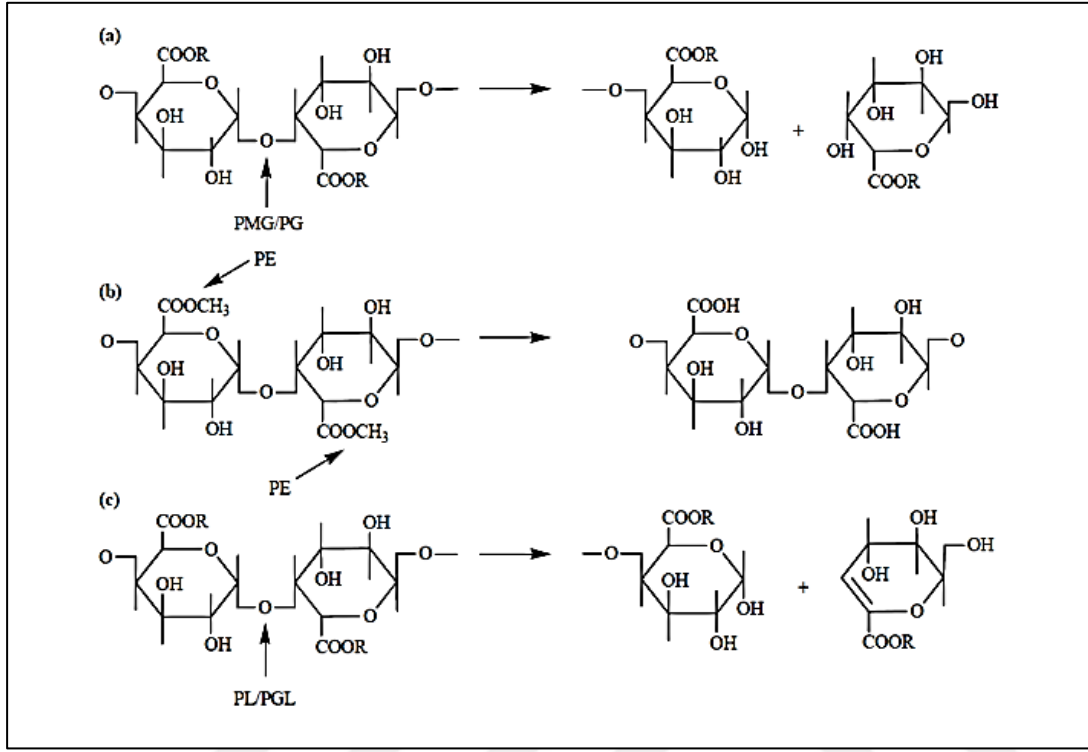
Pektinazlar endüstriyel işlemlerin vazgeçilmez parçalarındandır. İlk kez 1930 yılında alkol ve içecek endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır (Oslen, 2000; Majumder ve ark., 2020). Mikrobiyal kökenli pektinolitik enzimler, küresel gıda enzimleri piyasasında %25'lik bir pazar payına sahiptir (Alkorta, Garbisu ve ark., 1998). Meyve sularının özütlenmesi ve saflaştırılması, çay ve kahve fermentasyonu, tekstil ve kâğıt endüstrisinde uygulama alanı bulmaktadır (Amin ve ark., 2021).

Mikrobiyal pektinazlar, bitki hücre duvarlarında pektinin parçalanmasını katalize etmektedir. Bakteri, mantar ve bitkilerde en yaygın bulunan enzimlerden biri olarak bilinmektedir (Jayani ve ark., 2005). Pektinazlar, depolimerizasyon (hidrolazlar ve liyazlar) ve deesterifikasyon (esterazlar) reaksiyonları yoluyla pektik bileşikleri katalize edebilen bir enzim grubunu ifade eder (Uyar ve Güvenmez, 2020). Pektik enzimler etki mekanizmalarına göre poligalakturonaz (PG), pektin metilesteraz (PE), pektat liyaz (PEL) olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3. Pektinazlar (EC 3.2.1.15) ve Etki Mekanizmaları

Hücre duvarlarının oluşumunda kilit bir rol oynayan pektinazlar, çekirdeği selüloz ve hemiselülozla tamamlayarak bitkisel dokuların sağlam bir hücresel yapı kazanmasına katkıda bulunurlar. Pektinazlar hidrolaz grubuna dahil olan enzimlerdendir (Fratesbianchi ve ark., 2018; Konak ve ark., 2012). Aynı zamanda, meyve ve sebzelerin doğal olgunlaşma sürecinde pektinazlar, pektik materyallerin modifikasyonunda

önemli bir rol oynamaktadır. Pektik bileşenler, glikozidik bağlara yönelik etki mekanizmalarına bağlı olarak farklı sınıflara ayrılmaktadırlar (Nakkeeran ve ark., 2012). Pektinaz grubunun etki mekanizmaları Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Pektinazların etki mekanizması (a) PG için R=H ve PMG için R=CH₃; (b) PE; (c) PGL için R=H ve PL için R=CH₃. Oklar enzimlerin etki ettiği yeri göstermektedir. PMG, polimetilgalakturonaz; PG, poligalakturonaz (EC. 3.2.1.15); PE, pektinesteraz (EC. 3.1.1.11).

2.4. Pektinazların Sınıflandırılması

Mikrobiyal pektinazlar, bitki hücre duvarlarında pektinin parçalanmasını katalize etmektedir. Bakteri, mantar ve bitkilerde en yaygın bulunan enzimlerden biri olarak bilinmektedir (Jayani ve ark., 2005). Pektinazlar, pektik bileşiklerin depolimerizasyonu ve deesterifikasyonu yoluyla çeşitli reaksiyonları katalize edebilen özel bir enzim sınıfını temsil eder. Pektinazlar etki gösterdiği substrata, etki ettiği substratı parçalama yoluna, enzimin parçalamayı sırası ile ya da rastgele yapmasına göre sınıflandırılmıştır (Uyar ve Güvenmez, 2020). Pektinolitik enzimlerin ayrıntılı sınıflandırması aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 2.1). Homogalakturonik asit zincirlerini parçalama kapasitesiyle bilinen pektinolitik enzimler, pektin yıkımında rol almaktadır. Pektinazlar üç gruba ayrılır (Palomäki ve Saarilahti, 1997; Jayani ve ark., 2005).

2.4.1. Poligalakturonaz (PG)

α (1-4) bağlarını hidrolitik olarak parçalama yeteneğine sahip enzimdir. Poligalakturonazın endo ve ekzo olarak iki tipi mevcuttur. Ekzo-poligalakturonazlar, PGA zincirinin indirgeyici olmayan ucundan başlayarak, monomerleri veya dimerleri serbest bırakma yeteneğine sahiptir. Ekzo-PG endüstride filtrasyon, sıvılaştırma, ekstraksiyon ve berraklaştırma gibi işlemlerde kullanımıyla öne çıkmaktadır. Endo-poligalakturonaz ise rastgele etki göstermektedir (Jacob ve Prema, 2006). Çözünmeyen protopektini çözündürme yeteneğine sahip olan endo-PG maserasyonda etkili rol oynamaktadır. Pektin esterazlar ve endo-pektinliyazlar ile birleştirilen poligalakturonazlar, yüksek oranda metillenmiş pektinlerin etkili bir şekilde parçalanmasını sağlamaktadır (Sharma ve ark., 2013). Poligalakturonazlar düşük viskozite sağladıkları için meyve suyu ekstraksiyonunda kullanılarak preslemeyi kolaylaştırırken su bağlama kapasitesini arttırmakta ve meyve suyu verimine katkıda bulunmaktadır (Mantovani ve ark., 2005).

2.4.2. Pektin metilesteraz (PE)

Pektin metilesteraz metilester gruplarını parçalayarak pektini deesterifiye eden pektinaz grubudur. Esterleşmiş pektinin demetilasyonunu katalize etmektedir. Bu özelliğiyle pektinin esterleşme derecesini düşürmektedir. Bu sayede yüksek metoksilli pektini düşük metoksilli pektine dönüştürmektedir (Ortega ve ark., 2004).

2.4.3. Pektat liyaz (PEL)

β -eliminasyon ile esterleşmemiş galakturonat birimlerinin parçalanmasını sağlamaktadır. Pektat liyazın endo ve ekzo olmak üzere iki türü bulunmaktadır (Jacob ve Prema 2006).

2.4.4. Pektin liyaz (PNL)

β -eliminasyon ile esterleşmiş galakturonat birimlerinin parçalanmasını sağlamaktadır. Elma, mango gibi meyvelerden elde edilen meyve sularının üretiminde renk ve bulanıklığın sabitlenmesi ve bitki dokularının maserasyonunda kullanılmaktadır (Mantovani ve ark., 2005).

Tablo 2.1. Pektinolitik enzimlerin ayrıntılı sınıflandırılması (Jayani ve ark., 2005).

Enzim	EC no	Modifiye EC sistematik adı	Hareket mekanizması	Hareket yolu	Birincil substrat	Ürün
Esteraz						
Pektin metil esteraz	3.1.1.11		Hidroliz	Random	Pektin	Pektik asit + metanol
Depolimerize enzimler						
a. Hidrolazlar						
1. Protopektinaz			Hidroliz	Random	Protopektin	Pektin
2. Endopoligalakturonaz	3.2.1.15	Poli-(1-4)- α -D-galaksiduronat glikanohidralaz	Hidroliz	Random	Pektik asit	Oligogalakturonatlar
3. Ekzopoligalakturonaz	3.2.1.67	Poli-(1-4)- α -D-galaktosiduronat glikanohidralaz	Hidroliz	Terminal	Pektik asit	Monogalakturonatlar
4. Ekzopoligalakturonan-digalakturono hidrolaz	3.2.1.82	Poli-(1-4)- α -D-galaktosiduronat digalakturonohidralaz	Hidroliz	Sondan bir önceki bağlar	Pektik asit	Digalakturonatlar
5. Oligogalakturonat hidralaz			Hidroliz	Terminal	Trigalakturonat	Monogalakturonatlar
6. Δ 4:5 Doymamış oligogalakturonat hidralazlar			Hidroliz	Terminal	Δ 4:5 (Galakturonat)	Doymamış monogalakturonatlar & doymuş (n-1)
7. Endopolimetil-galakturonazlar			Hidroliz	Random	Çok esterlenmiş pektin	Oligometilgalakturonatlar
8. Endopolimetil-galakturonazlar			Hidroliz	Terminal	Çok esterlenmiş pektin	Oligogalakturonatlar
b. Liyazlar	4.2.2.2	Poli-(1-4)- α -D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Random	Pektik asit	Doymamış oligogalakturonatlar
1. Endopoligalakturonaz liyaz	4.2.2.9	Poli-(1-4)- α -D-galaktosiduronat ekzoliyaz	Trans-eliminasyon	Sondan bir önceki bağlar	Pektik asit	Doymamış digalakturonatlar
2. Ekzopoligalakturonaz liyaz	4.2.2.6	Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	Trans-eliminasyon	Terminal	Doymamış digalakturonatlar	Doymamış monogalakturonatlar
3. Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	4.2.2.10	Poli (metil galaktosiduronat) liyaz	Trans-eliminasyon	Random	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)	Doymamış metiloligogalakturonatlar
4. Endopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz			Trans-eliminasyon	Terminal	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonatlar)	Doymamış metilmonogalakturonatlar
5. Ekzopolimetil-D-galaktosiduronat liyaz						

2.4.5. Mikrobiyal pektinazların üretimi ve kullanılan mikroorganizmalar

Bitkisel ve hayvansal kaynaklardan enzim üretimi mikrobiyal kaynakların kullanımına göre oldukça düşüktür ve enzim üretiminin sadece %15'i bitkisel veya hayvansal kökenlidir (Anisa ve Girish, 2014). Endüstriyel enzimlerin yarısından fazlasını funguslar ve mayalar oluşturur; özellikle *Aspergillus* türleri gibi iplikli yapıya sahip funguslar enzim üretiminde öncelikli tercih edilen mikroorganizmalardandır. Örneğin; en iyi pektinaz üretici mikroorganizma kaynaklarından biri olarak *Aspergillus niger* bilinmektedir. *A. niger* dışında mikrobiyal pektinaz üretimi yapmak amacıyla en fazla tercih edilen fungal mikroorganizmalar ise *A. versicolor*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer*, *Mucor racemosus*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium jensenii*, *Penicillium citrinum* ve *Trichoderma viride* şeklinde sıralanabilir (Rebello ve ark., 2017). Bazı *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerine ait yapılan çalışmalarda elde edilen pektinaz üretim koşullarıyla ilgili veriler Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Bakteriyel kaynaklar da mikrobiyal enzim üretiminde önemli bir paya sahiptir ve enzim üretiminin %35'ini oluşturmaktadır. Bakteriler mikrobiyal kaynaklar arasında önemli bir paya sahiptir. Endüstriyel ölçekli enzim üretimindeki verimliliği sebebiyle araştırmacıların bakteriyel türler üzerindeki çalışmaları yoğunlaşmıştır ve ticari enzimlerin üretimi için kapsamlı araştırmalar yapılmasına sevk etmiştir (Garg ve ark., 2016; Amin ve ark., 2019).

Pektinaz meyve ve sebzelerin olgunlaşma süreçlerinde doğal olarak bulunmaktadır. Ancak bitkisel materyallerden pektinaz elde edilmesi mevsimsel sınırlamaların olması ve zayıf biyokimyasal özellikleri dolayısıyla mikrobiyal kaynakların daha fazla ön plana çıkmasına neden olmuştur. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı üretimlerin dezavantajlarının yanında mikrobiyal kaynakların kullanımıyla enzim üretiminin sağladığı avantajlar oldukça fazladır. Endüstriyel alanlarda kullanılmak üzere farklı sektörlerin gereksinim duyduğu özelliklere sahip enzimlerin üretimi mikrobiyal kaynakların kullanımıyla mümkün hale gelmektedir. Bakım ve üretim kolaylığı, diğer kaynaklarla kıyaslandığında daha az yan ürün açığa çıkarıyor olmaları, yüksek aktivite eldesi, daha ekonomik oluşları ve yüksek stabilite özellikleri sayesinde mikrobiyal kaynaklar günümüzde daha çok tercih edilir hale gelmektedir. Aynı zamanda büyük ölçekli üretim kapasitesi ve yüksek saflıkta üretilebilirlikleri enzim kullanımına ihtiyaç duyulan bir çok çalışma alanını mikroorganizma kaynaklı enzim üretimine yöneltmiştir. Bunun yanı sıra özellikle mikrobiyal pektinazlar için değerlendirme

yapılacak olursa çok yönlü özelliklere sahip olmaları, çok çeşitli substrat kullanımlarına uygun olmaları ve aynı zamanda da birden fazla pektik maddeye etki edebilme kabiliyetleri sayesinde biyoteknolojik olarak değerlendirildiğinde büyük bir potansiyeli barındırmaktadırlar (Coşkun, 2010; Horikoshi, 1999).

Tablo 2.2. Farklı fermantasyon koşullarında pektinaz üretimleri.

Mikroorganizma	Pektinaz türü	Substrat	FT*	Sonuç	Kaynak
<i>Bacillus subtilis</i> ZGL14	Alkali pektinaz	Glukoz	Sıvı	~ 52,37 U/mg	Yu ve ark., 2017
<i>Penicillium notatum</i>	Ekzo-PG	Buğday kepeği	Sıvı	~ 110 U/gds	Amin ve ark., 2017
<i>Aspergillus fumigatus</i> R6	PG	Pirinç kepeği	Katı	565 U/g	Wong ve ark., 2017
<i>Bacillus subtilis</i> strain Btk27	Pektinaz	Buğday kepeği	Katı	2103.3 U/g	Oumer ve Abate, 2017
<i>Bacillus subtilis</i>	Pektinaz	Pektin	Katı	217.4 U/mg	Mercimek Takcı ve Türkmen 2016
<i>Aspergillus terreus</i> NCTF 4269.10	Pektinaz	Muz kabuğu	Katı	6500 U/g	Sethi ve ark., 2016
<i>Aspergillus niger</i>	Pektinaz	Portakal kabuğu	Katı	117.1 U/mL	Ahmed ve ark., 2016
<i>Penicillium notatum</i>	PG	Buğday kepeği	Katı	1129.62 U/gds	Amin ve ark., 2013

*FT: Fermantasyon tipi. **PG: Poligalakturonaz. ***Uluslararası Birim (IU), dakikada bir μ mol galakturonik asidin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak ifade edilmiştir.

Bozulmuş veya çürümüş meyve yapılarından izole edilebilen pektinolitik mikroorganizmalar aynı zamanda topraktan, tarımsal kaynaklı açığa çıkan atıklardan ve hayvanlardan da izole edilebilmektedir. *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Actinomycetes* ve *Streptomyces* pektinaz elde etmek amacıyla kullanılan

önde gelen mikroorganizmalardır (Favela-Torres ve ark., 2006). Yapılan bazı çalışmalarda *Bacillus* türlerinin pektinaz üretim düzeyleri Tablo 2.2’de verilmiştir.

Ticari olarak enzim üretim pazarında mikroorganizmaların kullanımının getirdiği avantajlar şu şekilde sıralanabilir:

- Enzim üretimi için kullanılması amaçlanan mikroorganizmaların izolasyonu teknolojik gelişmelerin ilerlemesiyle beraber daha kolay hale gelmiştir ve izole edilen mikroorganizmalar saf kültürlerde muhafaza edilebilmektedir.
- Enzim üretimi için hammadde olarak endüstriyel atıkların kullanılabilir olması, üretim maliyetini düşürmekte ve hammadde ihtiyacını karşılama zorluğunun olmaması büyük ölçekli enzim üretim ihtiyacını karşılamada kolaylık sunmaktadır.
- Mikrobiyal gelişimin kısa sürede gerçekleşebiliyor olması gerçekleştirilen proseslerin daha ekonomik olmasını sağlamaktadır.
- Besiyeri ortamındaki gelişimlerde hücre dışı yapıların izolasyonu kolay bir şekilde gerçekleştirilirken aynı zamanda hücre içi enzimlerde ise hücrenin parçalanması için tek aşamalı prosesler yeterli olmaktadır.
- Farklı santrifüjleme aşamalarına ya da fraksiyonel izolasyon işlemelerine gerek duyulmamaktadır.
- Endüstride ekstrem koşulları tolere edebilen enzimlerin kullanımına ihtiyaç duyulduğunda mikroorganizma kaynaklı enzim üretimiyle gerekli şartları sağlayan enzimler elde edilebilmektedir.

Tablo 2.3’de bazı termoalkalifil ve alkalifil *Bacillus* türlerinin ürettiği ekstremofilik enzimlerin üretim koşulları (sıcaklık ve pH) üzerine gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilmiş veriler yer almaktadır.

Bacillus’ların tür ve alt türleri tarafından sentezlenebilen ve endüstrinin çeşitli alanlarında kullanım olanağı olan 10’den fazla enzim bulunmaktadır. *Bacillus* cinsine ait bakter çoğunlukla bitkisel atıkların üzerinde ve toprakta yaygın olarak bulunmaktadır. *Bacillus* cinsi bakteriler sentezledikleri proteinleri dış ortama salma kapasitelerinin yüksek oluşundan dolayı endüstriyel açıdan kullanışlı mikroorganizmalar olarak görülmektedir. Aynı zamanda gram negatif bakterilerin insanlar üzerinde toksik etki yaratabilecek endotoksin ve intrasellüler protein

üretmeleri nedeniyle gram pozitif *Bacillus* cinsleri endüstriyel açıdan hem maliyet açısından hemde toksik etki yaratmaması nedeniyle öncelikli tercih olarak yer almaktadır (Boyce ve Walsh, 2007).

Ticari amaçlara yönelik olarak üretilen ve özellikle deterjan endüstrisinde yaygın kullanım olanağı olan termostabil amilaz enzimlerinin üretiminde *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* en çok kullanılan türlerden ikisidir (Horikoshi, 1996; Horikoshi, 1999; Lin ve ark., 1998; Kumar ve Takagi, 1999).

Büyük bir çoğunluğu aerobik (oksijenli) olan *Bacillus* cinsi bakterilerin bazıları ise fakültatiftir. Aerob ve spor oluşturan çubuklar ailesine ait olan *Bacillus*'lar düz vejetatif forma sahip, Gram pozitif (+) bakterilerdir. Uçları yuvarlak veya künt yapıya sahip ve kenarları birbirine paralel olacak şekilde bir görünüme sahiptirler. Vejetatif hücre çapları 0,5- 1,2 µm ile 2,5-10 µm arasında değişen boyutlara sahiptir. Mikroskop altında incelendiğinde görünüm olarak tek tek ya da uzun zincirler şeklinde oldukları belirlenmiştir (Kalkan ve Halkman, 2006). *Bacillus* cinslerinin koloni morfolojisi çeşitlilik göstermekle beraber genelinen beyaz ve krem rengi kolonilere sahip olduğu bilinmektedir. Ancak bazı türlerinde turuncu (portakal rengi), pembe, sarı ve siyah renkli kolonilerde rastlamak mümkündür. *Bacillus* türlerinin tamamı ısıya karşı dayanıklı olmalarının yanı sıra spor üretme yeteneğine de sahiptirler. Bazı türleri dışında (*Bacillus anthracis*) tümü saprofitiktir. Ek olarak patojen özellik göstermedikleri bilinmektedir. Bilinen tüm *Bacillus* türlerinin Nutrien Agar, Kanlı Agar, Trypticase Soy Agar ve Brain Heart Infusion besiyeri ortamlarında oldukça iyi gelişim gösterdikleri tespit edilmiştir (Altun ve ark., 2002). Mezofilik türlerin çoğunlukta olduğu bilinmektedir ancak zorunlu termofil, psikrofil, asidofil ve halofil türleri de keşfedilmiştir (Ustaçelebi, 1999).

Tablo 2.3. Bazı termoalkalifil ve alkalifillerin ürettiği ekstremofilik enzimler (Coşkun, 2010).

Termoalkalifiller /Alkalifiller	Termoalkalifilik ve /Alkalifilik Enzimler	Optimum Sıcaklık (°C)	Optimum pH
<i>Bacillus firmus</i>	Ksilanazlar (xyn10A ve xyn11A)	70	5,0-9,5
<i>Bacillus halodurans</i> Suşları	Amilaz, pullulanaz	55-65	10,0
<i>Bacillus subtilis</i>	α -amilaz	52-55	9,0
<i>Bacillus</i> KSM-K38 İzolatu	α -amilaz	55-60	8,0-9,0
<i>Bacillus pumilus</i>	Alkalın proteaz	50-60	11,5
<i>Bacillus</i> sp.	Azoredüktaz	80	8,0-9,0
<i>Bacillus</i> sp.	Katalaz-Peroksidaz	60	8,0
<i>Bacillus alcalophilus</i>	Pektat liyaz	45	9,0-10,0

Mikroorganizma kültürünün bulunduğu besiyeri bileşimi ve inkübasyonun gerçekleştirildiği sıcaklık gibi çevresel faktörlere bağlı olarak *Bacillus* suşlarını koloni görünimleri değişmektedir. Besiyeri ve sıcaklık gibi dış faktörlerin değişmesiyle beraber mikroorganizma kültürünün kendisinde de bazı değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Özellikle besiyeri seçimi ve seçilen besiyerinin ihtiva ettiği agar konsantrasyonu oluşan kolonilerin çapları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin; *Bacillus* türlerinin bir çoğunda pigment üretimi olmamasına rağmen içeriğinde kazein bulunduran agarda geliştirildiğinde *Bacillus megaterium* suşları sarı renkte görülmektedir (Aygan ve Arıkan, 2008).

2.4.6. Poligalakturonazın kullanım alanları

Endüstriyel bağlamda poligakaturonaz son yıllarda özellikle gıda endüstrisinin birçok alanında kullanılmaya başlanmıştır. Poligalakturonazın kullanım alanları Şekil 2.5.'te verilmiştir.

- Asit pektinazlar

Asit pektinazlar genellikle mantarlar, özellikle *Aspergillus niger* tarafından üretilmektedir. Meyve sularındaki pektinin ekstrasyonu ve berraklaştırılmasında sebze maserasyonunda ve şarap yapımında yaygın olarak kullanılmaktadır (Pedrolli ve ark., 2009).

- Alkali pektinazlar

Alkali pektinazlar genellikle bakteriler, özellikle *Bacillus* türleri tarafından üretilmektedir (Kapoor ve ark., 2001). Pektin kalıntıları içeren bitkisel gıda işlemeden kaynaklanan atık suların arıtılmasında kullanılabilirler; keten, jüt ve kenevir gibi tekstil liflerinin işlenmesi, kahve ve çay fermantasyonu, bitkisel yağ ekstraksiyonu ve kağıt hamurunun işlenmesi gibi alanlarda alkali pektinazlar endüstride kolaylık sağlamaktadırlar (Zhang ve ark., 2000).



Şekil 2.5. Poligalakturonaz enziminin kullanım alanları.

2.4.6.1. Meyve suyu ekstraksiyonu

Meyve pektininin enzimatik bozunmasının meyve sularını berraklaştırabileceği ve meyve suyu verimini arttırılabileceği anlayışı, mikrobiyal pektinazların araştırılmasına ve sebze ve meyve işleme endüstrilerinde uygulanmasına yol açmıştır (Khan ve ark., 2013). Poligalakturonazların en geniş endüstriyel uygulamaları arasında meyve suyu ekstraksiyonu ve berraklaştırılması yer almaktadır. Pektik maddeler meyve suyunda viskoziteye ve bulanıklığa neden olabilmektedir (Jayani ve ark., 2005). Meyve sularını berraklaştırmada poligalakturonaz ve amilaz birlikte kullanılmaktadır. Ekstraksiyon işlemi sırasında, bazı meyve ve sebzelerin pektin bileşeninin posa içerisinde tutulmasıyla koloidal parçacıklara sahip meyve suyu elde edilmektedir (Azar ve ark., 2020). Poligalakturonaz ilavesi ile viskozite %20 ila %55 oranında azaltılabilirken, ışık geçirgenliğini %30 ila %70 oranında artırabilir ve şeker salınımını azaltabilir; bu da poligalakturonazın meyve suyu kalitesini yükselttiğinin göstergesi olarak belirtilmektedir (Singh ve ark., 2019). Meyve suyu söz konusu olduğunda, enzimatik maserasyon yoluyla ekstraksiyon, organoleptik (renk, tat) ve besinsel (vitaminler) özellikleri ve teknolojik verimliliği (filtreleme kolaylığı) geliştirmenin yanı sıra, geleneksel yöntemlerle elde edilen meyve suyuyla karşılaştırıldığında verimi %90'dan

fazla arttırabildiği bildirilmiştir (Pedrolli ve ark., 2009). Gıda endüstrilerinde, meyve sularının ekstraksiyonu ve berraklaştırılması amacıyla başta mantarlardan elde edilen poligalakturonaz (PG) olmak üzere asidik pektinazlar kullanılmaktadır (Ramírez Tapias ve ark., 2016).

2.4.6.2. Kahve ve çay fermantasyonu

Genel olarak kahve ve çay fermantasyonu amacıyla kullanılan poligalakturonaz *Bacillus* cinsi bakteriler tarafında üretilmektedirler. Bu sayede özellikle kahve endüstrisi için ekonomik ve atık geri dönüşümünü sağlayan alternatifler uygulanmaktadır. Poligalakturonaz çay fermantasyonunu hızlandırmakta ve pektik maddeleri parçalayarak çayda köpük oluşumunu engellemeye yardımcı olmaktadır (Murthy ve Naidu, 2011). Pektinolitik mikroorganizmalar, kahve fermantasyonunda, kahve çekirdeklerindeki müsilaj tabakasını uzaklaştırmada kullanılmaktadır (2010; Hoondal ve ark., 2002). Fermantasyon sırasında çaya özgü rengin ve karakteristik aromanın oluşumuna da katkıda bulunmaktadır (Thakur ve Gupta, 2012).

2.4.6.3. Yağ ekstraksiyonu

Yağ elde etmek için organik çözücülerin (hekzan) kullanıldığı ve bunların muhtemel kanserojen etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Poligalakturonaz enziminin yağ ekstraksiyonu için kullanımı bu sebeple geniş çaplı araştırmalara yön vermiştir. Poligalakturonaz; ayçiçeği, turunçgil, zeytinyağı, keten tohumu ve hurma gibi çeşitli kaynaklar kullanılarak yağ elde edilmesinde kullanılabilirliği ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bitkisel yağ üretiminde poligalakturonaz kullanımıyla beraber düşük yağ asitleri, peroksit değeri ve renk yoğunluğu göz önünde bulundurulduğunda organik olarak ekstrakte edilen yağlardan daha yüksek kalitede yağ elde etmenin mümkün hale geldiği bu alanda ilerletilen çalışmalarla ortaya çıkmıştır (Mehanni ve ark., 2017). Aynı zamanda poligalakturonaz enzimi kullanımıyla yağlarda polifenolik madde içeriği arttığı bilinmektedir. Bu da elde edilen yağların fonksiyonel özelliğini iyileştirdiğinin göstergesidir. Bunlara ek olarak poligalakturonaz kullanımıyla beraber yağda çözünen ve antioksidan özelliğiyle bilinen E vitamini içeriğinin de arttığı tespit edilmiştir (Iconomou ve ark., 2010).

2.4.6.4. Biyoetanol üretimi

Pektik maddeler açısından zengin olan tarımsal atıklarda bulunan pektinin hidrolizi için de poligalakturonaz enzimi yeni teknolojiler sayesinde kullanılmaya başlanmıştır

(Biz ve ark., 2014). Çeşitli endüstriyel işlemler sonucunda açığa çıkan bu tarımsal atıkların biyoetanole dönüşümü basit şekerler olarak işlenmeleriyle veya fermente edilebilir şekerler olarak kullanılabilmeleriyle olmaktadır (Collares ve ark., 2012; Hossain ve ark., 2011). Biyokütledeki bu enzimatik parçalanma toksik etki yaratabilecek atık açığa çıkarmadığı için ve maliyet açısından avantaj sağladığı için etkili bir işlemdir (Rebello ve ark., 2017).

2.4.6.5. Biracılık endüstrisi

Biyoteknolojik gelişmelerin beraberinde getirdiği avantajlardan biri de biracılık ve şarap endüstrisinde poligalakturonaz enziminin kullanım olanağı bulmasıdır. Meyve olarak tüketilmesinin yanı sıra şarap yapımının da ana materyali olan üzümün hücre duvarında bulunan en önemli yapılardan biri pektindir. Üzümün olgunlaşması sırasında hücre duvarındaki pektin yapısı poligalakturonaz enzimi sayesinde parçalanmaktadır. Üzümün kendi yapısında bulunan bu ham pektinaz hücre duvarında bulunan pektini parçalama konusunda yetersiz kalır ve parçalanma işleminin çok yavaş ilerlemesine sebebiyet vermektedir. Bu işlemin daha kısa sürede ve daha verimli bir şekilde sürdürülebilmesi için mikroorganizmalar tarafından üretilen poligalakturonaz enziminden faydalanılmaktadır. Meyvedeki pektin miktarı üzüm sırasının viskozitesine etki eden en önemli faktördür. Mikrobiyal kaynaklı poligalakturonaz enzimi ilavesiyle pektin parçalanması kolaylaşır ve yapılan presleme işlemleri sonrasında viskozite azaldığı için meyveden elde edilen üzüm suyu miktarında ciddi bir artış sağlanmış olur. Son yıllarda poligalakturonaz enzimi kırmızı şarap üretiminde kullanımıyla öne çıkmaktadır (Herron, S.R. ve ark., 2000). Aynı zamanda pektinolitik enzimlerin maserasyon işlemi yapılmış meyvelere ilave edilmesiyle şarabın renk ve bulanıklık gibi özelliklerinde iyileşmeler olduğu görülmüştür. Bu konu üzerine yapılan bir çalışmada enzim uygulanmış kırmızı şaraplarda renk özellikleri enzim uygulaması yapılmayan diğer şarap örneklerine göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Ek olarak enzim uygulaması yapılan şarapların daha dayanıklı hale geldikleri de varılan sonuçlardandır (Revilla ve Ganzalez-san jose, 2003).

2.4.6.6. Bitki virüslerinin saflaştırılması

Virüsler hakkında bilgi sahibi olabilmek için saflaştırma önemli bir aşamadır. Saflaştırma öncesinde bir virüs hakkındaki bilgiler oldukça sınırlı kaldığından saflaştırmanın önemi büyüktür. Virüsler hakkında fiziksel, kimyasal ve biyolojik

Çalışmaların yürütülebilmesi için öncelikli koşul çok saf virüs preparatlarının elde edilebilmesidir. Bitki yapılarını enfekte eden virüslerin çoğuna uygulanabilecek birçok saflaştırma alternatifi bulunmaktadır. Ancak virüsün türüne göre uygulanabilecek çok fazla saflaştırma prosedürü bulunmamakla beraber işlemde sınırlı hale gelmektedir. Virüsün floem (soymuk boru) ile sınırlı olduğu durumlarda poligalakturonaz enzimi ve selülazlar virüsün dokulardan kurtarılmasını sağlamaktadır (Hoondal ark., 2002).

2.4.6.7. Hayvan yemi

Hayvan yemlerinde enzim kullanımının ilk başarılı ticari denemesi arpaya β -glukanaz ilavesi ile gerçekleştirilmiştir (Praveen ve Suneetha, 2014). Poligalakturonaz da hayvan yemi üretiminde kullanılan enzimler arasında yer almaktadır. Poligalakturonaz yem içeriğinde bulunan ve parçalanması zor olan besin bileşiklerinin ayrışmasına yardımcı olmaktadır. Bu sayede yemdeki besin maddelerini açığa çıkması kolaylaşmaktadır. Hayvan yemlerinde genellikle enzim karışimleri kullanılmaktadır ve bu karışimler içerisinde poligalakturonaz enzimi de önemli bir etkiye sahiptir. Bu enzim karışimleri yemin viskozitesinin azalmasını sağlarken, bloke olmuş besin maddelerinin de açığa çıkmasına yardımcı olmaktadırlar. Emilimi kolaylaştırdıkları içinde aynı zamanda dışkı miktarını azaltmak gibi pozitif bir etki ortaya çıkarmış olurlar (Hoondal ve ark., 2000; Murad ve Azzaz, 2011).

2.4.6.8. Kağıt yapımı ve pulp endüstrisi

Biyoteknolojinin ilerlemesiyle beraber kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde biyoağartma ve kağıt yapımında mikroorganizmalara ve bu mikroorganizmaların enzimlerine olan bağımlılıkta artış göstermektedir (Bajpai 1999; Kirk ve Jeffries, 1996; Tepe ve Dursun 2022). Birçok ülkede kağıt endüstrisinde ksilanaz ve ligninazın yanısıra poligalakturonaz ve α -galaktosidaz gibi enzimlerin kullanımına talep artmaktadır ve çoğu zaman bunların kombinasyonları tercih edilmektedir (Ahlawat ve ark., 2008). Kağıt yapımında poligalakturonaz enzimi galakturonik asit polimerlerini depolimerize eder ve peroksit ağartma işlemi sırasında ortaya çıkan filtratı azaltma özelliğine sahiptir (Reid ve Ricard, 2004). Poligalakturonik asitlerin katyonik polimerlerle kompleks oluşturma yeteneği, büyük ölçüde polimerizasyon derecesine bağlıdır. Pektinazlar poligalakturonik asitleri depolimerize eder ve bunun sonucunda termomekanik hamurun peroksit ağartılmasından kaynaklanan filtrattaki katyonik gereksinimi azaltır (Zhang ve ark., 2013).

2.4.6.9. Atık su arıtımı

Gıda üretimi yapan tesislerdeki endüstriyel işlemlerin ardından ana ürünlerin yanı sıra yan ürünlerinde açığa çıktığı bilinmektedir. Açığa çıkan bu yan ürünlerden biri de atık sulardır ve bu atık suların içeriğinde pektin bulunmaktadır. Yüksek miktarda pektin içeren atık suların arıtılması amacıyla pektini parçalaması için atık sular önce pektinolitik enzimlerle bir ön işlem basamağından geçirilir ve bu sayede pektik maddelerin ortamdan uzaklaştırılması kolaylaşmış olur. Bu işlemin ardından atıklar çamur prosesiyle ayrışmaya uygun hale gelmektedir. Bu aşamada poligalakturonaz enzimi prosesi kolaylaştırmaktadır (Hoondal ve ark., 2000; Rebello ve ark., 2017).

2.4.6.10. Bitki liflerinin zambkının giderilmesi

Bazı bitki liflerinin (ananas) zambkının giderilmesi amacıyla sülfürik asit (H_2SO_4) ve sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile bir dizi işlem aşamasından geçirilerek yapılmasının yanı sıra aynı zamanda enzimlerin kullanımı ile de gerçekleştirilebilmektedir. Asidik çözeltiler kullanılarak yapılan zambk giderme işlemlerinde doğru konsantrasyonlar kullanılmaması halinde liflerin zarar görme ve çekme dayanımlarının düşmesi söz konusu olmaktadır. Bu sebeple alkali kullanılarak yapılan işlemlere göre daha fazla özenli olunması gerekmektedir. Poligalakturonaz enzimi kullanarak gerçekleştirilen zambk giderme işlemlerinde zambk giderme için optimum şartlar belirlenip uygulandığı takdirde tekstil endüstrisinde kullanılmak amacıyla gerekli özelliklerde ve uygun kalitede liflerin elde edilebileceği sonucuna varılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre zambk giderme işlemi uygulanan ananas liflerinde selüloz dışındaki yabancı maddelerde önemli ölçüde azalma tespit edilmiş olup liflerin daha yumuşak, daha ince ve esnek hale geldiği belirtilmiştir (Kalaycı ve ark., 2016).

2.4.6.11. Tekstil endüstrisi

Tekstil işlemede enzim kullanımı hem çevre kirliliğinin önlenmesi hem de ürün kalitesi açısından büyük fayda sağlamaktadır. İpliğin kumaşa dokunmasından önce çözgü iplikleri, ipliği yağlamak ve dokuma sırasında aşınmaya karşı korumak için bir haşıl maddesi ile kaplanır. Tarihsel olarak pamuklu kumaşlar için ana haşıl maddesi olarak uzun yıllar nişasta kullanılmıştır. Nişasta film oluşturma kapasitesinin yüksek oluşu ve düşük maliyetinden dolayı avantajlıdır (Hoondal ve ark., 2000). Kumaş, boyanmadan önce uygulanan haşıl maddesinin ve pamukta bulunan doğal selülozik olmayan malzemelerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Enzimlerinin keşfinden önce,

nişasta bazlı haşıllamanın giderilmesinin tek yolu, yüksek sıcaklıkta kostik soda ile uzun süreli işlemdir. Kimyasal işlemler nişastanın giderilmesinde yeterli olmamakla beraber pamuk liflerinin zarar görmesine ve yumuşaklık hissinin bozulmasına da sebep olmaktadır. Poligalakturonaz enziminin amilazlar, lipazlar, selülozlar ve diğer hemiselülitik enzimlerle birlikte haşıl maddelerinin uzaklaştırılmasında kullanılması, tekstil endüstrisinde sert kimyasalların kullanımını azaltmış, bu da atık kimyasalların çevreye daha az boşaltılmasıyla sonuçlanmıştır (Karapınar ve Sarıışık 2004). Aynı zamanda kumaş kalitesinin artmasına, zamandan tasarruf edilmesine ve tekstil işçilerinin kimyasal maddelerden zarar görmelerine de engel olmuştur. Pektin güçlü bir biyolojik yapıştırıcı gibidir; Çoğunlukla suda çözünmeyen pektin tuzları, liflerin koruyucu bariyerini oluşturmak için mumları ve proteinleri birbirine bağlamaya yarar. Pamuğun yıkanması geleneksel olarak, tekdüze boyama ve yüksek sıcaklıkta kostik alkali çözelti (%3-6 sulu sodyum hidroksit) ile gerçekleştirilir. Bu işlem safsızlıkların giderilmesinde çok etkili olmasına rağmen durulama için yüksek miktarda su ve enerji kullanımına sebep olurken aynı zamanda işlem sonunda çevreye zarar verebilecek atık ürünler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle pamuğun ıslak işlenmesine yönelik uygun maliyetli ve çevre üzerindeki etkiyi azaltan yeni ve daha verimli stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Poligalakturonaz gibi enzimlerle yapılan hidroliz işlemi yan etkisi olmaksızın iyi bir su emilimi sağlamaktadır ve bu işleme biyo-yıkama denmektedir. Biyo-yıkama, selülozik olmayan safsızlıkların spesifik enzimlerle spesifik olarak hedeflenmesi fikrine dayanan yeni bir prosestir. Poligalakturonaz, pektin içeren maddelerin ayrıştırılmasında, proteazlar protein yapıları için, lipazlar yağlar için kullanılmaktadır. Bu prosesin bir başka avantajı da, enerji tasarruflu ve daha çevre dostu olmasıdır (Choi ve ark., 2015). Biyo-yıkama için kullanılan enzimlerin selüloz omurgasını etkilememesi, dolayısıyla lif hasarını büyük ölçüde sınırlaması önemli bir etkendir (Kapoor ve ark., 2001). Biyo-yıkama için kullanılacak poligalakturonaz enzimi, gerekli arıtma süresi, son ürün kalitesi, su emiciliği ve atık pektin dikkate alınarak pH ve sıcaklık uyumluluklarına göre seçilmektedir (Hoondal ve ark., 2000).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan ve daha önceki yapılan çalışmalarda izole edilmiş 25 adet *Bacillus* cinsine ait suş poligalakturonaz üretiminde kullanılmak üzere seçilmiştir. Seçilen mikroorganizmalar – 45 °C’de %50 (h/h) gliserol içeren Nutrient Broth (NB) içerisinde muhafaza edilmiştir. Bahsedilen izolatlar ve kaynakları Tablo 3.1.’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan Van Gölü numunelerinden elde edilmiş izolatlar.

İzolatlar	Geliştiği pH	Elde Edildiği Kaynak
VGA1	12	Van Gölü Suyu
VGA2	12	Van Gölü Suyu
VGA3	12	Van Gölü Suyu
VGA4	12	Van Gölü Suyu
VGA5	12	Van Gölü Suyu
VGA6	12	Van Gölü Suyu
VGA7	12	Van Gölü Suyu
VGB1	10	Van Gölü Suyu
VGB2	12	Van Gölü Suyu
VGB3	12	Van Gölü Suyu
VGB4	10	Van Gölü Suyu
VGB5	10	Van Gölü Suyu
VGB6	10	Van Gölü Suyu
VGB7	12	Van Gölü Suyu
VGC1	12	Van Gölü Suyu
VGC2	12	Van Gölü Suyu
VGC2	10	Van Gölü Suyu
CGC3	10	Van Gölü Suyu
VGC4	10	Van Gölü Suyu
VGC5	12	Van Gölü Suyu
VGC6	12	Van Gölü Suyu
VGC7	10	Van Gölü Suyu
VGC9	12	Van Gölü Suyu
VGC10	12	Van Gölü Suyu
VGC11	12	Van Gölü Suyu

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan Araç-Gereçler ile Markaları ve Modeller.

Araç-Gereçler	Marka-Model
-45°C dondurucu	NUVE DF 590
Hassas terazi	RADWAG - AS 220.R2
Çalkalamalı su banyosu	DAIHAN, WiseBath WSB-30
Çalkalamalı su banyosu	JSR
Vorteks	VELP Scientifica ZX3
Vorteks	LABTECK
Soğutmalı santrifüj	Hettich Zentrifugen, Universal 320 R
Santrifüj	Hettich Zentrifugen, EBA 21
Isıticılı manyetik karıştırıcı	M TOPS, MS300HS
UV-VIS Spektrofotometre ve Quartz küvet	Shimadzu UV – mini 1240, Isolab
Otoklav	Hirayama
Otoklav	DAIHAN, WiseClave WAC-80
pH metre	Mettler-Toledo Seven Compact S210
Otomatik pipet serisi	Hamilton
Mini-çalkalamalı inkübatör	Benchmark Incu-Shaker
Soğutmalı-çalkalamalı inkübatör	İldam, İL-Çİ 55
Etüv	Elektro-mag, M 5040
Damıtık su cihazı	NÜVE-ND 8
Kar-buz makinesi	Scotsman-AF80
Dijital gıda termometresi	Weather Forecast

3.1.3. Besiyeriler

Pektin katkılı katı besiyeri: Enzim üreten mikroorganizmaların seçiminde kullanılmıştır. Pektin katkılı katı besiyeri hazırlamak amacıyla 1 g/L maya özütü, 1 g/L pektin, 15 g/L agar agar, 0,5 g/L NaCl, 0,1 g/L K₂HPO₄, 0,01 g/L MgSO₄·7H₂O tartılmış ve 1 L saf su eklenerek ısıticılı manyetik karıştırıcıda 100 °C sıcaklık ayarlanarak 30 rpm'de çözündürülmesi sağlanmıştır. Besiyerinin pH değeri 10'a ayarlanmıştır. Daha sonra hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiş ve 40-45°C'ye kadar soğutulup 9 cm çapındaki steril petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında katılaşması sağlanmıştır.

Pektin katkılı sıvı besiyeri: Poligalakturonaz enziminin üretiminde kullanılmıştır. Pektin katkılı sıvı besiyeri hazırlamak amacıyla 10 g/L maya özütü, 10 g/L pektin, 1,5 g/L NaCl, 1 g/L K₂HPO₄, 0,1 g/L MgSO₄·7H₂O tartılmış ve 1 L saf su eklenerek

ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 100 °C, 30 rpm'de çözündürülmesi sağlanmıştır. Besiyerinin pH'ı 10'a ayarlanmıştır. Daha sonra besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Nutrient Agar (NA): Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi için genel amaçlı katı bir besiyeri olan NA kullanılmıştır. Dehidre formdaki % 0,8 NB ve %1,2 agar agar tartılmış ve 1 L saf su eklenerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılarak çözelti berrak hale gelene kadar kaynatılmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiş ve ardından 45 °C'ye kadar soğutulup alev çatısı altında 9 cm çapındaki steril petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında katılaşması sağlanmıştır.

Nutrient Broth (NB): Mikroorganizmaların katı ortamdan sıvı ortama aktarılması için kullanılan genel bir besiyeridir. Aşı kültürü elde etmek amacıyla kullanılmıştır. Dehidre formdaki %0,8 NB tartılmış ve 1 L saf suda manyetik karıştırıcı kullanılarak çözündürülmüştür. pH ölçer ile NaOH kullanılarak pH'ı 10'a ayarlanmıştır. Berrak sarımsı kahverengi olan besiyeri 30 mL'lik erlenlere dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler

İyot Çözeltisi: pH 10'a ayarlanmış NA besiyerinde geliştirilen bakterilerin zon oluşumlarını gözlemleyebilmek için iyot çözeltisi hazırlanmıştır. Bir balon jojeye 0,75 g potasyum iyodat ve 0,3 g iyot tartılarak 50 mL saf suda çözündürülmüştür.

Sodyum sülfid (Na_2SO_3) Çözeltisi: DNS yönteminde kullanılmak üzere %10'luk Na_2SO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla hassas terazide 2,5 g Na_2SO_3 tartılıp 25 mL saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülmüştür.

Rochelle Tuzu Çözeltisi (sodyum-potasyum tartarat): DNS yönteminde kullanılmak üzere %40'luk Rochelle tuzu çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla hassas terazide 40 g sodyum-potasyum tartarat tartılarak 100 mL saf suda manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürülmüştür.

Glisin-NaOH Tampon Çözeltisi (100 mM; pH 10,11,12): Enzim aktivitesi tayininde substrat olarak kullanılan pektinin çözündürülmesi için glisin-NaOH tamponu hazırlanmıştır. Bu amaçla hassas terazide 0,94 g glisin tartılıp 250 mL saf suda manyetik karıştırıcı kullanılarak çözündürülmüştür. pH'ı 10'a ayarlamak için NaOH kullanılmıştır.

Trizma Base - Hidroklorik Asit Tampon Çözeltisi (Tris-HCl; 100 mM; pH 7, 8, 9): Hazırlanan çözelti enzimin optimum pH'sının belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. 12,11 g Trizma Base (Sigma-Aldrich, ABD) tartılarak bir miktar damıtık su ile manyetik karıştırıcıda çözünmesi sağlanmıştır. Çözündürme işleminin ardından pH 7,8,9 için 2 N HCl kullanılarak pH metre cihazı ile ayarlama yapılmıştır. Daha sonra çözelti huni yardımıyla balon jojeye aktararak 1 L çizgisine kadar damıtık su ile tamamlanmıştır.

Sitrat Tampon Çözeltisi (100 mM; pH 4, 5 ve 6): Enzimin optimum pH'sının belirlenmesi için kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 294,1 g/mol olan Sodyum Sitrat Dihidrat 1,205 g tartılmış; molekül ağırlığı 192,1 g/mol olan Sitrik Asit 0,174 g olacak şekilde tartılmış ve damıtık su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Dinitrosalisilik Asit (DNS) Çözeltisi: DNS yöntemiyle indirgen şeker tayininde kullanılmıştır. Bu amaçla 1 g DNS ve 1 g NaOH hassas terazide tartılıp balon jojeye alınmış ve üzeri 100 mL saf suya tamamlanıp manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Hazırlanan 100 mL'lik çözeltiye 1 mL sodyum sülfite (Na_2SO_3) eklenmiştir.

Sodyum Hidroksit Çözeltisi (NaOH; 4 M): pH ayarlamalarında kullanılmak amacıyla hazırlanmıştır. Bir beher içerisine 16 g NaOH (Merck, Almanya) tartılarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Hidroklorik Asit Çözeltisi (HCl; 2 N): pH ayarlanmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Molekül ağırlığı 36,5 g/mol olan ve yoğunluğu 1,18 g/cm³ olan ağırlıkça %37'lik (sodyum klorür) HCl'den 16,7 mL alınarak saf su ile balon joje içerisinde 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tarama Çalışması

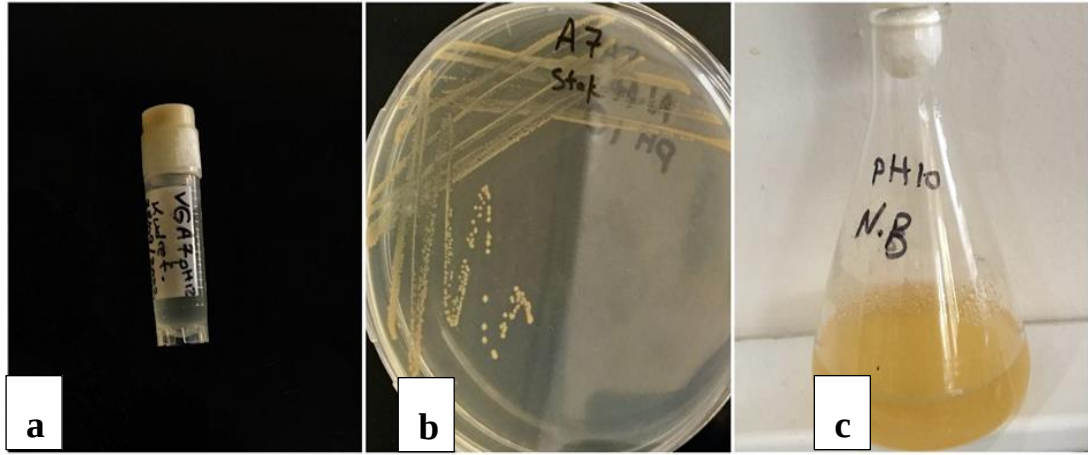
Önceki çalışmalarda Van Gölü'nden alınan [Prof. Dr. Mehmet Emiroğlu (Sakarya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi İnşaat Mühendisliği Bölümü) tarafından] numunelerden izole edilen *Bacillus* izolatlarından 25 izolat bu çalışmada kullanılmak üzere seçilmiş ve her biri 9 cm çaplı steril petrilere hazırlanmış Pektin katkılı agar besiyerine ekim yapılmıştır. Petriler 33 °C sıcaklıkta inkübayona bırakılmıştır. Ekimi yapılan izolatların 24 saat sonunda gelişimleri gözlemlenmiştir. Besiyerinde gelişen

suşların şeffaf zon oluşumlarını gözlemleyebilmek için petrilere iyot çözeltisi damlatılmıştır ve 25 adet izolat içerisinde en iyi gelişim gösteren, en geniş ve şeffaf zon yapısını oluşturan izolat belirlenmiştir.

3.3. Poligalakturonaz Enzimi Üretimi

3.3.1. İnokulum hazırlama ve inokülasyon

Yirmi beş adet izolat arasından ileriki çalışmalarda kullanmak üzere test mikroorganizması olarak belirlenen *Bacillus* sp. VGA7 suşunun aktifleştirilmesi için öncelikle 9 cm çaplı steril petrilere hazırlanmış Nurtient Agar besiyerinde bir öze dolusu alınarak petri ekim yöntemlerinden biri olan çizme yöntemiyle tek koloni oluşturacak şekilde mikroorganizma ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekimi yapılan petrilere 33 °C sıcaklığa ayarlanmış inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1a, Şekil 3.1b). İnkuvasyon süresi sonunda petride gelişim gösteren suş 30 mL olarak hazırlanan Nutrient Broth sıvı besiyerlerine alev çatısı altında ekilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 33 °C ve 120 rpm'e ayarlanmış inkübatörde 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1c). Enzim üretimi için inkübasyon sonucu elde edilen sıvı kültür kullanılmıştır.



Şekil 3.1. *Bacillus* sp. VGA7 izolatı; a) Eppendorf tüplerinde muhafazası, b) NA besiyerinde gelişimi, c) NB besiyerinde gelişimi.

3.4. *Bacillus* sp. VGA7 İzolatının Tanımlanması

Bakterinin bazı morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için ışık mikroskobu kullanılarak 100x büyütme oranındaki objektifle hücre yapısı incelenmiştir; Gram boyama, spor boyama ve katalaz testi yapılmıştır. 16S rDNA genotiplendirme yöntemi ile bakterinin moleküler düzeyde tanımlaması yapılmıştır.

16S rDNA analizleri BMLabosis (Çankaya/Ankara) laboratuvarı tarafından yapılmıştır. DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek amacıyla Thermo Scientific Nanodrop 2000 (ABD) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) Kyratec Thermocycler cihazı ile (Hertfordshire/İngiltere) yapılmış olup 27F ve 1492R universal primerleri kullanılarak tür tayini için hedeflenen 16S rDNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları aşağıdaki gibidir.

- **Primerler**

27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

- **Reaksiyon içeriği**

PCR buffer: 1x

MgCl₂: 1,5 mM

dNTP mix: 0,2 mM

Primer: 0,3 mM

Taq DNA polimeraz: 2 U

DNA örneği: 3 µL

- **PCR koşulları**

Başlangıç denatürasyonu: 95 °C/5 dak

Denatürasyon: 95 °C/45 sn

Primer eşleşmesi: 57°C/45 sn

Zincir uzaması: 72 °C/1 dak

Son uzama: 72 °C/5 dak

Yaklaşık 1470 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. PCR ile elde edilen amplifikasyon ürünleri 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt

akımda 90 dakika elektroforezde yürütölmüş ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır. AgaroZ jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır.

Sanger Dizileme örnekleriniz için ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA).

27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com>) yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Elde edilen dizi Genbank Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılarak filogenetik olarak yakın olduğu bakteriler belirlenmiştir.

3.5. Poligalakturonaz Aktivitesi Tayini

İnkübasyon ortamındaki örneklerden 24. saatte Eppendorf tüplerine 1,5 mL alınarak 10000 rpm'de, 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi sonrası elde edilen hücresiz süpernatant yani ham enzim poligalakturonaz aktivitesi tayini yapmak için kullanılmıştır.

Poligalakturonaz aktivitesi tayininde substrat olarak pektin kullanılmıştır. Deney tüplerinde; 1 mL substrat (pektin) çözeltisi [50 mM, pH 10 Glisin-NaOH tamponu içerisinde %1 oranında pektin] ile 0,1 mL enzim örneği vortekslelendikten sonra su banyosunda 50 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası reaksiyonu durdurmak amacıyla tüplere hızlı bir şekilde 2 mL %1 DNS çözeltisi ilave edilip vortekslenmiştir. Daha sonra ortamda renk kompleksinin oluşması için örnekler zaman kaybetmeden bu kez 90 °C'de 15 dakika su banyosunda beklemeye bırakılmıştır. 15 dakikanın sonunda cam tüplerin her birine renk sabitlemesi amacıyla 1 mL Rochelle tuzu ilave edilerek vortekslenmiştir. Seyreltme amacıyla son olarak tüplere 5 L saf su eklenmiştir ve 540 nm dalga boyunda köre karşı UV-VIS spektrofotometrede absorbansı okunarak ölçüm gerçekleştirilmiştir (Miller, 1959).

Kör denemeler reaksiyon karışımı olarak enzim örneği yerine aynı miktarda saf su (0,1 mL) kullanılarak gerçekleştirilmiş, üzerine 1 mL substrat olarak %1'lik pektin çözeltisi eklenerek diğer örneklerle yapılan tüm işlemler sırasıyla uygulanmıştır. Diğer örnekler ile kör deneme arasındaki absorbans farkı spektrofotometrede okunan değerler kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5.1. D-galakturonikasit-Monohidrat standart grafiğinin hazırlanması

Poligalakturonazın enzim aktivitesinin tespit edilmesinde kullanılan D-galakturonikasit-Monohidrat standart grafiğinin oluşturulması için 10 mL saf suda 0,02125 g GA çözündürülmüştür. Hazırlanan stok çözeltiden belli hacimlerde alınarak saf suyla seyreltme yapıp farklı konsantrasyonlarda GA (0,8; 1; 2; 4; 6; 8 ve 10 mM) çözeltisi oluşturulmuştur. Standart örnek tüplerine 2 mL DNS çözeltisi eklenerek 90 °C'de 15 dakika su banyosunda beklemeye bırakılmıştır. 15 dakika sonra tüplere oluşan rengin sabitlenmesi için 1 mL Rochelle tuzu eklenmiştir. Son olarak seyreltmek için 5 mL saf su ilave edilip UV-VIS Spektrofotometre kullanılarak kuvarz küvet ile 540 nm dalga boyunda absorbans okuması yapılmıştır (Honda ve ark., 1982). GA konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen absorbans verileri kullanılarak GA standart grafik çizilmiştir (Şekil 3.3). Elde edilen standart grafiğindeki eğim değeri kullanılarak “Denklem 3.1” ile enzim aktivitesi hesaplanmıştır (Biz ve ark., 2014).

$$\text{Enzim aktivitesi} \left(\frac{U}{\text{mL.dk}} \right) = \frac{A*B}{C*D} * SF \quad (3.1)$$

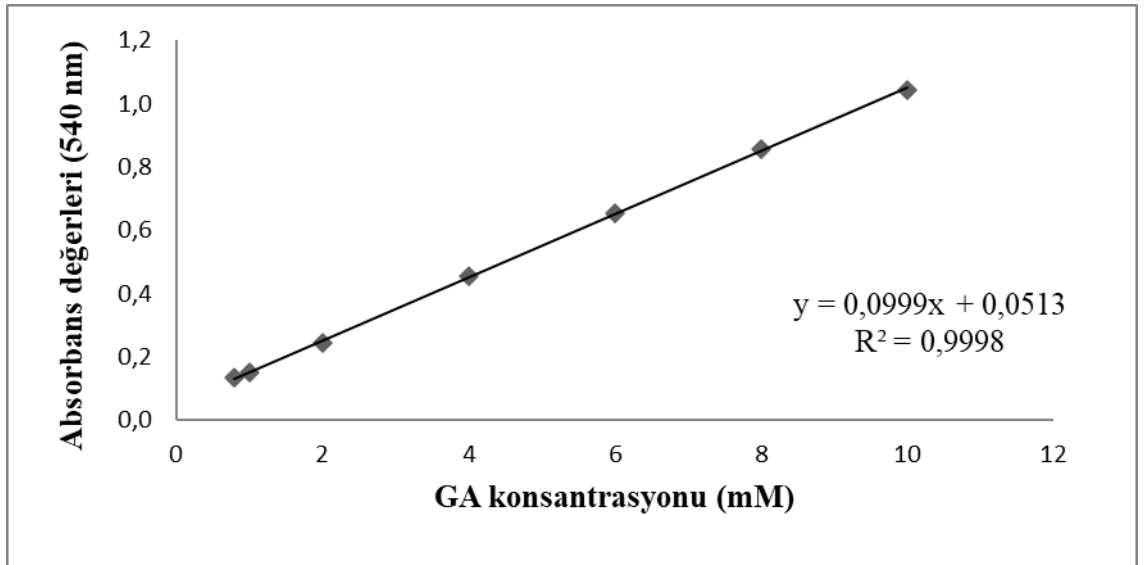
Denklem 3.1’de verilen ifadeler aşağıdaki bilgileri temsil etmektedir.

- A :Standart eğriden bulunan değer (μmol)
- B :Toplam hacim (mL)
- C :Enzim miktarı (mL)
- D :İnkübasyon süresi (dk)
- SF :Seyreltme faktörü



Şekil 3.2. Standart eğri için yapılan analizinde deney türlerindeki renk oluşumu.

Pektinaz enzim aktivitesinin tespiti için kullanılan D-galakturonikasit standart grafiğini elde etmek için analizler 3 paralel olacak şekilde yapılmış ve UV-VIS spektrofotometrede elde edilen verilerin ortalaması alınarak standart eğri grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.3. D-galakturonikasit-Monohidrat standart eğrisi.

3.6. Enzim Üretimi Koşullarının Belirlenmesi

3.6.1. Enzim üretimine pH'nın etkisinin belirlenmesi

Enzim üretimine pH'nın etkisinin belirlenmesi için çeşitli pH'larda (7, 8, 9, 10, 11) hazırlanan pektin katkılı sıvı besiyerilerine NB besiyeride geliştirilen aktif kültürlerden 1,5 mL alınarak 3'er paralel olacak şekilde aşılama yapılmıştır. Ardından 33°C sıcaklıkta ve 120 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aşılamanın 24. saatinde örneklerden Eppendorf tüpelerine 1,5 mL alınarak 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantın enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.6.2. Enzim üretimine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Enzim üretimine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için başlangıç pH'sı 10 olacak şekilde hazırlanan pektin katkılı sıvı besiyerilerine nutrient brothta geliştirilen aktif kültürlerden 1,5 mL alınarak 3'er paralel olacak şekilde aşılama yapılmıştır. İnkübasyonlar 25 °C, 30 °C, 33 °C, 37 °C ve 40 °C sıcaklıklarda 120 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun 24. saatinde örneklerden Eppendorf tüpelerine 1,5 mL alınarak 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantın enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.6.3. Enzim üretimine pektin konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi

Enzimin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi için çeşitli pektin konsantrasyonlarında hazırlanan (2-5-10-15-20 g/L) pektin katkılı sıvı besiyerilerine 1,5 mL inokülasyon ortamındaki örneklerden 3'er paralel olacak şekilde aşılama yapılmıştır. Ardından 33°C'de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aşılamanın 24. saatinde örneklerden Eppendorf tüplerine 1,5 mL alınarak 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantın enzim aktivitesi belirlenmiştir.

3.6.4. Enzim üretimine karbon kaynaklarının etkisinin belirlenmesi

Karbon kaynaklarının pektinolitik aktivite üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla karbon kaynağı olarak pektin yerine 6 farklı karbon kaynağı (fruktoz, gum arabik, nişasta, sukroz, glukoz, laktoz) kullanılmıştır. Petride gelişimini tamamlamış kolonilerden farklı karbon kaynakları kullanılarak hazırlanmış sıvı besiyerilerine aşılama yapılmış ve ardından 33°C'de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 24. saatinde örneklerden Eppendorf

tüpelerine 1,5 mL alınarak 10000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantta enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

3.6.5. Enzim üretimine azot kaynaklarının etkisinin belirlenmesi

Azot kaynaklarının pektinolitik aktivite üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla azot kaynağı olarak maya özütü yerine 6 farklı azot kaynağı (pepton, yağsız süt tozu, sarı mercimek unu, soya unu, amonyum sülfat, kazein) kullanılmıştır. Farklı azot kaynaklarıyla hazırlanan sıvı besiyerilerine yapılan aşılamanın ardından 24 saat çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda örnekler Eppendorf tüplerine alınmış ve santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantta enzim aktivitesi tayini yapılmıştır

3.7. Poligalakturonaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklığının Belirlenmesi

3.7.1. Poligalakturonaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Sıcaklığın pektinolitik aktivite üzerinde olan etkisini belirlemek amacıyla enzim aktivitesi tayini farklı sıcaklıklarda (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C) yapılmıştır. Her bir sıcaklık değeri için kör denemeler de gerçekleştirilmiş ve süre sonunda ortamdaki indirgen şeker miktarı DNS yöntemiyle belirlendikten sonra UV-VIS spektrofotometrede absorbans değerleri okunup enzim aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.7.2. Poligalakturonaz enziminin optimum pH’nın belirlenmesi

pH’nın pektinolitik aktivite üzerine olan etkisinin belirlenmesi için standart enzim aktivitesi deneyinde substrat olarak kullanılan %1’lik pektin çözeltisi farklı pH değerlerinde (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) hazırlanmıştır. Bu amaçla pH 4-5-6 için Sitrat tamponu, pH 7-8-9 için Tris-HCl ve pH 10-11-12 için Glisin tamponu kullanılmıştır. Deney tüplerinde 1 mL %1’lik pektin çözeltisi ile 0,1 mL enzim örneği vortekslendikten sonra standart enzim aktivitesi deneyi gerçekleştirilmiş ve son aşamada 540 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede absorbans değerleri okunarak enzim aktiviteleri hesaplanmıştır.

3.8. İstatistik Analiz

Varyans analizleri, SPSS versiyon 22 (İstatiksel Analiz Sistemi) içerisindeki Genel Doğrusal Model kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı ortalamalar arasında 0,05

düzeyinde anlamlı fark olması durumunda Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır (Duncan, 1955).

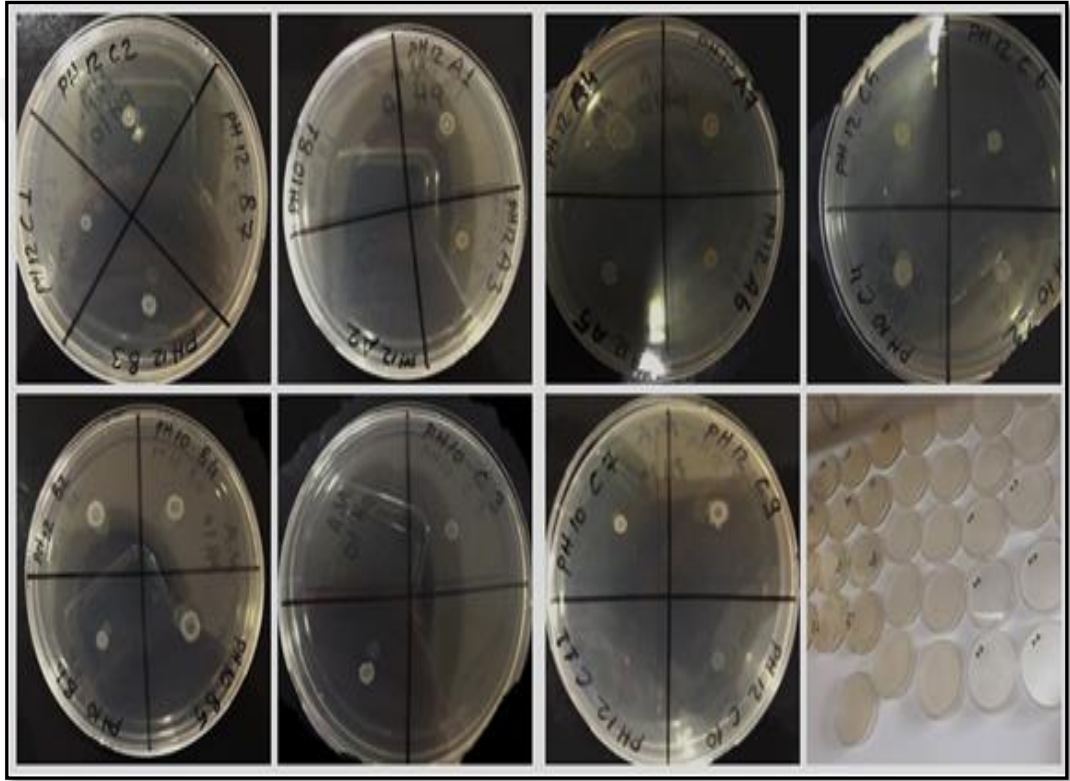


4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Tarama Çalışması Bulguları

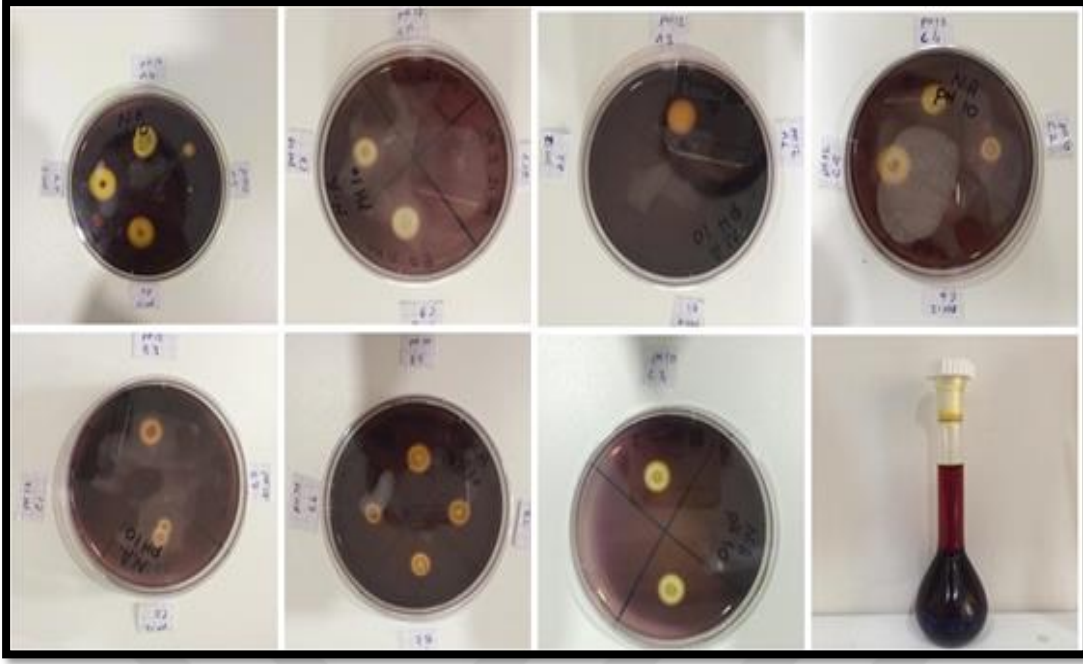
4.1.1. Poligalakturonaz üreten suşların taranması ve poligalakturonaz aktivitesi

Şekil 4.1. Pektin içeren besiyeri üzerindeki 25 izolatin 24. saatteki gelişimini göstermektedir.



Şekil 4.1. 24 saatlik süre sonunda pektin içeren katı besiyerinde geliştirilen izolatlarının görünümü.

Şekil 4.2. Pektin içeren katı besiyerinde gelişen 25 izolatın iyot çözeltisi damlatıldıktan sonra oluşturdukları zon yapılarını göstermektedir.



Şekil 4.2. 24 saat sonunda gelişen izolatların iyot çözeltisi ile oluşturdukları zon yapısı.

25 izolatın her birinin 24. saat inkübasyonları sonunda gelişimleri incelenmiş ve iyot çözeltisi damlatılarak cetvel yardımıyla şeffaf zon oluşturan bölgenin çapı ölçülmüştür. Tablo 4.1’de 24 saat sonunda gelişen bakterilerin gelişimleri:

gelişim yok ‘(-)’,

az gelişme ‘(+)’,

iyi gelişme ‘(++)’,

çok iyi gelişme ‘(+++)’ şeklinde ifade edilmiştir.

Tablo 4.1. Pektin katkılı katı besiyerinde 33°C’de 24 saat inkübe edilen 25 izolatın gelişimleri ve zon çapları.

Ph	<i>Bacillus</i> sp. Suşu	24 saat sonu	
		Zon çapı (mm)	Bakteri gelişimi
12	VGA1	(-)	(++)
12	VGA2	(-)	(-)
12	VGA3	16	(+)
12	VGA4	15	(++)
12	VGA5	(-)	(++)
12	VGA6	17	(++)
12	VGA7	18	(+++)
10	VGB1	(-)	(++)
12	VGB2	10	(++)
12	VGB3	13	(++)
10	VGB4	12	(++)
10	VGB5	13	(++)
10	VGB6	9	(++)
12	VGB7	(-)	(+)
12	VGC1	7	(+)
12	VGC2	(-)	(++)
10	VGC2	10	(++)
10	VGC3	13	(++)
10	VGC4	12	(++)
12	VGC5	16	(++)
12	VGC6	(-)	(++)
10	VGC7	13	(++)
12	VGC9	14	(++)
12	VGC10	(-)	(+)
12	VGC11	(-)	(+)

24 saatlik inkübasyonun sonunda gelişmeyen izolat; VGA2 olmuştur. 24. saatin sonunda zon oluşturmeyen izolatlar; VGA2, VGA5, VBA7, VGC2, VGC6, VGC11 olarak belirlenmiştir. Şeffaf zon oluşumları değerlendirildiğinde kolonilerin çevresinde en geniş zon oluşturan suşlar; VGA3, VGC5, VGA6, VGA7 olarak belirlenmiştir. Çalışılan 25 izolat arasından en geniş şeffaf zon oluşturan VGA7 ilerideki optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

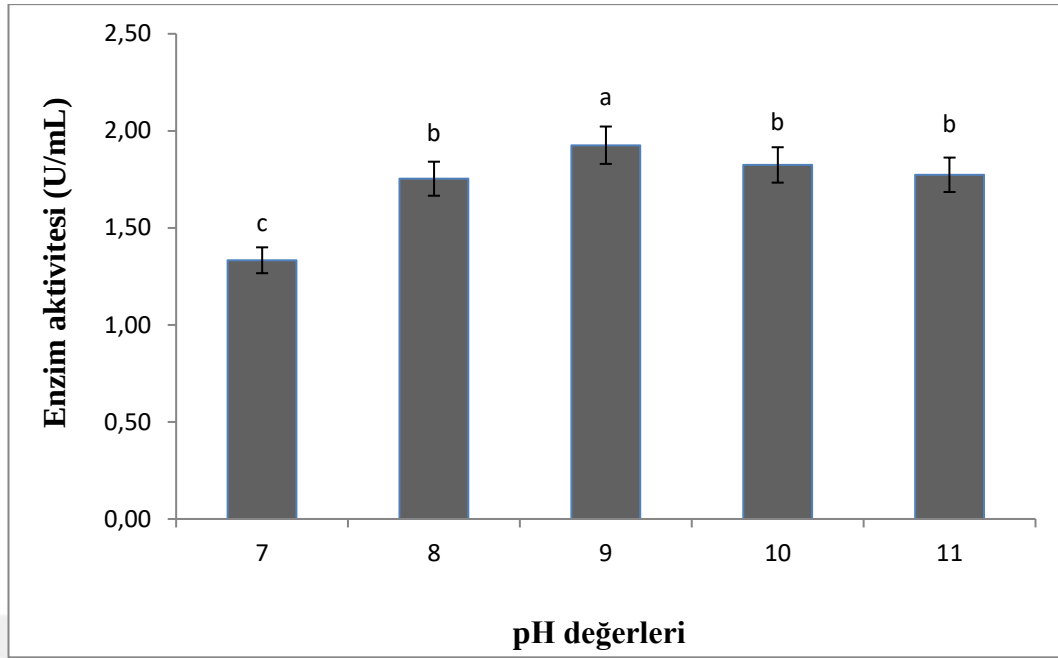
4.1.2. *Bacillus* sp. VGA7 suşunun enzim üretiminin optimizasyonu

4.1.2.1. Poligalakturonaz enzim üretimine ortam pH’ın etkisi

Bacillus sp. VGA7 suşunun poligalakturonaz üretimine ortam pH’ının etkisinin belirlenmesi için besiyerinin pH’ları 7, 8, 9, 10 ve 11’e ayarlanmış ve inkübasyonlar 24 saat, 33 °C’de gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda alınan örneklerden enzim aktivitesi tayini yapılmıştır (Şekil 4.3).

Çalışılan bütün pH'larda enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. pH 7'de en düşük (1,33 U/mL) enzim aktivitesi görülmüş pH arttıkça enzim aktivitesinin de arttığı tespit edilmiştir ($P<0,05$). Enzim aktivitesi pH 9'da en yüksek değere (1,93 U/mL) ulaşmış ve pH 10 ve 11'de tekrar bir düşüş meydana gelmiştir. Enzim aktivitesi pH 9'da %100 olarak değerlendirildiğinde pH 7'de %68,9 ile en düşük enzim aktivitesi, pH 10'da %94,3 (1,82 U/mL) ve pH 11'de %91,7 (1,77 U/mL) olarak elde edilmiştir. pH 9'dan sonra pH 10 ve 11'de enzim aktivitesinde %6-9 oranında bir azalma olmasına rağmen yüksek pH ortamında da bakterinin enzim üretebildiği görülmektedir. Çalışma sonunda poligalakturonaz enziminin pektin hidrolizi için en iyi ortam pH'ının 9 olduğu belirlenmiştir.

Poligalakturonaz üretimindeki artış veya azalış fermantasyon ortamının pH'ındaki değişime bağlı olarak değişebilmektedir. Uenojo ve Pastore (2007) ve Cordeiro ve Martins (2009) poligalakturonaz üretiminin pH'a bağlı olarak değişmesinde enzim üretimini etkileyen pektin üzerindeki poligalakturonazın etkisiyle olabileceğini ileri sürmektedirler. Poligalakturonaz üretimi için en uygun başlangıç pH değeri mikroorganizmanın yapısına bağlı olarak önemli farklılık göstermektedir. Örneğin, *Bacillus pumilus* dcsr1'in poligalakturonaz üretimi için pH 8,5 enzim üretimi için en uygun pH değeri, (Sharma ve Satyanarayana, 2006); bakteriler tarafından üretilen (*Cocci* Sps) alkali pektinaz için pH 8,0'ın en uygun pH değeri olduğu bildirilmektedir (Kumar ve Sharma, 2012). Bu farklılıklar bazı mikroorganizmalarda belirli enzimlerin üretiminde görev alan genlerin pH'a etki ettiği şeklinde yorumlanmaktadır (Young ve ark., 1996).



Şekil 4.3. *Bacillus* sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine pH'ın etkisi.

Karbon kaynağı olarak turunçgil pektini içeren sıvı ortamda geliştirilen termofilik *Bacillus* sp. SMIA-2 suşu tarafından poligalakturonaz enzimini ve bazı özelliklerini inceleyen Cordeiro ve Martins (2009), enzimin en iyi gelişim ortamının pH değerini 7 olarak rapor etmişlerdir. Aynı zamanda enzim, oda sıcaklığında 24 saat boyunca pH 8.0 ve 8.5'te inkübe edildiğinde maksimum aktivitesinin sırasıyla %90 ve %75'ini koruduğunu bildirmişlerdir. En düşük enzim aktivitesini ise çalıştıkları en uç değerler olan pH 5,5 ve 9,5'te elde etmişlerdir.

Benzer sonuçlar çeşitli *Bacillus* sp. suşlarının poligalakturonaz aktivitesi üzerinde ortam pH'ının etkisini araştıran Soares ve ark., (1999), tarafından da bulunmuştur. Bu araştırmacılara göre incelenen suşların çoğu, en iyi poligalakturonaz aktivitesi için ortam pH'ının 6 olduğunu bildirmiştir. Kapoor ve ark., (2000), *Bacillus* sp. MG-cp-2 tarafından üretilen poligalakturonaz için ortam pH'ını 10 olarak rapor etmişlerdir.

Soares ve ark., (1999), 168 farklı bakteri suşunu tek karbon kaynağı (turunçgil pektini) kullanılarak poligalakturonaz üretimi açısından incelemiş ve *Bacillus* sp. tarafından üretilen poligalakturonazın karakterizasyonu üzerine çalışmışlardır. Çalışmalarında 168 bakteri suşu arasından *Bacillus* sp.'nin 5 suşunun (P4.3, M2.1, B1.3, P6.1, AR1.2) yüksek oranda enzim ürettiğini tespit etmiş ve bu 5 *Bacillus* sp. suşu tarafından üretilen poligalakturonazın aktivitesine pH'ın etkisini değerlendirmeye almışlardır. Bu doğrultuda pH 3-10 aralığında değişen reaksiyon karışımları kullanmışlardır. Çalışma

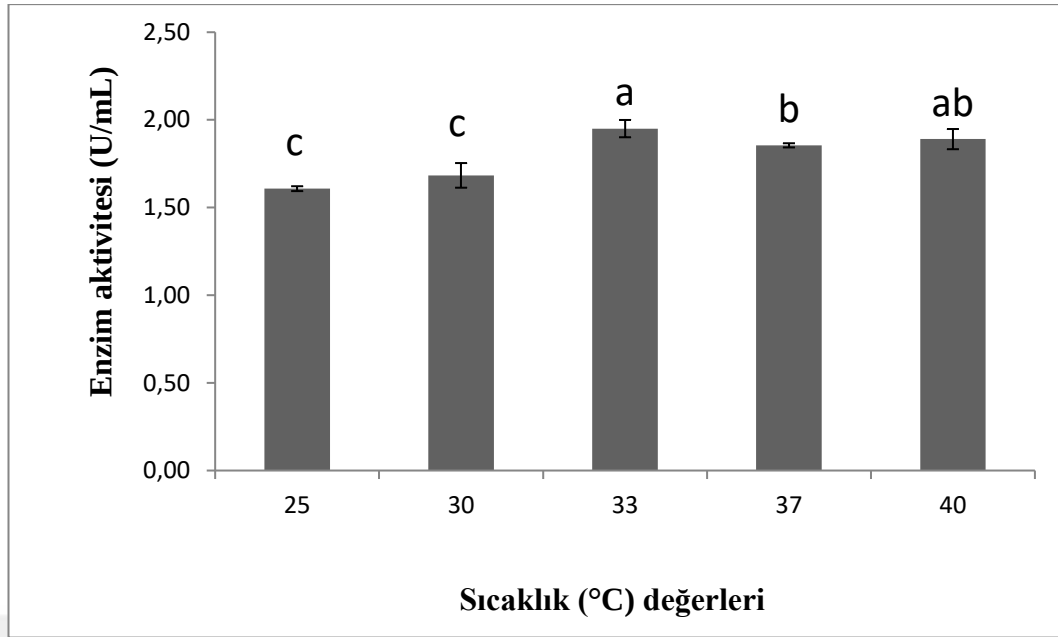
verilerine bakıldığında poligalakturonaz aktivitesi, optimal pH'ı 6,5 ile 7,0 arasında olan *Bacillus* P4.3 dışındaki tüm suşlar için pH 6,0'da en yüksek değerlerde görülmüştür.

Manal ve ark., (2016), *Paenibacillus lactis* NRC1 kullanarak poligalakturonaz enzimi ürettikleri çalışmada ortam pH'ının poligalakturonaz enzimi üretimine etkisini belirlemek için farklı pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) değerlerinde çalışmışlardır. Çalışma sonucunda poligalakturonaz üretiminin en yüksek olduğu değer pH 9 olarak belirtilmiştir.

Kapoor ve ark., (2000) *Bacillus* sp. MG-cp-2 suşu ile DNS metodu uygulanarak yaptıkları çalışmalarında ortam pH'ının bakterinin poligalakturonaz üretimine etkisini belirlemek amacıyla farklı pH aralıklarında (3-12) yaptıkları ölçümler sonucunda optimal enzim aktivitesinin pH 10'da (%100) gerçekleştiğini ve pH 8,5-12 arasında %86 aktivite gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

4.1.2.2. Poligalakturonaz enzim üretimine ortam sıcaklığının etkisi

Bacillus sp. VGA7 suşunun ürettiği poligalakturonaz enziminin en iyi çalıştığı ortam sıcaklığını belirlemek için 25 °C ile 40 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde Bölüm 3.6.2'de verilen yöntem kullanılarak çalışılmış ve bulgular Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Ortam sıcaklığı mikroorganizma gelişimini ve enzim aktivitesini doğrudan etkileyen parametrelerden biridir. Çalışılan tüm sıcaklıklarda enzim aktivitesi gözlemlenmiş olup 30-40 °C sıcaklıklarda enzim aktivitesinde önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Çalışma sonuçlarına göre poligalakturonaz enziminin aktivitesinin en yüksek olduğu ortam sıcaklığı 33 °C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 33 °C'de 1,95 U/mL iken 25,30,37 ve 40 °C'de sırasıyla 1,61 U/mL, 1,68 U/mL, 1,85 U/mL, 1,89 U/mL olarak elde edilmiştir. Çalışılan tüm sıcaklıklarda enzim üretiminin gerçekleşmesi *Bacillus* sp. VGA7 suşunun geniş bir sıcaklık aralığında enzim üretimi yapabildiğini göstermiştir.



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine sıcaklığın etkisi.

Çalışmadaki mevcut gözlemle uyumlu şekilde *Bacillus* sp.’nin enzim üretim koşulları için 30-50 °C aralığında rapor edilmiştir. Cassava bitkisinin atıklarından elde ettikleri *Bacillus* sp. MFW7 ile yapılan poligalakturonaz üretimi ve optimizasyonun incelendiği bir çalışmada bakteri izolatı, poligalakturonaz üretim koşullarını belirlemek amacıyla farklı kültür koşullarına tabi tutulmuş ve bu amaçla seçilen sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 55 °C) enzimin gelişimi incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre *Bacillus* sp. MFW7’den en yüksek poligalakturonaz üretiminin 35 °C’de gerçekleştiği bulunmuştur. Sıcaklığın daha da artması enzim aktivitesinin azalmasına sebep olmuştur (Kalaichelvan ve ark., 2012).

Bir başka çalışmada *Bacillus* sp. Y1 suşunun ürettiği poligalakturonaz enzim miktarını arttırmak amacıyla çalışan araştırmacılar 30, 34 ve 37 °C’de enzimin üretimini araştırmış ve *Bacillus* sp. Y1’in en yüksek poligalakturonaz enzimi ürettiği ortam sıcaklığının 34 °C olduğunu rapor etmişlerdir (Gua ve ark., 2019).

Bitkisel atıklardan izole edilen beş *Bacillus* sp. izolatı (PPB1, PPB2, PPB3, PPB4 ve PPB5) ile yaptıkları poligalakturonaz enzimi üretimi çalışmalarında Kaur ve ark., (2016) değerlendirilen parametreler göz önünde bulundurulduğunda en yüksek poligalakturonaz enzimi üretimi *Bacillus* sp. PPB5 suşu ile elde edilmiştir. Enzim üretim koşulları için farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 55°C) Lowry metodu ile çalışılmış ve *Bacillus* sp. PPB5 suşunun poligalakturonaz enzim üretiminin en yüksek 35 °C’de gerçekleştiği rapor edilmiştir. Diğer tüm üretim parametrelerinde de

PPB5 suşu en yüksek üretimi sağladığından endüstriyel ölçekli poligalakturonaz üretimi amaçlanan durumlar için kullanılabileceği bildirilmiştir.

Raju ve Divakar, (2013) poligalakturonaz enzimi üretimi için yaptıkları bir çalışmada sıcaklığın enzim üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla farklı sıcaklıklarda (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C) çalışmışlar ve en yüksek enzim üretiminin 40°C’de gerçekleştiğini bu sıcaklıktan sonra enzim üretimin düşmeye başladığını bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada poligalakturonaz enzimi üretimi üzerine yapılan araştırmada Manal ve ark., (2016), *Paenibacillus lactis* NRC1 ile çalışmışlardır. Ortam sıcaklığının poligalakturonaz üretimi üzerindeki etkisini incelemek üzere 25, 30, 35, 40, 45, 50 ve 55 °C sıcaklık değerlerinde enzim üretimi gerçekleştirmişler ve çalışma sonucunda en yüksek poligalakturonaz üretiminin 40 °C’de gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

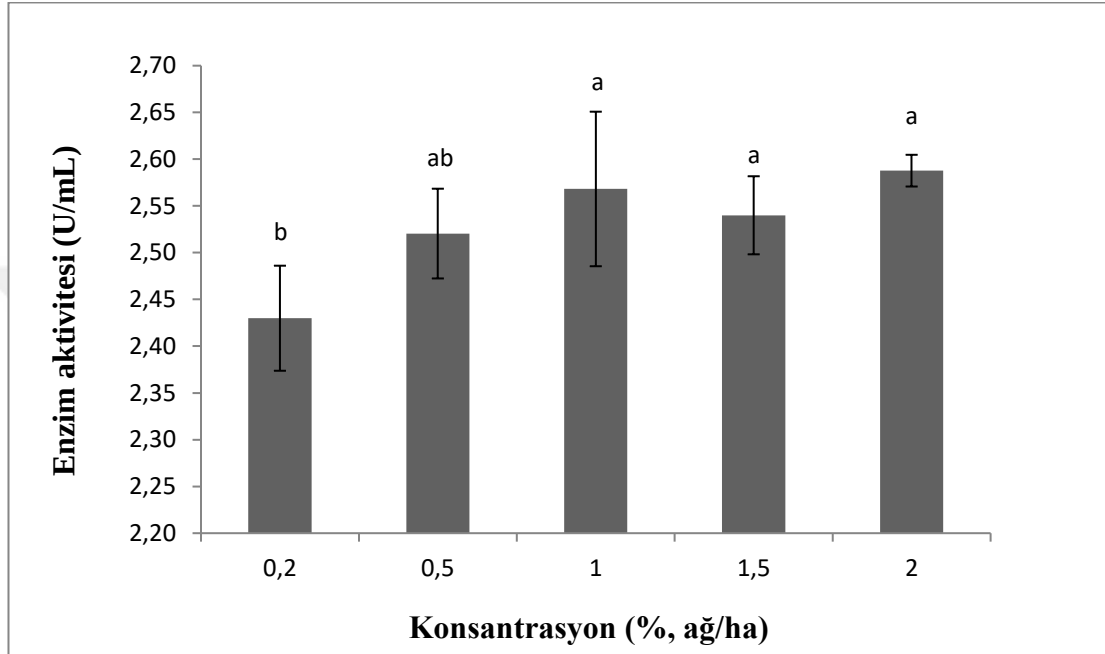
Tarımsal endüstriyel atıkların bakteriyel poligalakturonaz üretiminde kullanımı ve üretim parametrelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir başka çalışmada Reda ve ark., (2008)’nın *Bacillus firmus* –I-4071 suşunu kullanarak ortam sıcaklığının poligalakturonaz enzim üretimine etkisini incelemişlerdir. Farklı ortam sıcaklıklarında (10, 15, 30, 37, 40, 45, 55, 65 ve 75 °C) 96 saat inkübasyon sonunda en yüksek enzim üretimi 37 °C’de gerçekleşmiştir. Genel olarak 30-45 °C aralığında en yüksek değerler elde edilirken bu sıcaklıkların altında ve üstünde enzim üretiminde düşüş olduğu rapor edilmiştir.

Sıcaklık enzimin metabolik aktivitesini ve mikrobiyal gelişimini doğrudan etkileyen parametrelerden biridir. Sıcaklığın enzim üretimi üzerindeki etkisini belirlemek üzere Kaur ve Gupta (2017) *Bacillus subtilis* SAV-21 suşu ile yaptıkları poligalakturonaz ve pektin liyaz üretimi çalışmalarında 30–50 °C aralığında sıcaklık parametrelerini test etmişlerdir. Çalışma verilerine bakıldığında hem poligalakturonazın hem de pektin liyazın en yüksek üretimi 35 °C’de gösterdiği gözlemlenmiştir. Artan sıcaklıklarda ise enzim üretiminin azaldığı görülmüştür.

4.1.2.3. Poligalakturonaz enzim üretimine pektin konsantrasyonunun etkisi

Bacillus sp. VGA7 suşunun ürettiği poligalakturonaz enzimine pektin konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla, Bölüm 3.6.3’te verilmiş olan yöntemle göre farklı konsantrasyonlarda (2-5-10-15-20 g/L) çalışılmıştır (Şekil 4.5). Çalışılan tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesi gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler

değerlendirildiğinde konsantrasyonun %2 (2,59 U/mL) olduğu ortamda enzim üretiminin en yüksek seviyede olduğu görülmektedir. Genel değerlendirme olarak konsantrasyon arttıkça enzim üretiminde bundan olumlu yönde etkilendiği görülmektedir. Ancak %1 ve daha yüksek konsantrasyonlarda elde edilen enzim aktivitelerinde önemli fark yoktur ($P<0,05$). Sırasıyla 2’de %93,8, 5’te %97,2, 10’da %99,2 ve 15’te %98,0 oranında enzim üretimine etkileri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. *Bacillus* sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine pektin konsantrasyonunun etkisi.

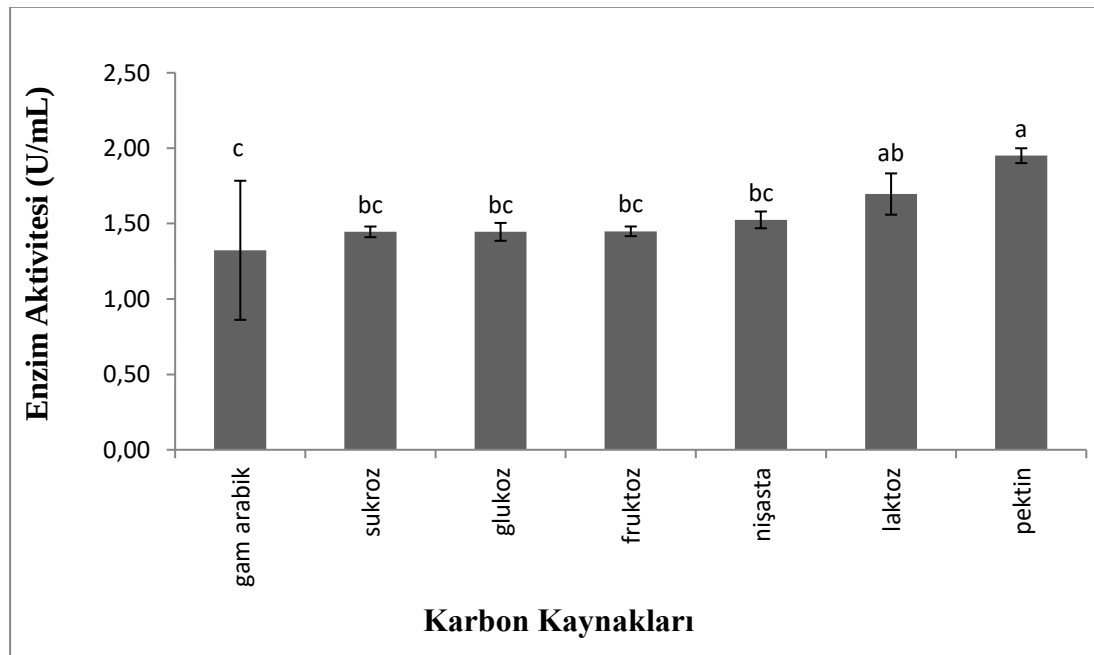
Kalaichelvan ve ark., 2012’de yaptıkları bir çalışmada *Bacillus* sp. MFW7’nin enzim üretim koşullarını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlardaki (%0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 ve 3,5) Cassava atıklarından enzim üretimi incelenmiş ve maksimum enzim üretiminin %1’de gerçekleştiği sonucunu elde etmişlerdir. %1’in altındaki ve üstündeki konsantrasyon değerlerinde enzim üretiminin sınırlandığı/baskılandığı bildirilmiştir.

Manal ve ark., (2016), *Paenibacillus lactis* NRC1 kullanarak poligalakturonaz enzimi ürettikleri çalışmada ortamdaki pektin konsantrasyonunun poligalakturonaz enzimi üretimine etkisini belirlemek için farklı konsantrasyonlarda (%0,01-0,02-0,03-0,04-0,05-0,06-0,07) pektin kullanmıştır. Çalışmanın sonucunda en yüksek pektinaz enzim aktivitesini %0,05 konsantrasyonda elde edilmiştir.

4.1.2.4. Poligalakturonaz enzim üretimine karbon kaynaklarının etkisi

Bacillus sp. VGA7 suşunun poligalakturonaz enzimi üretimine 6 farklı karbon kaynağının (gam arabik, sukroz, glukoz, fruktoz, nişasta, laktoz) etkisi belirlenmiştir (Şekil 4.6). Çalışmada elde edilen bulgulara bakıldığında kullanılan karbon kaynaklarının tamamında enzim aktivitesi sağlandığı görülmektedir. Ancak enzim üretiminin en yüksek olduğu karbon kaynağı pektin olarak belirlenmiştir. Ortamda pektin varlığında poligalakturonaz enzim üretimi 1,95 U/mL (%100) değerine ulaşmıştır. Pektini 1,70 U/mL (%87,1) ile laktoz ve 1,52 U/mL (%77,9) değeri ile nişasta takip etmektedir. Sukroz, glukoz, fruktoz, ve nişasta kullanımı ile elde edilen enzim aktivitesi değerleri arasında önemli fark olmadığı ($P>0,05$) gözlenmiştir. Öte yandan en düşük enzim üretimi ortamda gam arabik olduğunda olmuştur ($P<0,05$).

Karbon kaynaklarının poligalakturonaz enzimi üretiminde kullanımıyla ilgili daha önceki çalışmalar incelendiğinde çalışmada kullanılan kaynaklara paralel olarak çeşitli pektin türevleri (narenciye pektini, elma pektini), laktoz, glikoz, fruktoz ve nişasta ile çalışılmış ve sonuçlar değerlendirildiğinde pektin, laktoz ve glikoz en yüksek enzim üretiminin gerçekleştiği karbon kaynakları olarak ifade edilmiştir (Rehman ve ark., 2015; Jayani ve ark., 2010). Pektinin kullanılmadığı bazı çalışmalarda ise çalışmada pektini takip eden laktoz ve nişasta karbon kaynağı olarak poligalakturonaz enzim üretiminde kullanılabilecek karbon kaynakları olarak belirtilmiştir.



Şekil 4.6. *Bacillus* sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine karbon kaynaklarının etkisi.

Kapoor ve ark., (2000) *Bacillus* sp. MG-cp-2 suşu ile yaptıkları çalışmalarında karbon kaynağı olarak basit şekerler (arabinoz, galaktoz, glukoz, laktoz, maltoz, mannitol, ramnoz, sukroz) ve tarımsal yan ürünler (buğday kepeği, pirinç kepeği, pirinç kabuğu, pamuk tohumu, ayçiçeği çekirdeği, portakal kabuğu, şeker kamışı melası, guar gam) kullanarak karbon kaynaklarının poligalakturonaz enzimi üretimine etkisini rapor etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre maltoz, laktoz, sukroz ve mannitol, poligalakturonaz üretimi üzerinde herhangi bir anlamlı etki göstermezken; ramnoz, arabinoz, glikoz ve galaktozun enzim üretimini baskıladığı görülmüştür. Glikoz ve diğer basit şekerlerin varlığında poligalakturonaz üretiminin inhibisyonu, katabolit baskılamasına bağlı olarak yorumlanırken arabinoz, glukoz ve galaktoz gibi basit şekerlerle karşılaştırıldığında pektin polimerinin daha yüksek poligalakturonaz verimini gösterdiği bildirilmiştir.

Rehman ve ark., (2015) çürümüş sebzelerden poligalakturonaz üreten *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 ile yaptıkları çalışmalarında enzim aktivitesine karbon kaynaklarının etkisini belirlemek amacıyla elma pektini, narenciye pektini, laktoz, sukroz, glukoz, maltoz, fruktoz ve gliserol gibi karbon kaynaklarından yararlanmışlardır. Kullandıkları karbon kaynakları arasında en yüksek enzim aktivitesi değerine elma pektini ve narenciye pektini ile ulaşmışlardır.

Kaur ve ark., (2016) bitkisel atıklardan izole edilen *Bacillus* sp.'nin poligalakturonaz üretimi ve optimizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, karbon kaynaklarının poligalakturonaz enzim üretimine etkisini belirlemek amacıyla nişasta, fruktoz, laktoz, glikoz ve maltoz kullanarak enzim aktivitesi tayini gerçekleştirmişlerdir. Çalışılan *Bacillus* suşlarının (PPB1, PPB2, PPB3, PPB4 ve PPB5) tamamında analizler sonucunda en yüksek enzim üretiminin glikoz ve ardından laktoz varlığında gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

Bir başka çalışmada ise Prakash ve ark., (2014) *Bacillus subtilis* MTCC 441 ile yaptıkları poligalakturonaz üretimi ve optimizasyonu konulu çalışmalarında karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla glikoz, maltoz, laktoz, nişasta, ksiloz ve sakkaroz kullanmışlardır. Portakal kabuğu fermantasyonu sırasında *Bacillus subtilis* MTCC 441'in en yüksek enzim üretimini laktoz ve glikoz ortamda bulunduğu durumda gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

Kalaichelvan ve ark., (2012) Cassava bitkisinin atıklarından elde ettikleri *Bacillus* sp. MFW7 ile yaptıkları poligalakturonaz üretimi ve optimizasyonu çalışmasında glikoz, maltoz, laktoz, nişasta, ksiloz ve sakkaroz gibi karbon kaynakları kullanmışlar ve en yüksek verimin laktoz ve ardından ksiloz varlığında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Jayani ve ark., (2010) çalışmalarında *Bacillus sphaericus* ile poligalakturonaz enzimi üretmişler ve en iyi karbon kaynağı olarak narenciye pektini ve ksilozun diğer karbon kaynaklarına oranla daha yüksek değerlere ulaştığını rapor etmişlerdir.

Qureshi ve ark., (2012) *Bacillus subtilis* EFRL01 suşunun glikoz, maltoz, fruktoz, nişasta, laktoz, şeker kamışı ve atık hurma şurubu ile poligalakturonaz üretimini araştırmışlardır. En yüksek poligalakturonaz aktivitesinin fermantasyon ortamında atık hurma şurubu varlığında gerçekleştiğinin belirlemişlerdir. Atık hurma şurubundan sonra en yüksek poligalakturonaz aktivitesi şeker kamışı ve glukoz varlığında gerçekleşmiştir.

4.1.2.5. Poligalakturonaz enzim üretimine azot kaynaklarının etkisi

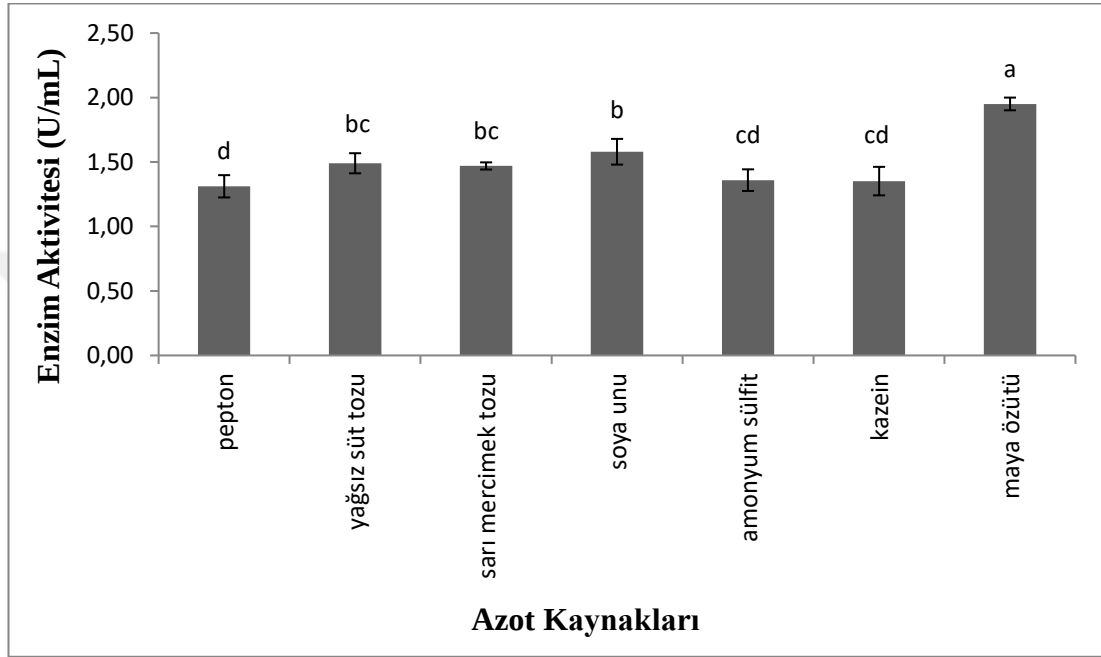
Bacillus sp. VGA7 suşunun poligalakturonaz enzim üretimi için ortamda bulunan azot kaynaklarının etkisinin incelenmesi amacıyla diğer tüm koşullar sabit tutularak ortama aynı miktarlarda organik ve inorganik azot kaynakları eklenmiştir. Bu çalışmayla azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Ortama azot kaynağı olarak pepton, yağsız süt tozu (YST), sarı mercimek tozu, soya unu, amonyum sülfid, kazein ve maya özütü eklenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.7’de verilmiştir.

Çalışılan tüm azot kaynaklarıyla enzim aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir. Maya özütü kullanıldığında enzim aktivitesinin önemli oranda arttığı gözlenmiştir ($P<0,05$). Elde edilen verilere göre enzim aktivitesi maya özütü varlığında 1,95 U/mL’ye değerine ulaşmıştır (%100). Maya özütünü takip eden diğer azot kaynakları sırasıyla soya unu 1,58 U/mL (%81), YST 1,49 U/mL (%76,4) ve sarı mercimek tozu 1,47 U/mL (%75,3)’dir. Kullanılan azot kaynakları arasından en düşük enzim üretimi pepton varlığında 1,31 U/mL (%67,1) olarak belirlenmiştir. Maya özütünün yüksek oranda serbest aminosit ve vitaminler içeren kompleks bir yapıya sahip olması diğer azot kaynaklarına kıyasla enzim üretiminde daha etkili olmasının sebebi olabilir.

Yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde bu çalışmada elde edilen sonuçlara paralel olarak bir çok araştırmacının *Bacillus*’lar üzerinde yaptıkları poligalakturonaz

enzim üretimi ve optimizasyonu çalışmalarında benzer azot kaynakları kullandıklarını ve çoğunun en uygun azot kaynağı olarak maya özütünü uygun buldukları görülmüştür.

Ancak maya özütünün pahalı bir substrat olması nedeniyle, büyük ölçekli üretimler hedeflendiğinde maya özütüne eşdeğer endüstriyel atıkların tercih edilmesi maliyet açısından daha doğrudur.



Şekil 4.7. *Bacillus* sp. VGA7 izolatının poligalakturonaz üretimine azot kaynaklarının etkisi.

Rehman ve ark., (2015) çalışmalarına *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 izolatının enzim aktivitesine azot kaynaklarının etkisini belirlemek amacıyla maya özütü, pepton, kazein, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorat, sodyum nitrat ve potasyum nitrat gibi azot kaynaklarından yararlanmışlardır. Kullandıkları azot kaynakları arasında en yüksek enzim aktivesi değerine maya özütü ile ulaşmışlardır. Poligalakturonaz üretimi açısından maya özütü, *B. licheniformis*'in diğer azot kaynaklarına kıyasla daha yüksek poligalakturonaz üretilmesini desteklemiştir. Bu sebeple Rehman ve ark., maya özütünü, poligalakturonaz üretimini arttırmaktan sorumlu olabilecek esansiyel amino asitleri, vitaminleri ve diğer eser elementleri içeren, bileşimi bilinmeyen karmaşık bir besin kaynağı olarak değerlendirmişlerdir.

Kaur ve ark., (2016) bitkisel atıklardan izole edilen *Bacillus* sp.'nin poligalakturonaz üretimi ve optimizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, azot kaynaklarının

poligalakturonaz enzim üretimine etkisini belirlemek amacıyla ortama organik ve inorganik azot kaynakları (tripton, maya özütü, üre, pepton, amonyum nitrat ve amonyum klorür) eklenerek enzim aktivitesi tayini gerçekleştirmişler ve analizler sonucunda *Bacillus* sp. PPB1, PPB2, PPB3, PPB4 ve PPB5'te en yüksek enzim üretiminin organik azot kaynaklarından pepton varlığında ve inorganik azot kaynaklarından amonyum klorür ($\text{NH}_4 \text{Cl}$) varlığında gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

Raju ve Divakar, (2013) bitkisel atık alanlarından izole edilen *Bacillus circulans*'ı kullanarak poligalakturonaz üretimi yaptıkları çalışmalarında seçmiş oldukları mikroorganizmaların polgalakturonaz üretimlerine organik azot kaynaklarının etkisini belirlemek amacıyla kazein, malt özütü, pepton, üre, jelatin ve maya özütü kullanmışlardır. Çalışma sonucunda bu çalışmaya paralel olarak kullanılan azot kaynaklarından maya özütü varlığında en yüksek poligalakturonaz enzimi üretiminin gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Bacillus subtilis MTCC 441 ile yapılan poligalakturonaz enzim üretimi ve optimizasyonu çalışmalarında Prakash ve ark., (2014) azot kaynaklarının enzim üretimi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla üre, pepton, maya özütü, KNO_3 , $\text{NH}_4 \text{Cl}$, ve NaNO_3 kullanmışlardır. Çalışma bulgularına bakıldığında pepton ve maya özütünün, kullanılan diğer azot kaynaklarına göre enzim üretimine daha yüksek oranda katkıda bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Bacillus sphaericus MTCC 7542, tek azot kaynağı olarak maya özütü içeren mineral ortamda geliştirildiğinde maksimum poligalakturonaz üretimi sağlandığı kanıtlanmıştır (Jayani ve ark., 2010).

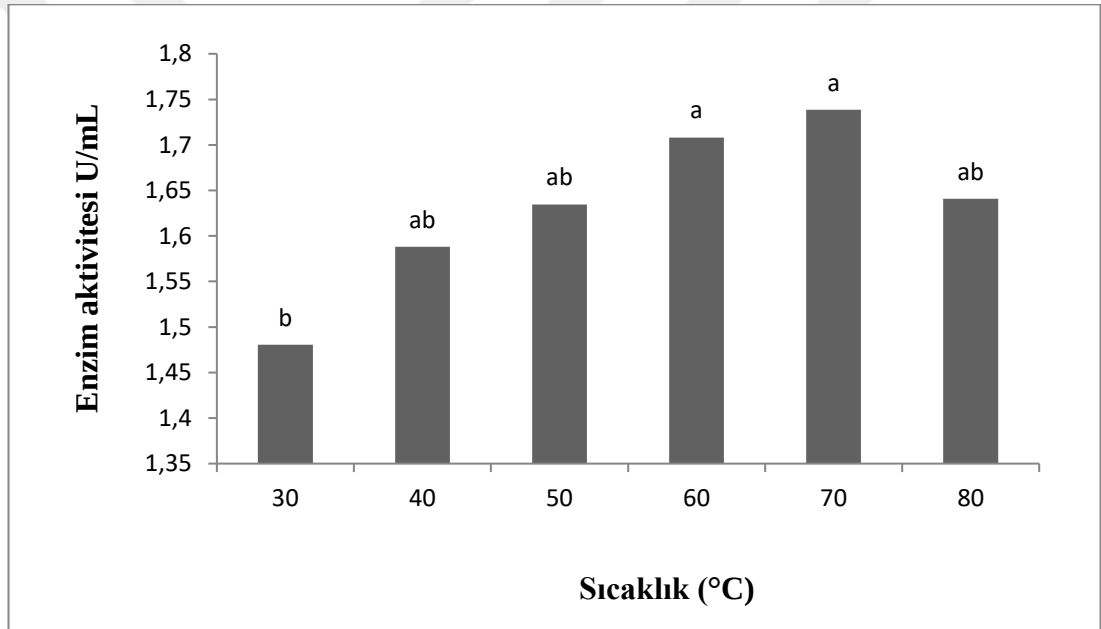
Başka bir çalışmada düşük maliyetli poligalakturonaz enzim üretimi için *Bacillus subtilis* EFRL01 kullanılarak azot kaynakları değerlendirilmiştir. Çalışmada pepton, maya özütü, mısır likörü, sodyum nitrat, potasyum nitrat ve amonyum klorat kullanılan azot kaynaklarıdır. En düşük poligalakturonaz üretimi potasyum nitrat ve sodyum nitrat varlığında gerçekleşirken; en yüksek poligalakturonaz enzim üretiminin maya özütü varlığında gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Qureshi ve ark., 2012).

4.1.3. *Bacillus* sp. VGA7 suşundan elde edilen poligalakturonaz enziminin birtakım özelliklerinin incelenmesi

4.1.3.1. Poligalakturonaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi

Poligalakturonaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için Bölüm 3.7.1’de belirtildiği şekilde farklı sıcaklık değerlerinde 30 °C, 40 °C, 50°C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C’de enzim aktivitesi tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’de verilmiştir.

Enzimin optimum sıcaklık değeri 70 °C olarak belirlenmiştir. Enzim aktivitesi 30 °C’den 70 °C’ye kadar sürekli bir artış göstermesinin ardından 70 °C’den sonra düşmüştür. Optimum sıcaklığın 70 °C gibi yüksek bir değer olması çalışılan enzimin yüksek sıcaklıklara dirençli olduğunun göstergesidir.



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. VGA7 suşunun optimum sıcaklığının belirlenmesi.

Manal ve ark., (2016) poligalakturonaz enzimi üretimi için *Paenibacillus lactis* NRC1 ile çalışmışlar ve *Paenibacillus lactis* NRC1’in ürettiği poligalakturonaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla 30-80 °C aralığında termal stabilite çalışması yapmışlardır. Çalışma sonucunda enzimin 40 °C’de %100 stabilite gösterdiği belirlenmiştir.

Benzer bir çalışmada poligalakturonaz enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi amacıyla *Aspergillus* spp. Gm suşu kullanılarak 25-50 °C sıcaklık aralığında stabilite bakılmış ve poligalakturonaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının 30 °C olduğu bildirilmiştir (Sudeep ve ark., 2020).

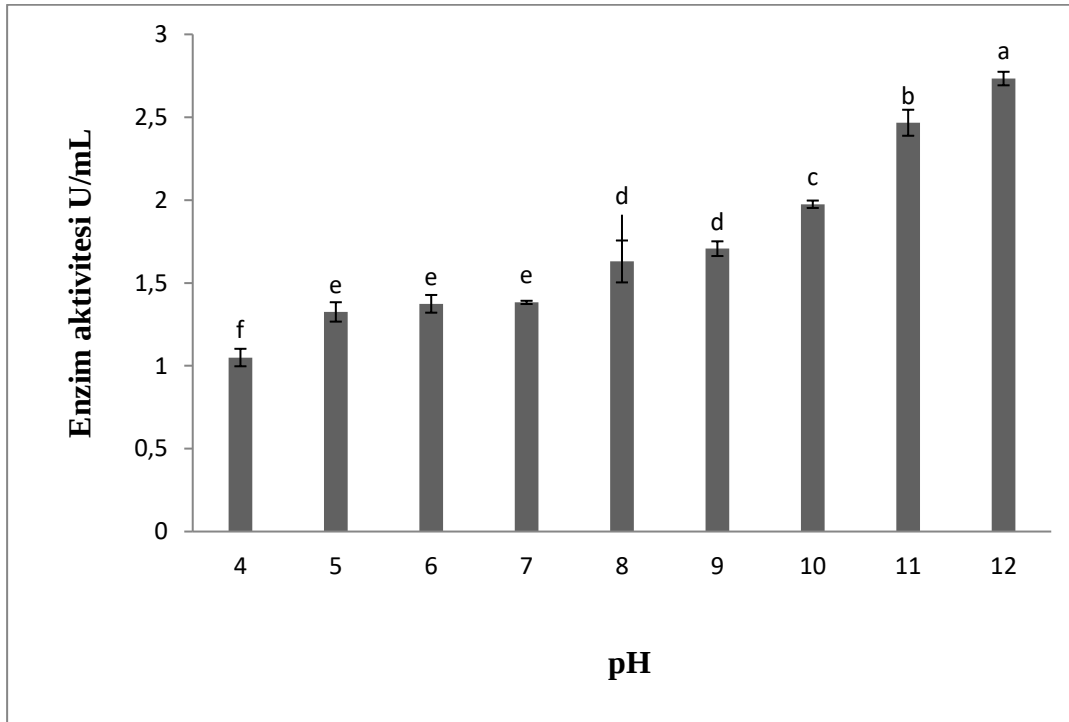
Bharadwaj ve ark., (2019) poligalakturonaz enziminin optimum sıcaklığını belirlemek için yaptıkları çalışmada 20, 40, 60, 80, 100 °C sıcaklıklarda çalışmışlar ve optimum sıcaklığın 60 °C olduğunu bildirmişlerdir.

4.1.3.2. Poligalakturonaz enziminin optimum pH'nın belirlenmesi

Poligalakturonaz enzimin optimum çalışma pH'nın etkini belirlemek için Bölüm 3.7.2'de belirtildiği gibi standart enzim aktivitesi deneyi gerçekleştirilmiştir. Substrat olarak kullanılan %1'lik pektin çözeltisinin pH'ı tampon çözeltiler yardımıyla farklı pH değerlerine (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) ayarlanmıştır. DNS metoduyla ortamdaki indirgen şeker miktarı belirlenmiş ve UV-VIS spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans okuması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kullanılarak oluşturulan grafik Şekil 4.9'da verilmiştir.

Enzimin optimum pH'nın 12 olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuç enzimin alkali özelliği gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Kapoor ve ark., (2000) *Bacillus* sp. MG-cp-2 suşu ile DNS metodu uygulayarak yaptıkları çalışmalarında 30-90 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda poligalakturonaz aktivitesi ölçümü yapmışlar ve en yüksek enzim aktivitesi değerine 60 °C'de ulaşıldığını rapor etmişlerdir.



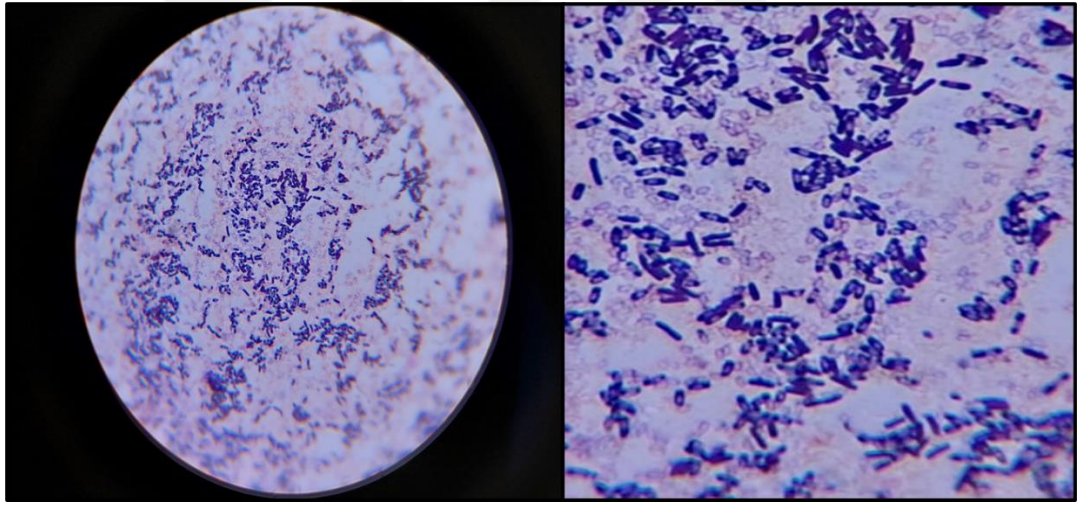
Şekil 4.9. *Bacillus* sp. VGA7 suşunun optimum pH çalışması.

Manal ve ark., (2016) poligalakturonaz enzimi üretimi için *Paenibacillus lactis* NRC1 ile çalışmışlar ve *Paenibacillus lactis* NRC1'in poligalakturonaz enziminin optimum pH'ını belirlemek amacıyla farklı tamponlar kullanarak bu çalışmaya paralel olarak pH 3-10 aralığında optimum koşulları incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre enzimin optimum pH'ı 6-8 aralığında çıkmıştır.

Sudeep ve ark., (2020) yaptıkları bir çalışmada poligalakturonaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla pH 3,2-9 aralığında çalışmışlar ve optimum enzim aktivitesinin pH 5,8'de olduğunu bildirmişlerdir. Bu da enzimin hafif asidik ortamda en yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

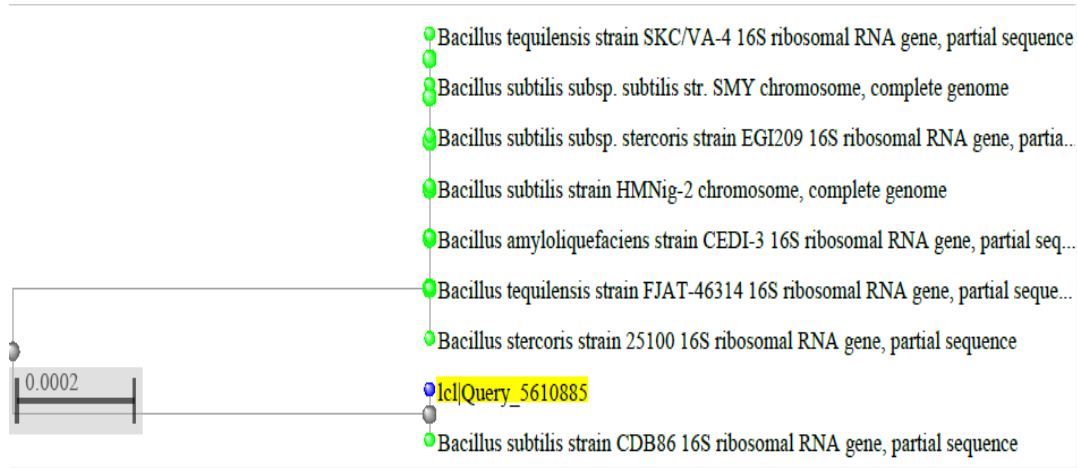
4.2. *Bacillus* sp. VGA7 İzolatının Tanımlanması

Yapılan morfolojik ve biyokimyasal testlerden elde edilen sonuçlara göre *Bacillus* sp. VGA7'nin Gram pozitif, katalaz pozitif ve spor pozitif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *Bacillus* sp. VGA7 izolatına ait 100x objektifle elde edilen mikroskop görüntüsü.

Moleküler düzeyde gerçekleştirilen 16S rDNA gen dizisi analizine göre izolatın *Bacillus subtilis* ile %100 uyumlu olduğu belirlenmiştir. VGA7 suşunun bazı *Bacillus* sp. türleri ile olan benzerlik oranları Tablo 4.2.'de, izolata ait filogenetik ağaç Şekil 4.11.'de verilmiştir.



Şekil 4.11. *Bacillus* sp. VGA7 bakterisine ait 16S rDNA gen dizisi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç.

Tablo 4.2. VGA7 izolatının *Bacillus* sp. türleri ile 16s rDNA benzerlik oranı.

<i>Bacillus</i> sp.	Benzerlik %'si
<i>B. tequilensis</i> SKC/VA-4 suşu	99,86
<i>B. subtilis</i> SMY suşu	99,86
<i>B. subtilis</i> EGI209 suşu	99,86
<i>B. subtilis</i> HMNig-2 suşu	99,86
<i>B. amyloliquefaciens</i> CEDI-3 suşu	99,86
<i>B. tequilensis</i> FJAT 46316 suşu	99,86
<i>B. stercoris</i> 25100 suşu	99,86

5. SONUÇLAR

Bu çalışma kapsamında, Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda yer alan ve önceki çalışmalarda örneklerden izole edilen 25 adet suş; pektin katkılı katı besiyerinde pektinolitik aktivite açısından taranmış ve yüksek poligalakturonaz enzimi üreticisi olarak *Bacillus* sp. VGA7 belirlenmiş ve *Bacillus* sp. VGA7'nin poligalakturonaz enzimi üretimi araştırılmıştır.

Bacillus sp. VGA7 maksimum enzim üretimi ve mikroorganizma gelişimi 24 saatlik inkübasyon ile elde edilmiştir. Çalışmada maksimum prektinaz üretimi ve mikroorganizma gelişimini elde etmek amacıyla, inkübasyon sıcaklığı, pektin konsantrasyonu, pH, karbon kaynakları ve azot kaynakları olmak üzere temel belirleyici parametreler kullanılarak mikroorganizma geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, enzim üretiminin en yüksek olduğu pH 9, konsantrasyon 20 g/L, sıcaklık 33 °C olarak belirlenmiştir. Bunlara ek olarak ortamda karbon kaynağı olarak pektin bulunduğu ve azot kaynağı olarak maya özütü varlığında en yüksek enzim üretimi gerçekleşmiştir. Aynı zamanda enzimin optimum sıcaklık ve pH değerini belirlemek için de bir çalışma gerçekleştirilmiş.

Optimum sıcaklığı 70 °C olarak belirlenmiş ve bunu takip eden sıcaklık değerinin 60 °C olduğu belirlenmiştir. Optimum pH'ın ise 12 olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde *Bacillus* sp. VGA7'nin alkali özellikleri gösterdiği kabul edilmiştir. Bu bilgiler ışığında enzimin uygulama alanları ile ilgili çalışmalar ileride gerçekleştirilebilir.



KAYNAKLAR

- Ahlawat, S., Mandhan, R. P., Dhiman, S. S., Kumar, R., & Sharma, J. (2008). Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149, 287-293.
- Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., & Nowrouzi, A. (2016). 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.
- Alkorta I, Garbisu C, Liama MJ, Serra JL. 1998. Industrial applications of pectin enzymes: A review. *Process Biochem*, 33(1): 21-28.
- Altun, B., Besler, T., & Ünal, S. (2002). Ankara’da satılan sütlerin değerlendirilmesi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 11(2), 45-55.
- Amin, F., Bhatti, H. N., & Bilal, M. (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1017-1026.
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bhatti, I. A., & Asgher, M. (2013). Utilization Of Wheat Bran for Enhanced Production of Exopolygalacturonase by *Penicillium Notatum* Using Response Surface Methodology. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 50(3).
- Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017). Multiple parameter optimizations for enhanced biosynthesis of exo-polygalacturonase enzyme and its application in fruit juice clarification. *International Journal of Food Engineering*, 13(2), 20160256.
- Anisa, S. K., & Girish, K. (2014). Pectinolytic activity of *Rhizopus* sp. and *Trichoderma viride*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 4(2), 28-31.
- Arslan, N. (1994). Pektinin fizikokimyasal özellikleri, üretimi ve gıdalarda kullanımı. *Gıda*, 19(3).
- Aygan, A., & Arıkan, B. Amilaz Selülaz ve Ksilanaz Üretebilen Orta Düzeyde Halofil *Bacillus* sp. İzolasyonu ve Optimum Üreme ve Enzim Sentezlerinin Belirlenmesi.
- Ázar, R. I. L., da Luz Morales, M., Maitan-Alfenas, G. P., Falkoski, D. L., Alfenas, R. F., & Guimarães, V. M. (2020). Apple juice clarification by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis*. *Food and Bioprocess Processing*, 119, 238-245.
- Bajpai, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 15(2), 147-157.

- Bharadwaj, P. S., & Udupa, P. M. (2019). Isolation, purification and characterization of pectinase enzyme from *Streptomyces thermocarboxydus*. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, 5(1), 001-006.
- Biz, A., Farias, F. C., Motter, F. A., de Paula, D. H., Richard, P., Krieger, N., & Mitchell, D. A. (2014). Pectinase activity determination: an early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works. *PLoS One*, 9(10), e109529.
- Bonner, J. (1936). The chemistry and physiology of the pectins. *The Botanical Review*, 2, 475-497.
- Boyce, A. and Walsh, G. 2007. Production, Purification and Application-Relevant Characterisation of an Endo-1,2 (4)-B-Glucanase from *Rhizomucor miegei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 76:835-841.
- Bülbül, M., (2014). *Biyokimya*, Hilal Ofset, 1. Baskı.
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1443-1454.
- Collares, R. M., Miklasevicius, L. V., Bassaco, M. M., Salau, N. P., Mazutti, M. A., Bisognin, D. A., & Terra, L. M. (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of cassava to obtain fermentable sugars. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13, 579-586.
- Cordeiro, C. A. M., & Martins, M. L. L. (2009). Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. *Food Science and Technology*, 29, 135-141.
- Coşkun A. (2010). Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu [Yüksek lisans tezi]. Çukurova Üniversitesi.
- Coşkun, A. (2010). Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana).
- Favela-Torres, E., Volke-Sepúlveda, T., & Viniegra-González, G. (2006). Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
- Fratebianchi, D., Acosta, M. A., & Cavalitto, S. F. (2018). Harnessing soybean hulls for improved polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* through fine-tuning of ambient pH. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(3), 667-674.
- Frey-Wyssling, A. (1948). *Submicroscopic morphology of protoplasm*. Elsevier Publishing.
- Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6, 1-13.
- Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 223-225.

- Gözükara, F., & Arıkan, B. (2009). Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Lichenaz (B-1, 3 Ve 1, 4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği. ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi).
- Guerrand, D. (2018). Economics of food and feed enzymes: Status and prospectives. In *Enzymes in human and animal nutrition* (pp. 487-514). Academic Press.
- Guo, F., Li, X., Zhao, J., Li, G., Gao, P., & Han, X. (2019). Optimizing culture conditions by statistical approach to enhance production of pectinase from *Bacillus* sp. Y1. *BioMed Research International*, 2019.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. 2013. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 2013, 1–18.
- Herron, S. R., Benen, J. A., Scavetta, R. D., Visser, J., & Jurnak, F. (2000). Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8762-8769.
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Honda, S., Nishimura, Y., Takahashi, M., Chiba, H., & Kakehi, K. (1982). A manual method for the spectrophotometric determination of reducing carbohydrates with 2-cyanoacetamide. *Analytical Biochemistry*, 119(1), 194-199.
- Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N. B. Q. K., & Beg, Q. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 409-418.
- Horikoshi, K. (1996). Alkaliphiles—from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 259-270.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnolgy. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (4): 735- 750.
- Hossain, A. B. M. S., Ahmed, S. A., Alshammari, A. M., Adnan, F. M., Annuar, M. S. M., Mustafa, H., & Hammad, N. (2011). Bioethanol fuel production from rotten banana as an environmental waste management and sustainable energy. *Afr J Microbiol Res*, 5(6), 586-598.
- Iconomou, D., Arapoglou, D., & Israilides, C. (2010). Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. *Grasas y Aceites*, 61(3), 303-311.
- Jacob, N., & Prema, P. (2006). Influence of Mode of Fermentation on Production of Polygalacturonase by a Novel Strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).
- Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.
- Jayani, R. S., Shukla, S. K., & Gupta, R. (2010). Screening of bacterial strains for polygalacturonase activity: its production by *Bacillus sphaericus* (MTCC 7542). *Enzyme Research*, 2010.

- Kalaichelvan, P. (2012). Production and optimization of pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using cassava waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(3), 369-375.
- Kalaycı, E., Avinc, O. O., BBOZKURT, A., & Yavaş, A. (2016). Sustainable textile fibers obtained from agricultural wastes: Pineapple leaf fibers. *Sakarya University Journal of Science*, 20(2), 203-221.
- Kalkan, S., & Halkman, K. (2006). *Bacillus cereus* ve içme sütünde oluşturduğu sorunlar. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 4(1), 1-11.
- Kapoor, M., Beg, QK, Bhushan, B., Dadhich, KS ve Hoondal, GS (2000). *Bacillus* sp.'den termo-alkali stabil bir poligalakturonazın üretimi ve kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. *MG-cp-2. Proses Biyokimyası*, 36 (5), 467-473.
- Karapinar, E., & Sariisik, M. O. (2004). Scouring of cotton with cellulases, pectinases and proteases. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 12(3), 79-82.
- Kaur, G., Kumar, S., & Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Bioresource Technology*, 94(3), 239-243.
- Kaur, S., Kaur, H. P., Prasad, B., & Bharti, T. (2016). Production and optimization of pectinase by *Bacillus* sp. isolated from vegetable waste soil. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 6(1), 4185-4190.
- Kirk, T. K., & Jeffries, T. W. (1996). Roles for microbial enzymes in pulp and paper processing.
- Kobayashi, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Sawada, K., Hagihara, H., Kawai, S., & Ito, S. (2001). Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(1), 70-75.
- Kuddus M. introduction to Food Enzymes. in: Kuddus M., eds. *Enzymes in Food Biotechnology*. Academic Press; 2019. p. 1-18.
- Kumar, A., & Sharma, R. (2012). Production of alkaline pectinase by bacteria (*Cocci* sps.) isolated from decomposing fruit materials. *J Phytol*, 4(1), 1-5.
- Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17(7), 561-594.
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., & Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase: source, structure and application. *Industrial enzymes: Structure, function and applications*, 505-529.
- Lin, L. L., Chyau, C. C., & Hsu, W. H. (1998). Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 28(1), 61-68.
- Manal, S. S., Sahar, S. M., Manal, G. M., Mohsen, M. A., & Osama, H. E. (2016). Purification, and kinetics of pectinase production from *Paenibacillus lactis* NRC1 locally isolated from Egyptian mangrove habitat. *Der Pharma Chem*, 8, 150-159.
- Mantovani, C. F., Geimba, M. P., & Brandelli, A. (2005). Enzymatic clarification of fruit juices by fungal pectin lyase. *Food Biotechnology*, 19(3), 173-181.

- McCready, R. M., & Reeve, R. M. (1955). Plant tissue analysis, test for pectin based on reaction of hydroxamic acids with ferric ion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3(3), 260-262.
- Mehanni, A. E. S., El-Reffaei, W. H. M., Melo, A., Casal, S., & Ferreira, I. M. (2017). Enzymatic extraction of oil from *Balanites Aegyptiaca* (Desert Date) kernel and comparison with solvent extracted oil. *Journal of Food Biochemistry*, 41(2), e12270.
- Mercan Ülkü, D. (2018). Antep fıstığı bitkisinden (*Pistacia vera* L.) lipaz enzimi saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin incelenmesi (Yüksek Lisans Tezi, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Mercimek Takcı, H. A., & Turkmen, F. U. (2016). Extracellular pectinase production and purification from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *International Journal of Food Properties*, 19(11), 2443-2450.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mohandas, A., Raveendran, S., Parameswaran, B., Abraham, A., Athira, R.S., Mathew, A.K. ve Pandey, A. 2018. Production of Pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. *Food Technology and Biotechnology*, 56 (1): 110.
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.
- Murad, H. A., & Azzaz, H. H. (2011). Microbial pectinases and ruminant nutrition. *Research Journal of Microbiology*, 6(3), 246-269.
- Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2011). Improvement of robusta coffee fermentation with microbial enzymes. *European Journal of Applied Sciences*, 3(4), 130-139.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2005. "Principles of Biochemistry", Fourth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 192.
- Ortega, N., De Diego, S., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. (2004). Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 88(2), 209-217.
- Oslen, H.S. 2000. *Enzymes at work- A concise guide to industrial enzymes and their use*. Novozymes A/S Bagsvaerd, Denmark.
- Oumer, O.J. ve Abate, D. 2017. Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. *Enzyme Research*, Vol. 2017, 7 s.
- Özlem, Tepe., & Dursun, A. Y. (2022). Biyoreaktörde *Bacillus pumilus* ile Pektinaz Enzimlerinin Üretimi ve Karıştırma ve Hava Akış Hızının Etkisinin İncelenmesi. *International Journal of Pure and Applied Sciences*, 8(1), 239-252.
- Palomäki, T., & Saarilahti, H. T. (1997). Isolation and characterization of new C-terminal substitution mutations affecting secretion of polygalacturonase in *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *FEBS letters*, 400(1), 122-126.
- Patel AK, Singhanian RR, Pandey A. Chapter 2 - Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. in: Brahmachari G., eds. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Academic Press; 2017. p. 13-41.

- Pedrolli, D. B., Monteiro, A. C., Gomes, E., & Carmona, E. C. (2009). Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnology Journal*, 9-18.
- Polaina J (ed), MacCabe AP (ed). 2007. *Industrial Enzymes, Structure, Function and Applications*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 633 p.
- Prakash, S., Karthik, R., Venthana, M. T., Sridhar, B., & Bharath, P. G. (2014). Optimization and Production of Pectinase from *Bacillus subtilis* (mtcc 441) by using Orange Peel as a Substrate. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(6), 1177-1179.
- Praveen, K. G., and V. Suneetha. "A cocktail enzyme-pectinase from fruit industrial dump sites: a review." *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 5.2 (2014): 1252-1258.
- Qureshi, A. S., Khushk, I., Ali, C. H., Chisti, Y., Ahmad, A., & Majeed, H. (2016). Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 146-151.
- Raju, E. V. N., & Divakar, G. (2013). Production of pectinase by using *Bacillus circulans* isolated from dump yards of vegetable wastes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(7), 2615.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.
- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E. M., Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/technology*, 16, 381-394.
- Reda, A. B., Hesham, M. Y., Mahmoud, A. S., & Ebtsam, Z. A. (2008). Production of bacterial pectinase (s) from agro-industrial wastes under solid state fermentation conditions. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(12), 1708-1721.
- Rehman, H. U., Siddique, N. N., Aman, A., Nawaz, M. A., Baloch, A. H., & Qader, S. A. U. (2015). Morphological and molecular based identification of pectinase producing *Bacillus licheniformis* from rotten vegetable. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 139-144.
- Revilla, I., & González-San José, M. L. (2003). Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International journal of food science & technology*, 38(1), 29-36.
- Ricard, M., & Reid, I. D. (2004). Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(5), 499-504.
- Saha, B.C., Jordan D.B., and Bothast R.J., *Enzymes, industrial (Overview)*, Encyclopedia of Microbiology. Academic Press, Oxford, 281-294, 2009.
- Sethi, B. K., Nanda, P. K., & Sahoo, S. (2016). Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. *3 Biotech*, 6, 1-15.

- Sharma, D. C., & Satyanarayana, T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresource Technology*, 97(5), 727-733.
- Singh, R., Kumar, A., Chopra, N., Mahajan, R., & Kaur, J. (2019). Conserved cysteine variants of metagenomic derived polygalacturonase concurrently shift its optima at acidic pH and enhanced thermostability: structural and functional analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(1), 265-273.
- Soares, M. M., Silva, R. D., & Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30, 299-303.
- Sudeep, K. C., Upadhyaya, J., Joshi, D. R., Lekhak, B., Chaudhary, D. K., Pant, B. R., ... & Raghavan, V. (2020). Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. *Fermentation*, 6(2), 59.
- Tabssum, F., & Ali, S. S. (2018). Screening of pectinase producing gram positive bacteria: isolation and characterization. *Punjab University Journal of Zoology*, 33(1), 11-15.
- Tapias, Y. A. R., Rivero, C. W., Gallego, F. L., Guisán, J. M., & Trelles, J. A. (2016). Stabilization by multipoint covalent attachment of a biocatalyst with polygalacturonase activity used for juice clarification. *Food Chemistry*, 208, 252-257.
- Thakur, J., & Gupta, R. (2012). Improvement of tea leaves fermentation through pectinases. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59(3), 321-334.
- Uenojo, M., & Pastore, G. M. (2007). Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Química Nova*, 30, 388-394.
- Ustaçelebi, Ş. (1999). Temel ve klinik mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi.
- Uzuner, S. Ve Çekmecelioğlu, D. (2016). Gıda Atıklarının Pektinaz Enzimi Üretiminde Kullanımı. *Gıda*, 41 (4), 259-266.
- Venkatanagaraju, E., & Divakar, G. (2017). Purification Strategies for Microbial Pectinases. *Current Trends in Biotechnology & Pharmacy*, 11(2).
- Wiseman, A. (1985). *Handbook of Enzyme Biotechnology*.
- Wiseman, A. (1987). *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, 274-373.
- Wong, L. Y., Saad, W. Z., Mohamad, R., & Tahir, P. M. (2017). Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. *Industrial Crops and Products*, 97, 175-183.
- Young, T. W., Wadeson, A., Glover, D. J., Quincey, R. V., Butlin, M. J., & Kamei, E. A. (1996). The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequence and pH-regulated transcription. *Microbiology*, 142(10), 2913-2921.
- Yu, P., Zhang, Y., & Gu, D. (2017). Production optimization of a heat-tolerant alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* ZGL14 and its purification and characterization. *Bioengineered*, 8(5), 613-623.

Zhang, J., Pakarinen, A., & Viikari, L. (2013). Synergy between cellulases and pectinases in the hydrolysis of hemp. *Bioresource Technology*, 129, 302-307.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Kudret BULUT

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2019, Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
- **Yükseklisans** : 2023, Sakarya Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, YL.

MESLEKİ DENEYİM

- 2020-2022 yılları arasında Güvenler Ekmek Fabrikası'nda Gıda Mühendisi olarak çalıştı.
- 2022-Halen Sodexo Entegre Hizmet Yönetimi A.Ş.'de Üretim ve Vardiya Şefi olarak çalışmaya devam etmekte.