

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Damla SİHAY

***Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T'den PULLULANAZ
ÜRETİMİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T'den PULLULANAZ ÜRETİMİ**

Damla SİHAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez / /2019 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Hatice KORKMAZ
DANIŞMAN

.....
Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ
ÜYE

.....
Dr. Öğr. Üyesi Akın YİĞİN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2014-2634**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T'den PULLULANAZ ÜRETİMİ**

**Damla SİHAY
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Yıl: 2019, Sayfa: 93
Jüri : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Doç. Dr. Dilek ALAGÖZ
: Dr. Öğr. Üyesi Akın YİĞİN

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi kampüs toprağından izole edilen ve *Fontibacillus* cinsine ait yeni bir type tür olarak tanılanan *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T'den pullulanaz üretilmiş ve enzimin karakterizasyonu yapılmıştır.

Pullulanaz aktivitesini saptamak amacı ile izole eden 110 suş %1 nişasta ve %1 pullulan içeren agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra bakteri kültürü iyot çözeltisi ile boyanmıştır. 14 suшта pullanaz aktivitesi görülmüştür.

Kısmi olarak saflaştırılan enzimin optimum aktivitesi pH 8,0 ve 30°C'de saptanmıştır. Enzimin pH 5,0-7,0 aralığında ortalama %87 aktiviteye sahip olması asidik ortamda çalışmaya elverişli olduğunu göstermiştir. 30°C-50°C aralığında ortalama %95 aktiviteyle enzimin yüksek oranda kararlılık da sağladığı belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular, izole edilen enzimin endüstride kullanıma uygun olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T, pullulanaz, pullulan, enzim üretimi

ABSTRACT

MSc THESIS

PRODUCTION OF PULLULANASE FROM *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T

Damla SİHAY
CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
Year: 2019, Pages: 93
Jury : Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ
: Assoc. Dr. Dilek ALAGÖZ
: Dr. Lecturer Akın YİĞİN

In this study, pullulanase was produced by a new type of genus of *Fontibacillus*; *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T isolated from soil of Cukurova University campus and the produced enzyme has been characterized.

Total 110 strains were inoculated into producing medias (%1 starch and %1 pullulan contained) and incubated at 37°C for 72 hours. Then for the detection of pullulanase activity the bacteria culture was stained with iodine solution. 14 of them showed pullulanase activity.

The partially purified pullulanase has optimum activity at pH 8.0, 30°C.

According to these results due to the characteristics of the enzyme, it can be suggested that industrial field use is appropriate.

Key Words: *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T, pullulanase, pullulan, enzyme production

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Bu çalışmada, Çukurova Üniversitesi kampüs toprağından izole edilen ve *Fontibacillus* cinsine ait yeni bir type tür olarak tanılanan *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T'den pullulanaz üretilmiş ve enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Toplam 110 suş izole edilmiş ve pullulanolitik aktivite gösteren 14 suş olduğu tespit edilmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği belirlenen DSHK107 suşu 16S rRNA ve yağ asiti analizleri sonucunda, *Fontibacillus* cinsine ait yeni bir tür olarak izole edilmiş ve DSHK107^T *Fontibacillus pullulanilyticus* olarak isimlendirilmiştir.

Katı besiyerinde DSHK107 suşunu kullanarak pullulanaz üretimi gerçekleştirdiğimizde, optimum pH 9,0, sıcaklık 37°C saptanmıştır. Sıvı besiyerinde ise en iyi enzim üretimi pH 8,0 ve 30°C'de gözlenmiştir.

Enzim üretiminde karbon kaynaklarının etkisini belirleyebilmek amacıyla yapılan çalışmada nişastanın pullulanaz üretimi için en uygun karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir. Kullanılacak nişastanın en uygun konsantrasyonun ise %1 olduğu tespit edilmiştir. Enzim üretiminde azot kaynağının doğru seçilmesi de son derece önemlidir. Maya, pullulanaz üretimi için en uygun azot kaynağı olarak bulunmuştur. Maya konsantrasyonunun enzim üretiminde etkinliği sırasıyla; %0,3>%0,5>%1>%0,1>%1,5>%2 olarak bulunmuştur. Bazal besiyerindeki metal iyonlarının etkinliği incelendiğinde ise sırasıyla; $MnCl_2 \cdot 4H_2O > K_2HPO_4 > Kontrol > MgSO_4 \cdot 7H_2O > FeSO_4 \cdot 7H_2O > CaCl_2 \cdot 2H_2O$ olarak bulunmuştur. En yüksek aktiviteye, %3'lük inokülasyon miktarıyla ulaşılmıştır. Çalkalama hızının etkinliği ise sırasıyla; 200>150>100>250>0 d/dk'dır. Optimum şartlar sağlandıktan sonra ise en yüksek enzim aktivitesinin 44. saatte olduğu saptanmıştır.

Enzimin karakterizasyonu için, pH'nın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisini saptamak amacıyla, pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 ve 11,0'de, %1 pullulan ile

hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak standart pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. Enzim pH 6,0'da en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Enzimin pH 5,0-7,0 aralığında ortalama %87 aktiviteye sahip olması asidik ortamda çalışılmaya elverişli olduğunu göstermiştir. pH kararlılığı incelendiğinde ise pH 4,0-7,0 arasında ortalama %96,75 aktivite kalmış olması enzimin geniş bir pH aralığında kararlılığını koruduğunu göstermektedir.

Sıcaklığın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisini saptamak amacıyla enzim ve substrat karışımı 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra standart pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 40°C saptanmış olmasına rağmen 35°C'de %90, 45°C'de ise %92 aktivite göstermektedir. 30°C-50°C aralığında ortalama %95 aktiviteyle yüksek oranda kararlılık sağlandığı belirlenmiştir. En az kararlılığın sağlandığı 80°C'de ise %57 aktivite kaybı görülmüştür.

Metal iyonlarının pullulanaz aktivitesi üzerine etkisini saptamak amacıyla enzim preparasyonuna son konsantrasyon 1 ve 5 mM olacak şekilde Co^{+2} , Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} ve Fe^{+2} iyonları eklenmiş ve aktivite tayini yapılmıştır. 5 mM Zn^{+2} varlığında %93 ve 5 mM Fe^{+2} varlığında %89 aktivite kaybı görülmüştür. Sırasıyla 1 mM ve 5 mM Co^{+2} kullanıldığında enzim %56 ve %58; Na^+ 'da %48 ve %47; Mg^{+2} 'da %71 ve %86; Cu^{+2} 'da %59 ve %56 aktivite göstermiştir.

TEŞEKKÜR

Uzun yıllar süren yüksek lisans deneyimim boyunca bıkmadan usanmadan yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e, bölümümüzün saygıdeğer hocalarına, sevgili arkadaşlarıma ve canımdan çok sevdiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimi 2210-C Öncelikli Alanlar kapsamında değerlendirip burs ile destek olan TÜBİTAK-BİDEB'e, bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoteknoloji Bölüm Başkanlığı'na ve maddi desteklerinden dolayı Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Endüstriyel Enzimler.....	1
1.2. Pullulanaz.....	5
1.2.1. Pullulanazın Kullanım Alanları	10
1.2.1.1. Nişastanın Sakkarifikasyonu.....	10
1.2.1.2. Maltoz ve Fruktöz Şurubu Üretimi	12
1.2.1.3. Deterjan	13
1.2.1.4. Siklodekstrin Üretimi.....	13
1.2.1.5. Fırıncılık	14
1.2.1.6. Tekstil	14
1.3. Pullulan	14
1.4. Çalışmanın Amacı.....	16
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	17
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Besiyerleri	23
3.1.1.1. N1 agar	23
3.1.1.2. Pullulanlı Besiyeri	24
3.1.1.3. Nişastalı Besiyeri (Enzim Üretme Besiyeri).....	24

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	25
3.1.2.1. Lugol çözeltisi.....	25
3.1.2.2. Sodyum Asetat Tamponu.....	25
3.1.2.3. Potasyum Fosfat Tamponu.....	26
3.1.2.4. Glisin-NaOH Tamponu.....	26
3.1.2.5. Boraks-NaOH Tamponu	27
3.1.2.6. Dinitro Salisilik Asit (DNS) Çözeltisi	27
3.1.2.7. %1'lik Substrat Çözeltisi	27
3.1.3. Elektroforez Uygulamalarında Kullanılan Çözeltiler	27
3.1.3.1. Solüsyon A (Akrilamid stok çözeltisi).....	27
3.1.3.2. Solüsyon B (4X Ayırma jeli tamponu)	28
3.1.3.3. Solüsyon C (4X Toplama Jeli Tamponu)	28
3.1.3.4. AMPS Çözeltisi (%10 Amonyum Persülfat)	28
3.1.3.5. Elektroforez Tamponu (Yürütme Tamponu)	28
3.1.3.6. Örnek Tamponu	29
3.1.3.7. TEMED (N, N, N', N'-tetrametilen-etilendiamin)	29
3.1.3.8. Boyama Çözeltisi	29
3.1.3.9. Boyayı Uzaklaştırma Çözeltisi.....	29
3.2. Metot	29
3.2.1. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu	29
3.2.2. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	30
3.2.2.1. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	30
3.2.2.2. Bakteri Tanılanması.....	31
3.2.2.3. Pullulanaz Aktivitesinin Ölçülmesi	31
3.2.2.4. Pullulanaz Üretimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	33
3.2.2.4.(1). Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Aktivitesine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi.....	33

3.2.2.4.(2). Sıvı Besiyerinde Üreme ve Enzim Aktivitesine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi.....	33
3.2.2.4.(3). Pullulanaz Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	34
3.2.2.4.(4).Enzim Üretiminde Nişastanın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi	35
3.2.2.4.(5). Enzim Üretiminde Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi	35
3.2.2.4.(6). Pullulanaz Üretiminde En Etkin Azot Kaynağının Optimum Konsantrasyonunun Saptanması	36
3.2.2.4.(7). Pullulanaz Üretiminde Farklı Metal İyonlarının Etkisi	36
3.2.2.4.(8). Pullulanaz Üretiminde İnokülasyon Miktarının Etkisi	37
3.2.2.4.(9). Pullulanaz Üretiminde Çalkalama Hızının (d/dk) Etkisi.....	37
3.2.2.4.(10). Pullulanaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi	37
3.2.2.5. Optimum Koşullarda Pullulanaz Üretimi ve Etanol (Et-OH) ile Presipitasyonu	38
3.2.2.6. Pullulanaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	38
3.2.2.7. Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	39
3.2.2.8. pH'nın Enzim Kararlılığına Etkisi.....	39
3.2.2.9. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi.....	39
3.2.2.10. Metal İyonlarının Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	40
3.2.2.11. Diğer Kimyasalların Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	40
3.2.2.12. SDS-PAGE Analizi	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47

4.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Pullulanolitik Aktivitenin Belirlenmesi	47
4.2. Pullulanolitik Suşların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	49
4.3. Katı Besiyerinde Pullulanaz Üretimine pH'nın Etkisi	49
4.4. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi	51
4.5. Enzim Üretici Suşun (DSHK107) Tür Düzeyinde Tanılanması	51
4.6. Sıvı Besiyerinde Enzim Üretimine pH ve Sıcaklığın Etkisi	54
4.7. Pullulanaz Üretiminde Karbon Kaynaklarının Etkisi	55
4.8. Çözünebilir Nişasta Konsantrasyonunun Üretimde Etkisi	57
4.9. Azot Kaynaklarının Enzim Üretimine Etkisi	58
4.10. Maya Konsantrasyonunun Etkisi	59
4.11. Bazal Besiyerindeki Metal İyonlarının Etkisi	60
4.12. Enzim Üretiminde İnokülasyon Miktarının Etkisi	62
4.13. Çalkalama Hızının Etkisi	63
4.14. Inkübasyon Süresinin Etkisi	64
4.15. pH'nın Pullulanaz Aktivitesi ve Kararlılık Üzerine Etkisi	65
4.16. Sıcaklığın Pullulanaz Aktivitesi ve Kararlılık Üzerine Etkisi	69
4.17. Metal İyonlarının Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	72
4.18. Diğer Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	73
4.19. SDS-PAGE Analizine Ait Bulgular	76
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	79
5.1. Sonuçlar	79
5.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Tanılanması	79
5.1.2. Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu	80
5.1.3. Enzimin Karakterizasyonu	80
5.2. Öneriler	81
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 1.1. Pullulanı hidroliz eden enzimlerin reaksiyon spesifiteleri.....	6
Çizelge 3.1. Sodyum Asetat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	26
Çizelge 3.2. Potasyum Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	26
Çizelge 3.3. Glisin-NaOH Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	27
Çizelge 4.1. DSHK55, DSHK65, DSHK107 suşlarının pH 4-12 aralığında katı besiyerinde koloni ve aktivite zon çapları.....	50
Çizelge 4.2. Katı besiyerinde DSHK65 ve DSHK107 suşlarının 4-50°C aralığında pH 8,0 ve pH 9,0'daki koloni ve aktivite zon çapları.	51



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Amilolitik ve pullulanolitik enzimlerin şematik gösterimi **9Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

Şekil 1.2. Nişastanın sıvılaştırılmasında glukoamilazın rolü 11

Şekil 1.3. Sakkarifikasyon süresince pullulanazın etkisi 12

Şekil 1.4. Pullulanın moleküler yapısı 15

Şekil 3.1. Ortamda serbest kalan şeker miktarının DNS yöntemi ile belirlenmesi sırasında gerçekleşen reaksiyon 32

Şekil 3.2. SDS PAGE düzeneği ve protein karışımının jeldeki hareketi 43

Şekil 4.1. Pullulanolitik suşların pullulanlı besiyerindeki görüntüsü..... 48

Şekil 4.2. Pullulanolitik suşların nişastalı besiyerindeki görüntüsü..... 48

Şekil 4.3. DSHK55, DSHK65 ve DSHK107 suşlarının pH 8,0, 9,0 ve 10,0'da koloni ve zon çaplarının görünümü 50

Şekil 4.4. DSHK107^T suşunun filogenetik ağaçtaki konumu 53

Şekil 4.5. Besiyeri pH'sının ve inkübasyon sıcaklığının enzim üretimine etkisi.. 55

Şekil 4.6. Pullulanaz üretiminde karbon kaynaklarının etkisi..... 56

Şekil 4.7. Pullulanaz üretiminde nişasta konsantrasyonunun etkisi..... 57

Şekil 4.8. Pullulanaz üretiminde azot kaynaklarının etkisi 59

Şekil 4.9. Pullulanaz üretiminde maya konsantrasyonunun etkisi..... 60

Şekil 4.10. Bazal besiyeri bileşimindeki metal iyonlarının etkisi 61

Şekil 4.11. Pullulanaz üretiminde inokülasyon miktarının etkisi 62

Şekil 4.12. Pullulanaz üretiminde çalkalama hızının etkisi 64

Şekil 4.13. Pullulanaz üretiminde inkübasyon süresinin etkisi..... 65

Şekil 4.14. pH'nın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi 66

Şekil 4.15. pH'nın pullulanaz kararlılığı üzerine etkisi 67

Şekil 4.16. Sıcaklığın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi..... 70

Şekil 4.17. Sıcaklığın Kararlılık Üzerine Etkisi	71	Hata!	Yer	işareti
tanımlanmamış.				
Şekil 4.18. Metal İyonlarının Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	73	Hata!	Yer	işareti
tanımlanmamış.				
Şekil 4.19. Diğer kimyasalların pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi	74			
Şekil 4.20. Pullulanazın SDS-PAGE sonucu	76			



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
AMPS	: Amonyum persülfat
Da	: Dalton
EDTA	: Etilendiamin, tetra, asetik asit
Kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
mM	: Milimolar
OD	: Optik Dansite
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
rpm	: Dakikada devir sayısı
sp.	: Species (tür, tekil)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin



1. GİRİŞ

Enzimler, 19. yüzyılın ikinci yarısında keşfedilmelerinden itibaren birçok endüstriyel proste yaygın olarak kullanılmaktadır. Enzimler, biyokimyasal reaksiyonlarda ve metabolizmanın bütün aşamalarında önemli rol oynayan son derece verimli ve oldukça spesifik biyokatalizörlerdir. Son otuz yılda, biyoteknolojideki, özellikle genetik ve protein mühendisliği alanındaki ilerlemelerle, enzimler birçok yeni endüstriyel proste kendilerine yer bulmuşlardır. Endüstriyel enzimlerin yarısından fazlası, yaklaşık %30'u bakteriler tarafından üretilmekle birlikte kalanı maya ve küfler tarafından üretilmektedir. Hayvanlar tarafından yalnızca %8, bitkiler tarafından ise %4'ü üretilir (Srivastava ve ark., 2019).

Mikrobiyal enzimler, birçok ekonomik ve çevre dostu endüstriyel sektörde rutin olarak kullanılmaktadır. Teknolojik toplumlarda çevre kirliliği konusunda son zamanlarda artan farkındalıktan sonra kimyasal işlemlerin, mikroorganizmalar ve enzimler içeren hem ekonomik hem de çevre dostu biyoteknolojik işlemlerle değiştirilmesi için artan bir talep oluşmuştur (Hoondal ve ark., 2002; Nigam, 2013). Mikrobiyal enzimler, genellikle düşük maliyet ve kısa sürede üretim, proses modifikasyonunda esneklik ve optimizasyon, yüksek verim gibi endüstriyel talepleri karşılamaktadır.

Endüstriyel enzimlerin gelişimi büyük oranda mikrobiyal kaynakların kullanımına bağlıdır. Mikroorganizmaların kısa sürede ve ucuz ortamlarda üremeleri ve izolasyonlarının kolay olması enzim üretimi için hayvansal ve bitkisel enzimlere göre mikrobiyal enzimleri daha avantajlı kılmaktadır (Barredo, 2005).

1.1. Endüstriyel Enzimler

Günümüzde endüstriyel alanda, mikroorganizmalardan üretilen enzimlerin kullanımı, bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre çok daha yüksek orandadır. Bu durum, hayvan ve bitki hücreleriyle karşılaştırıldığında mikroorganizmaların hızlı

bir şekilde ve ucuz ortamlarda üreyebilmeleriyle ilgilidir. Böylece kısa zamanda yüksek enzim verimi elde edilir. Mikroorganizmaların genetik, coğrafik ve fizyolojik çeşitliliklerine bağlı olarak katalitik aktiviteleri farklılık gösterir. Bu durum, üretimleri sırasında istenmeyen ürünlerin oluşumu ve verim artışının kontrol edilebilmesini sağlayan genetik manipülasyonların kolaylaşmasını sağlar. Ayrıca, mikrobiyal enzimlerin üretildiği fermentatif prosesler mevsimsel değişikliklerden bağımsızdır. Hayvan ve bitki dokusundan elde edilen enzimin verimi ve kalitesi ise mevsimsel değişikliklere bağlıdır. Bitkilerden enzim izolasyonu süreçleri; kompleks ve oldukça pahalı uygulamalardır. Ayrıca bitkilerden enzim üretiminde fenolik bileşiklerin, hayvanlardan enzim üretiminde ise endojen enzim inhibitörleri gibi zararlı maddelerin oluşmasıyla sonlanan proseslerdir. Bu nedenle, mikrobiyal enzimler bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre uygun ve güvenli üretim yöntemleriyle daha kararlı ve verimlidir (Saxena, 2015).

Diğer bir önemli nokta, enzim üretme özelliğine sahip uygun mikroorganizmanın seçilmesidir. İdeal mikroorganizmalar kısa sürede yüksek verimle enzim üretmeli, kararlı olmalı, ucuz ve uygun ortamda kolayca üreyebilmeli, toksik bileşikler üretmemeli ve genetik manipülasyona uygun olmalıdır (Denizci ve ark., 2005).

Enzimler, binlerce yıldır peynir, bira ve ekmek yapımında bilinçsizce kullanılmışlardır. Günümüzde enzimlerin kullanıldığı endüstriyel alanlar oldukça genişlemiş ve mikroorganizmalar kullanılarak her yıl üretilen saf enzimlerin miktarları 500 ton gibi değerlere ulaşmıştır. Endüstriyel yolla üretilen enzimlerin %75'i gıda, deterjan ve nişasta endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin %60'ı da rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen ürünlerdir. Günümüzde enzimler; etlerin işlenmesinde, bira yapımında, süt ürünlerinin üretiminde, meyve sularının berraklaştırılmasında, fruktoz şurubu üretiminde kullanılmalarıyla gıda sektöründe, protein ve yağ artıklarını parçalamak için deterjan katkı maddesi olarak deterjan endüstrisinde, deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırmak,

deri, kot ve pamuğu yumuşatmak için tekstilde, teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadır. Enzimlerin kullanım alanları, özellikle rekombinant DNA teknolojisinin kullanımıyla yeni ve istenilen özellikteki enzim elde edilmesinin sağlanmasına bağlı olarak da her geçen gün artmaktadır.

Enzimler, endüstriyel ve biyoteknolojik olarak büyük öneme sahiptirler. Endüstriyel enzimler için global pazar, BBC Research tarafından yapılan araştırmaya göre, 2008’de 2,9 milyar dolar, 2009’da 3,1 milyar dolar, 2010’da 3,3 milyar dolara ulaşmıştır ve yıllık %6’lık bileşik büyüme oranıyla artmaya devam etmektedir. Teknik enzimler, genellikle deterjan, tekstil, küspe ve kâğıt endüstrisi ile biyoyakıt endüstrisinde kullanılırlar. Deri ve biyoetanol alanında enzim kullanımı, en yüksek satış oranlarının sebebidir. Teknik enzimler (örneğin; biyoyakıtlar için) 2010’da 1,1 milyar dolara, yiyecek ve içecek enzimleri (örneğin; süt ürünleri ve günlük ürünler için) 2010’da 975 milyon dolara ulaşmıştır (Erickson ve ark., 2012).

Enzimler veya mikrobiyal hücreler yüksek spesifitelerine ve ekonomik avantajlarına bağlı olarak herhangi bir çevresel etki olmadan biyolojik katalistler olarak kullanılırlar. Çünkü;

1-Enzimler, mevcut sıcaklık ve diğer çevresel koşullarda iyi çalışır. Sert koşullar ve kimyasalların yerine enzim kullanımı mümkündür. Böylece, çevre kirliliği ve enerji kaybı önlenir ve proses süresince korozyona dayanıklı pahalı ekipmanlar kullanılmaz.

2-Enzimler, yüksek oranda spesifik olduklarından, istenmeyen ürünlerin oluşumu önlenir ve daha kapsamlı bir işleme gerek kalmaz.

3-Enzimler immobilize edilebilir ve defalarca kullanılabilir.

4-Enzimler, zararlı bileşenlerden oluşan atıkların temizlenmesi ya da yararlı bileşiklere dönüşümü için kullanılabilir.

5-Genellikle enzimler çürükçüllerin yardımıyla ayrışabilir ve böylece enzimleri oluşturan kimyasal bileşenler doğaya kolayca geri döner. Ayrıca, enzimlerin katalizleyebildiği birçok farklı biyotransformasyondan dolayı ticari

alanda kullanılan enzimlerin sayısı büyük oranda artmıştır (Andualema ve Gessesse, 2012).

Bacillus cinsinin kapsadığı türler genellikle metabolit ve enzim üretiminde kullanılır. Bunun nedeni; çoğunun mükemmel protein ve metabolit salgılayıcısı olmaları, laboratuvar koşullarında kolay ve hızlı üretilibilmeleri (hatta biyolojik atıkların besin maddesi olarak kullanılabilmesi) ve patojen olan türlerin sınırlı sayıda olmasıdır. Moleküler biyolojideki önemli gelişmeler *Bacillus* sp.'nin heterolog gen ekspresyonunda kullanımını artırmıştır (Batt ve ark., 2014).

Tablo 1.1. Doğadaki ve kültür besiyerlerindeki makrobesinler (Madigan ve Martinko, 2010)

ELEMENT	DOĞADA BESİN FORMU	BULUNAN KÜLTÜR ORTAMINA EKLENEN KİMYASAL FORM
KARBON (C)	CO ₂ , organik maddeler	Glukoz, malat, asetat, piruvat, amino asitler, yüzlerce farklı bileşik ya da kompleks karışım (maya özütü, pepton, vb.)
HİDROJEN (H)	H ₂ O, organik maddeler	H ₂ O, organik maddeler
OKSİJEN (O)	H ₂ O, O ₂ , organik maddeler	H ₂ O, O ₂ , organik maddeler
NİTROJEN (N)	NH ₃ , NO ₃ ⁻ , N ₂ , organik azot bileşikleri	İnorganik: NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , KNO ₃ , N ₂ Organik: Amino asitler, nükleotitlerin azotlu bazları, N içeren diğer organik maddeler
FOSFOR (P)	PO ₄ ³⁻	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄
KÜKÜRT (S)	H ₂ S, SO ₄ ²⁻ , organik S bileşikleri, metal sülfürler (FeS, CuS, ZnS, NiS, vb.)	Na ₂ SO ₄ , Na ₂ S ₂ O ₃ , Na ₂ S, sistein veya diğer organik kükürt bileşikleri
POTASYUM (K)	çözeltide K ⁺ veya çeşitli K tuzları olarak	KCl, KH ₂ PO ₄

MAGNEZYUM (MG)	çözeltide Mg^{+2} veya çeşitli Mg tuzları olarak	$MgCl_2$, $MgSO_4$
SODYUM (NA)	çözeltide Na^+ veya NaCl veya diğer Na tuzları olarak	NaCl
KALSİYUM (CA)	çözeltide Ca^{+2} veya $CaSO_4$ veya diğer Ca tuzları olarak	$CaCl_2$
DEMİR (FE)	çözeltide Fe^{+2} veya Fe^{+3} veya FeS , $Fe(OH)_3$ veya diğer Fe tuzları olarak	$FeCl_3$, $FeSO_4$, şelatlanmış demir çözeltileri (Fe^{+3} EDTA, Fe^{+3} sitrat vb.)

Potasyum (K): Protein sentezinde görev yapanlar da dahil olmak üzere çeşitli enzimler aktivite gösterebilmek için özgül olarak potasyuma gereksinim duyarlar.

Magnezyum (Mg): Ribozomları, zarları ve nükleik asitleri kararlı hale getirmekte görev yapmasının yanı sıra, pek çok enzimin aktivitesi için gereklidir. Çoğu mikroorganizmanın gelişimi için gerekli bir besin olmayan kalsiyum, hücre duvarını stabilize etmeye yardımcı olur ve endosporların ısıya karşı direnç göstermesinde önemli rol oynar.

Demir (Fe): Elektron taşınmasında görev alan sitokromların ve demir-kükürt proteinlerinin önemli bileşeni olarak hücre solunumunda önemli bir rol oynar.

Manganez (Mn): Glukoz metabolizması, enerji üretimi, süperoksit dismutaz dahil olmak üzere çok sayıda enzim sistemini aktive eder. Manganez, çeşitli metalloenzimler, hormonlar ve proteinlerin önemli bir bileşenidir.

1.2. Pullulanaz

Pullulanaz (α -dekstrin glukanohidrolaz, pullulan 6-glukanohidrolaz, limit dekstrinaz, amilopektin 6-glukanohidrolaz) (EC 3.2.1.4), pullulan ve

amilopektindeki α -(1,6) bağlarını ve nişastanın α - ve β - limit dekstrinini hidrolizleyen α -amilaz ailesine ait bir enzimdir (McCleary ve ark., 2014).

Pullulanaz, ilk defa 1961’de pullulanı tek karbon kaynağı olarak kullanan Bender ve Wallenfels tarafından *Klebsiella pneumoniae* (*Aerobacter aerogenes*) kültüründen izole edilmiştir (Wallenfels ve ark., 1966). Günümüze kadar, pullulanaz hayvanlardan, bitkilerden, mayalardan ve küflerden izole edilmiştir. Ayrıca mezofil, termofil ve hipertermofilleri içeren birçok mikroorganizma pullulanaz üreticisi olarak izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Duan ve ark., 2013; Wei ve ark., 2014).

Şimdiye kadar literatürde pullulanı hidrolizleyen 5 grup tanımlanmıştır ve detaylar Çizelge 1.1’de özetlenmiştir. Bu enzimler, substrat spesifiteleri ve reaksiyon ürünlerine göre gruplandırılmıştır.

Çizelge 1.1. Pullulanı hidroliz eden enzimlerin reaksiyon spesifiteleri (Hii ve ark., 2012)

Enzim	EC numarası	Hidrolizlediği Bağlar	Bağlanılan Substrat	Son Ürünler
Tip 1 Pullulanaz	3.2.1.41	α -(1,6)	Oligo-, polisakkaritler, pullulan	Trimer (maltotrioz), Lineer oligosakkaritler
Tip 2 Pullulanaz (amilopullulan)	3.2.1.41	α -(1,6) α -(1,4)	Pullulan, poli- ve oligosakkarit (nişasta)	Glukoz, maltoz, maltotrioz
Pullulan hidrolaz tip-1 (neopullulanaz)	3.2.1.135	α -(1,4)	Pullulan	Panoz
Pullulan hidrolaz tip 2 (izopullulanaz)	3.2.1.57	α -(1,4)	Pullulan	İzopanoz

Pullulan hidrolaz tip 3	3.2.1.—	α -(1,4) ve α -(1,6)	Pullulan Nişasta, amiloz, amilopektin	Panoz, maltoz, maltotrioz
--------------------------------	---------	------------------------------------	--	------------------------------

1- Tip 1 Pullulanaz (EC 3.2.1.41), gerçek pullulanaz olarak da bilinir ve pullulan ile dallanmış oligosakkaritlerdeki sadece α -(1,6) glikozidik bağlarını hidrolizleyen dallanma kırıcı bir enzimdir. Bununla birlikte, glukan ve amilozdaki α -(1,4) bağlarını ve glikojen ile panozdaki α -(1,6) bağlarını hidrolize edemez (Wei ve ark., 2014). Son ürünleri maltotrioz ve lineer oligosakkaritlerdir (Wu ve ark., 2014).

2- Tip 2 Pullulanaz (amilopullulanaz, [EC 3.2.1.1 ve EC 3.2.1.4]), tip 1 pullulanazdan farklı olarak sadece pullulandaki α -(1,6) glikozidik bağlarını değil, aynı zamanda diğer polisakkaritlerdeki α -(1,4) bağlarını da parçalayan bifonksiyonel bir enzimdir (Wu ve ark., 2014). Bu özelliğinden dolayı sakkarifikasyon işlemlerinde genellikle amilopullulanaz kullanılır. Tip 2 pullulanazın amilopektin üzerine etkisiyle glukoz, maltoz ve maltotrioz gibi küçük şekerler oluşur.

Hem pullulanaz tip 1 hem de tip 2 siklodekstrinleri hidrolize edemez (Orhan ve ark., 2014).

Ayrıca bu enzimler, sadece α -(1,6) glikozidik bağlarıyla bağlı izomaltotrioz, izomaltoz ve dekstran gibi substratları da hidrolize edemezler. Enzimlerin bu substratları hidrolize edememesi, enzimatik aktivite için α -(1,6) bağlarının çevresinde α -(1,4) bağlarının gerektiğini gösterir (Satyanarayana ve ark., 2013).

Pullulanazın moleküler ağırlığı, kaynağına bağlı olarak büyük farklılıklar gösterir. Genellikle tip 1 pullulanaz 70-80 kDa, tip 2 pullulanaz ise 100-210 kDa moleküler ağırlığı sahiptir (Kim ve ark., 2000).

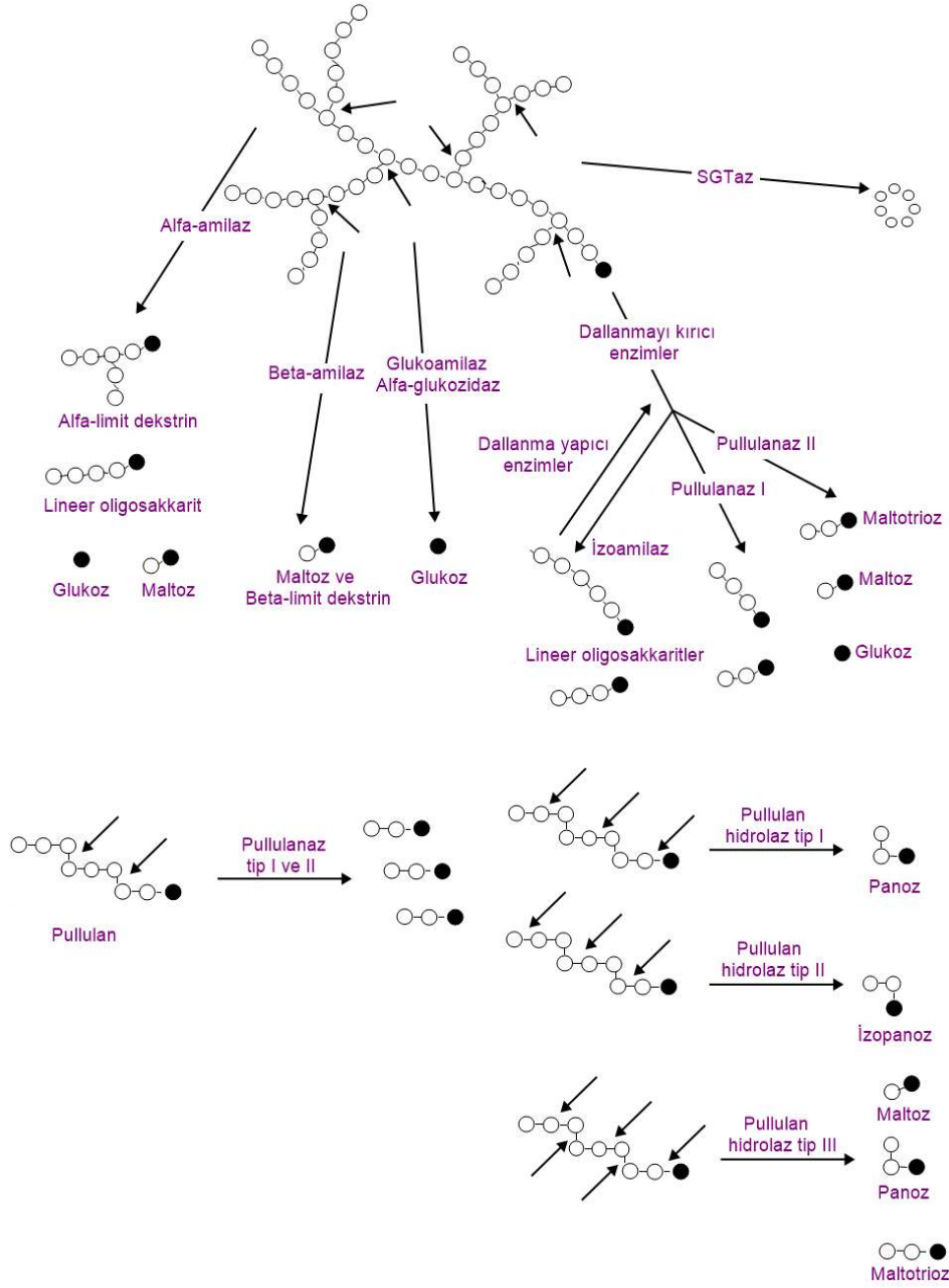
3- Pullulan Hidrolaz Tip 1, (neopullulanaz, [EC 3.2.1.35]) ve **Pullulan Hidrolaz Tip 2** (izopullulanaz, [EC 3.2.1.57]) pullulandaki α -(1,4) glikozidik

bağlarını parçalar ve son ürün olarak sırasıyla panoz (α -6-D-glikozilmaltoz) ve izopanoz (α -6-maltozilglikoz) oluşmasını sağlar. Ayrıca, siklodekstrinler üzerinde oldukça etkilidirler (Orhan ve ark., 2014).

4- Pullulan Hidrolaz Tip 3, diğerlerinin aksine, termofilik bir arkeadan izole edilmiştir ve pullulandaki hem α -(1,6) hem de α -(1,4) bağlarını hidrolize ederek son ürün olarak maltotrioz, panoz ve maltoz oluşumunu sağlar (Wu ve ark., 2014; Elleuche ve ark., 2015).

Şekil 1.1.'de amilolitik ve pullulanolitik enzimler şematik olarak gösterilmiştir.





Şekil 1.1. Amilolitik ve pullulanolitik enzimlerin şematik gösterimi (Bertoldo ve Antranikian, 2002)

1.2.1. Pullulanazın Kullanım Alanları

1.2.1.1. Nişastanın Sakkarifikasyonu

1960'lerden beri, nişastayı glukoza çeviren bütün proseslerde geleneksel asit yöntemi yerine enzimatik hidroliz yöntemi kullanılmaktadır. Nişastanın, yiyecek tatlandırıcısı olarak glukoz, maltoz ve fruktoza dönüşümü, endüstriyel enzim kullanımında, gelişen önemli bir alanı teşkil eder. Pullulanazın başlıca uygulaması, nişastanın sakkarifikasyon aşamasındadır ve pullulanazın en önemli endüstriyel uygulaması glukoz ve maltoz şurubu üretimidir. Pullulanaz, sakkarifikasyon işleminde, glukoamilaz veya β -amilazla birlikte kullanılır (Hii ve ark., 2012).

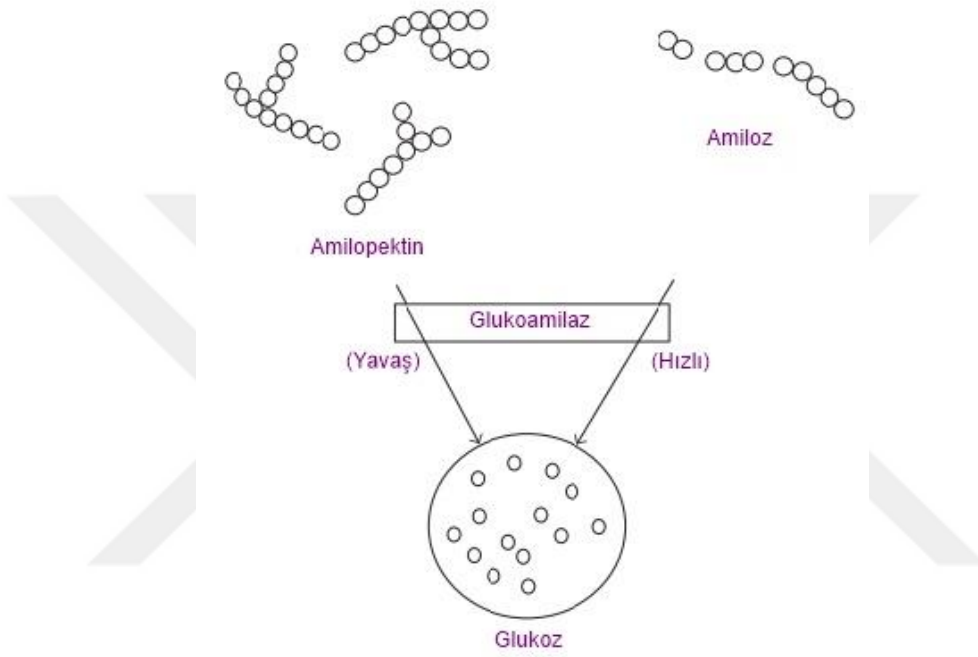
Sakkarifikasyon aşamasında, maltodekstrinde bulunan α -(1,4) glikozidik bağlarını ve yavaş bir şekilde de α -(1,6) glikozidik bağlarını hidrolize eden glukoamilaz kullanılır. Bu durum, izomaltoz birikimine neden olur. Bu probleme en iyi çözüm ise α -(1,6) glikozidik bağlarını etkili bir şekilde kesen pullulanazı kullanmaktır. Buradaki ön koşul, pullulanazın glukoamilazla aynı optimum pH ve sıcaklığa sahip olmasıdır (van der Maarel ve ark., 2002).

Sakkarifikasyon aşamasında pullulanaz gibi dallanmayı kıran bir enzim ve glukoamilaz birlikte kullanılırsa, glukoamilaz sadece lineer α -(1,4) glikozidik bağlarının hidrolizasyonunu sağlarken, pullulanaz, amilopektin kalıntılarındaki dallanma noktalarını kırar. Sonuç olarak, ulaşılan depolimerizasyon seviyesi daha yüksek olur.

Dallanma kırıcı enzim kullanımı toplam sakkarifikasyon oranını artırır ve proses döngüsünün tamamlanması için gereken toplam glukoamilaz miktarını azaltır. Glukoamilaz ve pullulanazın birlikte kullanımının pratik avantajı, daha az glukoamilaz aktivitesini gerektirmesidir. Glukoamilaz kullanımında %60'a kadar bir azalma görülmektedir. Sonuç olarak daha az glukoamilaz kullanılır ve sakkarifikasyon sonunda izomaltoz üretiminin önemli ölçüde olduğu daha az dallanmış oligosakkarit birikir. Şekil 1.2.'de nişastanın sıvılaştırılmasında

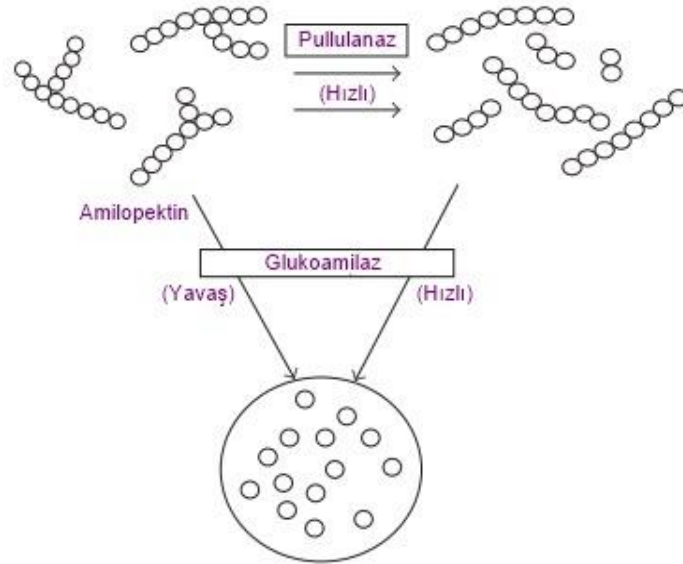
glukoamilazın rolü, Şekil 1.3.'te ise sakkarifikasyon aşamasında pullulanaz eklenmesinin sürece etkisi gösterilmiştir.

Pullulanaz kullanımı glukoz verimini %94 dolayına kadar artırabilir



(Polaina ve ark., 2007).

Şekil 1.2. Nişastanın sıvılaştırılmasında glukoamilazın rolü (Hii ve ark., 2012)



Şekil 1.3. Sakkarifikasyon süresince pullulanazın etkisi (Hii ve ark., 2012)

Pullulanazlar, lif takviyesi olarak kullanılan dirençli nişasta üretiminde de rol oynarlar (Mesbah ve ark., 2018).

1.2.1.2. Maltoz ve Fruktöz Şurubu Üretimi

Maltoz şurubu, yumuşak şekerlilik, çözelti içinde düşük viskozite, düşük nem çekme ve iyi termal kararlılığa sahiptir. Yüksek kaliteli şeker ve dondurma üretimi gibi gıda proseslerindeki birçok uygulama için uygundur. Son yıllarda ilaç endüstrisinde de saf maltoz önem kazanmaya başlamıştır. Damar yoluyla beslenmede kan glukoz değerini yükseltmeksizin daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanabilen maltoz, D-glukoz yerine kullanılabilir.

Fruktöz şurubu, dekstroz şurubunun, immobilize glukoz izomerazla katalizlenmesiyle oluşturulur. Fruktöz şurubu yüksek kaliteli, sükrozdan daha ucuz ve daha az kalorili, ayrıca 1,2-1,8 kat daha tatlıdır. Maltoz şurubu gibi, insülin

olmadan metabolize olabildiği için diyabetiklere yönelik yiyeceklerde %90 oranında ve düşük kalorili ürünlerin üretiminde fruktoz şurubu kullanılır.

Bunların dışında pullulanaz düşük kalorili bira üretiminde kullanılır (Shehata ve ark., 2016).

1.2.1.3. Deterjan

Bazı alkali pullulanazlar bulaşık ve çamaşır deterjanlarında, alkali koşullarda, nişasta lekesinin giderilmesi için katkı maddesi olarak kullanılırlar. Bu dallanmayı kırıcı enzimlerin etkisi, amilopullulanaz, alkali α -amilazla birlikte kullanıldığı zaman, tek bir amilopullulanaz hem dallanmayı kırıcı [α -(1,6) hidrolitik] hem de sıvılaştırıcı [α -(1,4) hidrolitik] reaksiyonları katalize ettiği için artar.

1.2.1.4. Siklodekstrin Üretimi

Siklodekstrinler α -(1,4) glikozidik bağlı glukoz ünitelerinden oluşan siklik maltooligosakkaritlerdir.

Siklodekstrin üretiminde genellikle α -amilazla birlikte siklodekstrin glikosiltransferaz kullanılır. Fakat amilopektinin α -(1,6) glikozidik bağları, siklodekstrin glukosiltransferazın çalışmasını engeller. Bu bağlar pullulanaz tarafından kırılarak siklodekstrin üretiminde verim artışı sağlanır. Ayrıca pullulanaz dallanmış siklodekstrin üretiminde de kullanılır.

Siklodekstrinler değişken materyalleri stabilize etmede, ısı, ışık ve oksijene duyarlı gıda bileşenlerini koruyarak raf ömürlerinin uzatılmasında, gıdaları mikrobiyal kontaminasyondan korumada, tat ve koku maskelemede ve çözünemeyen veya az çözünen ilaçların çözünür hale getirilmesinde, çeşitli vitaminlerin çözünürlüklerinin artırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Szente ve ark., 2004; Tanimoto ve ark., 2005).

1.2.1.5. Fırıncılık

Fırıncılıkta, nişasta ve nişasta değiştirici enzimler büyük oranda kullanılır. Bayatlama etkisi, bu endüstrideki en büyük problemdir. Kırıntı sıklığının artması, kabuk gevrekliğinin kaybı, kırıntıdaki nem içeriğinin ve ekmeğin lezzetinin kaybı gibi sonuçları içeren bayatlama etkisi kalitenin bozulmasına neden olur (van der Maarel ve ark., 2002). Bu durum sağlık problemlerine neden olabilecek kimyasal işlemlerle üstesinden gelinebilmesine rağmen, bugünlerde doğal bileşenlerle uygulanan enzimatik işlem daha çok tercih edilir. Pullulanaz, enzimatik bayatlama önleyici işlemde önemli bir rol oynar (Bertoldo ve ark., 2002; Prakash ve ark., 2012). Pullulanaz, bayatlamayı önleyici ajan olarak kullanılan α -amilazın hafif doz aşımı halinde meydana gelen yapışkanlıktan sorumlu bileşikler ortadan kaldırır.

1.2.1.6. Tekstil

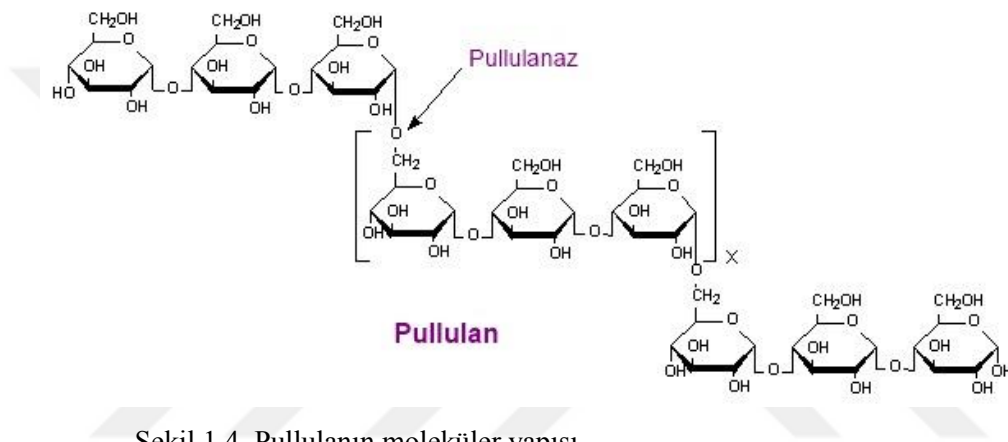
Çirişlenmiş nişastayı parçalayabilme özelliğinden dolayı dokuma işlemi sırasında nişasta esaslı banyoya yatırılan ham bezdeki nişastanın kolasını uzaklaştırmakta kullanılır.

1.3. Pullulan

Mikroorganizmalar, nadir kimyasal ve fiziksel karakteristiğe sahip çeşitli ekzopolisakkaritler üretirler. Bunlar, özel yapılarından dolayı yiyecek ve ilaç endüstrisinde potansiyel uygulamalara sahiptirler. Mikrobiyal polimerler, bitkiler tarafından üretilen doğal polisakkaritlerin yerini aldıkları için endüstriyel olarak çok önemlidirler. Pullulan, dimorfik maya *Aurebasidium pullulans* (Siyah pigment olan melanini oluşturduğu için “siyah maya” olarak da bilinir.) başta olmak üzere bazı mikroorganizmalar tarafından hücre dışı olarak fermentasyon yoluyla üretilen, bu önemli polimerlerden birisidir (Prajapati ve ark., 2013; Singh ve ark., 2015).

Pullulan, kimyasal yapı olarak, α -(1,4) glikozidik bağlarıyla bağlanmış maltotrioz ünitelerinin α -(1,6) glikozidik bağlarıyla birbirlerine bağlanmasıyla oluşan lineer ve suda çözünebilir nötral bir polisakkarittir (Mishra ve ark., 2011).

Kimyasal formülü $C_6H_{10}O_5$ olan pullulan 4.5×10^4 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahiptir ve bu ağırlık fermentasyon parametreleri tarafından önemli ölçüde etkilenir (Cheng ve ark., 2011). Pullulanın, yapısında bulunan α -(1,4) ve α -(1,6) bağlarının düzenli değişimi sonucu yapısal esneklik ve çözünürlük artışı kazandığı düşünülmektedir (Leathers ve ark., 1993). Şekil 1.4.'te pullulanın moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Pullulanın moleküler yapısı

Pullulan, kokusuz, tatsız ve biyoçözünür bir polisakkarittir. Nontoksik, sıcaklıktan etkilenmeyen ve nonimmunojenik özellikleri nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılır. Suda çözünür fakat organik çözücülerde çözünmez, ayrıca nem tutma özelliğine sahiptir. Yiyeceklerde düşük kalorili katkı maddesi olarak nişasta yerine kullanılabilir. Maltotrioz şurubu eldesinde, yiyecek ve ilaçlarda jelleştirme ajanı, kaplama ve paketlenme maddesi olarak, tabletler için oksidasyon önleyici ajan olarak kullanılır. Diğer uygulama alanları arasında, kontakt lens üretimi, biyobozunur folyo üretimi, suda çözünürlüğü artırma, yenilebilir filmlere şekil verme, cilt bakım ürünlerinde nemlendirme kazandırma, yapıştırıcı üretimi gibi alanlar sayılabilir (İtik ve ark., 2013; Oğuzhan ve ark, 2013).

1.4. Çalışmanın Amacı

Enzimler, endüstriyel ve biyoteknolojik olarak büyük öneme sahiptirler. Günümüzde endüstriyel alanda, mikroorganizmalardan üretilen enzimlerin kullanımı, bitki ve hayvan kaynaklı enzimlere göre çok daha yüksek orandadır.

Pullulanazlar; gıda endüstrisinde nişastanın sakkarifikasyonu, fırıncılık, maltoz ve früktoz şurubu üretimi ile siklodekstrin üretimi gibi birçok alanda kullanılırlar. Ayrıca deterjanlarda katkı maddesi olarak da kullanılabilmektedirler.

Bu araştırmada, pullulanolitik aktivite gösteren *Bacillus* cinsi bakterilerin topraktan izolasyonu, izolatların tanılanması ve en yüksek pullulanolitik aktivite gösteren suşun tanılanması sonrasında pullulanaz üretimi; pullulanazın optimizasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Prabhu ve ark. (2018), *Klebsilla aerogenes* NCIM 2239 suşundan pullulanaz izole etmişlerdir. Yaptıkları optimizasyon çalışmaları sonucunda maksimum pullulanaz üretimine 48. Saatte ulaşmışlardır. Optimum pH ve sıcaklığa sırasıyla 7,0 ve 37°C bulunmuştur. Maksimum pullulanaz üretimi için farklı karbon kaynakları (pullulan, nişasta, sükroz, maltoz, glukoz) ve farklı azot kaynakları (pepton, et özütü, maya özütü ve kazein) test edilmiş ve sonuç olarak en iyi üretime karbon kaynağı olarak nişasta; azot kaynağı olarak da pepton kullanımında ulaşmışlardır.

Kahar ve ark. (2016), *Anoxybacillus* sp. SK3-4. suşundan pullulanaz tip 1 üretmişlerdir. Saflaştırılan pullulanaz pH 5,0-6,0 aralığında stabil iken en aktif haline pH 6,0'da ulaşmıştır. Optimum sıcaklık 60°C bulunmuştur ve enzim bu sıcaklıkta yüksek oranda stabildir. SDS-PAGE kullanılarak enzimin moleküler ağırlığı 80 kDa olarak saptanmıştır.

Qoura ve ark. (2014), kutup deniz buzulundan izole edilen psikrofilik bakteri *Shewanella arctica* 40-3 suşundan soğuğa adapte olmuş pullulanazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu araştırmışlardır. Enzim, beş aşamalı saflaştırma basamağıyla 50 kat saflaştırılmış ve son spesifik aktivite 3,0 U/mg bulunmuştur. Enzimin moleküler ağırlığı 150 kDa, optimum sıcaklığı 45°C, optimum pH 7,0 olarak saptanmış ve 10-50°C'de ve pH 5,0-9,0'da aktif olduğu görülmüştür. Pullulanaz çeşitli metal iyonlarını tolere ederken, deterjanlar aktiviteyi düşürmüştür.

Orhan ve ark., (2014), *Hypocrea jecorina* mantarından pullulanaz üretimi ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. *Hypocrea jecorina* QM9414 suşundan pullulanaz üretimi %0,5 amilopektin içeren pH 6,5 olan kültür ortamında 30°C'de gerçekleştirilmiştir. Enzim, amonyum sülfatla çöktürme, anyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografisiyle 11 kat saflaştırılmış ve %10,12 verim ile 1.36 ± 0.14 U/mg spesifik aktiviteye ulaşmıştır. SDS-PAGE ile pullulanazın moleküler ağırlığı,

130.56 kDa bulunmuştur. Saflaştırılan enzimin optimum pH ve sıcaklığı, sırasıyla 6,5 ve 35-65°C'dir. Enzimin, 40-70°C'de 30 dakika stabil kaldığı fakat aynı inkübasyon zamanında 80°C'de yaklaşık %33; 90°C ve 100°C'de %43 oranında aktivite kaybettiği görülmüştü. Pullulanaz aktivitesi CoCl_2 , NiCl_2 , KI, NaCl, MgCl_2 ve LiSO_4 varlığında artmış; üre, CaCl_2 ve β -merkaptöetanol varlığında ise inhibe olmuştur. Enzimatik özellikler, substrat spesifitesi ve hidroliz ürünleri dolayısıyla bu enzimin tip 2 pullulanaz ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Asha ve ark. (2013), *Bacillus halodurans*'tan pullulanaz üreterek saflaştırmışlar ve enzimin özelliklerini incelemişlerdir. Maksimum pullulanaz üretimi pH 10,0'da 32°C'de, %0,5 pepton ve %1,5 çözünebilir pullulan varlığında gerçekleşmiştir. Saflaştırılmış alkali pullulanazın moleküler ağırlığı 37 ± 1 kDa, optimum pH 10,0 ve optimum sıcaklık 50°C bulunmuştur. Pullulanaz aktivitesi, Zn^{+2} ve Cu^{+2} iyonları ile inhibe olmuştur. Ca^{+2} 'nin enzim aktivitesi üzerinde uyarıcı bir etkisi varken, Mg^{+2} , Mn^{+2} ve Fe^{+2} belirgin olmayan düzeyde inhibe etmişlerdir. N-etil malamid (NEM) ve iyodoasetik asit (IAA) enzimi kısmen inhibe ederken etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), dithiothreitol (DTT), fenil metil sülfonil florid (PMSF), tosil klorür metil keton (TLCK) ve sodyum azid (NaI) belirli bir şekilde inhibe edememiştir. N-bromosüksinimid (NBS) enzim aktivitesini tamamen inhibe etmiştir ki bu da enzim aktivitesi için triptofanın çok önemli olduğunu göstermiştir. İzole edilen enzim, sıcaklığa dayanıklı ve alkalofilik olduğundan, nişasta işleme, deterjan endüstrisi ve diğer biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaya elverişli olarak tanımlanmıştır.

Wasko ve ark. (2011), amilolitik bir laktik asit bakterisi olan *Lactococcus lactis*'ten pullulanaz tip 1'in saflaştırılması ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. *Lactococcus lactis* IBB 500 suşunun kültür süpernatantı, amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz, iyon değiştirme kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı 73,9 kDa, optimum sıcaklık 45°C, optimum pH 4,5 bulunmuştur. Pullulanaz aktivitesi Co^{+2} varlığında artmış, Hg^{+2} varlığında ise tamamen inhibe olmuştur.

Zareian ve ark. (2010), pullulanı, glukoz, maltoz ve maltotrioza; nişastayı, glukoz ve maltoza parçalayan bir amilopullulanazın saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. Termofilik *Geobacillus stearothermophilus* L14 suşundan elde edilen enzim, amonyum sülfatla çöktürme, anyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografisiyle %30 verimle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 100 kDa olarak hesaplanmıştır. Optimum pH 5,5, optimum sıcaklık 65°C bulunmuş ve enzimin 60-70°C’te stabil olduğu gözlenmiştir. Enzimin, pullulan, nişasta ve maltooligosakkaritleri hidrolize edebiliyorken siklodekstrin ve panozu edemediği görülmüştür. Pullulan kullanıldığında son ürün olarak glukoz, maltoz ve maltotrioz, nişasta kullanıldığında ise glukoz ve maltoz olduğu bulunmuştur. Ayrıca enzim, pullulan, nişasta gibi polisakkaritlerin α -(1,4) ve α -(1,6) glikozidik bağlarını keserek glukoz ve maltoz üretebildiğinden, *Geobacillus* sp. L14 suşundan saflaştırılan amilopullulanaz, pullulandan glukoz üretebilen spesifik bir dallanma kırıcı enzim varlığıyla ilgili ilk rapor olarak literatüre geçmiştir.

Nair ve ark. (2007), tarafından, topraktan izole edilmiş *Bacillus cereus* FDTA-13 suşundan pullulanaz üretimi ve dallanmış farklı polisakkaritlerin pullulanaz aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Maltooligosakkaritler (maltozdan maltotetraoza) ortama ayrı ayrı eklendikleri zaman veya 1:1 oranında maltotrioz ve maltotetraoz kombinasyonu, kontrolle karşılaştırıldığında, farklı pullulanaz seviyelerine neden olduğu görülmüştür. İndükleyicilerle karbon bakımından sınırlı koşullar altında (5 g/L) büyüme, pullulanaz aktivitesinde önemli bir biçimde artışa neden olmuştur. Pullulanaz aktivitesi, glukoz varlığında ciddi bir şekilde engellenmiştir. Birkaç farklı maltosakkarit kombinasyonunda bile, azot bakımından sınırlı ortamda düşük seviyede pullulanaz aktivitesi gözlenmiştir.

Kunamneni ve Singh (2006), termofilik *Bacillus* sp. AN-7 suşundan yüksek termal stabiliteye sahip pullulanaz üretmişlerdir. Enzim, amonyum sülfatla çöktürme, anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Optimum pH 6,0; optimum sıcaklık 90°C bulunmuştur. 80°C’de bir günden uzun

yarı ömre sahip olduğu, pH 4,5-7,0 aralığında stabil kaldığı, 105°C üzerinde ve pH 4,5 altında ise hızlı bir şekilde aktivite kaybettiği gözlenmiştir. Pullulanaz, Hg^{+2} iyonlarıyla tamamen inaktif olurken, Ca^{+2} , ditionitritol (DTT), Mn^{+2} ise aktiviteyi artırmıştır.

Gomes ve ark. (2003), ekstrem termofilik bir bakteri olan *Rhodothermus marinus*'tan termostabil pullulanaz, amilaz üretimi ve kısmi karakterizasyonunu araştırmışlardır. Kültür besiyeri, enzim üretimini artırmak için merkezi kompozit dizaynı kullanılarak optimize edilmiştir. En iyi karbon kaynakları, α -amilaz için çözünebilir nişasta, mısır nişastası ve glikojen; pullulanaz için ise pullulan, glikojen ve mısır nişastası olarak bulunmuştur. Optimum pH ve sıcaklık, amilaz için 6,5 ve 85°C; pullulanaz için 7,0 ve 80°C bulunmuştur. 85°C'de amilaz 3 saat, pullulanaz 30 dakika yarı ömre sahiptir.

Roy ve ark. (2003), *Bacillus* sp.'den asidik pullulanaz tip 2 üretmişler ve saflaştırmışlardır. Yüksek pullulanaz aktivitesine sahip US149 suşu Tunus'ta kaplıca yakınlarındaki topraktan izole edilmiştir. Bu suşun hücreleri çubuk şeklinde, gram-pozitif, hareketsiz, 37-55°C arasında, asidik pH (4,5-5,0)'da en iyi üreme göstermiştir. Suş, *Bacillus naganoensis* ile 16S rRNA gen sekansında en yüksek benzerliği gösterdiğinden (%96) bu tür olduğu düşünülmüştür. Enzim, hücresiz kültür süpernatantından ayırma (SEC) ve iyon değişirme kromatografisi yoluyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış doğal formun, SDS-PAGE ile belirlenen moleküler ağırlığı her biri 95 kDa olan iki alt birimden oluşan, yaklaşık 200 kDa olarak saptanmıştır. Saflaştırılan enzimin optimum pH'sı 5,0; 80 ve 90°C'lerde sırasıyla 48 ve 20 dakikalık yarı ömre sahip olduğu görülmüştür. Pullulan hidrolizinden oluşan DP3 ürününün, α -glukosidaz tarafından glukoz ve izomaltoz oluşturmak için kesilmesi dolayısıyla izopanoz olduğu kanıtlanmıştır. Bu durum, PulUS149'ın pullulanaz tip 2 olarak sınıflandırılan bir izopullulanaz olduğunu kanıtlamıştır.

Kriegshauser ve Liebl (2000), hipertermofilik bakteri olan *Thermotoga maritima*'dan pullulanaz tip 1'i anyon değişim ve β -siklodekstrin afinite

kromotografisi ile saflaştırmışlardır. Bu iki aşamalı yöntem ile %26 verimle 406 kat saflaştırmayı başarmışlardır. Optimum pH 5,9, optimum sıcaklık ise 90°C bulunmuştur ve bu sıcaklıkta 3,5 saatlik yarı ömre sahiptir.

Ara ve ark. (1995), tarafından yapılan çalışmada alkalofilik *Bacillus* sp.'den alkali amilopullulanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Alkalofilik *Bacillus* sp. KSM-137 suşu tarafından üretilen yeni bir alkali amilopullulanaz, kültür ortamından saflaştırılmıştır. 210 kDa moleküler ağırlığa sahip olan enzim, son ürün olarak hem maltotrioz oluşturmak için spesifik olarak pullulandaki α -(1,6) bağlarını hem de çeşitli oligosakkaritler oluşturmak için glikojen, amilopektin ve amilozdaki α -(1,4) bağlarını hidrolizleyebilmiştir. Pullulanaz ve α -amilaz aktiviteleri için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla, pH 9,5 ve 50°C ile pH 8,5 ve 50°C olarak bulunmuştur. İki aktivite de dietilpirokarbonat ve N-bromosüksinimid gibi inhibitörlerle güçlü bir şekilde inhibe edilmiştir. Ca^{+2} iyonları tarafından tersine çevrilebilmesi ile birlikte amilaz aktivitesi, EDTA ve EGTA tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirken pullulanaz aktivitesi spesifik olarak, Hg^{+2} iyonları, α -siklodekstrin ve β -siklodekstrin tarafından inhibe olmuştur. Tek bir alkali amilopullulanaz proteininin, birisi α -(1,4) bağlı substratların kesimi diğeri de α -(1,6) bağlı substratların kesimi için olan iki farklı aktif bölgesi olduğu belirtilmiştir.

Kuriki ve ark. (1988), *Bacillus stearothermophilus*'tan termostabil pullulanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu, moleküler klonlaması ve genin *Bacillus subtilis*'te ekspresyonunu çalışmışlardır. Enzim, pullulanın α -(1,6) glikozidik bağlarını hidrolize ederek maltotriozla dönüştürmüştür. Optimum sıcaklık 65°C olarak bulunmuş ve bu sıcaklıkta 60 dakika sonunda enzimin %90'ının stabil olarak kaldığı görülmüştür. Optimum pH 6,0 ve pH 6,0-8,5 aralığında enzimin stabil kaldığını bildirmişlerdir. Aktivite, Ca^{+2} , Ba^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} , O^{+2} ve Fe^{+2} varlığında artmış, Zn^{+2} ve Cu^{+2} varlığında ise büyük oranda azalmıştır. pTB 522 vektör plazmidi kullanılarak pullulanaz geni klonlanmış ve *Bacillus subtilis*'te eksprese edilmiştir.

Saha ve ark. (1988), *Clostridium thermohydrosulfuricum*'dan yüksek termostabil pullulanazın saflaştırılması ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. Pullulanaz, beş aşamada, 3511 kat saflaştırılmıştır. Bu pullulanazın optimum sıcaklığının 90°C olduğu ve bu sıcaklıkta stabil kaldığı; optimum pH'nın 5,0-5,5 olduğu ve pH stabilite aralığının 3,0-5,0 olduğu görülmüştür. Enzim, siklodekstrin, EDTA ve N-bromosüksinimid ile inhibe olurken p-kloromerküribenzoat ve akarboz ile inhibe olmamıştır. Rölatif substrat spesifitesi, pullulan hidrolizi %100 kabul edildiğinde glikojen için %75 ve çözünebilir nişasta için %50 olarak bulunmuştur.

3.MATERYAL VE METOT**3.1. Materyal**

Bu araştırmada canlı organizma olarak Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınmış topraktan izole edilen *Bacillus* sp. suşları kullanılmıştır.

Suşların izolasyonu, identifikasyonu ve enzimin karakterizasyonu için çeşitli besiyerleri, substratlar, tamponlar ve diğer kimyasallar kullanılmıştır. Soğutmalı santrifüj, PAGE elektroforez sistemi, yağ ve su banyosu, çalkalamalı inkübatör, spektrofotometre, otoklav, steril hava kabini kullanılan ekipmanlardandır.

3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Tanılanmasında Kullanılan Besiyerleri**3.1.1.1. N1 agar**

Saf kültür olarak izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarının ilk izolasyonu, çoğaltılması ve stok kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	g/L
Pepton	10
Et özütü	10
Maya	5
Glukoz	1
Agar	15

Distile suyla 1000 mL'ye tamamlanmış ve 1 N NaOH ile istenilen pH'ya (ilk izolasyon için pH: 7,0) ayarlanarak, otoklavda 121°C'de, 1,2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.2. Pullulanlı Besiyeri

İzolatların pullulanaz aktivitelerini gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır (Khalaf ve Aldeen, 2013).

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

Distile suyla 1000 mL'ye tamamlanmış ve 1 N NaOH ile pH: 7,0'ye ayarlanarak, otoklavda 121°C'de, 1,2 atm'de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.1.3. Nişastalı Besiyeri (Enzim Üretme Besiyeri)

Pullulanlı besiyerinde en iyi aktiviteyi gösteren suş seçildikten sonra pullulanaz üretmek için aynı besiyeri pullulan yerine nişasta ile hazırlanıp kullanılmıştır.

Bileşimi	g/L
Çözünebilir Nişasta	10
Maya Özü	5
K ₂ HPO ₄	0,3
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,001

Distile suyla 1000 mL'ye tamamlanmış ve 1 N NaOH ile pH: 7,0 olarak ayarlanarak, otoklavda 121°C'de, 1.2 atm'de 15 dk steril edilmiştir (Ling ve ark., 2009).

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. Lugol çözeltisi

Nişasta ve pullulanın enzimatik hidrolizini gözlemlemek amacıyla kullanılmıştır (Çetin, 1968).

Bileşimi	g/100 mL
İyot	7
Potasyum İyodür	3

Hazırlanan çözelti renkli şişede saklanmış ve kullanılmadan önce 1:20 oranında seyreltilmiştir.

3.1.2.2. Sodyum Asetat Tamponu

Enzimin pH 4,0 ve 5,0'te gösterdiği aktivitenin saptanması için kullanılmıştır. 0,1 M istenilen pH'da sodyum asetat tamponu hazırlamak için, 0,2 M asetik asit ve 0,2 M sodyum asetat çözeltileri, çizelgede belirlenen miktarlarda

alınıp distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır. İstenilen pH değerlerine uygun karışımlar Çizelge 3.1'de verilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.1. Sodyum Asetat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0,2 M Asetik Asit (11,55 mL/L) [mL]	0,2 M $C_2H_3O_2Na$ (16,4 g/L) [mL]	Distile Su [mL]	Toplam Hacim [mL]
4,0	82,0	18,0	100	200
5,0	29,6	70,4	100	200

3.1.2.3. Potasyum Fosfat Tamponu

Enzimin pH 6,0, 7,0 ve 8,0'de gösterdiği aktivitenin saptanması için kullanılmıştır. 0,1 M istenilen pH'da potasyum fosfat tamponu hazırlamak için, 0,2 M KH_2PO_4 ve 0,2 M K_2HPO_4 çözeltileri, çizelgede belirlenen miktarlarda alınıp distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır. İstenilen pH değerlerine uygun karışımlar Çizelge 3.2'de verilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.2. Potasyum Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0,2 M KH_2PO_4 (27,2 g/L) [mL]	0,2 M K_2HPO_4 (34,84 g/L) [mL]	Distile Su [mL]	Toplam Hacim [mL]
6,0	87,7	12,3	100	200
7,0	39,0	61,0	100	200
8,0	5,3	94,7	100	200

3.1.2.4. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimin pH 9,0 ve 10,0'da gösterdiği aktivitenin saptanması için kullanılmıştır. 0,1 M istenilen pH'da glisin-NaOH tamponu hazırlamak için, 0,2 M glisin ve 0,2 M NaOH çözeltileri, çizelgede belirlenen miktarlarda alınıp distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır. İstenilen pH değerlerine uygun karışımlar Çizelge 3.3'te verilmiştir (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.3. Glisin-NaOH Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0,2 M Glisin (15,01 g/L) [mL]	0,2 M NaOH (8 g/L) [mL]	Distile Su [mL]	Toplam Hacim [mL]
9,0	8,8	50	141,2	200
10,0	32	50	118	200

3.1.2.5. Boraks-NaOH Tamponu

Enzimin pH 11,0'de gösterdiği aktivitenin saptanması için kullanılmıştır. İstenilen pH'da boraks-NaOH tamponu hazırlamak için, 0,05 M boraks (19,05 g/L) ve 0,2 M NaOH çözeltileri hazırlanmıştır. 50 mL 0,05 M boraks çözeltisi alınarak üzerine, istenilen pH elde edilinceye kadar NaOH çözeltisi eklenerek son hacim distile su ile 200 mL'ye tamamlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

3.1.2.6. Dinitro Salisilik Asit (DNS) Çözeltisi

Pullulanaz aktivitesi sonucunda açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 1 g DNS 50 mL distile suda çözüldükten sonra üzerine yavaşça 30 g Na-K-Tartarat eklenerek çözülmesi beklenmiştir. Son olarak 20 mL 2 N NaOH eklenip son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Mulimani ve ark., 2000). Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede +4°C'te saklanmıştır.

3.1.2.7. %1'lik Substrat Çözeltisi

Enzim aktivite tayininde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 1 g pullulan tartılarak bir miktar 0,1 M (pH 7,0) potasyum fosfat tamponu içerisinde homojen bir şekilde çözülmüş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.1.3. Elektroforez Uygulamalarında Kullanılan Çözeltiler**3.1.3.1. Solüsyon A (Akrilamid stok çözeltisi)**

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid 80 mL distile suda çözüldükten sonra hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede +4°C’te saklanmıştır (Bollag ve ark., 1996).

3.1.3.2. Solüsyon B (4X Ayırma jeli tamponu)

pH’sı 8,8 olan 2 M Tris-HCl tamponu (75 mL) ve %10’luk SDS (4 mL) karıştırılarak distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede +4°C’te saklanmıştır (Bollag ve ark., 1996).

Native jel uygulamalarında SDS kullanılmamıştır. 75 mL Tris-HCl tamponu distile su ile 100 mL’ye tamamlanarak kullanılmıştır.

3.1.3.3. Solüsyon C (4X Toplama Jeli Tamponu)

pH’sı 6,8 olan 1 M Tris-HCl tamponu (50 mL) ve %10’luk SDS (4 mL) karıştırılarak distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede +4°C’te saklanmıştır (Bollag ve ark., 1996).

Native jel uygulamalarında 50 ml Tris-HCl tamponu distile su ile 100 ml’ye tamamlanarak kullanılmıştır.

3.1.3.4. AMPS Çözeltisi (%10 Amonyum Persülfat)

Polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır. 0,1 g AMPS tartılarak 1 mL distile su içerisinde çözölmüştür (Bollag ve ark., 1996).

3.1.3.5. Elektroforez Tamponu (Yürütme Tamponu)

3 g Tris, 14,4 g glisin ve 1 g SDS 300 mL distile suda çözöldükten sonra son hacim 1000 mL’ye tamamlanmıştır (Peterson ve ark., 2009).

Bu çözelti, çalışma çözeltisidir. 10X konsantrasyonlarda hazırlanarak kullanılacağı zaman seyreltilir. Böylece kontaminasyon ihtimali azaltılmış olur.

3.1.3.6. Örnek Tamponu

pH'sı 6,8 olan 1 M Tris-HCl tamponu (0,6 mL), %10'luk SDS (2 mL), %50'lik gliserol (5 mL), β -merkaptoetanol (0,5 mL), %1'lik bromofenol mavisi (1 mL) ve 0,9 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3.7. TEMED (N, N, N', N'-tetrametilen-etilendiamin)

Polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır.

3.1.3.8. Boyama Çözeltisi

Elektroforezden sonra protein bantlarının boyanarak görünür hale gelmesini sağlamak için kullanılmıştır. 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol ile iyice çözündükten sonra filtre edilmiştir. Sonra 100 mL glasiyel asetik asit ve 200 mL distile su ile çözünmesi sağlanarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Cam plakanın arasından çıkarılan jel hazırlanan boya çözeltisinde bekletilmiştir.

3.1.3.9. Boyayı Uzaklaştırma Çözeltisi

Boyama işlemi sonrasında jele bağlanan fazla boyanın uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Protein bantlarına bağlanan boya dışındaki bölgelerdeki boyayı uzaklaştırarak örnekler görünür hale getirilir. 100 mL metanol, 100 mL glasiyel asetik asit karıştırılarak distile su ile 1000 mL'ye tamamlanmıştır (Bollag ve ark., 1996).

3.2. Metot**3.2.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu**

Çukurova Üniversitesi kampüsünden, içinde buğday çimlenmiş toprak alınarak önceden güneş altında bekletilerek çürütülmüş patates karıştırılmış ve açık havada 1 ay bekletilmiştir. 1 ay sonunda, *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu için bu toprak örneğinden 1 g tartılarak 9 mL steril distile su içerisine karıştırılmış ve 5

dakika çalkalanmıştır (Moraga ve ark., 2004). Homojen bir şekilde karıştıktan sonra vejetatif formların ölmesi, ortamda yalnızca sporlu bakterilerin kalmasını sağlamak için 80°C’de 15 dakika bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır (Lennette ve ark., 1985; Venkateswaran ve ark., 2003)

Tek koloni elde edebilmek amacıyla ısı şoku uygulanan örnek, seri sulandırılmalar (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) yapıldıktan sonra N1 agar besiyerine (pH: 7,0) yayma metoduyla (0,1 mL) ekim yapılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra tek düşmüş kolonilerden, *Bacillus* sp. görünümüne sahip ve koloni morfolojileri farklı olan suşlar seçilip N1 agar besiyerine (pH: 7,0) çizgi ekim yapılmış, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sonraki analizlerde kullanılmak üzere stok kültür şeklinde saklanmışlardır.

3.2.2. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Pullulanaz üreten suşların belirlenmesi için stok kültür olarak saklanan suşlardan nişastalı agar besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutusuna lugol çözeltisi dökülmüştür. Besiyeri maviye boyanırken nişastayı parçalayan kolonilerin etrafında şeffaf zon oluşmuştur.

Nişastanın yanı sıra pullulanı da parçalayan suş arandığı için aynı işlem pullulanlı besiyeri ile de tekrarlanmıştır. Nişastalı agar besiyerinde hidroliz zonu veren suşlar seçilip pullulanlı agar besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petri kutusuna soğuk etanol dökülerek 1 saat bekletilmiştir. Üreyen kolonilerin çevresindeki şeffaflaşmayla gözlenen hidroliz zonları bu suşların pullulanaz üreterek pullulanı parçaladığını göstermiştir (Khalaf ve ark., 2013; Wei ve ark., 2014).

Hem pullulanlı hem de nişastalı besiyerinde şeffaf zon oluşturan suşlar seçilerek hidroliz zonlarının genişliği ölçülüp kaydedilmiştir. En büyük zon çapına

sahip suşlar tanılanmış ve bu araştırmada yabancı tip organizma olarak kullanılmıştır.

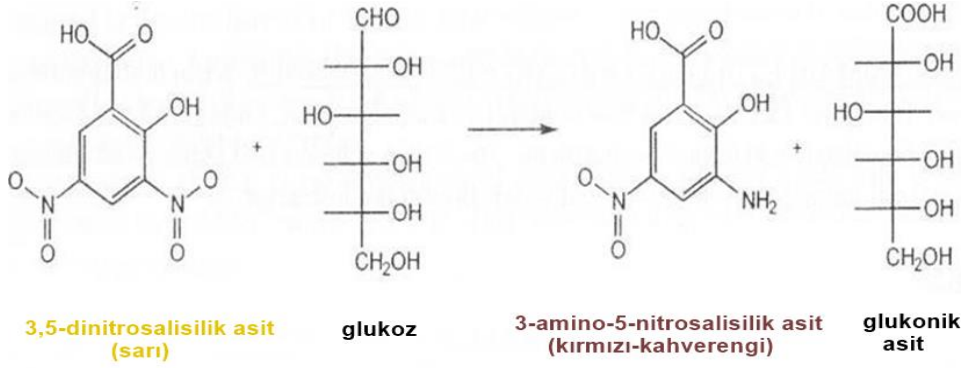
3.2.2.2. Bakteri Tanılanması

Pullulanaz üretici suşların tanılanması için öncelikle koloni morfolojisi, gram boyama davranışı gözlenmiş ve katalaz, β -hemoliz, indol gibi biyokimyasal testler uygulanmıştır. Bu testlerden sonra *Bacillus* sp. olduğu düşünülen ve en yüksek hidroliz zonuna sahip DSHK107 suşu 16S rRNA dizi analizi ile tanılanmıştır.

3.2.2.3. Pullulanaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Pullulanaz aktivitesi, indirgen şeker yöntemine göre spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Aktivite ölçümü için dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanılmıştır. Pullulanazın hidrolize ettiği pullulanın son ürün olan glukoz miktarı spektrofotometre ile 540 nm’de saptanmıştır.

DNS yönteminde 2-hidroksi-3,5-dinitrobenzoik asit, 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenirken; glukoz birimleri glukonik asite yükseltgenir (Şekil 3.1.). DNS çözeltisindeki Na-K-tartarat, çözeltiyi çözünmüş oksijenden korumak için kullanılırken, glukozun yükseltgenmesi için ortamın alkali olması gerektiğinden NaOH kullanılır (Miller, 1959).



Şekil 3.1. Ortamda serbest kalan şeker miktarının DNS yöntemi ile belirlenmesi sırasında gerçekleşen reaksiyon

Reaksiyon karışımı

0.5 mL enzim örneği (uygun oranda seyreltilmiş, üst faz)

+

0.5 mL pullulan çözeltisi (%1'lik)



37°C'de su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır (20 dk).

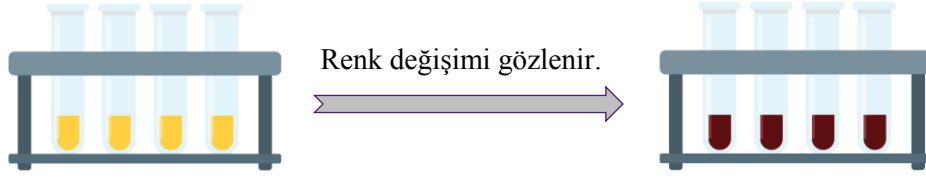


Buz üzerinde bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır (5 dk).



Bütün tüplere 0,5 mL DNS çözeltisi eklenerek kaynatılmıştır (5 dk).





540 nm’de spektrofotometrede köre karşı absorbans değerleri okunarak indirgen şeker miktarı hesaplanmıştır.

Bir ünite pullulanaz aktivitesi (U), standart koşullar altında 1 dakikada pullulandan 1 μ mol glukoz oluşmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Salleh ve ark., 2006).

3.2.2.4. Pullulanaz Üretimi İçin Optimum Koşulların Belirlenmesi

3.2.2.4.1. Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Aktivitesine Sıcaklık ve pH’nın Etkisi

Katı besiyerinde üreme ve enzim aktivitesine sıcaklık ve pH’nın etkisini saptamak amacı ile *Bacillus* spp. olarak tanımlanan suşlar pH 4,0-12,0 aralığında hazırlanan nişastalı agar besiyerlerine çizgi ekim yapılarak, 37°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. En iyi üreme ve enzim aktivitesinin gerçekleştiği pH değerleri, koloni ve aktivite zon çapının ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Seçilen suşların en iyi ürettiği ve enzim ürettiği pH değerleri belirlendikten sonra bu pH’larda nişastalı agar besiyeri hazırlanmış ve suşlar çizgi ekim yapılarak 4°C, 20°C, 27°C, 30°C, 37°C ve 50°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. En iyi üreme ve enzim aktivitesinin gerçekleştiği sıcaklık değerleri koloni ve aktivite zon çapının ölçülmesiyle belirlenmiştir.

3.2.2.4.2. Sıvı Besiyerinde Üreme ve Enzim Aktivitesine Sıcaklık ve pH’nın Etkisi

Katı besiyerinde, en iyi üreme ve pullulanaz aktivitesi alkali ortamda (pH 8,0), 30°C ve 37°C’de saptanmıştır. Bu bulguların doğrulanması amacıyla, söz

konusu sıcaklık ve pH değerleriyle sıvı besiyerinde de pullulanaz aktivitesine bakılmıştır.

Bu amaçla, stok olarak saklanan bakteri kültüründen 20 mL N1 besiyerine (bakteri geliştirme besiyeri, 100 mL'lik erlende) ekim yapılmış, 37°C'de 150 d/dk çalkalama hızında, inkübatörde 18 saat boyunca üretilmiştir. İnkübasyon sonunda bakteri kültürünün 600 nm'deki optik yoğunlukları (O.D.₆₀₀) bir standart elde edebilmek amacıyla steril boş besiyeri kör olarak kullanılarak spektrofotometre ile 0,5'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür, pH 7,0, 8,0, 9,0 ve 10,0'da 100 mL nişastalı besiyerlerine (enzim üretim besiyeri, 500 mL'lik erlenlerde) %1 oranında aşılanmıştır. 150 d/dk çalkalama hızında, 30°C ve 37°C'ye ayarlanmış iki ayrı inkübatörde 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kültür +4°C'de 8000 d/dk'da, 15 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz kullanılarak standart metotla enzim aktivitesi saptanmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği değer %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

Her deney için üç seri tüp hazırlanarak ortalamaları alınmıştır.

3.2.2.4.3. Pullulanaz Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi

Enzim üretim proseslerinde birçok parametre üretilen enzim miktarını etkilemektedir. Bu parametreler arasında besin elementlerinin önemi yadsınamaz. Bu çalışmada karbon kaynağının enzim üretimine etkisinin saptanması amacıyla; enzim üretim besiyerine ilave edilen çözünebilir nişastanın yerine, karbon kaynağı olarak, %1 konsantrasyonda, ayrı ayrı pullulan, glukoz, maltoz, mısır nişastası ve çözünebilir nişasta eklenerek 50 mL'lik besiyerleri hazırlanıp (250 mL'lik erlenlerde pH 8,0'de) steril edilmiştir. 18 saatlik taze bakteri kültürünün O.D.₆₀₀'de 0,5'e ayarlanarak besiyerlerine %2 oranında aşılama yapılmıştır. 30°C sıcaklıkta 150 d/dk çalkalama hızında inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler +4°C'de 8000 d/dk'da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği

karbon kaynağı değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.4.4. Enzim Üretiminde Nişastanın Farklı Konsantrasyonlarının Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının test edilmesi sonucunda, en iyi enzim üretimi nişasta katkısıyla sağlanmıştır. Bu nedenle, pullulanaz üretiminde ideal karbon kaynağı olan nişastanın farklı konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır. Enzim üretim besiyerleri 50 mL'lik miktarlarda hazırlanıp (pH 8,0, 250 mL'lik erlenlerde) %0,1, %0,25, %0,5, %1, %2, ve %3 konsantrasyonlarda nişasta eklenmiştir. 18 saatlik taze bakteri kültürü O.D.₆₀₀'de 0,5'e ayarlanarak besiyerlerine %2 oranında aşılama yapılmıştır. 30°C'de 150 d/dk çalkalamalı hızında, inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler +4°C'de 8000 d/dk'da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivitesi tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği nişasta konsantrasyon değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.4.5. Enzim Üretiminde Farklı Azot Kaynaklarının Etkisi

Kullanılan azot kaynağının enzim üretimine etkisinin saptanması için enzim üretim besiyerindeki amonyum sülfat ve maya yerine azot kaynağı olarak, %0,5 konsantrasyonda, ayrı ayrı; amonyum sülfat, amonyum nitrat, maya, pepton, et özütü, maya-pepton ikilisi ilave edilmiştir. Kontrol olarak enzim üretim besiyeri (*Azot kaynakları %0,5 maya ve %0,1 amonyum sülfat kullanılmıştır.*) kullanılmış, tüm konsantrasyonlar ve kontrol için 50 mL'lik besiyerleri hazırlanıp (pH 8,0) steril edilmiştir. 18 saatlik taze bakteri kültürü O.D.₆₀₀'de 0,5'e ayarlanarak besiyerlerine %2 oranında aşılama yapılmıştır. 30°C'de 150 d/dk çalkalama hızında inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler +4°C'de 8000 d/dk'da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği azot kaynağı değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.4.6. Pullulanaz Üretiminde En Etkin Azot Kaynağının Optimum Konsantrasyonunun Saptanması

Pullulanaz üretiminde kullanılacak en etkin azot kaynağının maya olduğu saptanmıştır. Enzim üretimlerinde değişkenler belirlendikten sonra, en uygun konsantrasyonun saptanması enzim üretiminin daha verimli ve ekonomik olması açısından kaçınılmazdır. Bu nedenle mayanın farklı konsantrasyonları %0,3, %0,5, %1, %1,5, %2, ve %3 oranlarında, 50 mL’lik üretim besiyerlerine (250 mL’lik erlenlerde, pH: 8,0) ayrı ayrı eklenmiş ve steril edilmiştir. 18 saatlik taze bakteri kültürünün O.D.’si 0,5’e ayarlanarak besiyerlerine %2 oranında aşılama yapılmıştır. 30°C sıcaklıkta 150 d/dk’daki çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler +4°C’de 8000 d/dk’da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği konsantrasyon değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.4.7. Pullulanaz Üretiminde Farklı Metal İyonlarının Etkisi

Pullulanaz üretim besiyerinin bileşeninde bulunan metal iyonlarının tek tek üretimdeki etkinliğini saptamak amacıyla, öncelikle orijinal besiyerinde $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ enzim üretilmiştir. Orijinal besiyerinde üretilmiş enzim aktivitesi kontrol olarak kabul edilmiştir. 250 mL’lik erlenlerde hazırlanmış 50 mL’lik besiyerine (pH: 8,0) iyonlardan birer tanesi (%0,1) eklenmiş ve 18 saatlik taze bakteri kültürünün O.D.’si 0,5’e ayarlanarak %2 oranında aşılama yapılmıştır. 30°C sıcaklıkta 150 d/dk’daki çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler +4°C’de 8000 d/dk’da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır ve kontrol ile kıyaslanmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği metal iyonu değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.4.8. Pullulanaz Üretiminde İnokülasyon Miktarının Etkisi

En uygun inokülasyon miktarının saptanması için optimize koşullarda 50 mL miktarlarda enzim üretim besiyeri hazırlanmıştır (pH 8,0, 250 mL'lik erlenlerde). 18 saatlik taze bakteri kültürü O.D.₆₀₀'de 0,5'e ayarlanarak besiyerlerine %0,5, %1, %2, %3, %4 ve %5 oranlarında aşılama yapılmıştır. 30°C'de 150 d/dk çalkalama hızında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler +4°C'de 8000 d/dk'da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği inokülasyon miktarı değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.4.9. Pullulanaz Üretiminde Çalkalama Hızının (d/dk) Etkisi

En uygun çalkalama hızının saptanması için, optimize koşullarda 50 mL miktarlarda enzim üretim besiyeri hazırlanmış (pH 8,0, 250 mL'lik erlenlerde) 18 saatlik taze bakteri kültürü O.D.₆₀₀'de 0,5'e ayarlanarak besiyerlerine optimum inokülasyon miktarı olan %3 oranında aşılama yapılmıştır. 30°C'de çalkalamasız (durgun), 100, 150, 200 ve 250 d/dk'daki çalkalamalı inkübatörlerde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler +4°C'de 8000 d/dk'da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği çalkalama hızı değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.4.10. Pullulanaz Üretiminde İnkübasyon Süresinin Etkisi

Daha önce belirlenen, üretim koşulları için optimum şartların sağlandığı enzim üretim besiyeri hazırlanmış ve 18 saatlik taze bakteri kültüründen (O.D.₆₀₀=0,5) %2 oranında aşılama yapılmıştır. Optimum şartlarda inkübasyon devam ederken, 16, 20, 24, 40, 44, 48, 52 ve 65. saatlerde örnekler alınıp +4°C'de 8000 devir/dk'da 15 dk santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini

yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği inkübasyon süresi %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.5. Optimum Koşullarda Pullulanaz Üretimi ve Etanol (Et-OH) ile Presipitasyonu

Pullulanaz üretimindeki optimum koşullar belirlendikten sonra, stok olarak saklanan DSHK107 suşu 20 mL N1 besiyerine (*bakteri geliştirme besiyeri, 100 mL'lik erlende*) ekim yapılmış, 37°C'de 150 d/dk çalkalama hızında 18 saat üretilmiştir. İnkübasyon sonunda 18 saatlik bakteri kültürü spektrofotometre ile O.D.₆₀₀'de 0,5'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür, pH 8,0, 100 mL modifiye edilmiş nişastalı besiyerine (*modifiye enzim üretim besiyeri, 500 mL'lik erlenlerde*) %3 oranında aşılanmıştır. 200 d/dk çalkalama hızında 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

24 saat sonunda kültür, +4°C'de 8000 d/dk'da 15 dk santrifüj edilmiştir. Hücre içermeyen üst faz alınarak üzerine hacminin %70'i oranında %96'lık soğuk etanol eklenmiş, -20°C'de 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda örnek, +4°C'de 15 dakika 10000 d/dk'da santrifüj edilerek enzim sıvı fazdan geri kazanılmıştır. Çökelti, 0,1 M potasyum fosfat tamponunda (pH: 7,0) çözülerek +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2.6. Pullulanaz Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Etanol presipitasyonu ile kısmi saflaştırma yapılan pullulanazın en iyi aktivite gösterdiği pH'nın saptanması için;

Sodyum asetat (pH 4,0-5,0),

K-fosfat (pH 6,0-8,0),

Glisin-NaOH (pH 9,0-10,0),

Boraks-NaOH (pH 11,0) tampon sistemleri kullanılmıştır (Temizkan ve Arda, 2008).

Bu tamponlar ile pH 4,0-11,0 aralığında, içerisinde %1 pullulan bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Farklı pH'larda hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak standart pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği pH değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.7. Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Pullulanazın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığı saptamak amacıyla, enzim ve substrat 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklardaki su banyolarında inkübe edilerek standart pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık değeri %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.8. pH'nın Enzim Kararlılığına Etkisi

Enzimlerin aktiviteleri pH değişimlerinden etkilenmektedir. Değişen pH koşullarında üretilen enzimin aktivitesini koruyabilmesi veya hangi düzeyde aktivite kaybına uğradığının bilinmesi üretim prosesleri için son derece önemlidir.

pH'nın enzim kararlılığına etkisini saptamak amacı ile pH 4,0-11,0 aralığındaki farklı tamponlarla 2 saat optimum sıcaklıkta (40°C) ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyona bırakılan enzim ve optimum pH'da hazırlanan substrat (pH 6.0) karıştırılarak, optimum aktivite sıcaklığında standart aktivite tayini yapılmıştır.

Ayrıca kontrol olarak, ön inkübasyona bırakılmamış enzim örneğiyle standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.9. Sıcaklığın Enzim Kararlılığına Etkisi

Sıcaklık da enzim aktivitesini olumlu/olumsuz yönde etkileyen fiziksel bir etkidir. Mikrobiyal enzimlerin endüstride tercih edilmesinin en önemli

nedenlerinden birisi de ekstrem sıcaklıklara dayanıklılık ve kararlılıktır. Bu çalışmada üretilen pullulanazın değişen sıcaklıklarda kararlılığını saptayabilmek amacıyla; enzim, 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C sıcaklıklarda 2 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyona bırakılan enzim ve optimum pH'da hazırlanan substrat (pH 6,0) karıştırılarak, optimum aktivite sıcaklığında (40°C) standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol olarak, ön inkübasyona bırakılmamış enzim örneğiyle standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.10. Metal İyonlarının Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bir enzimin kullanıldığı proseslerde farklı kimyasal bileşenler enzim aktivitesini etkileyebilen kimyasal ajanlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu gerçekten hareketle, metal iyonlarının pullulanaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla CoCl₂, NaCl, MgSO₄, CaCl₂, CuSO₄, ZnCl₂, MnCl₂ ve FeSO₄ metalleri kullanılmıştır.

Metal iyonlarının distile su içerisinde 100 mM stok çözeltileri hazırlandıktan sonra son konsantrasyonları 1 ve 5 mM olacak şekilde enzime eklenmiş ve 10 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır (Asha ve ark., 2013). Ön inkübasyona bırakılan enzim ve optimum pH'da hazırlanan substrat (pH 6,0) karıştırılarak, optimum aktivite sıcaklığında (40°C) standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol olarak, metal iyonu içermeyen enzim ile standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.11. Diğer Kimyasalların Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Üre, SDS, EDTA, Tween 20, Tween 80 ve Triton X-100'ün, DSHK107 suşundan üretilen pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ürenin son

konsantrasyonu 4 ve 6 M, diğerlerinin ise %1 ve %5 olacak şekilde enzime eklenmiş, 10 dakikalık ön inkübasyon sonrası optimum pH'da hazırlanan pullulan çözeltisi eklenerek standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol olarak, inhibitör içermeyen ortamda standart aktivite tayini yapılmış ve bu değer %100 kabul edilerek bağıl aktivite cinsinden grafiklendirilmiştir.

3.2.2.12. SDS-PAGE Analizi

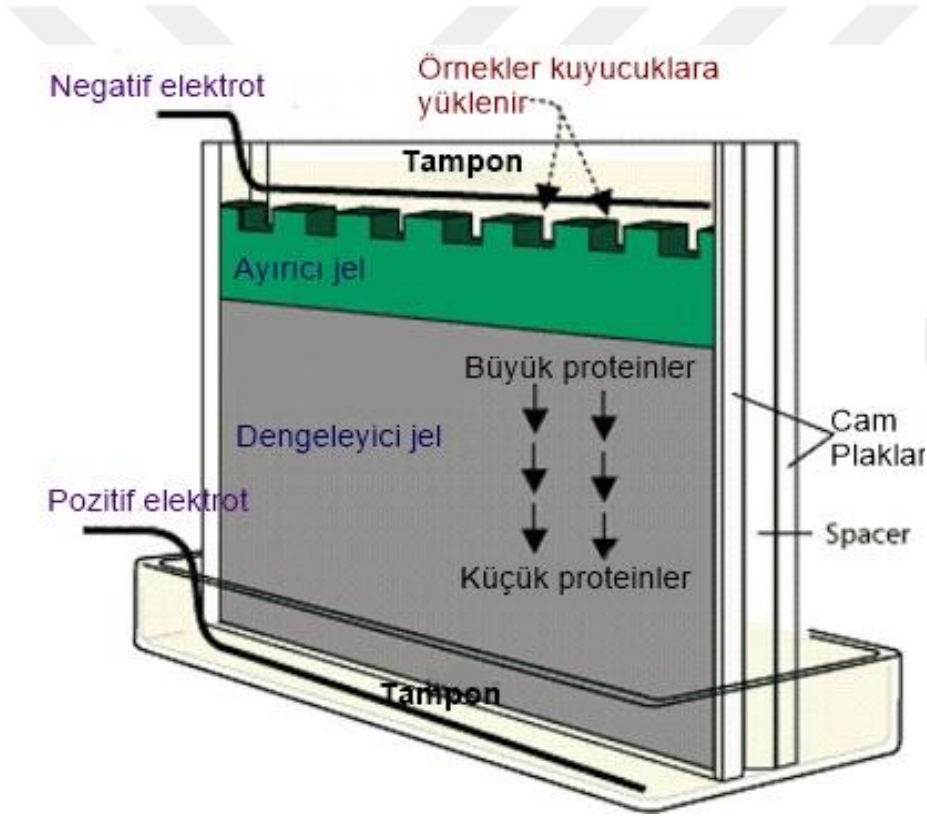
Poliipeptitlerin moleküler büyüklüğüne göre ayrılmasını sağlayan SDS-PAGE (sodyum-dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ilk defa Shapiro, Viñuela ve Maizel (1967) tarafından tanımlanmıştır. SDS ve proteinler kısa ve esnek poliipeptit segmentleri ile bağlanmış protein misellerinden oluşan kompleks bir yapı oluşturur. 1,4 g SDS g/protein oranında SDS-protein bağlanarak kompleks oluşur. SDS proteinlerin yüklerini maskeler ve oluşan anyonik kompleksler kütle başına net sabit bir negatif değerle yüklenir. Genellikle, sisteinler arasındaki disülfid bağlarını kırmak için örneğe DTT gibi indirgen bir ajan eklenir (Westermeier ve Naven, 2002).

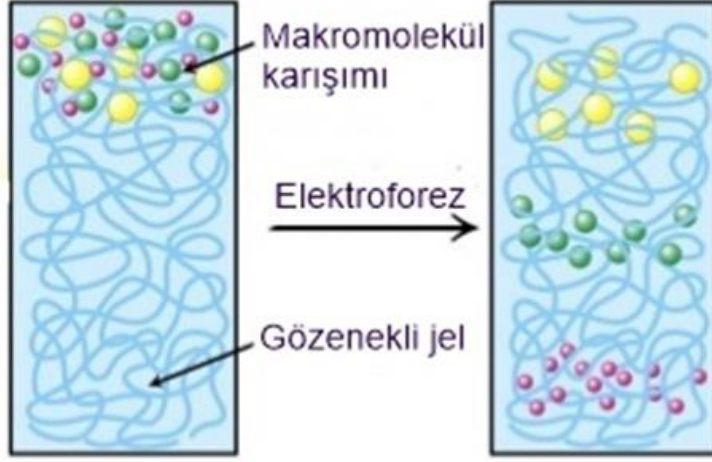
SDS-PAGE'in avantajlarından birkaçı şunlardır;

- SDS, çok hidrofobik ve denatüre proteinler dahil neredeyse bütün proteinleri çözünür hale getirir.
- SDS-protein kompleksi yüksek oranda yüklendiğinde elektroforetik mobilitayı sağlar. Bu durum ayrışmayı hızlandırır.
- Fraksiyonlar tamamen negatif olarak yüklendiğinden hepsi tek bir yöne, anoda doğru hareket etmeye başlar.
- Poliipeptitler SDS ile muamele edildiklerinde katlanmaları açılır ve esnek hale geçerler. Bu ayrışma güçlü bir bağlayıcı jel ortamında gerçekleşir; böylece difüzyon sınırlandırılır.
- Bu durum yüksek çözünürlüğün ve keskin bantların oluşumunu sağlar.
- Bantları düzeltmek kolaydır, güçlü asitlere ihtiyaç duyulmaz.

- Ayrışma, tek bir fizikokimyasal parametreye yani moleküler büyüklüğe dayalıdır. Moleküler ağırlığın belirlenmesi için kolay bir yöntemdir.
- SDS ile ayrılmış proteinler boyayı daha iyi tutar. Bandı belirleme sınırı, Native Page ile karşılaştırıldığında 10 kat daha fazladır (Westermeier, 2016).

Şekil 3.2.'de SDS PAGE düzeneği ve protein karışımının jeldeki hareketi gösterilmiştir.





Şekil 3.2. SDS PAGE düzeneği ve protein karışımının jeldeki hareketi

Bu çalışmada üretilen pullulanazın moleküler ağırlığının ve aktivitesinin saptanabilmesi amacıyla SDS-PAGE sistemi kullanılmıştır.

Ayırıcı jel (separating, %12) ve dengeleyici jel (stacking, %5) hazırlanmıştır.

X Ayırıcı jelin bileşimi ve hazırlanışı (%12)

Bileşimi	
Sol-A	6,5 mL
Sol-B	5,0 mL
dH ₂ O	8,4 mL
AMPS (%10)	66 µL
TEMED	15 µL
Toplam	20 mL

Taze olarak hazırlanan Sol-A ve Sol-B, çizelgedeki miktarlarda karıştırıldıktan sonra vakum pompası ile 5 dk degaz işlemi yapılmıştır. Degaz işlemi önemlidir çünkü oksijen, polimerizasyonu inhibe edebileceğinden karışımdan çözünmüş oksijen uzaklaştırılmalıdır (Walker, 2002). Reaksiyon,

katalist olarak AMPS'nin eklenmesiyle başlar. TEMED ise polimerizasyonu sağlayan serbest radikalleri açığa çıkarmak için üçüncül amino grupları oluşturur (Westermeier, 2005). Karışıma AMPS ve TEMED eklendikten sonra çözelti iyice karıştırılarak zaman kaybetmeden mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına yavaşça dökülür. Üzerine dikkatlice distile su eklendikten sonra (*havanın difüzyonunu engellemek amacıyla*) düzgün bir üst yüzey oluşumu sağlanarak donmaya bırakılmıştır.

Dengeleyici Jelin Bileşimi

Bileşimi	
Sol-A	1,5 mL
Sol-C	2,25 mL
dH ₂ O	5,25 mL
AMPS (%10)	30 µL
TEMED	10 µL

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yüzeydeki su dökülerek plakalar kurulanmıştır. Aynı yöntemle hazırlanan dengeleyici jel plakalar arasına dökülerek polimerizasyon beklenmeden hızlı ama hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek tarak yerleştirilmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra kuyucukları bozmadan yavaşça tarak çıkarılmıştır.

Örneklerin Hazırlanması ve Elektroforez Koşulları

Yüklenen örnek miktarı	80 µL
Yüklenen Marker miktarı	10 µL
(Tüm tüpler 5 dk 95°C’de su banyosunda bekletilmiştir)	
Uygulanan akım	örnekler stacking jelden çıkıncaya kadar 15 mA, daha sonra 20 mA
Elektroforez zamanı	6 saat

Jelin Boyanması ve Görüntülenmesi

Jel, diğer yöntemlere göre en hızlı ve genel bir yöntem olan Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) boyasıyla boyanmıştır. Boya öncelikle lizin ve arginin gibi pozitif yüklü amino asitlere bağlanır. Bu nedenle bazik proteinler asidik proteinlere göre daha güçlü boyanırlar (Ahmed, 2005).

Elektroforez işleminden sonra jel CBB R-250 içeren boyama küvetine alınmış ve 2 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde boyanmış, sonrasında bir gece boyayı geri alma (destaining) solüsyonunda bekletilmiştir. Sonra %1 gliserol içeren distile su içerisinde 4 saat bekletilmiş ve beyaz ışık altında jel görüntülenmiştir. Jelde yürütülen marker proteinin aldığı yol ile örnek/örnekler kıyaslanarak enzimin moleküler ağırlığı hesaplanmıştır



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

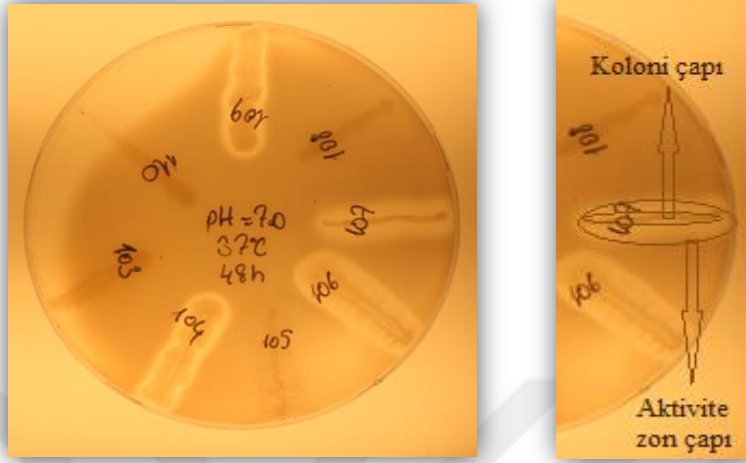
4.1. Bakterilerin İzolasyonu ve Pullulanolitik Aktivitenin Belirlenmesi

Çukurova Üniversitesi kampüsünden alınan, içerisinde buğday çimlenmiş toprağa çürütülmüş patates karıştırılarak açık havada 1 ay bekletilmiştir. Bu karışımdan bakteri izolasyonu yapılmıştır.

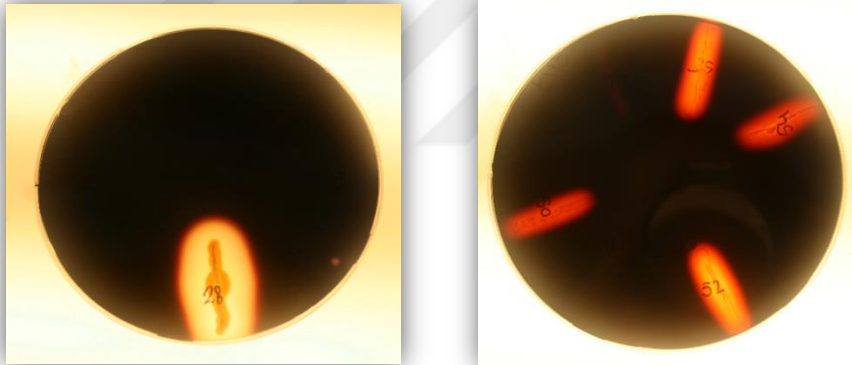
1 g toprak örneği + 9 mL steril saf su →5 dakika çalkalanmış (Moraga ve ark., 2004) ve vejetatif bakteri formlarının elimine edilmesi için ısı şoku uygulanmıştır (80°C’de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir., Lennette ve ark., 1985; Venkateswaran ve ark., 2003).

Tek koloni elde edebilmek amacıyla ısı şoku uygulanan örnek, seri sulandırılmalar (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) yapılarak N1 agar besiyerine (pH: 7,0) yayma metoduyla (0,1 mL) ekilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyondan sonra tek düşmüş kolonilerden, *Bacillus* sp. görünümüne sahip ve koloni morfolojileri birbirinden farklı olan suşlar seçilip N1 agar besiyerine (pH: 7,0) çizgi ekim yapılmış, 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sonraki analizlerde kullanılmak üzere 110 bakteri suşu, N1 agarda üretilerek stok kültür olarak saklanmışlardır.

Toplam 110 bakteri suşu nişastayı hidroliz edebilme yeteneğini saptamak için nişastalı agar besiyerine çizgi metoduyla ekilmiş, 3 günlük inkübasyon (37°C’de 24 saat) sonunda nişastalı agar besiyerindeki 110 suştan en yüksek hidroliz zonu gösteren 19 suş seçilerek pullulanolitik aktivitelerinin olduğunu kesinleştirmek için pullulanlı agar besiyerine ekilmiştir. 3 gün inkübasyondan sonra pullulanolitik aktivite gösteren suşların pullulanlı agardaki görüntüleri Şekil 4.1’de, nişastalı besiyerindeki görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Pullulanolitik suşların pullulanlı besiyerindeki görüntüsü



Şekil 4.2. Pullulanolitik suşların nişastalı besiyerindeki görüntüsü

Sonuç olarak; 19 suştan 14'ünde pullulanaz aktivitesi saptanmıştır. Koloni ve aktivite zon çapları ölçülmüştür. Aktivite zon çaplarının ölçülmesi sonucunda en yüksek aktivite gösterdiği belirlenen DSHK55, DSHK65 ve DSHK107 suşları mikroskopik, biyokimyasal ve moleküler tanılama metotları ile tür düzeyinde tanılanmıştır.

4.2. Pullulanolitik Suşların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Enzim üretimi için seçilen 3 suş gram boyama ve spor boyama metodu ile boyanmıştır. Boyanmış preparatlar ışık mikroskopunda incelendiğinde, incelenen suşların gram pozitif, endosporlu, çubuk şeklinde oldukları gözlenmiştir. DSHK107 suşunun besiyerindeki üreme karakteristiği ve boyanma davranışı, biyokimyasal testler ile oksijen gereksinimi (aerob) ve hareket kabiliyeti dikkate alındığında, *Bacillus* sp.'den farklı olduğu düşünülmüştür. Moleküler tanılama amacıyla; 16S rRNA ve yağ asiti analizleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji bölümünde yapılmış ve bu araştırmaya konu olan DSHK107 suşu *Fontibacillus* cinsine ait yeni bir tür olarak izole edilmiş, tip tür olarak SCI indexlerince taranan Journal of Basic Microbiology dergisinde 2016 yılında (56:8, 857-863) yayımlanmıştır.

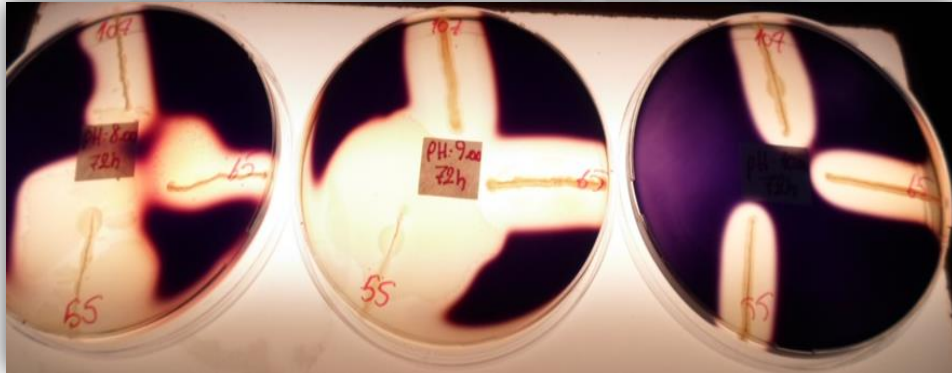
4.3. Katı Besiyerinde Pullulanaz Üretimine pH'nın Etkisi

DSHK55, DSHK65, DSHK107 suşları, pH 4,0-12,0 aralığındaki nişastalı agar besiyerlerine ekilerek 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakılmış ve optimum enzim üretiminin alkali ortamda gerçekleştiği görülmüştür. pH 5,0'da hiçbir suşta üreme gerçekleşmemiş, pH 6,0'da sadece DSHK107 suşunda çok az üreme ve enzim üretimi gerçekleşmiştir. En fazla üreme görülen DSHK55 suşunun pH 8,0 ve 9,0'da koloni zon çapı sırasıyla 40 ve 48 mm, aktivite zon çapı ise 43 ve 47 mm olarak ölçülmüştür. Dolayısıyla DSHK55 suşu fazla ürettiği halde pullulanolitik aktivitesi diğer suşlara kıyasla çok düşüktür.

Hidroliz zonları karşılaştırıldığında 37°C'deki en yüksek enzim aktivitesi, DSHK107 suşu tarafından pH 8,0, 9,0 ve 10,0'da gerçekleşmiştir. Çizelge 4.1'de suşların pH 4,0-12,0 aralığında katı besiyerinde koloni ve aktivite zon çaplarının değerleri, Şekil 4.3'te ise en yüksek enzim aktivitesinin görüldüğü pH 8,0, 9,0 ve 10,0'da nişastalı besiyerindeki görünümleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. DSHK55, DSHK65, DSHK107 suşlarının pH 4-12 aralığında katı besiyerinde koloni ve aktivite zon çapları

	DSHK55		DSHK65		DSHK107	
	Koloni Çapı (mm)	Aktivite Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Aktivite Zon Çapı (mm)	Koloni Çapı (mm)	Aktivite Zon Çapı (mm)
pH 5,0	-	-	-	-	-	-
pH 6,0	-	-	-	-	1	2
pH 7,0	2	6	3	6	3	7
pH 8,0	40	43	2	11	2	20
pH 9,0	48	50	14	22	5	25
pH 10,0	2	17	4	16	3	21
pH 11,0	1,5	5	1	2	1,5	5
pH 12,0	1,5	6	-	-	-	-



Şekil 4.3. DSHK55, DSHK65 ve DSHK107 suşlarının pH 8,0, 9,0 ve 10,0'da koloni ve zon çaplarının görünümü

Bu aşamadan sonra DSHK55 suşunun iyi bir enzim üreticisi olmadığı düşünülmüş ve çalışmalarda diğer iki suş kullanılmıştır.

4.4. Katı Besiyerinde Pullulanaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisi

Alkali ortamda en iyi enzim aktivitesi gösteren **DSHK65** ve **DSHK107** suşları pH'sı 8,0 ve 9,0 olan nişastalı agar besiyerlerine ekilerek optimum üreme sıcaklığının belirlenmesi için 4°C, 20°C, 27°C, 30°C, 37°C ve 50°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Optimum enzim üretiminin 30-37°C'de (*mezofil*) gerçekleştiği görülmüştür. 50°C'de suşlarda üreme gözlenmemiş, 4°C'de bakteriler 1 mm çaplı üreme alanı oluşturmalarına rağmen enzim aktivitesi saptanmamıştır. Sıcaklık arttıkça (37°C'ye kadar) genel olarak aktivite artışı gözlenmiştir. Bu deneyler sonucunda, katı besiyerinde DSHK107 suşunun enzim aktivitesinin DSHK65'e göre daha yüksek, optimum aktivite sıcaklığının da 30-37°C aralığında olduğu belirlenmiştir. Çizelge 4.2'de katı besiyerinde DSHK65 ve DSHK107 suşlarının pH 8,0 ve 9,0'da, 4-50°C aralığında üreme ve aktivite düzeyleri mm olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Katı besiyerinde DSHK65 ve DSHK107 suşlarının 4-50°C aralığında pH 8,0 ve pH 9,0'daki koloni ve aktivite zon çapları

	DSHK65				DSHK107			
	pH 8,0		pH 9,0		pH 8,0		pH 9,0	
	K.Ç. (mm.)	A.Z.Ç. (mm)	K.Ç. (mm)	A.Z.Ç. (mm)	K.Ç. (mm)	A.Z.Ç. (mm)	K.Ç. (mm)	A.Z.Ç. (mm)
4°C	1	-	1	-	1	-	1	-
20°C	1	1,5	1	1,5	1,5	1,8	1,5	1,8
27°C	2,5	7	3	5	2	12	3	8
30°C	2	12	2	6	2	13	3	12
37°C	2	10	2,5	10	2	17	7	20
50°C	-	-	-	-	-	-	-	-

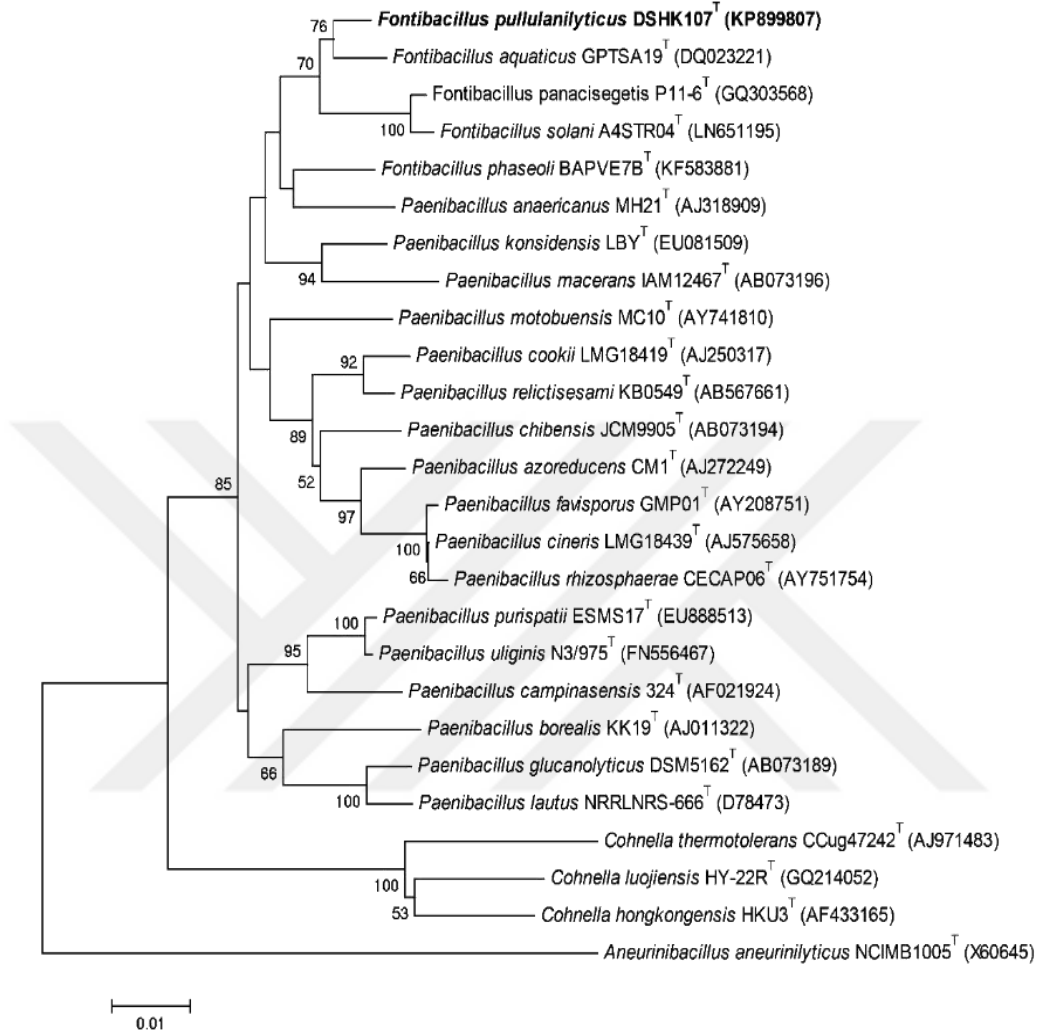
K.Ç.: Koloni Çapı, A.Z.Ç.: Aktivite Zon Çapı

4.5. Enzim Üretici Suşun (DSHK107) Tür Düzeyinde Tanılanması

Katı besiyerinde en yüksek enzim aktivitesi gösteren suş olan DSHK107 kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Doğal bir izolat olan bakteri

suşunun tür düzeyinde tanılanması amacıyla; 16S rRNA dizi analizi Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünde yaptırılmış ve elde edilen dizilere BLAST analizi yapılmıştır. Tanılama testlerine göre DSHK107 (Damla Sihay-Hatice Korkmaz 107) suşu *Fontibacillus pullulanilyticus* (Tip tür, tür düzeyinde ilk kez tanılandı.) olarak filogenetik ağaçta yerini almıştır.

Gram negatif, hareketli, oksidaz ve katalaz pozitif, DSHK107^T olarak isimlendirilmiş suş, Çukurova Üniversitesi kampüs toprağından izole edilmiştir. Suş, 20-42°C'de (optimum, 30°C), pH 6,0-9,0'da (optimum, pH 7,0) ve %0-2,0 NaCl içeren ortamda gelişme göstermektedir. 16S rRNA gen sekansı analizi DSHK107^T suşunun *Fontibacillus* cinsine ait olduğu görülmüş ve *Fontibacillus aquaticus* GPTSA 19^T (%97,8) ve *Fontibacillus panacisegetis* P11-6^T (%97,0) suş tipleriyle en yüksek sekans benzerliğini göstermiştir. DSHK107^T suşunun major yağ asidi anteiso-C_{15:0} olarak bulunmuştur. DSHK107^T suşunun polar yağ asitleri difosfatidigliserol fosfatidigliserol, fosfatidiletanolamin, bilinmeyen dört fosfolipit, bilinmeyen dört lipit, bilinmeyen üç glikolipit, bilinmeyen iki aminofosfolipit, bilinmeyen bir aminolipit ve bilinmeyen bir aminofosfoglikolipitten oluşmaktadır. Major izoprenoid kinonu MK-7'dir. DSHK107^T suşunun DNA G+S miktarı %42,1 mol'dur. DNA-DNA hibridizasyonu DSHK107^T suşunun *F. aquaticus* DSM 17643^T, *Fontibacillus solani* A4STRO4^T ve *F. panacisegetis* DSM 28129^T (sırasıyla %47, 58 ve 59,3) ile düşük oranda DNA-DNA ilişkisi olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, DSHK107^T suşunun daha önce tanımlanmamış, yeni bir tür olduğunu desteklemektedir. Polifazik yaklaşımlar kullanılarak yapılan taksonomik çalışmalar ışığında, DSHK107^T *Fontibacillus pullulanilyticus* sp. nov. olarak isimlendirdiğimiz *Fontibacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu kabul edilmiştir. Tip suş: DSHK107^T (=NCCB 100560^T =DSM 100116^T) (Bektaş ve ark., 2016). Bu suşun filogenetik ağaçtaki yeri Şekil 4.4.'te verilmiştir.

Şekil 4.4. DSHK107^T suşunun filogenetik ağaçtaki konumu

Tablo 4.1. DSHK107^T suşunun ve en yakın filogenetik akrabasının farklı fenotipik karakteristikleri

KARAKERİSTİK	1	2	3
Katalaz	+	-	-
Hidroliz:			
Jelatin	+	-	-
Nişasta	+	Z	-
Asit Üretimi			
Arbutin	-	+	+
D-Früktoz	-	+	+
İnülin	-	-	+
D-Raffinoz	-	+	+
Sükroz	-	+	+
D-Ksiloz	+	-	+
D-Riboz	+	-	-
Melibiyoz	+	-	-
Nitrat İndirgenmesi	-	-	+

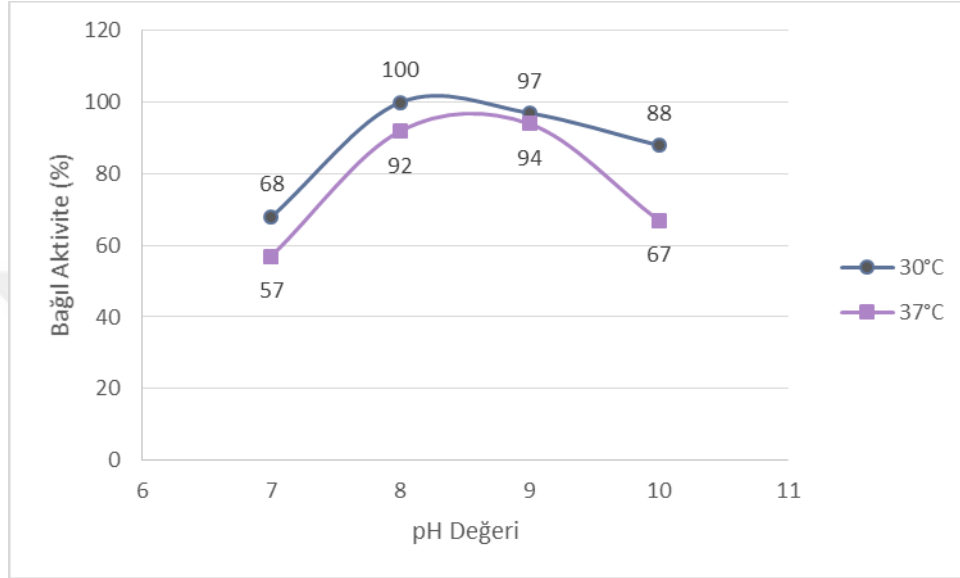
+, pozitif; Z, zayıf pozitif; -, negatif

Suşlar: 1, DSHK107^T; 2, *Fontibacillus aquaticus* DSM 17643^T; 3, *Fontibacillus panacisegetis* DSM 28129^T

4.6. Sıvı Besiyerinde Enzim Üretimine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Katı besiyerinde DSHK107 suşunu kullanarak pullulanaz üretimi gerçekleştirdiğimizde, optimum pH 9,0, sıcaklık 37°C saptanmıştır. Enzim üretimlerinde, katı besiyeri verileri suşun özelliklerini saptamada ön bilgi açısından son derece önemli olmakla beraber, üretimler sıvı besiyerinde gerçekleştirildiğinden, enzim üretim koşullarının sıvı besi yeri için optimizasyonu kaçınılmazdır. Bu amaçla, pH'sı 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 olan nişastalı sıvı besiyerleri hazırlanarak hem 30 ve 37°C'lerde enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra, kültür santrifüj edilerek (+4°C, 6000 d/dk'da) üst faz ayrılmıştır. Üst faz enzim preparasyonu olarak kullanılmış ve standart aktivite

tayini yapılmıştır. En iyi enzim üretimi pH 8,0 ve 30°C’de gözlenmiştir. Sonuçlar grafiksel olarak Şekil 4.4’te gösterilmiştir.



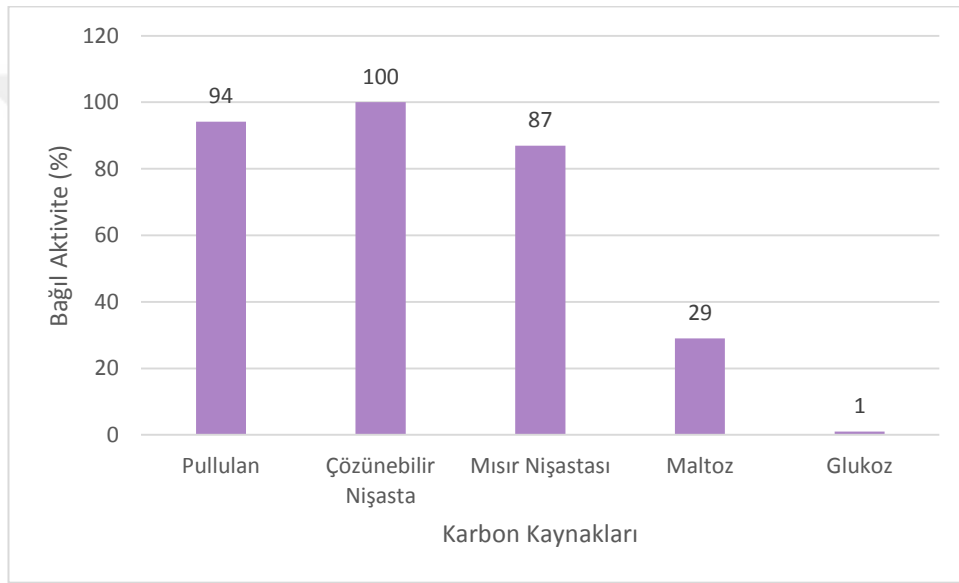
Şekil 4.5. Besiyeri pH’sının ve inkübasyon sıcaklığının enzim üretimine etkisi

4.7. Pullulanaz Üretiminde Karbon Kaynaklarının Etkisi

Substrat indüksiyonu ve katabolit represyonu bakımından karbon kaynaklarının seçimi enzim üretimi için çok kritiktir. Bazı substratlar düşük konsantrasyonda indüktör, yüksek konsantrasyonda represör olarak etki gösterebilir. Bazen de reaksiyonun son ürünü enzim için indükleyici olurken katabolit represyon durumunda tam tersi represör etki gösterir (Nair ve ark., 2006). Dolayısıyla optimum enzim üretimi için besiyerindeki karbon kaynağı ve konsantrasyonunun saptanması çok önemlidir.

Karbon kaynaklarının etkisini belirleyebilmek amacıyla, enzim üretim besiyeri içeriğindeki nişasta yerine %1 konsantrasyonda pullulan, glukoz, maltoz, mısır nişastası ve kontrol için çözünebilir nişasta eklenerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra santrifüj edilerek üst fazdan

pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. Sonuçlar, Şekil 4.6’da verilmiştir. Grafikteki veriler incelendiğinde; kullanılan karbon kaynaklarının enzim üretimindeki etkinliği sırasıyla çözünebilir nişasta>pullulan>mısır nişastası>maltoz>glukoz olarak belirlenmiştir. Glukoz kullanımı enzim üretimini %99 oranında baskılamıştır. Çözünebilir nişastanın pullulanaz üretimi için en uygun karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Pullulanaz üretiminde karbon kaynaklarının etkisi

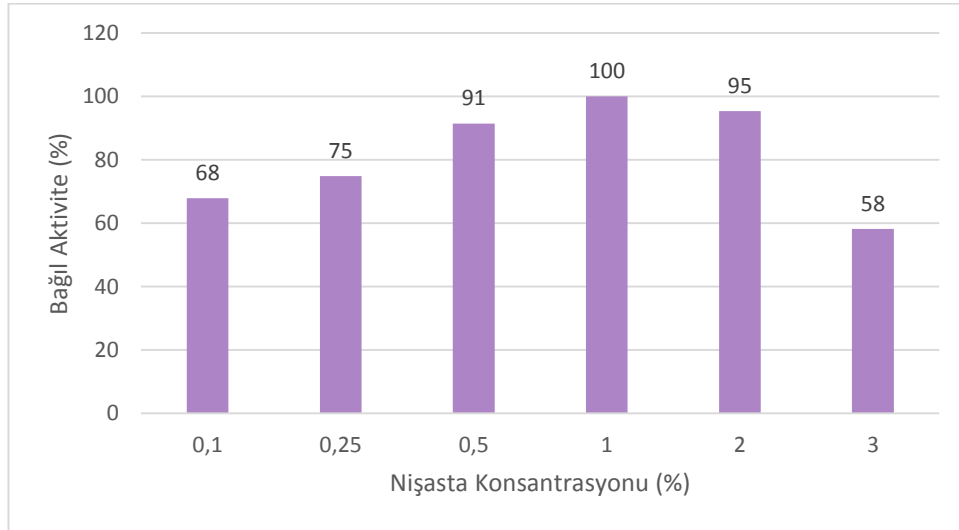
Nişasta (%1 konsantrasyonda) genellikle pullulanazlar için en çok tercih edilen karbon kaynağıdır (Noorwez ve ark., 2006).

Subhash ve ark. (2006), *Bacillus cereus* FDTA-13 suşundan pullulanaz üretimi için en uygun karbon kaynağını belirlemek amacıyla çözünebilir nişasta, patates nişastası, amilopektin, maltodekstrin, pullulan, glikojen, maltoz, glukoz gibi nişasta ve dekstrin çeşitlerini denemiştir. En yüksek pullulanaz aktivitesinin çözünebilir nişasta, en düşük aktivitenin ise glukoz kullanımıyla gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Razack ve ark. (2012), *Bacillus subtilis* kullanarak pullulanaz üretimi için farklı konsantrasyonlardaki farklı karbon kaynaklarını (glukoz, fruktoz, maltoz, laktoz, sükroz) denemişler ve en yüksek aktivitenin %2 konsantrasyondaki sükroz, en düşük aktivitenin ise %10 konsantrasyondaki maltoz kullanımında gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Test edilen karbon kaynakları %1 konsantrasyonda kullanıldığında enzim üretiminde sırasıyla laktoz>sükroz>glukoz>maltoz>fruktozun etkin olduğu bulunmuştur.

4.8. Çözünabilir Nişasta Konsantrasyonunun Üretimde Etkisi

Pullulanaz üretimi için en uygun karbon kaynağı çözünabilir nişasta olarak saptandıktan sonra, nişastanın en uygun konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla; enzim üretim besiyerine %0,1, %0,25, %0,5, %1, %2 ve %3 konsantrasyonlarda çözünabilir nişasta eklenmiş ve enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra, kültür santrifüj edilmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.7'deki grafikte görüldüğü gibi; en yüksek aktivite %1 en düşük aktivite %3 nişasta varlığında görülmüştür.

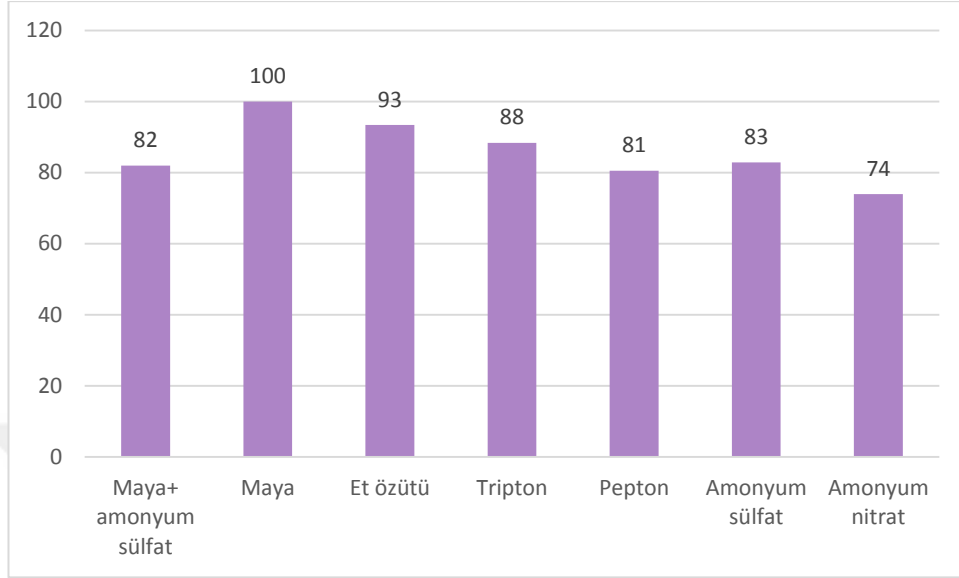


Şekil 4.7. Pullulanaz üretiminde nişasta konsantrasyonunun etkisi

Takasaki (1975), *Bacillus cereus* ile yaptığı çalışmada pullulanaz üretiminde çözünebilir nişasta konsantrasyonunu araştırmış ve en uygun nişasta konsantrasyonunun %1 olduğunu bildirmiştir.

4.9. Azot Kaynaklarının Enzim Üretimine Etkisi

Enzim üretiminde azot kaynağının doğru seçilmesi de son derece önemlidir. Azot kaynaklarının etkisini belirleyebilmek amacıyla, enzim üretim besiyerine %0,5 konsantrasyonda amonyum sülfat, amonyum nitrat, maya, pepton, et özütü ve besiyeri içeriğindeki azot kaynakları (%0,5 maya ile %0,1 amonyum sülfat) eklenerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra kültür santrifüj edilerek, üst fazdan pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.8'deki grafikte görüldüğü gibi tercih edilen azot kaynaklarının etkinlik sırası; maya>et özütü>tripton>amonyum sülfat>maya+amonyum sülfat>pepton>amonyum nitrat olarak belirlenmiştir. Besiyeri içeriğindeki maya ve amonyum sülfat birlikte kullanıldığında aktivite, sadece maya kullanıldığında görülen aktiviteye göre daha düşüktür. Maya, pullulanaz üretimi için en uygun azot kaynağı olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. Pullulanaz üretiminde azot kaynaklarının etkisi

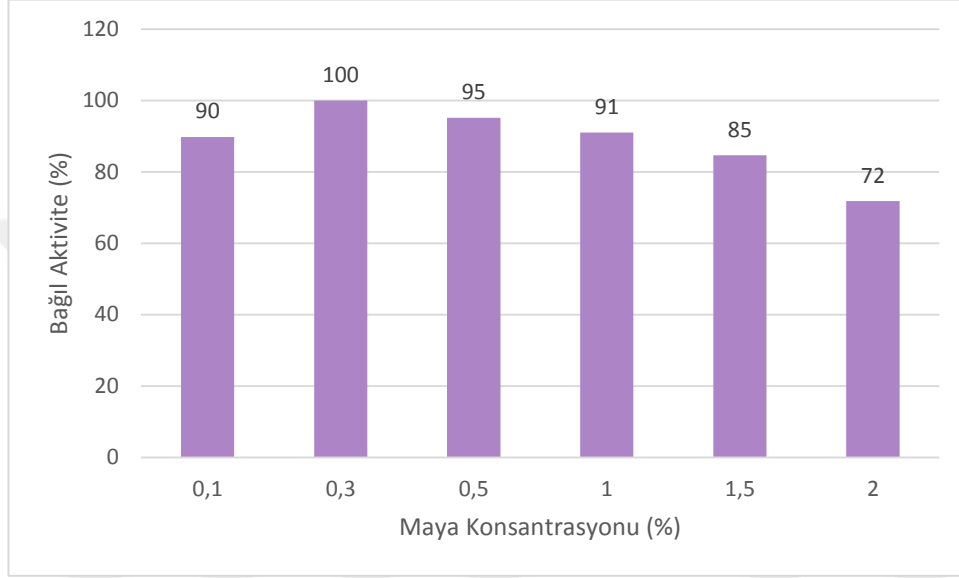
Razack ve ark. (2012), değişen konsantrasyonlardaki farklı azot kaynaklarını incelemişler ve en yüksek aktivitenin %0,5 maya, en düşük aktivitenin ise %0,1 amonyum nitrat kullanıldığında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Nair ve ark. (2006), farklı azot kaynaklarının (maya, pepton, amonyum sülfat, soya unu, amonyum klorür, tripton, maya+tripton) pullulanaz üretimindeki etkinliğini araştırmışlardır. %1 pullulan içeren bazal besiyerinde (pH 6,5), 200 d/dk hızda çalkalayarak, $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de, 4 g/L oranında farklı azot kaynakları kullanarak 48 saat üretim yaptıklarında; en yüksek aktivitenin 24. saatte maya+tripton ve maya ihtiva eden besiyerinde gerçekleştiğini saptamışlardır. 48 saatlik inkübasyon sürecinde en düşük enzim aktivitesi amonyum klorür varlığında görülmüştür.

4.10. Maya Konsantrasyonunun Etkisi

Enzim üretimi için en uygun azot kaynağı maya olarak belirlendikten sonra, enzim üretim besiyerine %0,1, %0,3, %0,5, %1, %1,5, %2 ve %3 konsantrasyonlarda maya eklenmiş ve üst fazdan pullulanaz aktivite tayini

yapılmıştır. Şekil 4.9'daki grafikte görüldüğü gibi; en iyi aktivite %0,3 maya varlığında görülmüştür. Maya konsantrasyonunun enzim üretiminde etkinliği sırasıyla; %0,3>%0,5>%1>%0,1>%1,5>%2 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9. Pullulanaz üretiminde maya konsantrasyonunun etkisi

Razack ve ark. (2012), pullulanaz üretiminde kullanılan farklı maya konsantrasyonlarını karşılaştırdığında %0,5>%0,3>%0,7>%0,1>%0,9>%1,1 olarak bulmuşken; Noorwez ve ark. (2006), ise en yüksek aktivitenin %0,3 konsantrasyonda maya kullanımıyla gerçekleştiğini bildirmiştir.

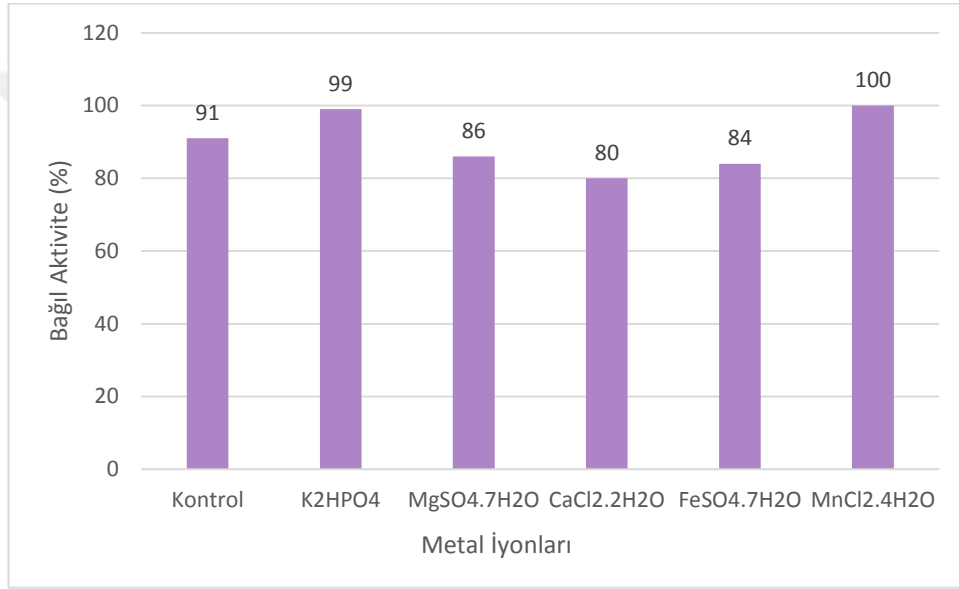
4.11.Bazal Besiyerindeki Metal İyonlarının Etkisi

Pullulanaz üretiminde kullanılan bazal besiyeri $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tuzlarını ihtiva etmektedir. Bu çalışmada bazal besiyeri kontrol olarak kullanılmış ve her metal iyonu ayrı ayrı %0,1 konsantrasyonda, çözünebilir nişasta (%1) ve mayadan (%0,3) oluşan besiyerine eklenerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra

kültür santrifüj edilerek üst fazdan aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.10'daki grafikte görüldüğü üzere; bazal besiyeri içeriğindeki metal iyonlarından $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ diğer metallere göre daha etkili bulunmuştur. Bazal besiyeri içeriğindeki metal iyonlarının etkinliği sırasıyla;

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} > \text{K}_2\text{HPO}_4 > \text{Kontrol} > \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

şeklindedir.



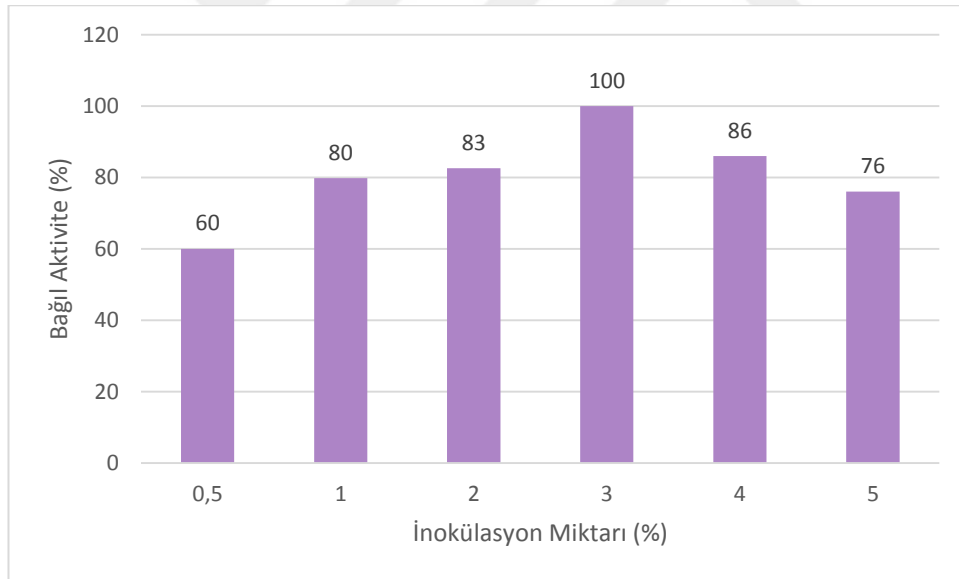
Şekil 4.10. Bazal besiyeri bileşimindeki metal iyonlarının etkisi

Takasaki (1975), pullulanaz üretiminde metal iyonlarının etkisini incelemek için yaptığı çalışmada en yüksek verimin MnSO_4 , ortalama verimin FeSO_4 , en az verimin ise ZnSO_4 varlığında gerçekleştiğini; Nair ve ark. (2006), en yüksek verimin K_2HPO_4 , en düşük verimin FeSO_4 kullanımıyla elde edildiğini bildirmişlerdir.

4.12. Enzim Üretiminde İnokülasyon Miktarının Etkisi

Gerek laboratuvar koşullarında küçük ölçekli üretimler, gerekse endüstriyel koşullarda orta ve büyük ölçekli üretimlerde ön kültür hazırladıktan sonra, üretim besiyerine hücre aktarılması noktasında verimin en yüksek olması bakımından inokülasyon miktarı en önemli parametredir.

Daha önce belirlenen, üretim koşulları için optimum şartların sağlandığı enzim üretim besiyeri hazırlanmış ve 18 saatlik taze bakteri kültüründen ($O.D_{600}=0,5$) %0,5, %1, %2, %3, %4 ve %5 oranlarında aşılama yapılmıştır. Kültür santrifüj edildikten sonra, üst fazdan yapılan pullulanaz aktivite tayini sonuçları Şekil 4.11’de grafiklendirilmiştir. En yüksek aktivite %3, en düşük aktivite %0,5 inokülasyon miktarında gözlenmiştir. İnokülasyon miktarının etkisi sırasıyla; %3>%4>%2>%1>%5>%0,5 şeklindedir.



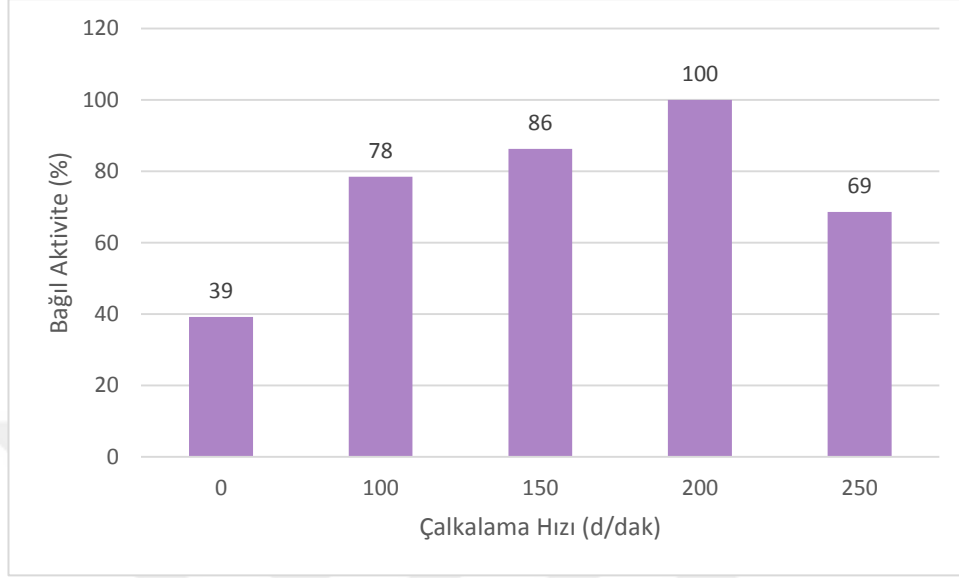
Şekil 4.11. Pullulanaz üretiminde inokülasyon miktarının etkisi

Khalaf ve Aldeen (2013), *B. licheniformis* (BS18) suşuyla çalışmışlar ve pullulanaz üretimindeki optimum aşılama miktarını araştırmışlardır. %2

konsantrasyondaki aşılama ile en yüksek pullulanaz aktivitesine ulaşmışlardır. %2'den düşük aşılama yapıldığında düşük enzim üretiminin nedenini, substratı kullanabilmek için enzim üretme besiyerindeki canlı hücre sayısının optimum sayıya ulaşabilmek için daha fazla zamana ihtiyaç duyması; %2'den yüksek aşılama yapıldığında daha az enzim üretilmesinin nedeninin ise büyük oranda toksik metabolit oluşumu veya hücre sayısının fazla olmasına rağmen besin öğelerinin yetersiz kalması olabileceğini belirtmişlerdir.

4.13. Çalkalama Hızının Etkisi

Oksijenin ve besiyeri içeriğinin homojen dağılımı, çalkalama hızıyla belirlenir. Düşük çalkalama hızı, mikroorganizma ile substratın temas edememesine, yüksek çalkalama hızı ise mikroorganizmaların fizyolojik yapılarının bozulmasına neden olabilmektedir. Pullulanaz üretimi için en uygun çalkalama hızının belirlenmesi için optimum koşullarda enzim üretim besiyeri hazırlanıp %3 oranında aşılama yapılarak 30°C sıcaklıkta 0 (durgun), 100, 150, 200 ve 250 d/dk'daki çalkalamalı inkübatörlerde 24 saat inkübe edilmiştir. Üst faz kullanılarak yapılan pullulanaz aktivite tayini sonucunda Şekil 4.12'deki grafikte görüldüğü gibi en yüksek aktiviteye 200 d/dk'da ulaşılmıştır. Durgun fazda (0°) aktivite büyük oranda düşüktür. Kıyaslama yapıldığında çalkalama hızının etkinliği sırasıyla; 200>150>100>250>0 d/dk şeklindedir.

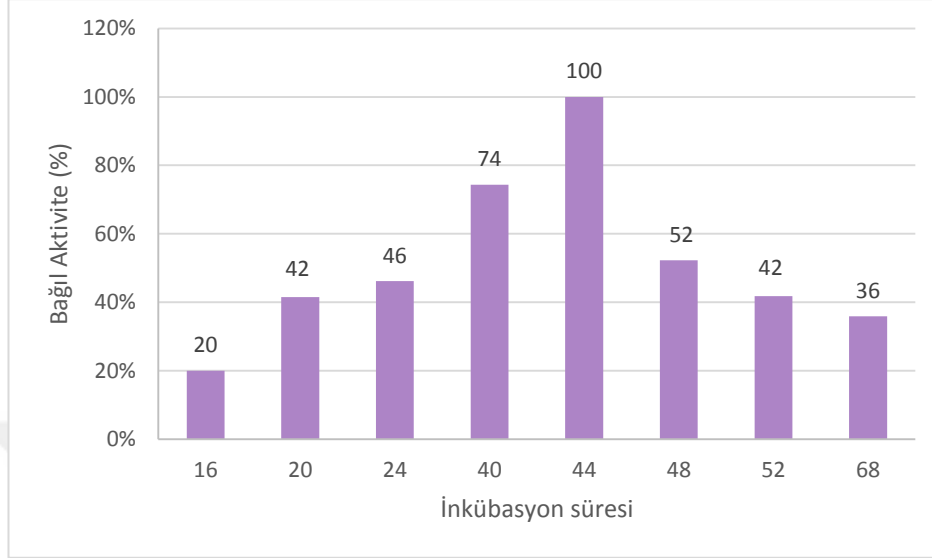


Şekil 4.12. Pullulanaz üretiminde çalkalama hızının etkisi

Noorweez ve ark. (2006), *Geobacillus thermoleovorans* kullanarak elde ettikleri amilopullulanaz üretimi için 100-250 d/dk arası çalkalama hızının etkisini incelemişler ve optimum hızı 200 d/dk olarak belirlemişlerdir.

4.14. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Gerek doğal ortamlardan izole edilen gerekse rekombinant mikroorganizmalar endüstriyel enzimlerin, hormonların ve birçok biyolojik materyalin üretiminde çığır açmıştır. Özellikle doğal izolatlardan endüstriyel boyutlarda enzim üretmek için öncelikle üretim koşullarının optimizasyonu kaçınılmazdır. Bu araştırmada; söz konusu enzimin (DSHK107^T, pullulanaz) sıcaklık, pH, inokülasyon miktarı, azot ve karbon kaynakları vb. koşullar optimize edildikten sonra üretim için en uygun zamanın belirlenmesi, enerji tasarrufu ve maksimum enzim verimi açısından mutlak belirlenmesi gereken bir parametredir.



Şekil 4.13. Pullulanaz üretiminde inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon süresinin etkisini belirlemek için, optimum koşullarda hazırlanan besiyerinde enzim üretimi devam ederken belirli zaman dilimlerinde standart enzim aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.13'te görüldüğü gibi en yüksek enzim aktivitesine 44. saatte ulaşılmıştır.

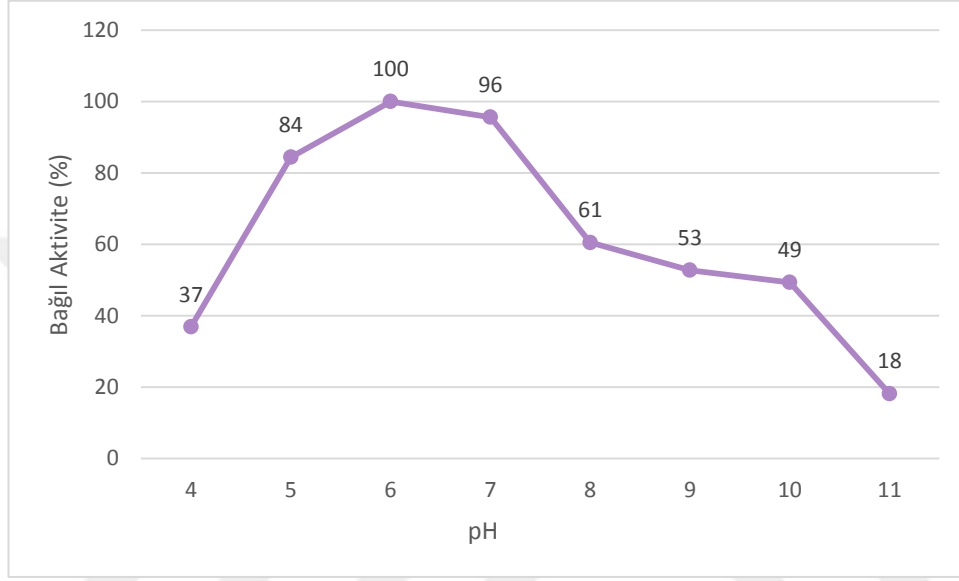
ENZİM KARAKTERİZASYONU

4.15. pH'nın Pullulanaz Aktivitesi ve Kararlılık Üzerine Etkisi

pH'nın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisini saptamak amacıyla, pH 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 ve 11,0'de %1 pullulan ile hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak standart pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.14'teki grafikte görüldüğü gibi, enzim pH 6,0'da en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

pH 5,0'te %84, pH 7,0'de ise %96 aktivite göstermektedir. pH 7,0'den sonra aktivite kaybetmeye başlayarak pH 11,0'de %82'lik aktivite kaybına

ulaşmıştır. Enzimin pH 5,0-7,0 aralığında ortalama %87 aktiviteye sahip olması asidik ortamda çalışılmaya elverişli olduğunu göstermiştir.



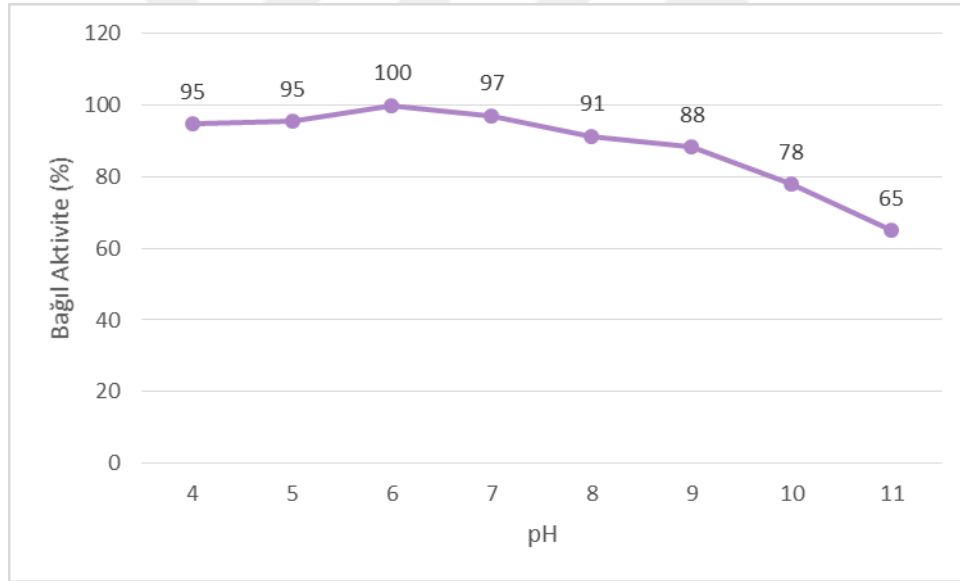
Şekil 4.14. pH'nın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi

Pujada ve ark. (2001), *Thermococcus hydrothermalis*'ten saflaştırdıkları pullulanazın optimum pH'sını 5,75; Roy ve ark. (2003), *Bacillus* sp'den izole ettikleri tip 2 pullulanazinkini 5,0; Vishnu ve ark. (2005), *Lactobacillus amylophilus*'tan elde ettikleri amilopullulanazın optimum pH'sını 6,5; Rajaei ve ark. (2015), *Exiguobacterium* sp.'den elde ettikleri tip 1 pullulanazın optimum pH'sını 8,5 olarak belirlemişlerdir.

Guan ve ark. (2013), *Thermococcus kodakarensis*'ten izole ettikleri amilopullulanazın optimum pH'sını, aktivite tayininde substrat olarak pullulan kullandıklarında 5,5; nişasta kullandıklarında ise 5,0 olarak bulmuşlar ve pH 4,0-7,0 aralığında %50'den fazla aktivite gösteriyorken pH 7,0'de ciddi bir aktivite düşüşü olduğunu belirtmişlerdir.

pH'nın kararlılık üzerindeki etkisini saptamak amacıyla enzim 4,0-11,0 aralığındaki pH'larda hazırlanmış tamponlarla karıştırılarak, 2 saat optimum sıcaklıkta ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben standart aktivite tayini yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.15'te grafiklendirilmiştir.

Enzimin pH kararlılığını saptayabilmek amacıyla, optimum pH olan 6,0'da normal enzim aktivitesi bakılarak, elde edilen absorbans 100 kabul edilmiştir. Seçilen pH'larda enzim ön inkübasyona bırakıldıktan sonra, optimum pH'da standart aktivite tayini yapılarak kontrol ile kıyaslanmıştır. pH 4,0-7,0 arasında ortalama %96,75 aktivite kalmış olması enzimin geniş bir pH aralığında kararlılığını koruduğunu göstermektedir. Kontrole göre; pH 8,0'de %91, pH 9,0'da %88, pH 10,0'da %78, pH 11,0'de ise %65 aktivite kaybı görülmüştür.



Şekil 4.15. pH'nın pullulanaz kararlılığı üzerine etkisi

Şekil 4.15'te görüldüğü gibi bu araştırmada izole edilen pullulanaz pH 4,0-8,0 aralığındaki proseslerde kullanım için önerilebilir. Enzimin geniş bir pH aralığında yüksek aktivite göstermesi endüstriyel kullanımlar için son derece

önemlidir. Çünkü, enzim kullanımı sırasında, proseste istenmeyen pH değişiklikleri söz konusu olabilir. Bu durumlarda enzim aktivite kaybetmeden katalizleme yetisini sürdürebilecektir.

Rüdiger ve ark. (1994) tarafından hipertermofilik arkea *Pyrococcus woesei*'den izole edilen pullulanazda, pH 5,5-8,0 aralığında kalan aktivitenin %70'den fazla kalmış olması, enzimin geniş bir pH aralığında çalışılmaya elverişli olduğunu göstermiştir. Optimum pH ise 6,0 olarak bulunmuştur.

Samah ve ark. (2005), *Bacillus flavothermus*'tan elde ettikleri pullulanazın optimum pH'sını 10,0, kararlı olduğu aralığı ise pH 7,0-10,0 olarak belirlemişler ve alkali pH'larda maksimum aktivite gösteren pullulanazların çamaşır ve bulaşık deterjanı için etkili bir katkı maddesi olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Jiao ve ark. (2010), *Thermococcus siculi*'den elde ettikleri rekombinant amilopullulanazın optimum pH'sının 6,0 olduğunu belirtmişlerdir. Enzimi, pH 5,0-6,5 aralığında optimum sıcaklıkta 4 saat beklettiklerinde ise %50'nin üzerinde kalan aktiviteye sahip olduğu, kararlı olduğu maksimum pH'nın 6,5'te görüldüğü ve 4 saat sonunda pH 6,5'te %90'ın üzerinde bağlı aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Wu ve ark. (2013), *Thermus thermophilus*'tan izole ettikleri pullulanazın optimum pH'sını 6,5 bulmuşlardır. 6,0-8,0 pH aralığında enzimin en iyi kararlılığa sahip olduğunu, pH 8,0'den sonra aktivitede hızlı bir düşüş görüldüğünü rapor etmişlerdir.

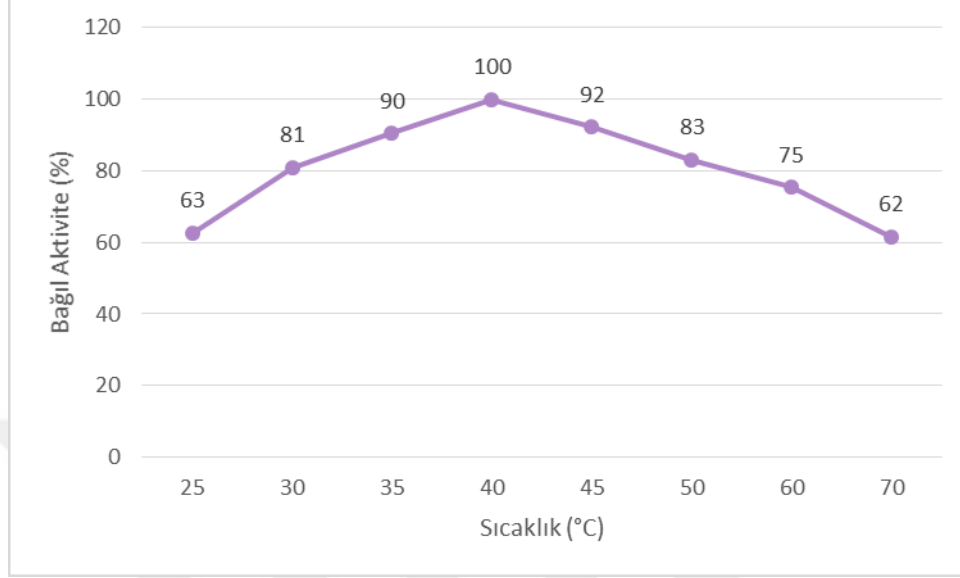
Qiao ve ark. (2014), *Exiguobacterium acetylicum*'dan izole ettikleri tip 1 pullulanazın pH 5,0-9,0 aralığında aktivite gösterdiğini ve optimum pH'nın 6,0 olduğunu belirtmişlerdir. Enzim, optimum sıcaklığında pH 5,0-8,0 aralığında maksimum aktivitesinin %70'ini korumuştur. Taranan literatürlerde pullulanazın pH kararlılığı genelde dar aralıklarda görülmüşken, bu araştırmada izole edilen pullulanaz pH 4,0-10,0 aralığında %93'ün üzerindeki kalan aktivitesiyle önemli bir farklılık göstermektedir.

Orhan ve ark. (2014), *Hypocrea jerocina* mantarından ürettikleri ve saflaştırdıkları pullulanazın optimum pH'sını belirlemek için üç farklı substrat kullanmışlardır. Substrat olarak nişasta kullanıldığında optimum pH'nın 5,0; amilopektin ve pullulan kullanıldığında ise 6,5 olduğunu belirtmişlerdir.

Farklı bakteriyel pullulanazların optimum pH'larının genellikle 4,5-6,5 arasında olduğu, bu farklılığın da kullanılan substrat ve enzim kaynağından kaynaklandığı görülmüştür (Orhan ve ark., 2014). Pullulanazların çoğu asidik pH aralığında kararlıyken alkali pH'larda aktivitelerini kaybetmektedirler (Qiao ve ark., 2014). Bu araştırmada izole edilen enzim, alkali pH'larda da kullanılmaya uygun olması bakımından önemlidir.

4.16. Sıcaklığın Pullulanaz Aktivitesi ve Kararlılık Üzerine Etkisi

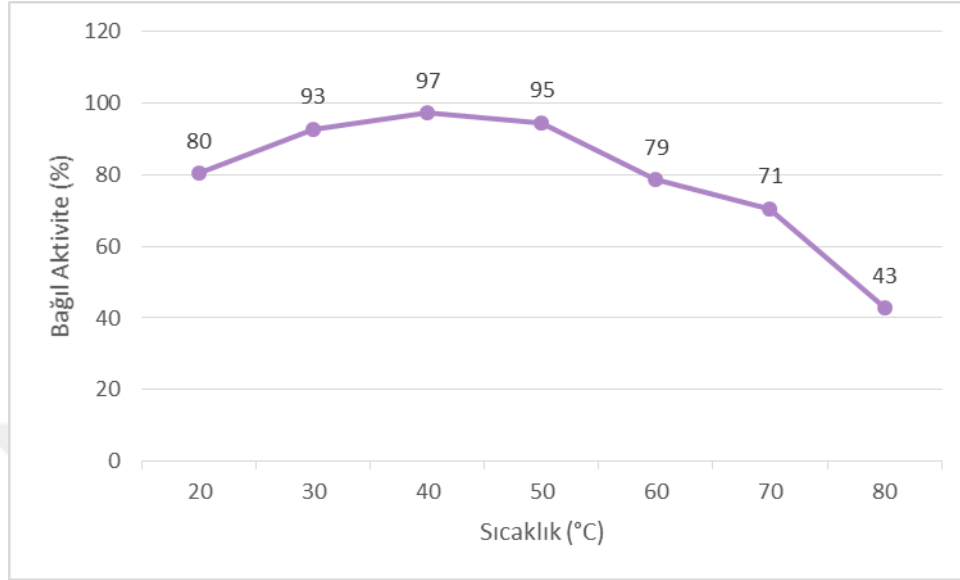
Sıcaklığın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisini saptamak amacıyla enzim ve substrat karışımı 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 ve 70°C sıcaklıklarda inkübe edildikten sonra standart pullulanaz aktivite tayini yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.16'daki grafikte gösterilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığı 40°C saptanmış olmasına rağmen 35°C'de %90, 45°C'de ise %92 aktivite göstermektedir.



Şekil 4.16. Sıcaklığın pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi

Sıcaklığın pullulanaz kararlılığı üzerindeki etkisini saptamak amacıyla enzim 20, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C’de 2 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra optimum pH ve sıcaklıkta standart aktivite tayini yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.16’daki grafikte gösterilmiştir.

Kontrol olarak oda sıcaklığındaki enzim ile, 40°C’de (optimum sıcaklık) ve pH 6,0’da standart aktivite tayini yapılmış ve absorbans 100 kabul edilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında; enzim aktivitesi %97 olarak gözlenmiştir. 30°C-50°C aralığında ortalama %95 aktiviteyle yüksek oranda kararlılık sağlandığı belirlenmiştir. En az kararlılığın sağlandığı 80°C’de ise %57 aktivite kaybı görülmüştür.



Şekil 4.17. Sıcaklığın Kararlılık Üzerine Etkisi

Ara ve ark. (1995), alkalofilik *Bacillus sp.*'den izole ettikleri alkali amilopullulanazın optimum aktivitesinin 50°C saptandığını bildirmişlerdir. Ayrıca pullulanaz 30 dakika inkübasyondan sonra optimum pH'da 50°C'ye kadar tamamen kararlı iken, 50°C'nin üzerine çıktığında hızlı bir şekilde aktivitenin düştüğü ve 60°C'de kalan aktivitenin %20'den daha da az olduğu görülmüştür.

Ling ve ark. (2009), *Bacillus cereus* H1.5 suşundan elde ettikleri pullulanazın optimum sıcaklığını 55°C bulmuşlar; 30 dakika inkübasyondan sonra enzimin 40°C'ye kadar kararlı kaldığı, 50°C'den sonra hızla düştüğü ve 60°C'de aktivitesinin tamamını kaybettiğini belirlemişlerdir. Aynı işlemi Ca^{+2} varlığında tekrarladıklarında aktivitenin 50°C'ye kadar kararlı kaldığı ve 60°C'nin üzerinde aktivitesinin yaklaşık %30'unu kaybettiğini gözlemişlerdir.

Soma ve ark. (2011), termofilik ve anaerobik *Clostridium thermosulfurogenes* SVM17 suşundan izole ettikleri pullulanazın optimum sıcaklığını 70°C olarak belirlemişler ve pullulanazın 70°C'de 2 saat boyunca

kararlı kaldığını, 80°C ve 90°C’de 2 saatten sonra kalan aktivitenin sırasıyla %84 ve %82; 100°C’de inkübe edildiğinde ise %65 olduğunu bulmuşlardır.

Wei ve ark. (2014), *Bacillus cereus*’tan ekspresyonla elde ettikleri rekombinant pullulanazın optimum sıcaklığını 40°C bulmuşlardır. 60 dakikalık inkübasyondan sonra 20°C-40°C arasında aktivitesinin %80’den fazlasını korumuş ve en yüksek kararlılığa 35°C’de ulaşmıştır. 50°C’nin üzerinde ise pullulanaz aktivitesi çok azalmış; 70°C’de büyük oranda inaktif olmuştur.

Orhan ve ark. (2014), fungus *Hypocrea jecorina* kullanarak ürettikleri pullulanazın, farklı substratlar kullanarak optimum sıcaklığını araştırmışlardır. Substrat olarak pullulan kullanıldığında optimum sıcaklık 45°C, amilopektin kullanıldığında 65°C, nişasta kullanıldığında 45°C olarak bulunmuştur. Sıcaklığın kararlılığa olan etkisi incelendiğinde ise, enzimin 30 dakikalık inkübasyonda 40°C-70°C arasında kararlı olduğu; kalan aktivitenin 30°C ve 20°C’de sırasıyla %84 ve %75 olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, aynı inkübasyon süresinde, 10°C ve 80°C’de enzim aktivitesinin yaklaşık %33’ünü, 90°C ve 100°C’de ise %43’ünü kaybetmiştir.

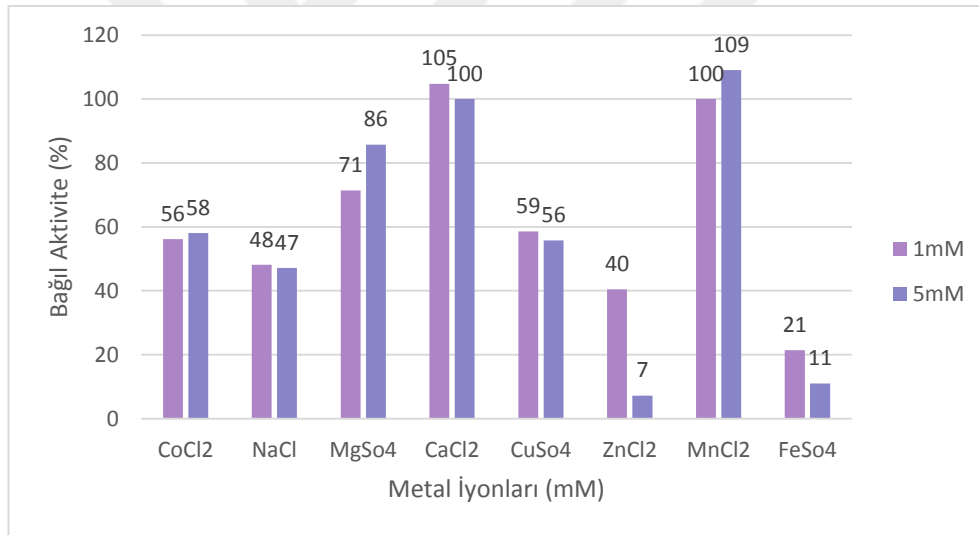
Elleuche ve ark. (2015), *Shewanella arctica*’dan ürettikleri rekombinant pullulanazın optimum sıcaklığını 35°C bulmuşlar; enzimin 40°C’de 30 dakika inkübasyondan sonra aktivitesinin tamamen kaybolduğunu, 20°C’de ise 6 saat boyunca kararlı kaldığını belirlemişlerdir.

Qiao ve ark. (2015), *Exiguobacterium acetylicum*’dan elde ettikleri pullulanazla yaptıkları çalışmada, pullulanazın optimum sıcaklığını 50°C bulmuşlardır. Sıcaklıktaki kararlılığı test ettiklerinde; enzimin 50°C’ye kadar aktivite kaybetmediğini, 50°C-70°C arasında hızlı şekilde bir aktivite kaybı göstererek 90°C’de aktivitesinin %80’ini kaybettiğini gözlemlemişlerdir.

4.17. Metal İyonlarının Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Metal iyonlarının pullulanaz aktivitesi üzerine etkisini saptamak amacıyla enzim preparasyonuna son konsantrasyon 1 ve 5 mM olacak şekilde Co^{+2} , Na^+ ,

Mg^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} ve Fe^{+2} iyonları eklenmiş, standart pullulanaz aktivite tayini yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.17'deki grafikte gösterilmiştir. 5 mM Ca^{+2} ve 1 mM Mn^{+2} 'ın enzim aktivitesi üzerine herhangi bir etkisi olmamıştır. 1 mM Ca^{+2} ve 5 mM Mn^{+2} varlığında ise enzim aktivitesinin sırasıyla %105 ve %109 olduğu görülmüştür. Çalışmada kullanılan diğer iyonlar enzim aktivitesini inhibe etmişlerdir. 5 mM Zn^{+2} ve Fe^{+2} 'nin her iki konsantrasyonunda da enzim güçlü bir şekilde inhibe olmuştur. 5 mM Zn^{+2} varlığında %93 ve 5 mM Fe^{+2} varlığında %89 aktivite kaybı görülmüştür. Sırasıyla 1 mM ve 5 mM Co^{+2} kullanıldığında enzim %56 ve %58; Na^{+} 'da %48 ve %47; Mg^{+2} 'da %71 ve %86; Cu^{+2} 'da %59 ve %56 aktivite göstermiştir.

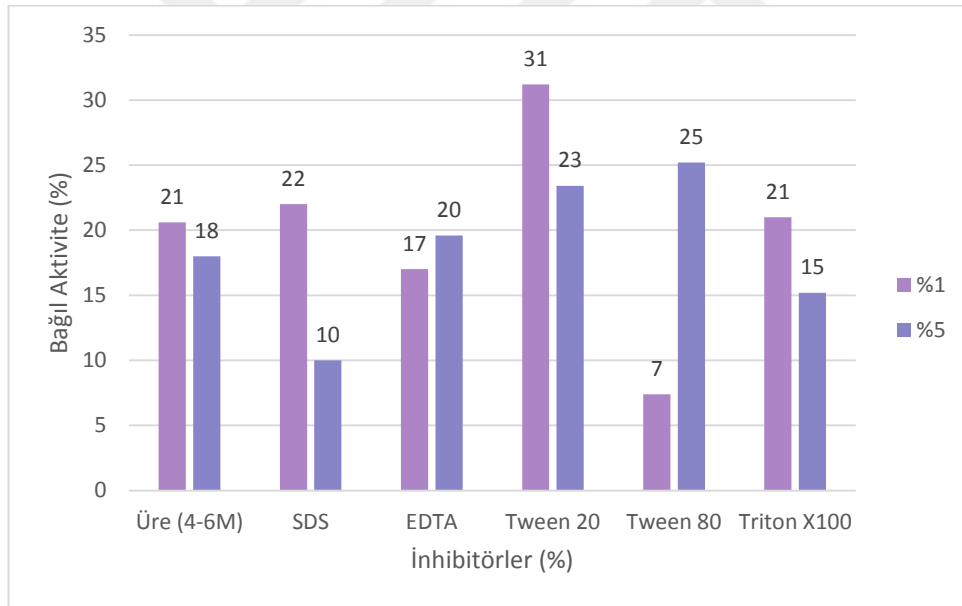


Şekil 4.18. Metal İyonlarının Pullulanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

4.18. Diğer Kimyasalların Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

SDS, EDTA, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 ve ürenin enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla son konsantrasyon; üre için 4-6 mM, diğer kimyasallar için %1-5 olacak şekilde enzim karışımına eklenmiş ve standart pullulanaz aktivite tayini yapılmıştır. Kontrol için enzime hiçbir kimyasal

eklenmeden aktivite bakılmış ve okunan absorbans 100 kabul edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.18'deki grafikte gösterilmiştir. %1 Tween 80 ve %5 SDS kullanıldığında kalan enzim aktiviteleri sırasıyla %7, %10 olarak belirlenmiş ve önemli düzeyde aktivite kaybı gözlenmiştir. 4 M ve 6 M üre kullanıldığında kalan enzim aktivitesi sırasıyla %21 ve %18 olarak belirlenmiş, üre, konsantrasyon artışına bağlı olarak aktiviteyi olumsuz yönde etkilemiştir. %1 ve %5 EDTA kullanıldığında enzim aktivitesi sırasıyla %17-%20; Tween 20'de %31-%23; Tween 80'de %7-%25; Triton X-100'de ise %21-%15 olarak belirlenmiştir. Test edilen tüm kimyasallar pullulanolitik aktiviteyi önemli ölçüde inhibe etmiştir. Bu araştırmada üretilen enzimin test edilen kimyasalların bulunacağı proseslerde kullanılması uygun olmayacaktır.



Şekil 4.19. Diğer kimyasalların pullulanaz aktivitesi üzerine etkisi

Rüdiger ve ark. (1995), ürettikleri *Pyrococcus woesei* pullulanazına 1, 3 ve 5 mM konsantrasyonlardaki çeşitli metal iyonlarının etkisini araştırmışlardır. 3 mM Ca^{+2} %270 düzeyinde aktivite artışına neden olmuştur. 1 mM Mn^{+2} %26, 1 mM

Mg⁺² %28 ve 1 mM Co⁺² %35 aktivite artışı sağlarken; Ni⁺², Zn⁺², Cu⁺², Fe⁺² ve Cr⁺² iyonları enzimi güçlü bir şekilde inhibe etmişlerdir. Enzimi 5 mM SDS ve 6 M üreyle inkübe ettiklerinde sırasıyla %87 ve %50 aktivite düşüşü görülürken %1 Triton X-100 kullanıldığında %202 aktivite görülmüştür.

Duffner ve ark. (2000), *Desulfurococcus mucosus*'tan rekombinant olarak elde ettikleri pullulanazda metal iyonlarının etkisini araştırmışlar, Zn⁺², Fe⁺², Cu⁺² kullanıldığında sırasıyla %51, %60 ve %0 aktivite görmüşken Ca⁺² ve Mn⁺²'nin pullulanaza herhangi bir etkisi olmadığını saptamışlardır. %1 Triton X-100'ün enzime herhangi bir etkisi olmazken 1 mM SDS enzimi tamamen inhibe etmiştir. 4 mM ve 6 mM üre varlığında sırasıyla %81 ve %63 aktivite kaldığını bildirmişlerdir.

Kunamneni ve ark. (2006), *Bacillus* sp. pullulanazı ile yaptıkları çalışmada, Ca⁺² ve Mn⁺² enzimin aktivitesini artırmış; Fe⁺², Mg⁺², Ba²⁺, K⁺, Na⁺ ve Zn⁺² ve EDTA aktiviteyi etkilememiştir. Cu⁺² %30 aktivite kaybına neden olurken, Hg⁺² enzimi tamamen inhibe etmiştir.

Ghollasi ve ark. (2008), *Bacillus* sp. pullulanazına %2 ve %5 konsantrasyonlardaki metal iyonlarıyla muamele etmişlerdir. 2 mM ve 5 mM Co⁺² varlığında sırasıyla %120-%126; Ni⁺² kullanıldığında %68-%60; Mn⁺² kullanıldığında %137-%109; Ba⁺² kullanıldığında %106-%79; Cu⁺² kullanıldığında %111-%5, Ca⁺² kullanıldığında %115-%112; Mg⁺² kullanıldığında ise %113-%110 aktivite göstermiştir.

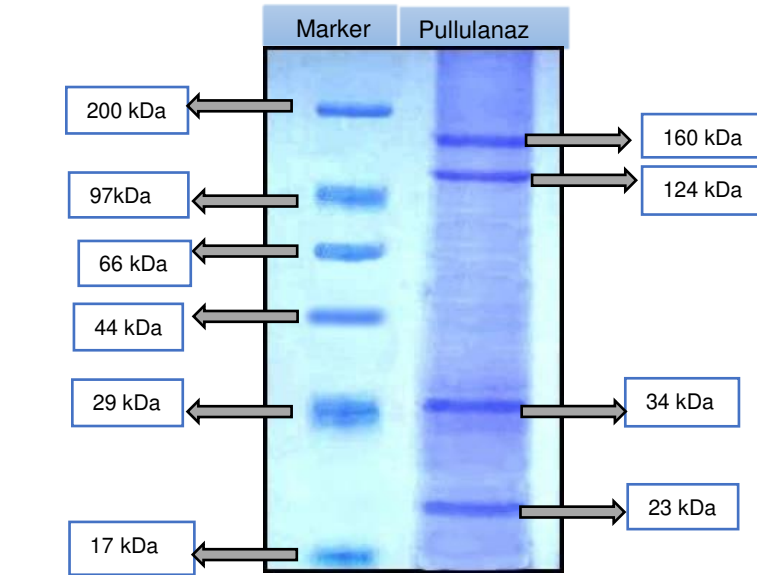
Guan ve ark. (2013) tarafından *Thermococcus kodakarensis*'ten üretilen pullulanaz üzerinde 5 mM Ca⁺², Mg⁺² ve Ba⁺²'nin herhangi bir etkisi olmamıştır. Mn⁺², Ni⁺² ve Co⁺² varlığında yaklaşık %60 oranında aktivite kaybı gözlenirken Zn⁺², Cu⁺² ve Fe⁺² ve EDTA enzimi tamamen inhibe etmiştir. 3 M ve 6 M üre varlığında sırasıyla %30 ve %38 aktivite kaybı; %2, %4, %6, %8 SDS varlığında sırasıyla %34, %45, %54 ve %61; Tween-20 varlığında %34, %0, %62 ve %63; Triton X-100 varlığında %59, %62, %64 ve %70 aktivite kaybı görülmüştür.

Qiao ve ark. (2015) tarafından *Exiguobacterium acetylicum*'den elde ettikleri pullulanazda, 5 mM Co^{+2} , Fe^{+2} ve Mn^{+2} varlığında sırasıyla %98, %21 ve %35 aktivite artışı görülürken, Na^{+2} , Ca^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , K^{+} aktiviteyi etkilememiş; Tris ve Mg^{+2} ise yaklaşık %10 inhibisyon sağlamıştır. Cu^{+2} , SDS, EDTA ve β -merkaptoetanol varlığında %30'un üzerinde aktivite kaybı görülmüştür.

4.19. SDS-PAGE Analizine Ait Bulgular

Fontibacillus pullulanilyticus DSHK107^T suşundan üretilen ve Et-OH presipitasyonu ile kısmi saflaştırılmış pullulanaz enzimi %12'lik SDS-PAGE jelinde analiz edilmiştir ve boyama sonrası jelde 4 adet bant gözlenmiş ve bu protein bantlarının moleküler ağırlıkları yaklaşık olarak 160, 124, 34, 23 kDa olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.19).

Protein bantlarının moleküler ağırlıklarının saptanmasında kullanılan standart marker protein olarak Broad Range Markers (sc-2361- 500 UL 200 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 44 kDa, 29 kDa, 17 kDa, 14 kDa, 6 kDa) kullanılmıştır.



Şekil 4.20. Pullulanazın SDS-PAGE sonucu

Roy ve ark. (2003), *Bacillus* sp.'den izole ettikleri pullulanazın moleküler ağırlığını 95 kDa; Ling ve ark. (2009), *Bacillus cereus*'tan ürettikleri pullulanazın moleküler ağırlığını 93 kDa; Zareian ve ark., (2010) *Geobacillus stearothermophilus*'tan saflaştırdıkları pullulanazını yaklaşık olarak 100 kDa; Kunamneni ve ark. (2006), *Bacillus* sp.'den izole ettikleri pullulanazını 106 kDa; Vishnu ve ark. (2006), *Lactobacillus amylophilus* pullulanazını 90 kDa; Malakar ve ark. (2012), streptokok pullulanazını 98 kDa; Orhan ve ark. (2014), *Hypocrea jecorina*'dan elde ettikleri pullulanazını 130,56 kDa; Rajaei ve ark. (2015), *Exiguobacterium* sp.'den saflaştırdıkları pullulanazını 110 kDa; Shehata ve ark. (2016), beyaz mantarlardan elde ettikleri pullulanazını 112 kDa ve Lu ve ark. (2018), *Bacillus pseudofirmus*'tan izole ettikleri pullulanazın moleküler ağırlığını yaklaşık 87 kDa olarak saptamışlardır.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; gıda endüstrisinde nişastanın sakkarifikasyonu, maltoz ve fruktoz şurubu üretimi, fırıncılık, siklodekstrin üretimi ve deterjan üretiminde katkı maddesi olarak kullanılan pullulanaz, doğal izolat olan *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T suşundan üretilerek enzimin karakterizasyonu yapılmıştır.

5.1. Sonuçlar

5.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Tanınması

Çukurova üniversitesi kampüs toprağı, çimlenmiş buğday, çürütülmüş patates ile hazırlanan ortamdan gram pozitif, sporlu bakteriler izole edilerek, mikroskopik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerine göre *Bacillus* sp. olarak tanımlanan 110 bakteri suşu nişastalı agar ve pullulanlı agarda test edilmiştir. Nişastalı agarda en yüksek aktivite gösteren 19 suş pullulanolitik aktivite bakımından test edilmiş ve 14 suşun pullulanı hidroliz ettiği saptanmıştır. DSHK55, DSHK65 ve DSHK107 en yüksek pullulanolitik aktivite göstermiş, pullulanaz üretimi için DSHK107 (DS: Damla Sihay, HK: Hatice Korkmaz) tercih edilmiştir.

DSHK107 izolatının; gram negatif, hareketli, oksidaz ve katalaz pozitif, çubuk şeklinde, 20°C-42°C'de (optimum sıcaklık: 30°C) ve pH 6,0-9,0'da (optimum pH: 7,0) üreme, 16S rRNA ve yağ asiti analizlerine göre *Fontibacillus* cinsine ait yeni bir tür olduğu saptanmıştır. Bu yeni izolat -Tip tür (type tür)- tarafımızca *pullulanilyticus* olarak isimlendirilmiş ve filogenetik ağaçta *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T olarak yerini almıştır (GenBank/EMBL/DDBJ 16S rRNA gen sekansı için kayıt numarası, suş: *Fontibacillus pullulanilyticus* DSHK107^T (=NCCB100560^T=DSM 100116^T) KP899807). *Fontibacillus*'un yeni bir türü olan bu doğal izolat; *Journal of Basic*

Microbiology dergisinde “*Fontibacillus pullulanilyticus* sp.nov. isolated from soil” isimli makale olarak yayımlanmıştır (2016, 56:857-863).

Bu araştırmada kullanılan bakterinin yeni bir tür olarak tanımlanmış olması bu çalışmanın en önemli sonuçlarından biridir.

Enzimin üretilmesi ve karakterizasyonundan önce üretim koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.1.2. Enzim Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Sıvı besiyerinde enzim üretimine pH ve sıcaklığın etkisi araştırılmış, optimum üretimin pH 8,0’de, 30°C’de gerçekleştiği saptanmıştır.

Karbon kaynakları ve konsantrasyonlarının etkinliği test edilmiş; %1 çözünebilir nişastanın enzim üretiminde en etkili olduğu belirlenmiştir.

Organik ve inorganik azot kaynaklarının enzim üretimine etkisi araştırılmış ve mayanın en iyi azot kaynağı olduğu belirlenmiştir. Mayanın konsantrasyonunun etkinliği test edildiğinde %0,3’lük konsantrasyonun en başarılı olduğu saptanmıştır.

Temel besiyerine ilave edilen tuzların %0,1’lik konsantrasyonlarının enzim üretimine etkinliği test edildiğinde $MnCl_2$ ve K_2HPO_4 ’ün en etkili tuzlar olduğu ortaya konmuştur.

Bakteri miktarı (inokülüm miktarı) ile ilgili denemelerde, besiyerine %3 (O.D.₆₀₀=0,5) taze kültür aşılandığında en yüksek enzim verimi sağlanmıştır.

Enzim üretiminde çalkalama hızının etkinliği test edilmiş ve 200 d/dk çalkalama hızının en iyi sonuç verdiği görülmüştür.

İnkübasyon için en uygun sürenin 44 saat olduğu saptanmıştır.

5.1.3. Enzimin Karakterizasyonu

DSHK107^T *Fontibacillus pullulanilyticus* sp.nov suşu bu çalışmada enzim üreticisi olarak kullanılmış ve endüstriyel kullanıma önerilmek üzere enzimin en yüksek aktivite göstereceği koşullar belirlenmiştir.

Enzim aktivitesi ve kararlılığı üzerine pH'nın etkisi araştırılmış ve pH 6,0'da en yüksek aktivite saptanırken, pH 4,0-8,0 aralığında enzimin kararlılığını koruduğu bulunmuştur.

Sıcaklığın enzim aktivitesi ve kararlılığına etkisi test edilmiş, optimum sıcaklık 40°C olmasına rağmen 35°C, 45°C'lerde %90 üzerinde aktivite saptanmıştır. Enzim endüstriyel üretimlerde veya süreçlerde 35-45°C aralıklarda yüksek verimlilikte kullanılabilecek özelliktedir. Ayrıca 30°C ve 50°C'lerde 30 dakika bekletildiğinde kararlılığını %90'ın üzerinde korumuştur.

Metal iyonları, üre, EDTA ve deterjanların pullulanolitik aktivite üzerine etkisi araştırılmış, CaCl_2 ve MnCl_2 'ün aktiviteyi arttırdığı, ZnCl_2 ve FeSO_4 'ün ve üre, EDTA ile test edilen deterjanların aktiviteyi önemli düzeyde inhibe ettiği gözlenmiştir.

Ayrıca, bu çalışmada üretilen enzim bir proje kapsamında Florisil® ve nano-silika üzerinde immobilize edilmiş ve sonuçlar *Appl Biochem Biotechnol* (DOI 10.1007/s12010-016-2063-2) dergisinde “Covalent Immobilization and Characterization of a Novel Pullulanase from *Fontibacillus* sp. Strain DSHK107 onto Florisil® and Nano-silica for Pullulan Hydrolysis” isimli makale olarak yayımlanmıştır (2016).

Bu yüksek lisans tezi ile elde edilen veriler, SCI indekslerince taranan iki [*Appl Biochem Biotechnol* (IF: 2,140) *Journal of Basic Microbiology* (IF: 1,76)] farklı dergide makale olarak yayımlanmıştır.

5.2. Öneriler

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, mikrobiyal enzim/metabolit/çeşitli proteinlerin üretimi amacıyla kullanılacak mikroorganizmaları (bakteri, küf) yurt dışındaki tanınmış kültür koleksiyonlarından almak yerine doğal isolatlar ile çalışılması gerçeğini bir kez daha kanıtlar niteliktedir. Çünkü ülkemizdeki mikroorganizma biyo çeşitliliği bir zenginliktir ve yeni cins/türlerin tanınması için önemli bir yaklaşımdır. Güncel moleküler biyolojinin sunduğu gen aktarım

teknikleri ile rekombinant suşlar üretilebilir, doğal ve rekombinant milli mikroorganizma kültür koleksiyonları oluşturulabilir.

DSHK107^T *Fontibacillus pullulanilyticus* sp.nov suşundan üretilen pullulanaz enzimi endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere sanayiciler ile iş birlikleri yapılabilir ve KOSGEB, TUBİTAK projeleri ile etkin kullanım olanakları araştırılabilir.



KAYNAKLAR

- Abdul Razack, S., Velayutham, V., Thangavelu, V., 2013. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. Turkish Journal of Biology, 37(3), 280–288.
- Ahmed H., Principles and Reaction of Protein Extraction, Purification and Characterization, CRC Press, USA, 2005.
- Alagöz, D., Yildirim, D., Güvenmez, H. K., Sihay, D., Tükel, S. S., 2016. Covalent Immobilization and Characterization of a Novel Pullulanase from *Fontibacillus* sp. Strain DSHK 107 onto Florisil® and Nano-silica for Pullulan Hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology, 179(7), 1262–1274.
- Andualema, B. and Gessesse, A., 2012. Microbial lipases and their industrial applications: Review. Biotechnology.
- Ara, K., Saeki, K., Igarashi, K., Takaiwa, M., Uemura, T., Hagihara, H., 1995. Purification and characterization of an alkaline amylopullulanase with both alpha-1,4 and alpha-1,6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. Biochimica et Biophysica Acta, 1243(3), 315–324.
- Asha, R., Niyonzima, F. N., Sunil, S. M., 2013. Purification and Properties of Pullulanase from *Bacillus halodurans*, 2(3), 35–43.
- Barredo, J. L., 2005. Microbial enzymes and biotransformations. Humana Press. New Jersey, xi, 319 p.
- Batt, C., 2014. Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd Edition. Academic Press. USA, 3248 p.
- Bektas, K. I., Belduz, A. O., Güvenmez, H. K., Sihay, D., 2016. *Fontibacillus pullulanilyticus* sp.nov. isolated from soil. Journal of Basic Microbiology, 56(8), 857–863.
- Bertoldo, C. and Antranikian, G., 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from

- thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(2), 151–160.
- Bollag, D.M., Edelstein, J., Rozycki, M.D., 1996. *Protein Methods*, Wiley-Liss Pres. 68-17, 107-128.
- Cheng, K.-C., Demirci, A., Catchmark, J. M., 2011. Pullulan: biosynthesis, production and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 29–44.
- Duan, X., Chen, J., Wu, J., 2013. Optimization of pullulanase production in *Escherichia coli* by regulation of process conditions and supplement with natural osmolytes. *Bioresource Technology*, 146, 379–385.
- Duffner, F., Bertoldo, C., Andersen, J. T., Wagner, K., 2000. A New Thermoactive Pullulanase from *Desulfurococcus mucosus*: Cloning, Sequencing, Purification and Characterization of the Recombinant Enzyme after Expression in *Bacillus subtilis*, 182(22), 6331–6338.
- Elleuche, S., Qoura, F. M., Lorenz, U., Rehn, T., Brück, T., Antranikian, G., 2015. Cloning, expression and characterization of the recombinant cold-active type-I pullulanase from *Shewanella arctica*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 116, 70–77.
- Erickson, B., Nelson, Winters, P., 2012. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. *Biotechnology Journal*, 7(2), 176–185.
- Erra-Pujada, M., Chang-Pi-Hin, F., Debeire, P., Duchiron, F., O'donohue, M. J. 2001. Purification and properties of the catalytic domain of the thermostable pullulanase type II from *Thermococcus hydrothermalis*. *Biotechnology Letters*, 23(16), 1273–1277.
- Ghollasi, M., Khajeh, K., Mollania, N., Zareian, S., Naderi-Manesh, H., 2008. An investigation on acarbose inhibition and the number of active sites in an amylopullulanase (L14-APU) from an Iranian *Bacillus* sp. *Biologia*, 63(6), 1051–1056.

- Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., 2003. Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: Production and partial characterization. *Bioresource Technology*, 90(2), 207–214.
- Guan, Q., Guo, X., Han, T., Wei, M., Jin, M., Zeng, F., Jia, B., 2013. Cloning, purification and biochemical characterisation of an organic solvent-, detergent- and thermo-stable amylopullulanase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Process Biochemistry*, 48(5–6), 878–884.
- Hii, S. L., Tan, J. S., Ling, T. C., Ariff, A. Bin., 2012. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. *Enzyme Research*, 2012.
- Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q., 2002. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59:409–418
- İtik, D., Sidal, U., İriş, G., 2013. Production By Co-Culture Method *Kültürasyon : Aureobasidium pullulans* P56 melanin, 1, 21–29.
- Jiao, Y. L., Wang, S. J., Lv, M. S., Xu, J. L., Fang, Y. W., Liu, S., 2011. A GH57 family amylopullulanase from deep-sea *Thermococcus siculi*: Expression of the gene and characterization of the recombinant enzyme. *Current Microbiology*, 62(1), 222–228.
- Jòzef S., 2007. The Use of Starch Processing Enzymes in the Food Industry. In: Polaina J., MacCabe A.P. (eds) *Industrial Enzymes*. Springer, Dordrecht, pp 19-34
- Khalaf, A. K., Aldeen, S. B., 2013. Optimum Condition of Pullulanase Production by Liquid State and Solid State Fermentation (SSF) Method from *Bacillus Licheniformis* (BS18) Bs 1, 54.
- Kim, T.J., Park, W.S., Choi, S.K., Yoon, Y.J., Park, K.H., Kim, J.W., 2000. Molecular Cloning and Chracterization of a Thermostable Pullulanase from a *Thermus* Strain IM6501. *Food Science Biotechnology* 9(3): 188-194
- Kriegshäuser, G., Liebl, W., 2000. Pullulanase from the hyperthermophilic

- bacterium *Thermotoga maritima*: Purification by β -cyclodextrin affinity chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 737(1–2), 245–251.
- Kunamneni, A., Singh, S., 2006. Improved high thermal stability of pullulanase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. AN-7. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(7), 1399–1404.
- Kuriki, T., Park, J. H., Okada, S., Imanaka, T., 1988. Purification and Characterization of Thermostable Pullulanase from *Bacillus stearothermophilus* and Molecular Cloning and Expression of the Gene in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(11), 2881–2883.
- Leathers, T.D., 1993. Substrate regulation and specificity of amylases from *Aureobasidium strain* NRRL Y-12,974. *FEMS Microbiol Lett* 110, 217–222.
- Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, J.W.JR., Shadomy, J.H., 1985. *Manual of clinical microbiology*. USA, 1149.
- Ling, H. S., Chuan, L. T., Mohamad, R., Ariff, A. B., 2009. Characterization of pullulanase type II from *Bacillus cereus* H1.5. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5(4), 170–179.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., 2003. *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall/Pearson Education.
- McCleary, B. V., Mangan, D., McKie, V., Cornaggia, C., Ivory, R., Rooney, E., 2014. Colourimetric and fluorometric substrates for measurement of pullulanase activity. *Carbohydrate Research*, 393, 60–69.
- Mesbah, N., Wiegel, J., 2018. Biochemical characterization of halophilic, alkalithermophilic amylopullulanase PulD7 and truncated amylopullulanases PulD7 Δ N and PulD7 Δ C. *International Journal of Biological Macromolecules*. 111: 632-638
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of

- reducing sugars. Anal. Chem. 31:426-428.
- Mishra, B., Vuppu, S., Rath, K., 2011. The role of microbial pullulan, a biopolymer in pharmaceutical approaches: A review. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 1(6), 45–50.
- Mrudula, S., Gopal, R., Seenayya, G., 2011. Effect of substrate and culture conditions on the production of amylase and pullulanase by thermophilic *Clostridium thermosulforegenes* SVM17 in solid state fermentation. Malaysian Journal of Microbiology, 7(1), 19–25.
- Nair, S. U., Singhal, R. S., Kamat, M. Y., 2006. Enhanced production of thermostable pullulanase type 1 using *Bacillus cereus* fdta 13 and its mutant. Food Technology and Biotechnology, 44(2), 275–282.
- Nair, S. U., Singhal, R. S., Kamat, M. Y., 2007. Induction of pullulanase production in *Bacillus cereus* FDTA-13. Bioresource Technology, 98(4), 856–859.
- Nisha M., Satyanarayana T., 2013. Thermostable Archaeal and Bacterial Pullulanases and Amylopullulanases. In: Satyanarayana T., Littlechild J., Kawarabayasi Y. (eds) Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. Springer, Dordrecht, Pp 535-587
- Nigam, P. S., 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. Biomolecules, 3(3), 597–611.
- Noorwez, S. M., Ezhilvannan, M., Satyanarayana, T., 2006. Production of a high maltose-forming, hyperthermostable and Ca^{2+} -independent amylopullulanase by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans* in submerged fermentation. Indian Journal of Biotechnology, 5(3), 337–345.
- Orhan, N., Altas Kiyamaz, N., Peksel, A., 2014. A novel pullulanase from a fungus *Hypocrea jecorina* QM9414: Production and biochemical characterization. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, 51(2), 149–155.
- Peterson, R., Grinyer, J., Joss, J., Khan, A., Nevalainen, H., 2009. Fungal proteins with mannanase activity identified directly from a Congo Red stained

- zymogram by mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 374–377.
- Prajapati, V. D., Jani, G. K., Khanda, S. M., 2013. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 540–549.
- Prakash, N., Gupta, S., Ansari, M., Khan, Z., Suneetha, V., 2012. Production Of Economically Important Products By The Use Of Pullulanase Enzyme. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*. 2. 266-273
- Qiao, Y., Peng, Q., Yan, J., Wang, H., Ding, H., Shi, B., 2015. Gene cloning and enzymatic characterization of alkali-tolerant type I pullulanase from *Exiguobacterium acetylicum*. *Letters in Applied Microbiology*, 60(1), 52–59.
- Qoura, F., Elleuche, S., Brueck, T., Antranikian, G., 2014. Purification and characterization of a cold-adapted pullulanase from a psychrophilic bacterial isolate. *Extremophiles : Life under Extreme Conditions*, 18(6), 1095–1102.
- Quesada-Moraga, E., García-Tóvar, E., Valverde-García, P., Santiago-Álvarez, C., 2004. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. *Microbiological Research*, 159(1), 59–71.
- Reddy, P. R. M., Reddy, G., Seenayya, G., 1999. of thermostable pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: Optimization of nutrients levels using response surface methodology. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 21, 497–503.
- Roy, A., Messaoud, E. Ben, Bejar, S., 2003. Isolation and purification of an acidic pullulanase type II from newly isolated *Bacillus* sp. US149. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 720–724.
- Rüdiger, A., Jorgensen, P. L., & Antranikian, G. (1995). Isolation and characterization of a heat-stable pullulanase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus woesei* after cloning and expression of its gene in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 567–575.
- Saha, B. C., Mathupala, S. P., Zeikus, J. G., 1988. Purification and characterization of a highly thermostable novel pullulanase from *Clostridium*

- thermohydrosulfuricum*. The Biochemical Journal, 252(2), 343–348.
- Samah, R. A., Hassan, O., Engineering, N. R., Teknologi, U., Sciences, F., 2005. *Bacillus Flavothermus*, (May), 960–963.
- Saxena, S., 2015. Applied Microbiology. Springer, India, xv, 190 p
- Shehata, A. N., Darwish, D. A., Masoud, H. M. M., 2016. Extraction, purification and characterization of endo-acting pullulanase type I from white edible mushrooms. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 6(1), 147–152.
- Singh, R. S., Kaur, N., Kennedy, J. F., 2015. Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. Carbohydrate Polymers, 123, 190–207.
- Srivastava, N., 2019., Production of Food-Processing Enzymes From Recombinant Microorganisms. ed: Mohammed Kuddus, Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects, 2nd ed., Academic Press, United States of America, pp 739-767
- Szente, L. and Szejtli, J., 2004. Cyclodextrins as food ingredients. Trends in Food Science and Technology, 15(3–4), 137–142.
- Takasaki, Y., 1976. Purifications and enzymatic properties of β -amylase and pullulanase from *Bacillus cereus* var. *mycoides*. Agricultural and Biological Chemistry, 40(8), 1523–1530.
- Tanimoto, T., Omatsu, M., Ikuta, A., Nishi, Y., Murakami, H., Nakano, H., Kitahata, S., 2005. Synthesis of Novel Heterobranched α -Cyclodextrins Having α -D-GlcNAc-6-Phosphate on the Side Chain. Biosci. Biotechnol. Biochem., 69(4), 732–739.
- Temizkan, G., Arda, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L., 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology, 94(2), 137–155.

- Venkateswaran, K., Kempf, M., Chen, F., Satomi, M., Nicholson, W., Kern, R., 2003. *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spores are γ -radiation resistant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 165–172.
- Walker, J. M. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In *The Protein Protocols Handbook*, 2nd ed.; Walker, J. M., Ed.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2002; pp 61–72.
- Wallenfels K, Bender H, Rached JR. Pullulanase from *Aerobacter aerogenes*; production in a cell-bound state. Purification and properties of the enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*. 1966;22:254-61.
- Waśko, A., Polak-Berecka, M., Targonski, Z., 2011. Purification and characterization of pullulanase from *Lactococcus lactis*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 41(3), 252–261.
- Wei, W., Ma, J., Guo, S., Wei, D., 2014. A type I pullulanase of *Bacillus cereus* Nws-bc5 screening from stinky tofu brine: Functional expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* and enzyme characterization. *Process Biochemistry*, 49(11), 1893–1902.
- Westermeier, Reiner, 2016. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations* (Fifth edition). Wiley-VCH, Weinheim, Germany
- Westermeier, R.; Marouga, R. Protein detection methods in proteomics research. *Bioscience Rep*. 2005, 25, 19-32.
- Westermeier R., Naven T., 2002. Expression proteomics. In: *Proteomics in practice*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp 11–160
- Wu, H., Yu, X., Chen, L., Wu, G., 2014. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27. *Protein Expression and Purification*, 95, 22–27.
- Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., Dabirmanesh, B., Ghollasi, M., Mollania, N., 2010. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that

converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(2), 57–63.





ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana’da tamamladı. 2008 yılında Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2012 yılında bu bölümden mezun oldu. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda başladığı yüksek lisans eğitimini azimli bir şekilde sürdürmektedir.

