

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMADAN
PEKTİNAZ ELDESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Elif SERBESTOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2019

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Elif SERBESTOĞLU

Haziran 2019

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN MİKROORGANİZMADAN
PEKTİNAZ ELDESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)

Elif SERBESTOĞLU

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2019

ÖZET

Bu çalışmanın amacı Amasya meyve bahçelerinden alınan toprak örneklerinden izole edilen mikroorganizmadan pektinaz enziminin elde edilmesi ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. Böylece ticari öneme sahip olan pektinaz enziminin ucuz ve yüksek miktarlarda üretiminin sağlanması hedeflenmektedir. Çalışma kapsamında Amasya'daki farklı meyve bahçelerinden alınan toprak örneklerinden pektinaz enzimi üreten mikroorganizmalar izole edildi. Toprakta izole edilen türler arasında en yüksek pektinaz aktivitesi gösteren K2 kodlu izolatın 16S rRNA gen bölgesi dizi analizleri yapılarak % 99 oranında *Bacillus mojavensis* türü ile benzerlik gösterdiği belirlendi. İzole edilen suştan pektinaz enzimi üretilerek amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi yöntemleri ile enzimin kısmi saflaştırması yapıldı. Saflaştırılan enzimin optimum çalışma şartları belirlendi. Farklı pH değerlerinde enzimin aktivitesine bakıldığında en yüksek aktivitenin pH: 8,5'da elde edildiği görüldü. Farklı sıcaklıklarda enzim aktivitesine bakıldığında ise en yüksek aktivite 80 santigrat derecede elde edildi. Bu çalışma ile topraktan izole edilen *Bacillus mojavensis* K2 ile ticari öneme sahip, termofilik ve alkafilik pektinaz enziminin üretimi sağlandı.

Sayfa Adedi : 63
Anahtar Kelimeler : Pektinaz, kromatografi, *Bacillus mojavensis*, 16S rRNA
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL

PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PECTINASE
FROM A MICROORGANISM ISOLATED FROM SOIL

(M. Sc. Thesis)

Elif SERBESTOĞLU

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2019

ABSTRACT

The aim of this study is to obtain and characterize pectinase from a microorganisms isolated from orchards in Amasya. Thus, it is aimed to provide cheap and high amounts of pectinase enzyme which is commercially important. Microorganisms producing pectinase enzyme were isolated from soil samples taken from different orchards in Amasya. It was determined that the isolate K2 showed the highest pectinase activity among the species isolated from the soil. According to the results of 16S rRNA gene region sequence analysis, isolate K2 was found to be similar to the genus *Bacillus mojavensis* by 99%. Pectinase enzyme was produced by isolate K2 and it was partially purified by ammonium sulfate precipitation, ultrafiltration and ion exchange chromatography methods. The optimum operating conditions of the purified enzyme were determined. When the activity of the enzyme at different pH values was examined, it was seen that the highest activity was obtained at pH: 8.5. When the enzyme activity at different temperatures was examined, the highest activity was obtained at 80 centigrade degree. In this study *Bacillus mojavensis* K2 was isolated from soil and it was provided to produce commercially important thermophilic and alkaphilic pectinase enzyme capable of working at high temperature and high pH levels.

Page Number : 63

Keywords : Pectinase, chromatography, *Bacillus mojavensis*, 16S rRNA

Supervisor : Asst. Prof. Önder İDİL

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, çalışmamın her aşamasında ilgi ve desteğini gördüğüm danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Önder İDİL'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyerek bana yardımcı olan Arş. Gör. Emine ÇELİKOĞLU ve Arş. Gör. Umut ÇELİKOĞLU'na çok teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimimi gerçekleştirebilmem için çalışma saatlerimin planlanmasında kolaylık sağlayarak destek olan Amasya Şehit Gültekin Tırpan Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi Müdürü Koray ÖRS nezdinde tüm idareci ve öğretmen arkadaşlarıma da minnet ve şükran duygularımı ifade etmek isterim. Tüm eğitim hayatımın maddi ve manevi destekçileri olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, FBM BAP 15-0102 Proje No' su ile Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Pektik Maddeler	3
2.1.1. Pektik asitler.....	3
2.1.2. Pektinik asitler	3
2.1.3. Pektinler	4
2.1.4. Protopektinler.....	4
2.2. Pektik Enzimler (Pektinazlar)	4
2.2.1. Protopektinazlar	5
2.2.2. Pektin esterazlar (PE).....	5
2.2.3. Depolimerazlar.....	5
2.3. Pektinaz Kaynakları ve Kullanım Alanları	7
2.4. Kaynak Özetleri	7

	Sayfa
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Kullanılan Kimyasallar	11
3.2. Kullanılan Cihazlar	13
3.3. Toprakta Mikroorganizma İzolasyonu.....	14
3.4. Pektinaz Aktivitesi Gösteren Mikroorganizmanın Belirlenmesi	15
3.5. Pektinaz Aktivitesi Gösteren Mikroorganizmanın Tanımlanması.....	16
3.5.1. Gram boyama.....	16
3.5.2. Genomik DNA izolasyonu.....	16
3.5.3. 16S rRNA PCR amplifikasyonu	17
3.5.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	18
3.6. Pektinaz Üretimi	19
3.7. Pektinaz Aktivitesi Belirleme	21
3.8. Protein Miktarı Tayini (Bradford Boyama).....	23
3.9. Enzimin Saflaştırılması.....	24
3.9.1. Amonyum sülfat çöktürmesi.....	24
3.9.2. Ultrafiltrasyon	24
3.9.3. İyon değişimi kromatografisi.....	25
3.10. Enzimin Karakterizasyonu.....	26
3.10.1. Zimogram analizi	26
3.10.2. Doğal olmayan jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	28
3.10.3. Coomassie boyama	29
3.10.4. Optimum sıcaklığın belirlenmesi.....	30
3.10.5. Optimum pH değerinin belirlenmesi	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	32

	Sayfa
4.1. Bulgular.....	32
4.1.1. Pektinaz aktivitesi gösteren mikroorganizmanın seçilmesi ve tanımlanması	32
4.1.2. Enzim standardı grafiğinin belirlenmesi	35
4.1.3. Protein miktarı standart grafiğinin belirlenmesi	35
4.1.4. İnkübasyon süresine göre pektinaz aktivitesi	36
4.1.5. Saflaştırma işlemleri sonrası pektinaz aktivitesi.....	36
4.1.6. Zimogram analizi	37
4.1.7. Doğal olmayan jel elektroforezi (SDS-PAGE).....	38
4.1.8. Optimum sıcaklık.....	39
4.1.9. Optimum pH	40
4.2. Tartışma	40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Pektinazların sınıflandırılması	6
Çizelge 3.1. Pektinli sıvı besiyerinin içeriği	20
Çizelge 3.2. Zimogram analizi için kullanılan çözeltilerin ve jellerin içeriği	27
Çizelge 3.3. SDS-PAGE’de kullanılan çözeltilerin ve jellerin içerikleri.....	29
Çizelge 3.4. Farklı pH değerleri için kullanılan tamponlar ve hazırlanışları.....	31
Çizelge 4.1. Saflaştırma işlemleri sonrası elde edilen spesifik pektinaz aktiviteleri	37

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. 16S rRNA filogenetik ağaç.....	34
Şekil 4.2. Enzim standardı grafiği.....	35
Şekil 4.3. Protein miktarı standart grafiği.....	35
Şekil 4.4. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesine etkisi	36
Şekil 4.5. İyon değişimi kromatografisi.....	37
Şekil 4.6. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi	39
Şekil 4.7. Farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi.....	40

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Mikrobiyal büyüme eğrileri	15
Resim 3.2. PCR cihazı	18
Resim 3.3. UV transillüminator cihazı	19
Resim 3.4. Santrifüj cihazı.....	20
Resim 3.5. Enzim aktivitesi ölçümü	22
Resim 3.6. Spektrofotometre cihazı.....	23
Resim 3.7. BioLogic LP (Bio-Rad Model 2110 Fraction Collector).....	25
Resim 3.8. Zimogram analizi için hazırlanan dikey jel elektroforezi düzeneği	28
Resim 4.1. Pektinaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalar.....	32
Resim 4.2. En yüksek zon çapına sahip K2 kodlu izolat.....	32
Resim 4.3. K2 kodlu izolatın gram boyama sonrası ışık mikroskopundaki görüntüsü .	33
Resim 4.4. PCR ürünlerinin jeldeki görüntüsü	33
Resim 4.5. Blast analizi sonuçları.....	34
Resim 4.6. Zimogram analizi jel görüntüsü.....	38
Resim 4.7. SDS-PAGE jel görüntüsü	39

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
bp	Baz çifti (DNA)
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kDa	Kilodalton
l	Litre
M	Molar
mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
V	Volt

Kısaltmalar**Açıklama**

BSA

Bovin Serum Albumin

DNA

Deoksiribonükleik Asit

PCR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA

Ribonükleik Asit

rpm

Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions Per Minute)

rRNA

Ribozomal RNA

SDS

Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

SmF

Sıvı Ortam Fermantasyonu

SSF

Katı Ortam Fermantasyonu

UV

Ultraviyole

1. GİRİŞ

Pektik maddeler, ana yapısını galakturonik asit birimlerinin oluşturduğu kompleks polisakkaritlerdir. Bitkilerde hücre duvarının ve ara lamelin yapısına katılan pektik maddeler protopektinler, pektik asitler, pektinik asitler ve pektinler olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Uçan ve Akyıldız, 2012). Pektik maddeleri parçalayan bir grup enzime genel olarak pektinazlar adı verilir. Pektinazlar parçaladıkları pektik maddenin türüne ve parçalama mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar (Favela-Torres, Volke-Sepulveda ve Viniegra-Gonzalez, 2006).

Pektinazlar doğada yaygın olarak bulunmakta olup bakteriler, mantarlar, protozoonlar ve nematodlar tarafından üretilmektedirler (Anisa, Ashwini ve Girish, 2013). Ayrıca bitkiler ve virüsler tarafından da üretildikleri bilinmektedir (Raju ve Divekar, 2013). Pektinazın mikrobiyal kaynakları arasında çeşitli bakteri, maya ve küf türleri bulunmaktadır. Mikrobiyal pektinaz üretimi çalışmalarında *Erwinia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Rhizopus* cinsi mikroorganizmalar sıklıkla kullanılsa da bunlar arasında en çok tercih edilen türler *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Erwinia* cinslerine ait olanlardır (Favela-Torres ve diğerleri, 2006).

Biyoteknolojik yöntemler geleneksel kimyasal yöntemlere göre çok daha ekonomik ve çevre dostu kabul edildiğinden endüstriyel alanlarda mikroorganizmaların ve mikrobiyal enzimlerin kullanımı giderek artış göstermektedir (Priya ve Sashi, 2014). Enzim üretimi modern biyoteknolojide önemli bir yere sahiptir ve pektinaz üretimi tüm enzim üretiminin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Semenova ve diğerleri, 2006). Pektinazlar, gıda sektöründe meyve suyu ve şarap üretimi, kahve ve çay fermantasyonu, bitkisel yağların elde edilmesi gibi işlemlerde, kağıt ve tekstil endüstrisinde hammaddelerin işlenmesi sırasında kullanılmaktadır. Ayrıca pektince zengin biyokütlelerden etanol üretiminde ve pektik madde içeren fabrika atık sularının arıtılmasında da pektinaz enzimleri kullanılmaktadır (Pedrolli ve Carmona, 2014).

Bu çalışmada genel olarak;

- Amasya ilinde bulunan çeşitli meyve bahçelerinden alınan toprak örneklerinden mikroorganizmaların izole edilmesi ve bu izolatlar içerisinde en yüksek pektinaz aktivitesine sahip türün belirlenmesi,
- Yüksek pektinaz aktivitesi gösteren türden pektinaz enzimi elde edilerek saflaştırılması,
- Saflaştırılan pektinaz enziminin karakterizasyonunun yapılması planlanmıştır.

Yapılacak olan bu çalışmaların sonucunda da pektinaz üretiminde kullanıldığı bilinen mikroorganizmalardan farklı bir türün tespit edilmesi ve yüksek verimlilikte pektinaz enzimi elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Pektik Maddeler

Pektik maddeler, bitkilerde hücre duvarının ve ara lamelin yapısına katılan glikozidik makromoleküllerdir (Alkorta, Garbisu, Llama ve Serra, 1998). Yüksek molekül ağırlığına sahip, negatif yüklü, asidik, kompleks polisakkaritler olup, taze bitki ağırlıklarının yaklaşık olarak %0,5 ile 4,0 arasındaki kısmını oluşturmaktadırlar (Jayani, Saxena ve Gupta, 2005).

Pektik maddeler, D-galakturonik asit birimlerinin birbirlerine α -(1-4) glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşan linear polisakkaritlerdir. Ayrıca yapılarında serbest karboksil grubu da bulunduran pektik maddeler içerdikleri galakturonik asit birimlerinin kimyasal yapılarındaki farklılıklar sebebiyle gruplara ayrılırlar (Muslu, 2016).

Pektik maddeler; pektik asit, pektinik asit, pektin ve protopektin olmak üzere 4 isim altında gruplandırılırlar (Alkorta, Garbisu, Llama, ve Serra, 1998).

2.1.1. Pektik asitler

Bütün pektik maddelerin yapısını büyük oranda poligalakturonik asitler oluşturmaktadır. En basit pektik yapı sadece poligalakturonik asit birimlerinden meydana gelen pektik asitlerdir. Pektik asitler en basit yapıya sahip pektik maddeler olmanın yanı sıra diğer pektik maddelerin meydana gelmesini sağlayan ana yapı olarak da tanımlanabilirler. Diğer pektik maddeler pektik aside çeşitli grupların eklenerek moleküler birimlerin büyüklüğünün artmasıyla meydana gelirler (Kertesz, 1951: 44). Pektik asitlerin poligalakturonik asit birimleri yok denilebilecek miktarda metil ester grubu içerir. Pektik asitlerin tuzları pektat adını alır (Kashyap, Vohra, Chopra ve Tewari, 2001).

2.1.2. Pektinik asitler

Metil grubu içeren poligalakturonik asitler pektinik asit adını alırlar. Doğadaki pektinik asitler farklı oranlarda metoksil içerirler. Metil ester gruplarının önemli fonksiyonlarından biri de çözünürlüğe olan etkileridir. Pektinik asitlerin içeriğindeki metil ester oranı arttıkça

çözünürlükleri de artmaktadır. %7' nin altında metoksil içeriğine sahip pektinik asitlerde çözünürlük oldukça düşer veya tamamen kaybedilir (Kertesz, 1951: 67-71). Pektinik asitlerin normal veya asit tuzlarına pektinat adı verilmektedir. (Kashyap ve diğerleri, 2001).

2.1.3. Pektinler

Şeker ve asitlerle jel oluşturabilen pektinik asitler pektin adını alırlar. Yani bütün pektinler aslında pektinik asitken, pektinik asitlerin hepsi pektin değildir (Kertesz, 1951: 67). Pektinler, D- galakturonik asit birimlerinin yanı sıra D-galaktoz, L-arabinoz ve L-ramnoz gibi başka şekerleri de yapılarında bulundurlar (Arslan, 1994).

Pektinler esterifikasyon derecelerine (DE: Degree of Esterification) göre yüksek metoksilli pektinler ve düşük metoksilli pektinler olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Esterifikasyon derecesi %50'nin üzerindeki pektinler yüksek metoksilli pektinler olarak adlandırılırken, esterifikasyon derecesi %50'nin altında olanlar düşük metoksilli pektinler olarak adlandırılmaktadırlar. Esterifikasyon derecesi ve molekül ağırlığı pektinlerin çözünürlüğünü ve pektin solüsyonlarının akışkanlığını etkileyen faktörlerdendir (BeMiller, 1986).

2.1.4. Protopektinler

Bitkisel dokuların büyük kısmında pektik maddeler protopektin olarak bulunur. Protopektinler bitkilerdeki suda çözünmeyen temel pektik maddeler olarak tanımlanırlar. (Doesburg, 1965:13). Protopektinlerin sınırlı hidrolizi sonucunda pektinler ve pektik asitler oluşur (Jayanni ve diğerleri, 2005).

2.2. Pektik Enzimler (Pektinazlar)

Pektinazlar, pektik maddelerin depolimerizasyon veya deesterifikasyon yoluyla parçalanmasını katalizleyen bir grup enzime verilen genel isimdir (Pedrolli, Monteiro, Gomes ve Carmona, 2009). Pektinazların ana görevi bitkilerin hücre duvarlarında ve ara lamellerinde bulunan pektik maddeleri parçalamaktır. Bu görevi yerine getirirken substrat olarak tercih ettikleri pektik maddelerin türüne ve bu pektik maddelere hangi

mekanizmalarla etki ettiklerine göre çeşitli gruplara ve alt gruplara ayrılırlar (Yadav, Yadav, Yadav ve Yadav, 2009).

2.2.1. Protopektinazlar

Suda çözünmeyen protopektini çözünebilir pektine dönüştüren enzimlerdir. Protopektinin poligalakturonik asit bölgesine etki eden türü Tip A; poligalakturonik asit zinciri ile hücre duvarı bileşenlerini birbirine bağlayan polisakkarit zincirlerine etki eden türü ise Tip B olarak sınıflandırılır (Pedrolli ve diğerleri, 2009).

2.2.2. Pektin esterazlar (PE)

Pektin metil hidrolazlar olarak da adlandırılan bu enzim grubu pektinin metoksil grubunun deesterifikasyonunu kataliz ederek pektik asit oluşumunu sağlar. Pektin esterazlar tercihen ester grubu içermeyen galakturonat birimin yanında bulunan galakturonat birimlerindeki metil ester gruplarına etki ederler (Kashyap ve diğerleri, 2001).

2.2.3. Depolimerazlar

Depolimerazlar, pektik maddeleri glikozidik bağların hidrolizi veya trans-eliminasyonu yoluyla parçalarlar (Kashyap ve diğerleri, 2001).

Pektik maddeleri hidroliz yoluyla parçalayan depolimerazlar; polimetilgalakturonazlar (PMG) ve poligalakturonazlar (PG) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Kashyap ve diğerleri, 2001). Polimetil galakturonazlar (PMG), pektinin omurgasındaki α -(1-4) glikozidik bağlarını kırarak 6-metil-D-galakturonat oluştururlar. Poligalakturonazlar (PG) ise poligalakturonik asitlerin α -(1-4) glikozidik bağlarını parçalayarak D-galakturonat oluştururlar. PMG ve PG'ler Endo ve Ekzo olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Endo PMG ve Endo PG'ler substratı rastgele parçalarken, Ekzo-PG ve Ekzo-PMG'ler substratı parçalamaya indirgenmeyen uçtan başlar ve çoğunlukla monogalakturonat, bazı durumlarda da digalakturonatlar oluştururlar (Pedrolli ve diğerleri, 2009).

Pektik maddeleri trans-eliminasyon yoluyla parçalayan depolimerazlar; polimetilgalakturonat liyazlar (PMGL) ve poligalakturonat liyazlar (PGL) olmak üzere iki

gruba ayrılır. PMGL'ler pektindeki α -(1-4) glikozidik bağlarını kırarken; PGL'ler pektik asitlerin α -(1-4) glikozidik bağlarını kırarlar. PMGL ve PGL'ler Endo ve Ekzo olmak üzere gruplara ayrılırlar. Endo PMGL ve Endo PGL'ler α -(1-4) glikozidik bağları rastgele kırarken; Ekzo PMGL ve Ekzo PGL'ler bağları sıralı olarak kırarlar (Kashyap ve diğerleri, 2001).

Çizelge 2.1. Pektinazların sınıflandırılması (Kashyap ve diğerleri, 2001; Pedrolli ve diğerleri, 2009; Yadav ve diğerleri,2009)

		Enzim Türü	Substrat	Etki Mekanizması	Ürün
		Protopektinaz	Protopektin	Hidroliz	Pektin veya Pektinik Asit
Esterazlar		Pektin Metil Esterazlar (PME)	Pektin	Hidroliz	Pektik Asit + Metanol
		Pektin Asetil Esterazlar (PAE)	Pektin	Hidroliz	Pektik Asit + Asetat
Depolimerazlar	Hidrolazlar	Endo PMG	Pektin	Hidroliz	Oligogalakuronatlar
		Ekzo PMG	Pektin	Hidroliz	Monogalakuronatlar
		Endo PG	Pektik Asit	Hidroliz	Oligogalakuronatlar
		Ekzo PG	Pektik Asit	Hidroliz	Monogalakuronatlar
	Liyazlar	Endo PMGL	Pektin	Trans-eliminasyon	Doymamış Metiloligogalakuronatlar
		Endo PGL	Pektik Asit	Trans-eliminasyon	Doymamış Oligogalakuronatlar
		Ekzo PGL	Pektik Asit	Trans-eliminasyon	Doymamış Digalakuronatlar

2.3. Pektinaz Kaynakları ve Kullanım Alanları

Ekstraselüler pektinazlar hayvanlar, bitkiler, virüsler ve mantarlar tarafından da üretilmesine karşın en önemlileri bakteriler tarafından üretilenleridir. *Bacillus* ve *coccus* türleri tarafından üretilen pektinazlar hem biyoteknolojik açıdan hem de ticari açıdan büyük öneme sahiptir ve dünya genelindeki enzim üretiminin %10'unu oluşturmaktadır (Raju ve Divakar, 2013).

Aktivite gösterdikleri optimum pH değerleri açısından pektinazlar asidik ve alkali pektinazlar olarak gruplandırılırlar. Asidik pektinazlar çoğunlukla maya ve mantarlar tarafından üretilirken, alkali pektinazlar bakteriler tarafından üretilmektedirler (Tepe ve Dursun, 2012). Asidik pektinazlar çoğunlukla meyve suyu ve şarap endüstrisinde ekstraksiyon verimini artırmak, bulanıklığa neden olan pektik maddeleri uzaklaştırarak berraklığı sağlamak ve akışkanlığı artırmak gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Alkali pektinazlar ise keten, kenevir, kendir ve hindistan cevizi gibi bitkilerin kabuklarındaki pektini parçalayarak liflerin açığa çıkarılmasında, meyve suyu fabrikalarının pektinli atık sularının arıtılmasında, çay ve kahve fermantasyonunda ve kağıt üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca bitkisel yağların çıkarılması sırasında geleneksel olarak kullanılan hekzan gibi organik çözücülerin kansorejen etkilerinden dolayı bunların yerine pektinazın da içinde bulunduğu hücre duvarı parçalayıcı enzimler kullanılabilir (Kashyap ve diğerleri, 2001).

2.4. Kaynak Özetleri

Soares ve arkadaşları yaptıkları çalışmada topraktan ve çürümüş sebze atıklarından izole ettikleri mikroorganizmalardan en yüksek pektinolitik aktivite gösteren beş farklı *Bacillus* türü (*Bacillus* sp Ar1.2, *Bacillus* sp B1.3, *Bacillus* sp M2.1, *Bacillus* sp P4.3 ve *Bacillus* sp P6.1) belirlemişlerdir. Bu türlerin sıvı ortam fermantasyonu (SmF: Submerged Fermentation) ve katı ortam fermantasyonu (SSF: Solid-State Fermentation) yöntemleri ile geliştirilmesi sonucu SmF ortamda geliştirilen türlerde pektinaz üretiminin daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Ancak SSF kültürlerdeki pektinolitik aktivitenin SmF kültürlerle oranla daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. SSF kültürlerinden elde edilen pektinaz enzimi için 3,0 ile 10,0 pH aralığında çalışmalar yaparak en yüksek aktivitenin *Bacillus* P4.3 için 6,5-7,0 pH aralığında, diğer dört tür için ise pH 6,0'da elde edildiğini

ifade etmişlerdir. Optimum sıcaklığın ise *Bacillus* sp Ar1.2, *Bacillus* sp B1.3 ve *Bacillus* sp P4.3 türlerinden elde edilen enzimler için 40-50°C, *Bacillus* sp M2.1 ve *Bacillus* sp P6.1 türlerinden elde edilen enzimler için 50-55°C olduğunu rapor etmişlerdir (Soares, Silva ve Gomes, 1999).

Kashyap ve arkadaşları topraktan izole ettikleri mikroorganizmalar arasından en yüksek pektin liyaz aktivitesini *Bacillus* sp. DT7'nin gösterdiğini saptamışlardır. Farklı besiyeri içeriklerinde yetiştirdikleri türde en yüksek pektinaz üretiminin ve aktivitesinin %1 YE (maya özütü- yeast extract) ve %0,25 pektin içeren, pH'ı 7,2 olan besi yerinde elde ettiklerini belirtmişlerdir. İnkübasyon işlemi 25, 30, 37 ve 40°C sıcaklıklarda yaparak pektinaz üretimi için en uygun sıcaklığı 37°C olarak belirlemişlerdir. Besiyerine CaCl₂ ve MgSO₄.7H₂O eklendiğinde enzim aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Enzimin saflaştırılmasında iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisi yöntemlerini kullanmışlar ve elde ettikleri saflaştırılmış enzimin molekül ağırlığının %10 SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) ile 106 kD civarında saptadıklarını rapor etmişlerdir (Kashyap, Chandra, Kaul ve Tewari, 2000).

Başka bir çalışmada Kashyap ve arkadaşları *Bacillus* sp. DT7' den katı hal (solid state) fermantasyonu yöntemiyle pektinaz üretimi üzerine yaptıkları çalışmada farklı substratların, tuzların, karbon kaynaklarının, nitrojen kaynaklarının ve vitaminlerin pektinaz üretimine etkilerini incelemişlerdir. Katı substrat çeşidi olarak buğday kepeği, pirinç kepeği ve elma posasını farklı su içerikleri ile kullanmışlar ve en yüksek pektinaz üretimini %75 nem seviyesindeki buğday kepeği ile 37°C ve 36 saatlik inkübasyon süresi ile elde ettiklerini belirtmişlerdir. Buğday kepeğine ilave olarak CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.2H₂O, CoCl₂.2H₂O, MnSO₄.4H₂O, H₃BO₃, ZnCl₂, KCl ve NaCl tuzları kullanıldığında CaCl₂.2H₂O ve MgSO₄.4H₂O tuzlarının pektinaz üretimini sırasıyla % 28.0 ve %11.6 oranlarında artırdığını, CoCl₂.2H₂O ve MnSO₄.4H₂O ilavesinin pektinaz üretiminde etki göstermediğini, H₃BO₃, ZnCl₂, KCl ve NaCl tuzlarının ise pektinaz üretimini %12' ye kadar azalttığını rapor etmişlerdir. Karbon kaynağı olarak PGA, SA, pektin ve laktoz kullanıldığında pektinaz üretiminin %11 ile %44 arasında arttığını, Nitrojen kaynağı olarak da maya özütü (yeast extract), peptone ve amonyum klorür kullanmanın üretimi %24'e kadar artırdığını belirtmişlerdir. Glisin, üre ve amonyum nitrat kullanımının pektinaz üretimini durdurduğunu, triptone kullanımının ise herhangi bir etki göstermediğini ifade etmişlerdir. Çalışmada ayrıca buğday kepeğine farklı oranlarda

Neurobion (B₁, B₆, B₁₂ vitaminlerini içeren multivitamin solüsyonu) ilavesinin pektinaz üretimine etkisini incelemişlerdir. 27 µl/g kuru substrat oranında neurobion kullanımının pektinaz üretimini %65,8 oranında artırdığını, bu miktarın üzerinde neurobion kullanımının ise pektinaz üretimine herhangi bir etkisinin olmadığını belirlemişlerdir (Kashyap, Soni ve Tewari, 2003).

Mukesh ve arkadaşları meyve atıkları bulunan topraktan izole ettikleri mikroorganizmalardan en yüksek aktiviteye sahip olanı *Bacillus* sp. MFW7 olarak belirlemişler ve bu türü optimum şartlar olarak belirledikleri %1 manyok (cassava – *Manihot esculenta*) atığı içeren besi yerinde, pH 6,5’de, 35°C’de ve 96 saatte geliştirmişlerdir. Nitrojen kaynağı olarak test edilen pepton, üre, maya özü, KNO₃, NH₄Cl ve NaNO₃ arasında en yüksek pektinaz üretiminin pepton kullanıldığında gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Karbon kaynağı olarak ise test edilen glikoz, maltoz, laktoz, nişasta, xyloz ve sükroz arasından en yüksek pektinaz üretimini laktozun sağladığını saptamışlardır. Amonyum sülfat çöktürmesinin ardından yapılan DEAE-Sephacel ve Sephadex G-150 kolon kromatografileri ile saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının SDS-PAGE analizi ile 37 kDa olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir (Mukesh ve diğerleri, 2012).

Torimiro ve Okonji yaptıkları bir çalışmada *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus stearothermophilus* türleri ile elde ettikleri pektinazın aktivitesine substrat çeşidinin, sıcaklığın, pH değerinin ve metal iyonlarının etkilerini incelemişlerdir. Üç türde de substrat olarak muz kabuğu ve buğday kepeği kullanıldığında yüksek aktivite elde edilirken, portakal kabuğu kullanıldığında aktivitenin diğer substratlara oranla çok daha düşük olduğu belirtilmiştir. Bu üç tür bakteriden elde edilen pektinazların farklı sıcaklıklarda aktivitelerine bakılmış ve optimum sıcaklık olarak *B. stearothermophilus* için 60°C, *B. cereus* ve *B. subtilis* için 50°C belirlenmiştir. Optimum pH değerleri ise *B. subtilis*, *B. cereus* ve *B. stearothermophilus* için sırasıyla 9,0; 8,0 ve 7,5 olarak rapor edilmiştir. Na⁺, K⁺, Ni⁺², Mn⁺² ve Zn⁺² metal iyonlarının ise belirgin bir pektinaz inhibisyonuna yol açmadığı belirtilmiştir (Torimiro ve Okonji, 2013).

Udenwobele ve arkadaşları Mango (*Mangifera indica*) kabukları içeren ortamda geliştirdikleri *Aspergillus* türlerinden pektinaz enzimi izole ederek kısmî saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları yapmışlardır. Çalışmalarında *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus flavus* türlerini kullandıklarını belirtmişlerdir. Mango kabukları

ilave ettikleri ortamda geliştirdikleri turlerden elde ettikleri ham enzimlerde belirli zaman aralıklarında enzim aktivitesi bakmışlardır. *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus* türlerinde en yüksek aktivitenin 4. günde, *Aspergillus flavus* türünde ise 5. günde elde ettiklerini ifade etmişlerdir. Enzimin kısmî saflaştırılmasını %80 amonyum sülfat çöktürmesinin ardından diyaliz yaparak gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. Elde ettikleri enzimlerin farklı pH ve sıcaklık değerlerindeki aktivitelerini incelemişlerdir. Her üç türden elde edilen enzimde de optimum pH değerini 5, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus fumigatus* için optimum sıcaklığı 40°C, *Aspergillus flavus* için ise 45°C olarak rapor etmişlerdir (Udenwobele ve diğerleri, 2014).

Laha ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada Hindistan, Karnataka, Bangalore, Andhrahalli bölgesi toprak örneklerinden dört farklı küf izolatu elde etmiş ve bunlar içerisinde en yüksek pektinaz aktivitesi gösteren türün *Penicillium chrysogenum* olduğunu belirlemişlerdir. *Penicillium chrysogenum* ile pektinaz üretimi için en uygun koşulların pH 6'da ve 30°C'de, karbon kaynağı olarak sükroz ve azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanımının olduğunu belirlemişlerdir. Elde ettikleri pektinazın en yüksek aktiviteyi 60°C'de ve pH 5'de gösterdiğini, ortama Manganez Sülfat ilavesinin aktiviteyi artırdığını rapor etmişlerdir. *Penicillium chrysogenum* türünden elde ettikleri pektinazın SDS-PAGE analizi sonucunda 32 kDa moleköl ağırlığına sahip olduğunu belirlemişlerdir (Laha, Sarkar ve Chaki, 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar

- 2-merkaptoetanol (Merck)
- Agaroz (Sigma Aldrich)
- Akrilamid (Sigma Aldrich)
- Amonyum persülfat (Sigma Aldrich)
- Amonyum sülfat (Sigma Aldrich)
- Asetik asit - glasiyel (Merck)
- Bakır sülfat (Sigma Aldrich)
- BİS (Sigma Aldrich)
- Borik asit (Kimetsan)
- Bovin serum albumin (Sigma Aldrich)
- Bromofenol mavisi (Sigma Aldrich)
- Butanol (Sigma Aldrich)
- Coomassie brilliant blue G-250 (Merck)
- Coomassie brilliant blue R-250 (Merck)
- Çinko sülfat (Sigma Aldrich)
- Demir sülfat (Sigma Aldrich)
- Di bazik sodyum fosfat (Kimetsan)
- Disodyum sosfat (Kimetsan)
- DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel - NucleoSpin Tissue XS)
- DNA marker (Lambda DNA Hind3)
- EDTA (Sigma Aldrich)
- Etanol (Sigma Aldrich)

- Fosforik asit (Carlo Erba Reagent)
- Gliserol (Sigma Aldrich)
- Glisin (Sigma Aldrich)
- Hemoglobin solüsyonu (ChemBio)
- Hidroklorik asit (Carlo Erba Reagent)
- İmmersiyon yağı (Cargille)
- İyot (Droğtaş)
- Jel yükleme boyası (Sigma G 2526 Gel Loading Buffer)
- Kalsiyum klorür (Sigma Aldrich)
- Kristal viyole boyası (Macrol)
- Lügol çözeltisi (Sigma Aldrich)
- Magnezyum sülfat (Park Scientific Limited)
- Manganez sülfat (Park Scientific Limited)
- Metanol (Sigma Aldrich)
- Molibden trioksit (Sigma Aldrich)
- Mono bazik sodyum fosfat (Kimetsan)
- Monopotasyum fosfat (Sigma Aldrich)
- Nutrient agar (Merck)
- PCR master mix 2X (ThermoFisher Scientific)
- Pektin (Pectin From Citrus Peel - Sigma Aldrich)
- Pektinaz (*Pectinase from Aspergillus niger* - Sigma Aldrich)
- Pektinli besiyeri (HIMEDIA MP 7 Medium)
- Poligalakturonik asit (Sigma Aldrich)
- Potasyum iyodür (Park Scientific Limited)
- Protein marker (BioLabs 7702S)

- Protein marker (PageRuler Prestained Protein Ladder- Thermo Scientific)
- Q- sepharose fast flow (Sigma-Aldrich)
- RedSafe nükleik asit boyama solüsyonu (Intron Biotechnology)
- Ringer (LABM)
- Safranin boya çözeltisi (Macrol)
- SDS – Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma Aldrich)
- Sitrik asit (Park Scientific Limited)
- Sodyum klorür (Sigma Aldrich)
- Sodyum hidroksit (Park Scientific Limited)
- Süktroz (Park Scientific Limited)
- TEMED - N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Sigma Aldrich)
- Thiobarbitürik asit (Serva)
- Trizma base (Sigma Aldrich)
- Yeast Extract (Merck)

3.2. Kullanılan Cihazlar

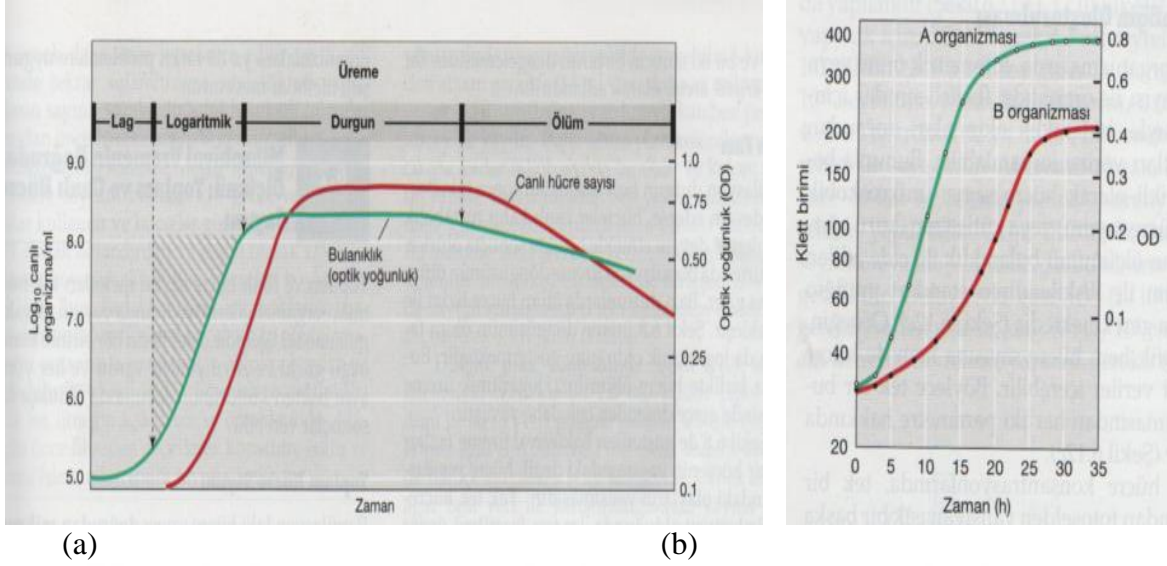
- Çalkalamalı inkübatör (Innova 43 Incubator Shaker Series)
- Derin donduruculu buzdolabı (Arçelik)
- Derin dondurucu (- 86 °C) (Nuair Glacier - 86 °C Ultralow Temperature Freezer)
- Elektroforez cihazı (Peqlab)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard)
- İnkübatör (Mettler IPP 110)
- BioLogic LP (Bio-Rad Model 2110 Fraction Collector)
- Kuru buz makinesi (Scotsman AF80)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD 574)

- Mikroskop (Leica DM500)
- Otoklav (Nüve SteamArt OT 90 L)
- PCR cihazı (Peqlab)
- Saf su cihazı (GFL 2004)
- Santrifüj cihazı (Sigma 3-30K)
- Spektrofotometre cihazı (Thermo Geenesys 10S UV-VIS)
- UV Transillüminator (Cleaver Scientific Ltd.)
- Vortex cihazı (Cleaver Vortexer)

3.3. Topraktan Mikroorganizma İzolasyonu

Amasya ili ve ilçelerindeki bazı meyve bahçelerinden toprak örnekleri alındı. Alınan toprak örneklerinden mikroorganizma izolasyonu için aşağıdaki işlemler yapıldı;

- 90 ml steril saf su içeren cam şişelere 10'ar gram toprak örneği konularak, şişeler 5 dakika boyunca yavaşça ters yüz edilerek çalkalandı (Katı, Karaca ve Gülşen, 2016).
- Şişelerden 100 µl örnek alınarak 900'er µl ringer çözeltilisi içeren 10 cam tüpte seri dilüsyon yapıldı. 6, 7, 8, 9 ve 10. tüplerden 100'er µl alınarak Nutrient Agar içeren steril petri plaklarına yayma yapıldı (Raju ve Divakar, 2013).
- Resim 3.1.a'da verilen bakterilerin büyüme eğrisinde de görüldüğü gibi bakterilerde üremenin en hızlı olduğu evre logaritmik fazdır. Bu nedenle enzim çalışmalarında logaritmik fazdaki hücreler tercih edilir. Resim 3.1.b'de görüldüğü gibi mikrobiyal organizmalar için üremenin en yüksek noktaya ulaştığı zaman aralığı genellikle 18-24 saat aralığındadır (Madigan ve Martinko, 2005/2012; 143,148). Bu bilgiler doğrultusunda, petri plakları yayma işleminin ardından 37°C' de, 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.



Resim 3.1. Mikrobiyal büyüme eğrileri (a): Bakteriye büyüme eğrisi; (b): Mikrobiyal büyümenin bulanıklık ölçümü

- İnkübasyon süresi sonunda petrilere oluşan kolonilerin her birinden örnek alınıp pektinli katı besiyeri (MP 7 Medium) içeren steril petrilere çizgi ekim yöntemi ile ekim yapıldı. Petrilere inkübatörde 37°C’ de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresinin sonunda petriden tek bir koloni alınıp pektinli katı besiyeri içeren steril petrilere nokta şeklinde ekim yapıldı ve inkübatörde 37°C’ de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4. Pektinaz Aktivitesi Gösteren Mikroorganizmanın Belirlenmesi

Nokta şeklinde koloniler elde edilen petri plakları üzerine 330 ml saf su içerisine 1 g iyot ve 5 g potasyum iyodür eklenerek hazırlanan çözeltiden ilave edildi (Priya ve Sashi, 2014). Koloni etrafında açık renkli zon oluşması pektinaz aktivitesini gösterdiğinden etrafında zon oluşan koloniler tespit edildi. Aktivite gözlenen kolonilerin etrafındaki zon çapları ölçüldü ve en yüksek zon çapına sahip olan izolat seçilerek %20’lik gliserol çözeltisinde stoklanıp -80°C’ de saklandı.

3.5. Pektinaz Aktivitesi Gösteren Mikroorganizmanın Tanımlanması

3.5.1. Gram boyama

En yüksek pektinaz aktivitesini gösterdiği belirlenen K2 kodlu izolata Gram boyama yapılarak mikroskopta incelendi. Gram boyama için öncelikle izolattan nutrient agar içeren petri plağına ekim yapılarak 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen genç kültürden yayma-kurutma-tespit işlemleri ile preparat hazırlandı. Hazırlanan preparata sırasıyla aşağıda verilen Gram boyama basamakları uygulandı (Johnson, Thatcher ve Cox, 1995);

- Preparatın üzeri kristal viyole boya çözeltisi ile kaplanarak 1 dakika bekletildi.
- Preparat distile su ile yıkandıktan sonra üzeri lügol çözeltisi ile kaplanarak 1 dakika bekletildi.
- Preparat distile su ile yıkandıktan sonra üzerine etanol (%95) dökülerek 10 saniye bekletildi.
- Preparat distile su ile yıkandıktan sonra üzeri safranin boya çözeltisi ile kaplanarak 30 saniye bekletildi.
- Preparat distile su ile yıkanarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Kurutma işleminin ardından üzerine immersiyon yağı damlatılan preparat mikroskopta 100'lük objektifle incelendi.

3.5.2. Genomik DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Macherey-Nagel firmasının NucleoSpin Tissue XS adlı izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. İşlemler kitin kullanım prosedürüne uygun olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi;

- %20'lik gliserol çözeltisinde stoklanan kültürden 80 µl alınarak üzerine 8 µl Proteinaz-K eklendi ve 56°C'de 4 saat inkübe edildi.

- 80 µl B3 eklenerek 70°C’de 5 dakika bekletildi.
- 80 µl etanol eklenerek örnek kolona yüklendi ve 10 000 rpm’ de 1 dakika santrifüjlendi.
- Birinci yıkama işlemi için 50 µl B5 eklenip 10 000 rpm’ de 1 dakika santrifüjlendi.
- İkinci yıkama işlemi için 50 µl B5 eklenip 10 000 rpm’ de 2 dakika santrifüjlendi.
- Elüsyon işlemi için 20 µl BE eklenip 10 000 rpm’ de 1 dakika santrifüjlendi.
- Ardından etanolün uzaklaştırılması için tüp ağzı açık bir şekilde etüvde 90°C’de 8 dakika bekletildi.
- Tüpe 50 µl steril saf su eklenerek DNA çözdürüldü ve -18°C’de muhafaza edildi.

3.5.3. 16S rRNA PCR amplifikasyonu

Mikroorganizmadan izole edilen DNA’nın 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu 27F ve 1492R primerleri (27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') kullanılarak yapıldı (Chen ve diğerleri, 2015).

PCR uygulaması için öncelikle mikroorganizmadan izole edilen DNA’dan 1 µl alınarak, 9 µl steril saf su ile 10^{-1} ’e seyreltildi. 10^{-1} ’e seyreltilen DNA örneğinden de 1 µl alınarak, üzerine 9 µl steril saf su eklendi. Böylece 10^{-1} ’lik DNA örneği 10^{-2} ’ye seyreltilmiş oldu. 3 farklı PCR tüpüne;

- 12,50 µl Master Mix 2X (ThermoFisher Sci.)
- 1,00 µl Primer 27F
- 1,00 µl Primer 1492 R
- 9,50 µl steril saf su

koyularak üzerlerine sırasıyla 1'er µl mikroorganizmadan izole edilen DNA (10^0), 10^{-1} 'e seyreltilen DNA ve 10^{-2} 'ye seyreltilen DNA eklendi. Tüpler Peqlab marka PCR cihazına yerleştirilerek cihaz 27-1492-55 no'lu programda çalıştırıldı. Elde edilen PCR ürünleri dizi analizi için BM Yazılım Danışmanlık Veri İletişim ve Laboratuvar Sistemleri Eğitim Sanayi ve Ticaret LTD. ŞTİ. aracılığıyla Makrogene (Hollanda) firmasına yaptırıldı.



Resim 3.2. PCR cihazı

3.5.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

16S rRNA PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi yöntemi ile jelde yürütülerek bant oluşumları görüntülendi. Agaroz jel elektroforezi için öncelikle 1X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) tamponu hazırlandı. Ardından 100 ml 1X TBE tamponu içine 1 g Agarose eklenerek mikrodalga fırında çözdürüldü. Karışımın sıcaklığı 50 - 55°C'ye düşünce içerisine 5 µl RedSafe nükleik asit boyama solüsyonu eklendi. Jel kaseti Peqlab marka yatay elektroforez cihazına havuz oluşturulacak şekilde yerleştirilip taraklar takıldı ve jel karışımı hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde boşaltıldı. Jel tamamen polimerize olunca elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örneğinden ve Lambda DNA Hind3 markalı markerdan 5'er µl alınarak yükleme boyası (Sigma G 2526 Gel Loading Buffer) ile karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. Örnekler elektroforez cihazında 120 V sabit voltajda 1 saat yürütüldü. Oluşan bantlar UV Transillüminator (Cleaver Scientific Ltd.) cihazı ile görüntülendi (Lee, Costumbrado, Hsu ve Kim, 2012).



Resim 3.3. UV transillüminator cihazı

3.6. Pektinaz Üretimi

Pektinaz aktivitesi gösterdiği belirlenen izolattan pektinaz üretimi için aşağıdaki basamaklar izlendi;

- 1000 ml'lik erlene 500 ml, 100 ml'lik erlene 50 ml olacak şekilde pektinli sıvı besi yeri hazırlandı. Pektinli sıvı besi yeri, MP 7 Medium besiyeri baz alınarak ve içeriğinden agar çıkarılarak Çizelge 3.1.'de gösterildiği gibi hazırlandı.
- 50 ml'lik besiyerine stok mikroorganizmadan 10 µl eklenerek, çalkalamalı inkübatörde 100 rpm'de, 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi bitiminde elde edilen kültürden 5 ml alınarak 500 ml'lik besiyerine ekim yapıldı ve 100 rpm'de, 37°C'de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonun 18, 20, 22, 24 ve 36. saatlerinde kültürden 2'şer ml örnek alınarak, 7 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatantlar enzim aktivitesi ölçümü için kullanıldı.

Çizelge 3.1. Pektinli sıvı besiyerinin içeriği

Pektin	5 g/l
Monopotasyum fosfat	4 g/l
Disodyum fosfat	6 g/l
Amonyum sülfat	2 g/l
Yeast Extract	1 g/l
Magnezyum Sülfat	0,20 g/l
Kalsiyum Klorür	0,001 g/l
Demir Sülfat	0,001 g/l
Bakır Sülfat	0,00007 g/l
Molibden Trioksit	0,00001 g/l
Manganez Sülfat	0,00001 g/l
Çinko Sülfat	0,00005 g/l
Borik Asit	0,00001 g/l



Resim 3.4. Santrifüj cihazı

3.7. Pektinaz Aktivitesi Belirleme

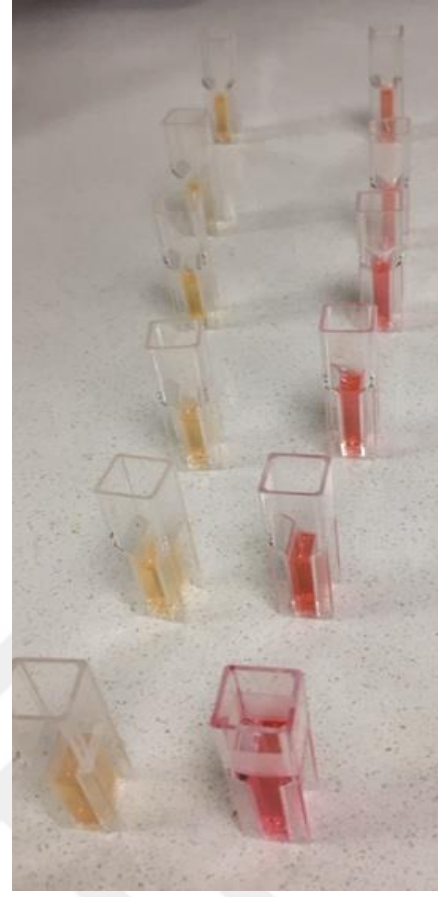
Enzim aktivitesinin belirlenmesinde Pitt tarafından açıklanan yöntem kullanıldı (Pitt, 1988). Bu yöntemle göre aktivite ölçümü yapılacak her bir örnek için;

- 2 falcon tüpe, 5 ml pektin solüsyonu (100 ml 0,05 M pH: 8,5 Tris-HCl Tamponu içinde 1 g pektin olacak şekilde hazırlanmış), 1 ml CaCl_2 (0,01 M), 1 ml enzim solüsyonu ve 3 ml saf su ilave edildi.
- Tüplerden biri çalkalamalı inkübatörde 100 rpm ve 30°C'de 2 saat inkübasyona bırakılırken diğer tüp inkübasyona bırakılmadan sonraki işlemlere geçildi.
- Tüplerdeki karışımlara sırasıyla 0,6 ml NaOH (0,5 M) ve 0,6 ml ZnSO_4 (100 ml saf su içerisinde 9 g ZnSO_4 olacak şekilde hazırlanmış) eklendi.
- 5000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenip süpernatantın 5 ml' si alınarak 3 ml tiobarbitürik asit (0,04 M), 1,5 ml HCl (0,1 M) ve 0,5 ml saf su karışımının üzerine eklendi.
- Karışımlar 30 dakika kaynar su banyosunda bekletilip soğutulduktan sonra, inkübasyona bırakılmamış olan karışım kör alınarak inkübe edilmiş olan karışımın 550 nm' de absorbansı ölçüldü.

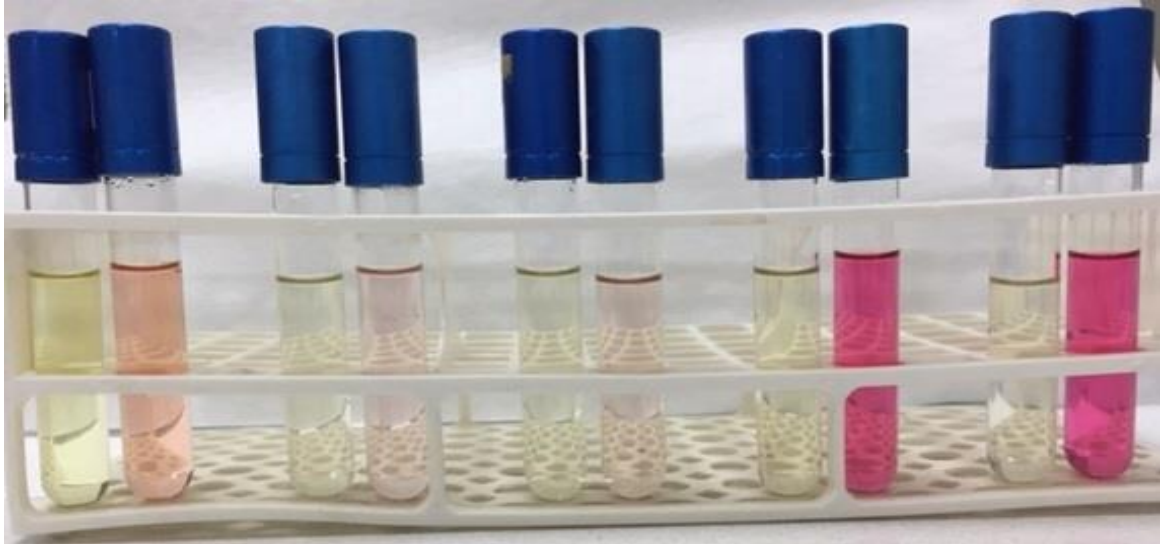
Enzim aktivitesi standart grafiğinin belirlenmesi için yukarıdaki işlemler *Aspergillus niger*'den elde edilen ticari pektinaz enzimi kullanılarak yapıldı. *Aspergillus* türlerinden elde edilen pektinazlar asidik ortamda aktivite gösterdiklerinden pektin solüsyonu hazırlanırken Tris-HCl tamponu yerine sitrat-fosfat tamponu (pH: 5,5) kullanıldı. Aktivite ölçümünde kullanılacak pektinaz örnekleri 1 ml sitrat-fosfat tamponu içerisinde 0,250; 0,100; 0,075; 0,010 ve 0,005 mg olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnek için elde edilen absorbance değerleri ile enzim standardı grafiği belirlendi. Mikroorganizmadan elde edilen pektinaz enzimi için yapılan tüm aktivite ölçümlerinde elde edilen absorbance değerleri standart enzim grafiği formülüne göre hesaplanarak enzim aktivite değerleri belirlendi.



(a)



(b)



(c)

Resim 3.5. Enzim aktivitesi ölçümü (a): Kaynar su banyosundaki örnekler (b): Spektrofotometrede ölçüm için hazırlanan örneklerin kör ve test küvetleri (c): Aktivite ölçümü yapılan farklı örneklerin inkübasyona bırakılmamış (kontrol) ve inkübasyona bırakılmış (test) tüplerinde meydana gelen renk değişimleri

3.8. Protein Miktarı Tayini (Bradford Boyama)

Protein miktarı belirlenmesinde Bradford Yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). Bu yöntemde göre 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası 50 ml %95'lik etanol içerisinde çözdürülüp üzerine 100 ml %85'lik fosforik asit eklendi. Elde edilen solüsyon saf su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan boya çözeltisi kullanılacağı zaman 5 kat sulandırılarak Whatman No:1 filtreden geçirildi. Standart eğri grafiğinin hazırlanmasında hemoglobin çözeltisi kullanıldı. Hemoglobin örnekleri saf su içerisinde 62,5 µl/ml, 125 µl/ml, 250 µl/ml, 500 µl/ml olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnekten 35 µl alınarak üzerlerine 1 ml boya çözeltisi eklendi. 10 dakika bekleme süresinin ardından 595 nm'de absorbans ölçümü yapıldı. Absorbans ölçümünde kör 35 µl saf su üzerine 1 ml boya eklenerek hazırlandı. Elde edilen değerlerle protein miktarı standart grafiği hazırlandı.

Çalışmada elde edilen ham örneğin ve her bir saflaştırma basamağından sonra elde edilen örneklerin protein miktarları Bradford Yöntemi ile belirlenerek standart grafik formülüne göre hesaplandı.



Resim 3.6. Spektrofotometre cihazı

3.9. Enzimin Saflaştırılması

3.9.1. Amonyum sülfat çöktürmesi

Farklı inkübasyon süreleri sonucunda elde edilen enzim solüsyonları arasında en yüksek enzim aktivitesi 18 saatlik inkübasyon sonrasında gözlemlendi. Bu nedenle Amonyum sülfat çöktürmesi 18 saat inkübasyonla elde edilen enzim solüsyonuyla yapıldı. Bu solüsyonla %20'lik amonyum sülfat çözeltisi hazırlandı. Çözelti buz içerisinde manyetik karıştırıcı yardımıyla 2 saat karıştırıldıktan sonra 10 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant ile %20'den %50'ye amonyum sülfat çözeltisi hazırlandı ve işlemler tekrarlandı. %50'lik çöktürme sonrasında elde edilen süpernatant ile bu kez de %50'den %70'e amonyum sülfat çözeltisi hazırlanarak işlemler tekrarlandı. Her çöktürme sonrası elde edilen pelletler minimum miktarda Tris-HCl tamponu ile çözdürülerek toplandı ve her biri için enzim aktivitesi bakıldı. Amonyum sülfat çözeltileri hazırlanırken hesaplamalar aşağıdaki formüle göre yapıldı (Temizkan ve Arda, 2008: 190) ;

$$X = \frac{505 (S_2 - S_1)}{1 - 0,285S_2}$$

X = 1 litre çözeltiliye eklenecek amonyum sülfat miktarı (g)
S₁ = Amonyum sülfatın başlangıç konsantrasyonu (%)
S₂ = Amonyum sülfatın son konsantrasyonu (%)

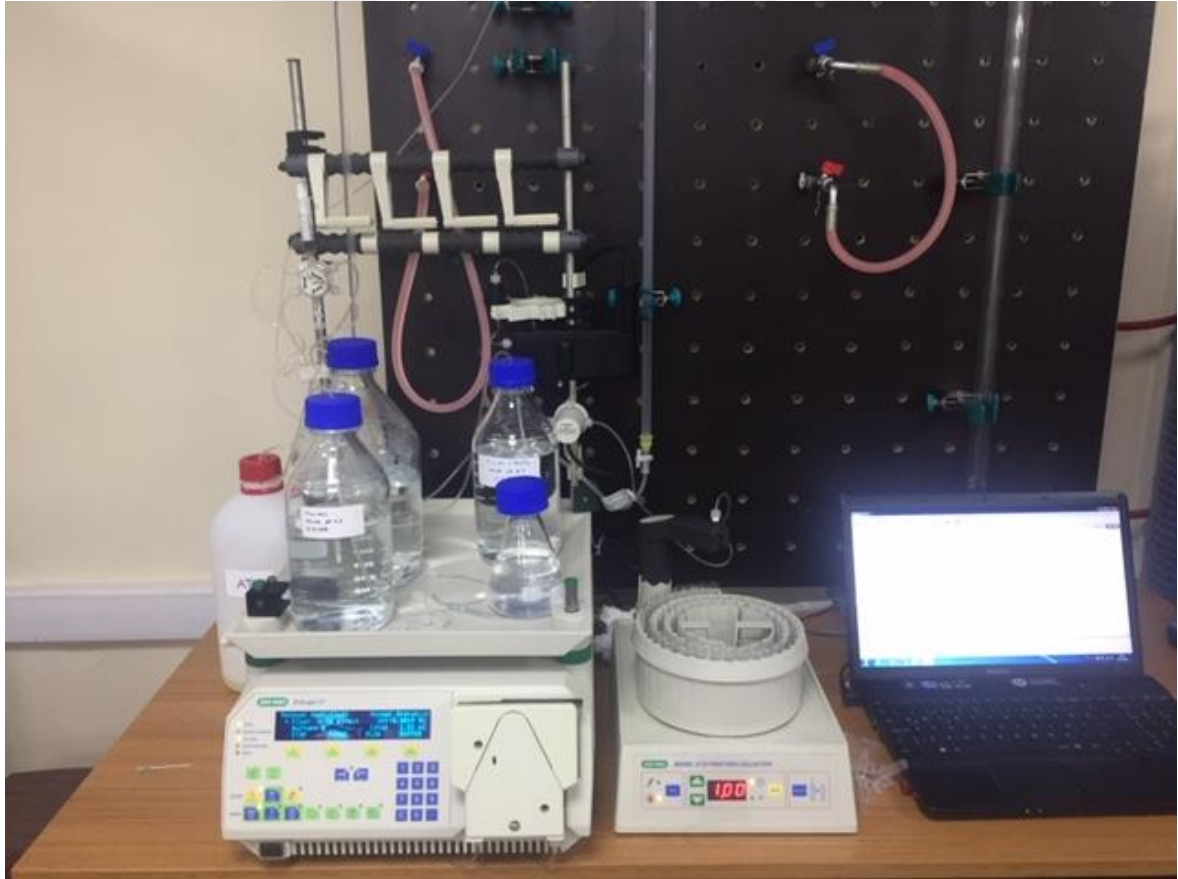
3.9.2. Ultrafiltrasyon

Amonyum sülfat çöktürmesi sonrası toplanan örneklerin enzim aktivitelerine bakıldığında en yüksek aktivitenin %50'den %70'e çöktürme sonrasında elde edildiği görüldü. %50'den %70'e amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen örnekten tuzu uzaklaştırmak için bu örneğe ultrafiltrasyon işlemi uygulandı. Ultrafiltrasyon işlemi Amicon Ultra 15 50 kDa ultrafiltrasyon tüpleri ile yapıldı. Her bir ultrafiltrasyon tüpüne 7,5 ml örnek konularak üzerlerine 7,5 ml Tris-HCl tamponu ilave edilerek toplam hacim 15 ml'ye tamamlandı. Tüpler 4 000 rpm'de 180 dakika santrifüjlendi. Tüplerin üst kısmında kalan kısımlar toplanarak hacimleri 0,05 M Tris-HCl tamponu ile 15 ml'ye tamamlandı.

3.9.3. İyon değişimi kromatografisi

Ultrafiltrasyonla elde edilen pektinazın saflaştırılmasında, moleköl ağrlıkları 70 kDa'a kadar olan proteinleri iyonik yük türüne ve yük gücüne göre etkili bir şekilde ayırabilen bir yöntem olan iyon değişimi kromatografisi yöntemi kullandı (Konak, Turhan ve Certel, 2014).

İyon değişimi kromatografisi 10 x 1 cm ebatında bir kolonla yapıldı. Kolon dolgu maddesi olarak Q- sepharose Fast Flow (Sigma-Aldrich) kullanıldı. İşlem, BioLogic LP cihazında, 0,005 M Tris-HCl yürütücü tamponu (pH: 8,5) ile gerçekleştirildi. Elüsyon tamponu (0,05 M Tris-HCl (pH:8,5) - 2 M Sodyum Klorür (NaCl)) kademeli olarak sırasıyla %0-5, %5-25, %25-50 ve %50-100 oranlarında kullanıldı. Elüsyon örnekleri 1 ml/dk akış hızında 3'er ml'lik hacimlerde toplandı.



Resim 3.7. BioLogic LP (Bio-Rad Model 2110 Fraction Collector)

3.10. Enzimin Karakterizasyonu

3.10.1. Zimogram analizi

Pektinaz aktivitesini gözlemleyebilmek amacıyla %0,2 g/ml oranında pektin içeren poliakrilamid jel ile zimogram analizi yapıldı (Tamaru ve Doi, 2001). Pektinli poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılacak olan çözeltiler ve jeller Çizelge 3.2.'deki gibi hazırlandı (Temizkan ve Arda, 2008: 200-201).

Dikey jel elektroforez cihazında (peqlab) jel kaseti hazırlanarak içerisine önce %0,2 g/ml pektin içeren %10'luk Ayırma Jeli döküldü ve üzeri su ile doyurulmuş n-butanol çözeltisi ile kaplandı. Jelin polimerizasyonu tamamlanınca n-butanol çözeltisi uzaklaştırılarak jel yüzeyi saf su ile yıkandı. Ayırma jelinin üzerine %3'lük yükleme jeli dökülerek tarak yerleştirildi. Jel polimerizasyonunu tamamlayınca tarak çıkarılarak protein marker (PageRuler Prestained Protein Ladder- Thermo Scientific) ve 10 hacim örneğe 1 hacim boya olacak şekilde sükröz-boya çözeltisi ile karıştırılan örnekler kuyucuklara yüklendi. Kasetin üzeri üst tank tamponu ve tank alt tank tamponu ile doldurularak örnekler yükleme jelinde 15 mA, ayırma jeli içerisinde 30 mA sabit akımda yürütüldü. Yürütme sırasında enzimin denatürasyonunu önlemek amacıyla tanktan 4°C'de su geçirilerek soğutma yapıldı.

Yürütmenin tamamlanmasının ardından jel kasetten çıkarılarak 0,05 M Tris-HCl tamponu içerisinde 100 rpm'de 30°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından Coomassie boyama yapıldı.

Çizelge 3.2. Zimogram analizi için kullanılan çözeltilerin ve jellerin içeriği

A	Alt Tank Tamponu	<ul style="list-style-type: none"> • 22,7 g Tris + 150 ml 1N HCl (pH: 7,5'e ayarlanır.) • Saf su ile 3 l'ye tamamlanır.
B	Üst Tank Tamponu	<ul style="list-style-type: none"> • 4,56 g Tris + 3 g Glisin (pH: 8,8'e ayarlanır.) • Saf su ile 1 l'ye tamamlanır.
C	4X Ayırma Jeli Tamponu	<ul style="list-style-type: none"> • 11,47 g Tris + 28,92 ml 1N HCl (pH: 6,9'a ayarlanır.) • Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
D	4X Yükleme Jeli Tamponu	<ul style="list-style-type: none"> • 1,92 g Tris + 25,6 ml 1N H₃PO₄ • Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
E	Ayırma Jeli İçin Monomer Çözeltisi	<ul style="list-style-type: none"> • 38 g Akrilamid + 2 g Bis • Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
F	Yükleme Jeli Monomer Çözeltisi	<ul style="list-style-type: none"> • 5 g Akrilamid + 1,25 g Bis • Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
G	% 10 Amonyum persülfat	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 g Amonyum persülfat saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.
H	% 10'lük Ayırma Jeli	<ul style="list-style-type: none"> • 5 ml Ayırma Jeli Monomer Çözeltisi (E) • 5 ml 4X Ayırma Jeli Tamponu (C) • 7,5 ml saf su • 40 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) • 2,5 ml % 10'lük Amonyum persülfat (G) • 0,04 g pektin
I	% 3'lük Yükleme Jeli	<ul style="list-style-type: none"> • 5 ml Yükleme Jeli Monomer Çözeltisi (F) • 2,5 ml 4X Yükleme Jeli Tamponu (D) • 10 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) • 2,5 ml %10'lük Amonyum persülfat (G)
J	Sükroz-Boya Çözeltisi	<ul style="list-style-type: none"> • 5 g sükroz + 1 ml % 1 bromofenol mavisi • Saf su ile 10 ml'ye tamamlanır.



Resim 3.8. Zimogram analizi için hazırlanan dikey jel elektroforezi düzeneği

3.10.2. Doğal olmayan jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Enzimin saflığının ve molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE yapıldı. Bunun için öncelikle SDS-PAGE için kullanılacak çözeltiler ve jeller Çizelge 3.3.'deki gibi hazırlandı. Ardından dikey jel elektroforezi cihazı (Peqlab) jel kaseti hazırlanarak %12'lik ayırma jeli kasete üstten 2-3 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Jelin üzeri su ile doyurulmuş n-butanol çözeltisi ile kaplandı. Jel tamamen polimerize olunca üzerindeki n-butanol çözeltisi dökülerek jel yüzeyi saf su ile yıkandı. Ayırma jelinin üzerine %5'lik yükleme jeli dökülerek tarak yerleştirildi ve jelin polimerize olması beklendi. Jel polimerizasyonunu tamamlayınca tarak çıkarıldı. Jele yüklenecek örnekler eşit hacimdeki 2X örnek uygulama tamponu (0,125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptotanol, %0,2 bromofenol mavisi - pH 6,8) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 5X Tank tamponu 5 kat sulandırılarak tanka dolduruldu. Marker (BioLabs 7702S) ve örnekler yükleme jeli içerisinde 15 mA, ayırma jeli içerisinde 30 mA sabit akımda

yürütüldü. Yürütme işlemi bitince jel kasetten çıkarılarak coomassie boyama yapıldı (Temizkan ve Arda, 2008: 205-206).

Çizelge 3.3. SDS-PAGE’de kullanılan çözeltilerin ve jellerin içerikleri

A	Monomer Çözeltisi	<ul style="list-style-type: none">• 29,2 g Akrilamid + 0,8 g Bis• Saf su ile 100 ml’ye tamamlanır.
B	4X Ayırma Jeli Tamponu	<ul style="list-style-type: none">• 18,15 g Tris + 3 N HCl ile pH: 8,8’e ayarlanır.• Saf su ile 100 ml’ye tamamlanır.
C	4X Yükleme Jeli Tamponu	<ul style="list-style-type: none">• 3 g Tris + 5 N HCl ile pH: 6,8’e ayarlanır.• Saf su ile 50 ml’ye tamamlanır.
D	% 10 SDS (sodyum dodesil sülfat)	10 g SDS saf su ile 100 ml’ye tamamlanır.
E	% 10 Amonyum persülfat	0,1 g Amonyum persülfat saf su ile 1 ml’ye tamamlanır.
F	5X Tank Tamponu	<ul style="list-style-type: none">• 15 g Tris + 72 g Glisin + 5 g SDS• Saf su ile 1 l’ye tamamlanır.
G	% 12’lik Ayırma Jeli	<ul style="list-style-type: none">• 12 ml Monomer Çözeltisi (A)• 7,5 ml 4X Ayırma Jeli Tamponu (B)• 0,3 ml % 10 SDS (D)• 10,2 ml saf su• 15 µl TEMED (N,N,N’,N’-Tetramethylethylenediamine)• 300 µl % 10 Amonyum persülfat (E)
H	% 5’lik Yükleme Jeli	<ul style="list-style-type: none">• 1,6 ml Monomer Çözeltisi (A)• 2,5 ml 4X Yükleme Jeli Tamponu (C)• 0,1 ml % 10 SDS (D)• 5,63 ml saf su• 5 µl TEMED (N,N,N’,N’-Tetramethylethylenediamine)• 100 µl % 10 Amonyum persülfat (E)

3.10.3. Coomassie boyama

Coomassie boyama yönteminin temeli jeldeki proteinlerin çöktürülerek boyanmasına dayanır. Bu amaçla jel, coomassie boyama yöntemine uygun olarak önce 500 ml metanol, 100 ml Asetik asit ve 400 ml saf su ile hazırlanmış olan fiksatif içerisinde 30 rpm’de 2 saat çalkalandı. Ardından fiksatif dökülerek jelin üzerine 500 ml metanol, 1 g Coomassie brilliant blue R-250 ve 100 ml Asetik asit karışımının saf su ile 1 litreye tamamlanmasıyla

hazırlanan boya çözeltilisinden ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk 30 rpm’de çalkalandı. Boyama süresinin ardından boya çözeltilisi uzaklaştırılarak jel 1-2 dk fiksatif ile çalkalandı. Fiksatif dökülerek jel 125 ml metanol, 175 ml Asetik asit ve 2200 ml saf su ile hazırlanmış olan yıkama çözeltilisi ile 2 saat boyunca 30 rpm’de çalkalanarak yıkandı. Yıkama çözeltilisi yenilenerek bantlar belirgin hale gelene kadar yıkama işlemine devam edildi (Temizkan ve Arda 2008: 224-225).

3.10.4. Optimum sıcaklığın belirlenmesi

Saflaştırılan enzimin en iyi aktiviteyi gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için enzim farklı sıcaklıklarda çalıştırılarak aktivite ölçümleri yapıldı. İnkübasyon sıcaklığı olarak 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100°C değerleri tercih edildi. İnkübasyon süresi 1 saat olarak uygulandı. 3 tekrarlı olarak yapılan testlerin sonuçları ile enzim aktivitesi / sıcaklık grafiği hazırlandı.

3.10.5. Optimum pH değerinin belirlenmesi

Enzim farklı pH değerlerine sahip tamponlar içerisinde çalıştırılarak aktivite ölçümleri yapıldı. 3 tekrarlı olarak yapılan testlerin sonuçları ile enzim aktivitesi / pH grafiği çizildi. Aktivite ölçümleri için belirlenen pH değerleri, tamponlar ve tamponların hazırlanışı çizelge 3.4.’de verilmiştir (Temizkan ve Arda, 2008: 314-321).

Çizelge 3.4. Farklı pH değerleri için kullanılan tamponlar ve hazırlanışları

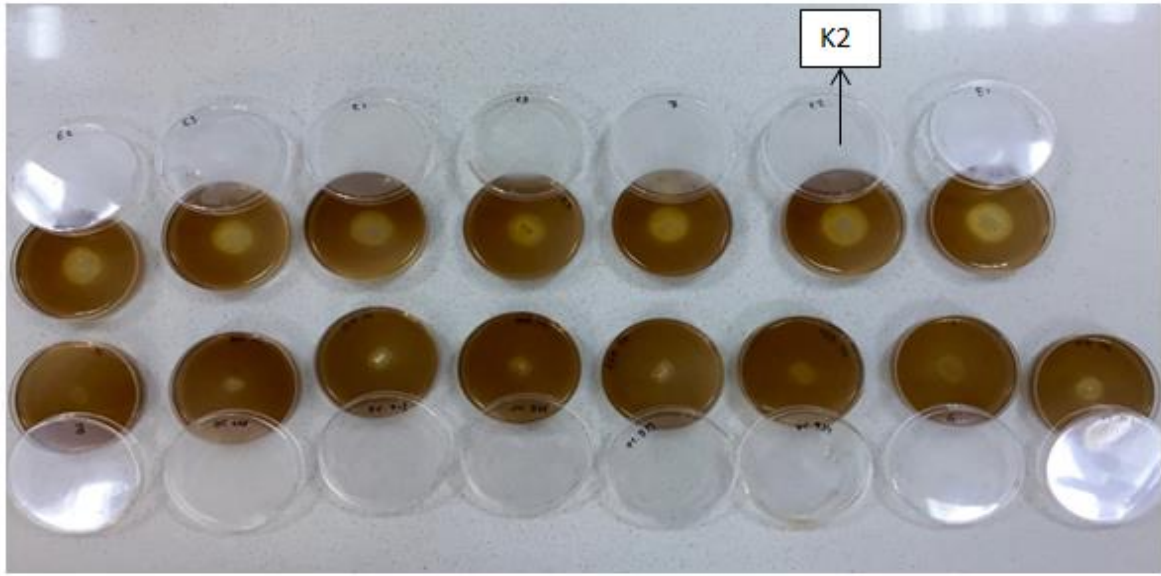
pH	Tamponun Adı	Tamponun Hazırlanışı
5	Sitrat-Fosfat Tamponu	24,3 ml 0,2 M sitrik asit çözeltisi ile 25,7 ml 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi karıştırılır. Son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
6	Sitrat-Fosfat Tamponu	17,9 ml 0,2 M sitrik asit çözeltisi ile 32,1 ml 0,2 M di bazik sodyum fosfat çözeltisi karıştırılır. Son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
7	Fosfat Tamponu	39 ml 0,2 M monobazik sodyum ile 61 ml 0,2 M dibazik sodyum karıştırılır.
8	Tris Tamponu	50 ml 0,2 M Tris ile 26,8 ml 0,2 M HCl karıştırılır. Son hacim saf su ile 200 ml'ye ayarlanır.
8,5	Tris Tamponu	50 ml 0,2 M Tris ile 12,2 ml 0,2 M HCl karıştırılır. pH, HCL ile 8,5'e ayarlanır. Son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanır.
9	Tris Tamponu	50 ml 0,2 M Tris ile 5 ml 0,2 M HCl karıştırılır. Son hacim saf su ile 200 ml'ye ayarlanır.
9,5	Glisin-NaOH Tamponu	50 ml 0,2 M glisin çözeltisi ile 16,8 ml 0,2 M NaOH çözeltisi karıştırılır. pH, NaOH ile 9,5'e ayarlanır. Son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanır.
10	Glisin-NaOH Tamponu	50 ml 0,2 M glisin çözeltisi ile 32 ml 0,2 M NaOH çözeltisi karıştırılır. Son hacim saf su ile 200 ml'ye tamamlanır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

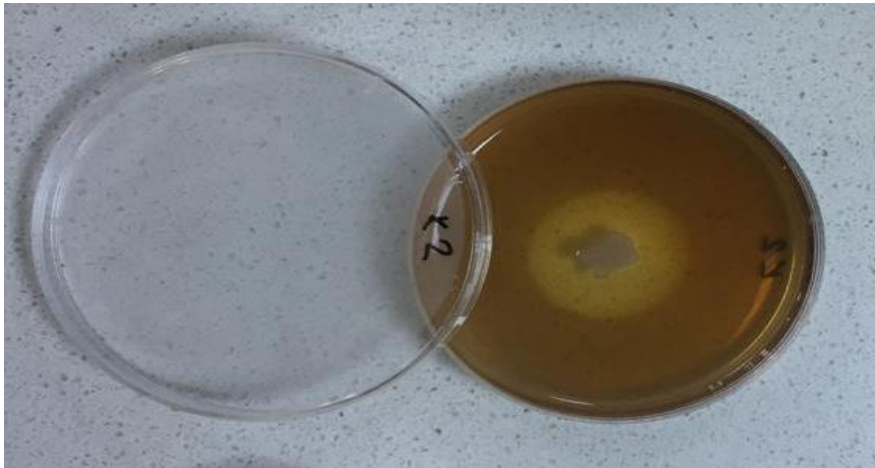
4.1. Bulgular

4.1.1. Pektinaz aktivitesi gösteren mikroorganizmanın seçilmesi ve tanımlanması

Topraktan izole edilen mikroorganizmalar için yapılan pektinaz aktivitesi ölçümlerinde 15 türde zon oluşumu gözlemlendi. Oluşan zon çaplarının ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçlarına göre en yüksek zon çapının 2,5 cm ile K2 kodlu mikroorganizmada olduğu belirlendi.



Resim 4.1. Pektinaz aktivitesi gösteren mikroorganizmalar



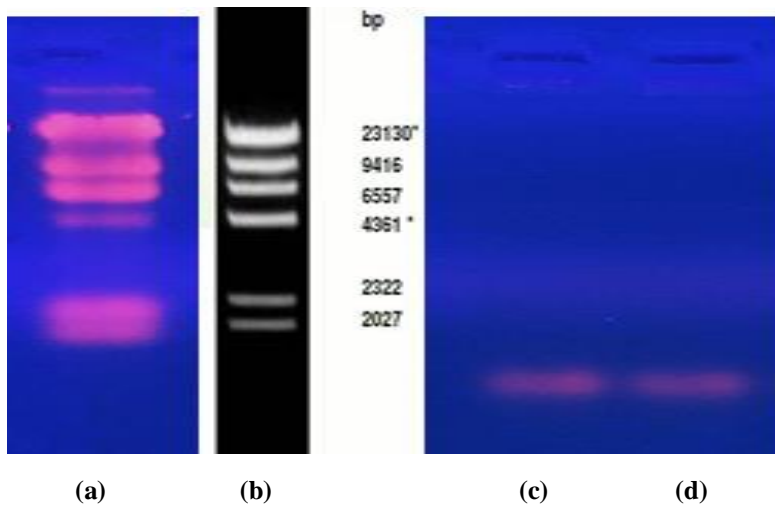
Resim 4.2. En yüksek zon çapına sahip K2 kodlu izolat

K2 kodlu izolat gram boyama yöntemi ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Mikroskop görüntülerine göre izolatın gram pozitif olduğu, hücrelerin çubuk şeklinde olduğu ve endospor oluşturduğu tespit edildi.



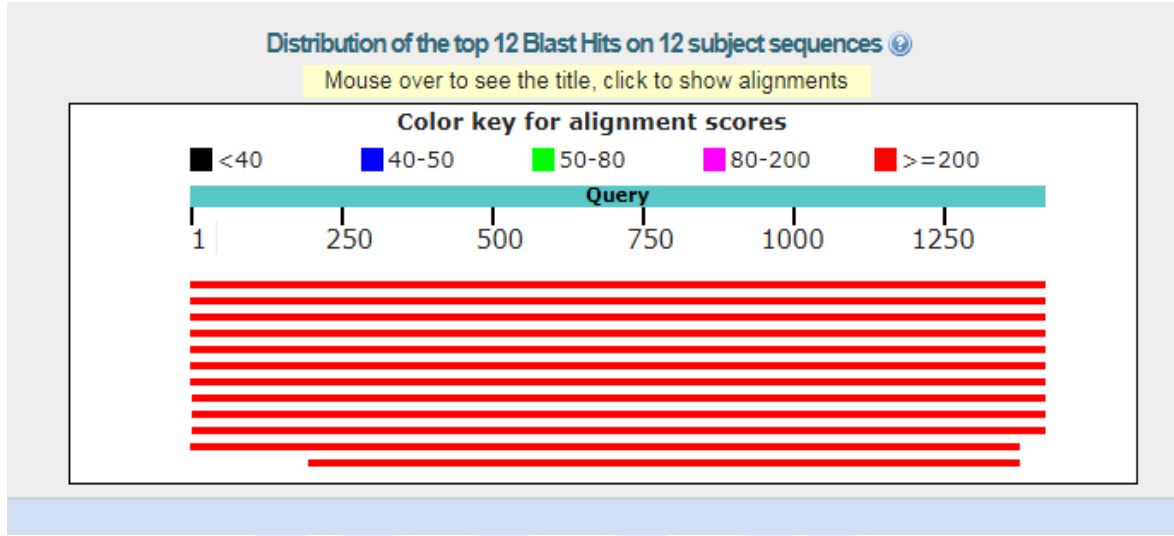
Resim 4.3. K2 kodlu izolatın gram boyama sonrası ışık mikroskopundaki görüntüsü

K2 izolatına ait 16S rRNA PCR ürünleri Lambda DNA Hind3 Marker kullanılarak elektroforezde yürütüldü. Ürünlerin jeldeki görüntüsü Lambda DNA Hin3'ün katalog görüntüsü ile karşılaştırıldığında K2 izolatının DNA uzunluğunun 1600 baz çifti civarında olduğu belirlendi.

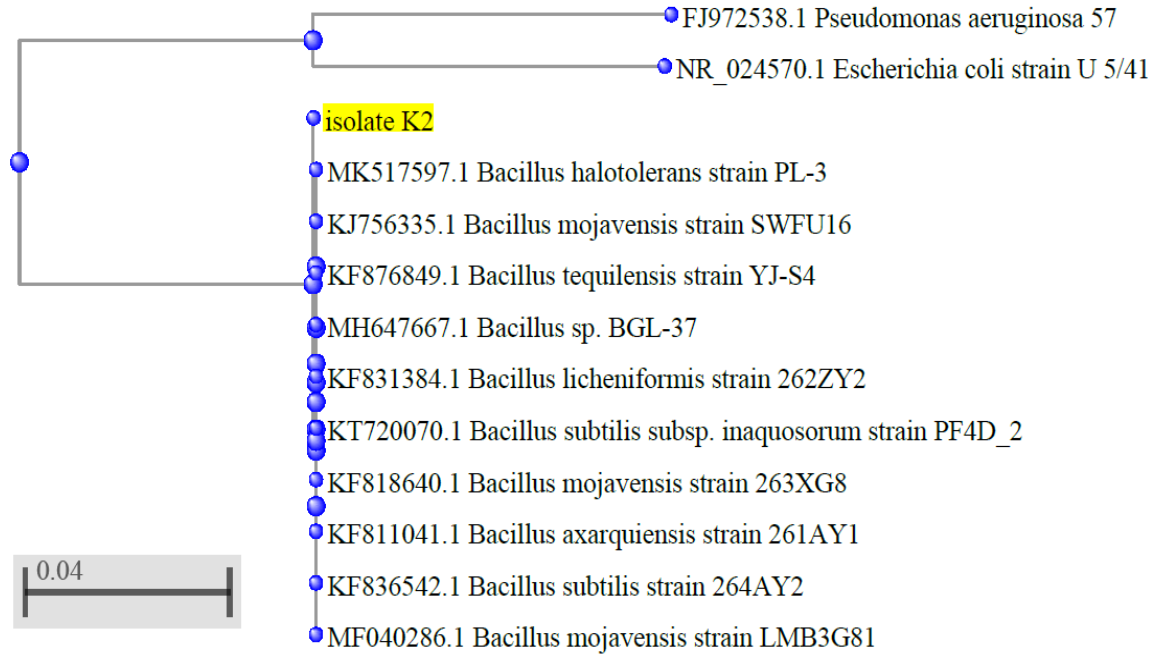


Resim 4.4. PCR ürünlerinin jeldeki görüntüsü (a) ve (b) Lambda DNA Hind III marker, (c) ve (d) K2 kodlu izolata ait 16S rRNA ürünü

Makrogen Firmasından gelen DNA dizisi ile yakın ilişkili türleri belirleyebilmek için NCBI Blast programı kullanıldı. Blast analizi sonucunda % 97 oranından fazla benzerlik gösteren yakın ilişkili türler seçildi. Bu seçilen türlerle filogenetik ağaç oluşturuldu.



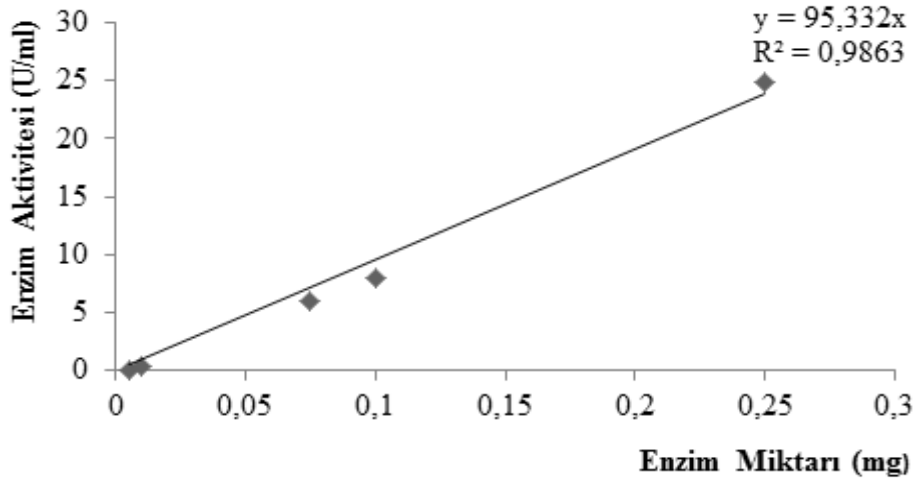
Resim 4.5. Blast analizi sonuçları



Şekil 4.1. 16S rRNA filogenetik ağaç

4.1.2. Enzim standardı grafiğinin belirlenmesi

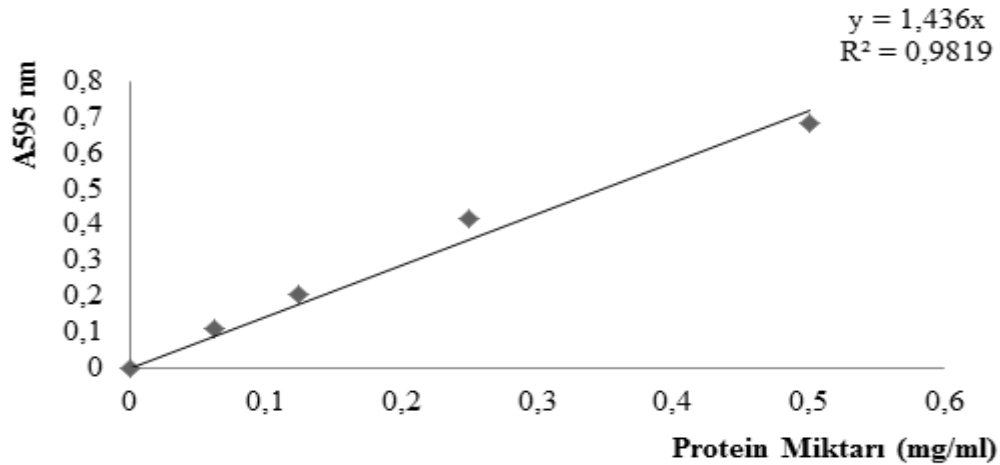
Ticari pektinaz enziminin farklı konsantrasyonlarda kullanımı ile elde edilen enzim aktivitesi ölçüm sonuçları ile enzim standardı grafiği çizildi (Grafik 4.1.).



Şekil 4.2. Enzim standardı grafiği

4.1.3. Protein miktarı standart grafiğinin belirlenmesi

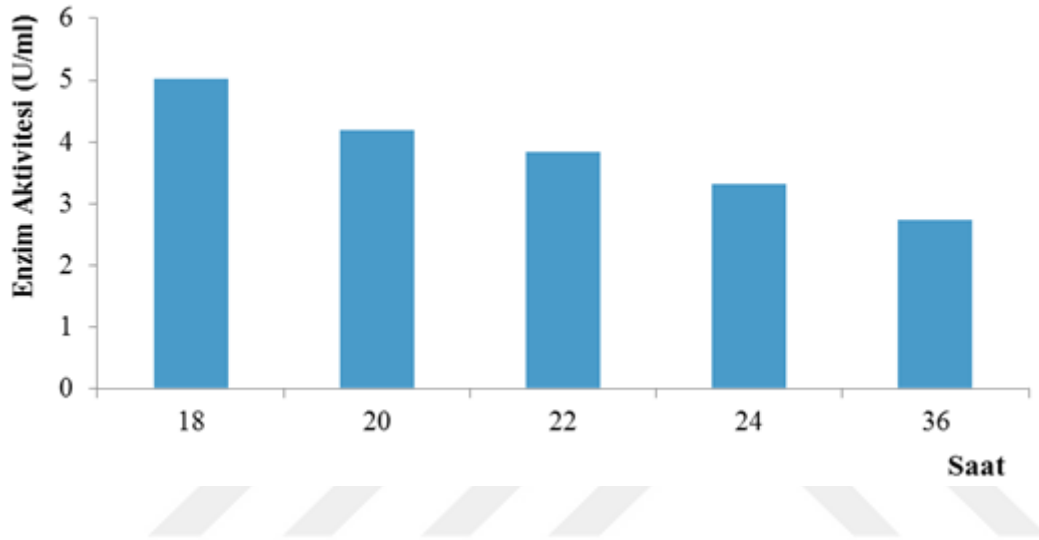
Farklı miktarlardaki hemoglobin çözeltileri ile yapılan ölçümlerde elde edilen protein miktarı değerleri kullanılarak protein miktarı standart grafiği çizildi (Grafik 4.2.).



Şekil 4.3. Protein miktarı standart grafiği

4.1.4. İnkübasyon süresine göre pektinaz aktivitesi

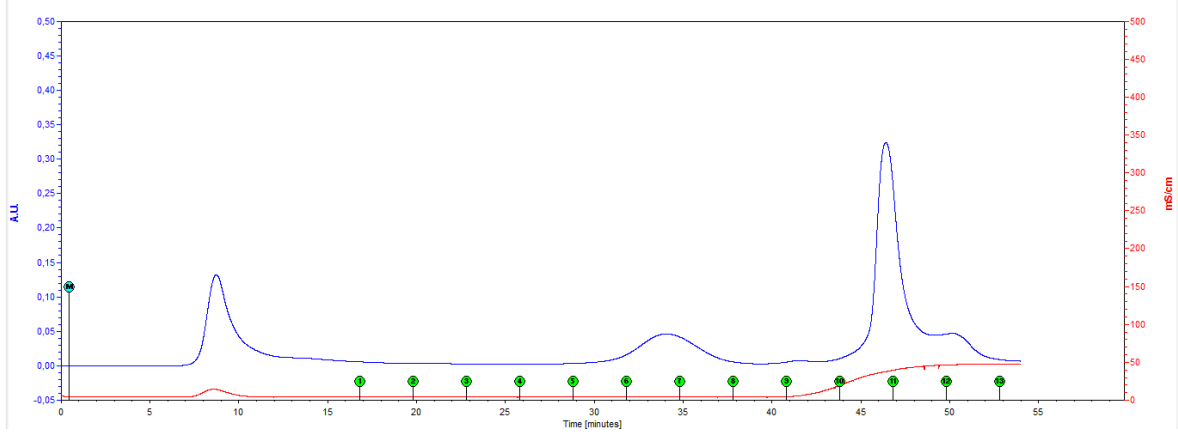
Enzim üretiminde en uygun inkübasyon süresini belirlemek için, inkübasyonun 18, 20, 22, 24 ve 36. saatlerinde alınan örneklerin pektinaz aktivitesine bakıldı. Üç tekrarlı testlerle elde edilen sonuçlara göre en yüksek aktivitenin 18 saatlik inkübasyon süresinde elde edildiği belirlendi.



Şekil 4.4. İnkübasyon süresinin enzim aktivitesine etkisi

4.1.5. Saflaştırma işlemleri sonrası pektinaz aktivitesi

Optimum inkübasyon süresi olarak belirlenen 18 saatlik inkübasyonla elde edilen ham enzime sırasıyla %0 - %20, %20 - %50 ve %50 - %70'lik Amonyum Sülfat çöktürmesi yapıldı. Her çöktürmeden sonra elde edilen örneklerde protein miktarı tayini ve pektinaz aktivitesi ölçümleri yapılarak spesifik aktivite değerleri hesaplandı. En yüksek spesifik aktivite %50 - %70 Amonyum Sülfat çöktürmesi ile elde edildiğinden ultrafiltrasyon işlemine bu örnekle devam edildi. Ultrafiltrasyon işlemi sonrası elde edilen örneğe iyon değişimi kromatografisi işlemi uygulandı. İyon değişimi kromatografisi sonucunda Şekil 4.5.'de gösterilen grafik elde edildi. Grafikte görülen tepe noktalarına denk gelen fraksiyonlardaki örneklerin aktivitelerine bakıldı. En yüksek spesifik aktivite 3. tepe noktasına (%25-%50 elüsyon tamponu) denk gelen örnekte saptandı.



Şekil 4.5. İyon değişimi kromatografisi

Saflaştırma işlemlerinin her bir basamağında sonra elde edilen örneklerin spesifik aktivite değerleri belirlendi (Çizelge 4.1.).

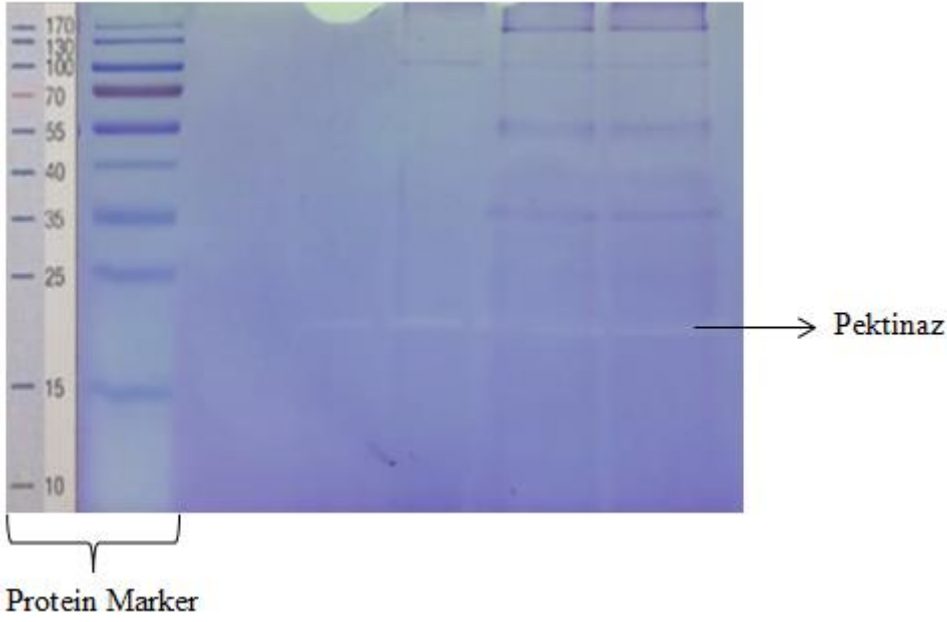
Çizelge 4.1. Saflaştırma işlemleri sonrası elde edilen spesifik pektinaz aktiviteleri

Örnek	Aktivite (U/ml) $y= 95,332x$ $r^2= 0,9863$	Protein Miktarı (mg/ml) $y= 1,436x$ $r^2= 0,9819$	Spesifik Aktivite (U/mg)
Ham Numune	0,0379	0,0327	1,1590
% 50 - % 70 Amonyum Sülfat Çöktürmesi	0,7351	0,5153	1,4265
Ultrafiltrasyon	0,7587	0,5292	1,4337
İyon Değişimi Kromatografisi	0,0108	0,0014	7,7143

4.1.6. Zimogram analizi

Yapılan zimogram analizi ile poliakrilamid jel üzerinde yürütülen ham örnek, %50-%70 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen örnek ve ultrafiltrasyon sonucu elde edilen örneklerin jelde yürütülmesi ile Resim 4.6.'da verilen görüntü elde edilmiştir. Pektinaz aktivitesinin gözlemlendiği bant yaklaşık olarak 20 kDa molekül ağırlığına karşılık geldiğinden, elde edilen pektinazın molekül ağırlığının 20 kDa civarında olduğu belirlenmiş oldu.

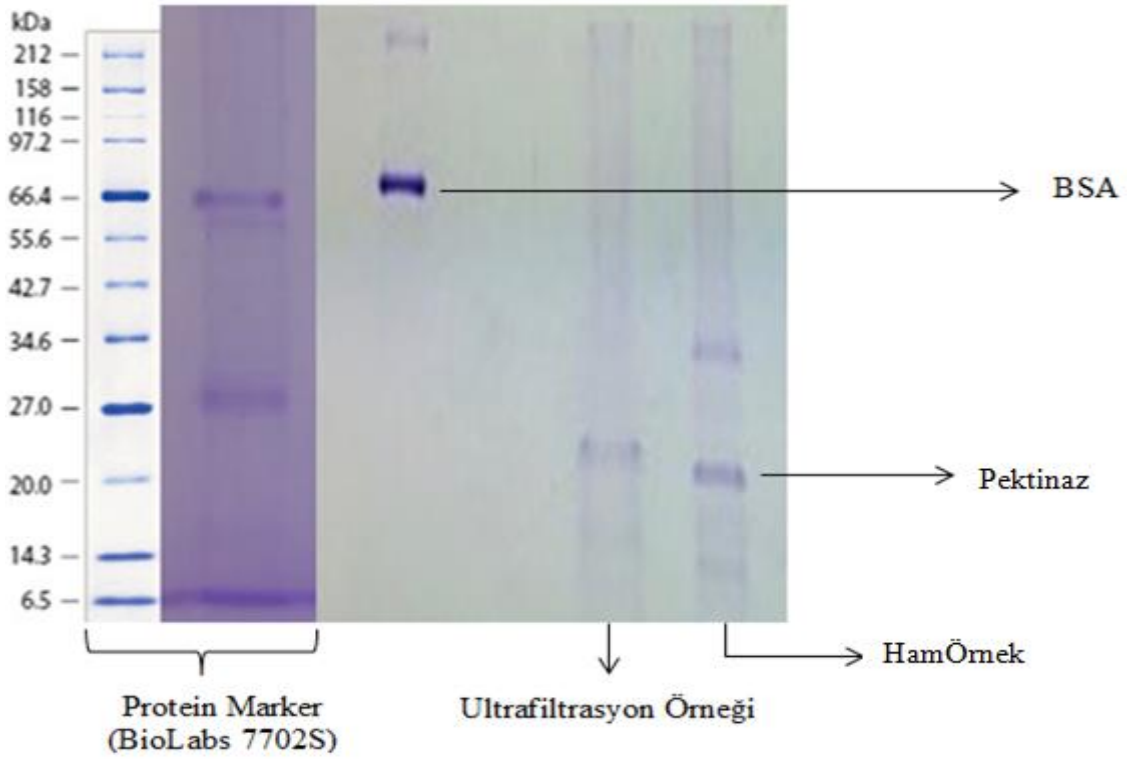
kDa



Resim 4.6. Zimogram analizi jel görüntüsü

4.1.7. Doğal olmayan jel elektroforezi (SDS-PAGE)

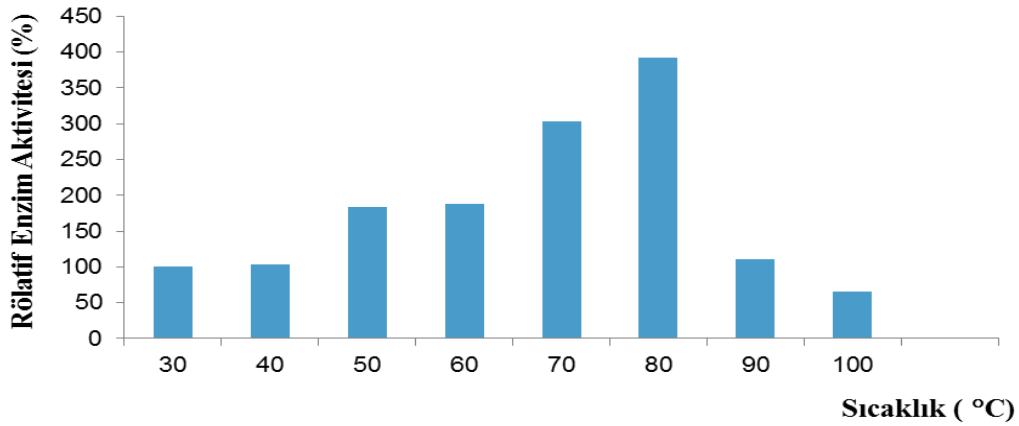
SDS-PAGE analizinde ham numune, ultrafiltrasyon sonucu elde edilen ve iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırılan örneklerin yüklendiği jelde Resim 4.7.'deki görüntü elde edildi. Ham numune ve ultrafiltrasyonda elde edilen örneklerde jelde görüntü elde edilirken, iyon değişimi ile elde edilen örnekte jelde görüntü elde edilememiştir. Bunun nedeninin, örnekteki protein konsantrasyonunun düşük oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Jelde 20 kDa civarında gözlenen bantların, zimogram analizi sonuçları ile uyumlu olarak, elde edilen pektinaza ait olduğu sonucuna varıldı.



Resim 4.7. SDS-PAGE jel görüntüsü

4.1.8. Optimum sıcaklık

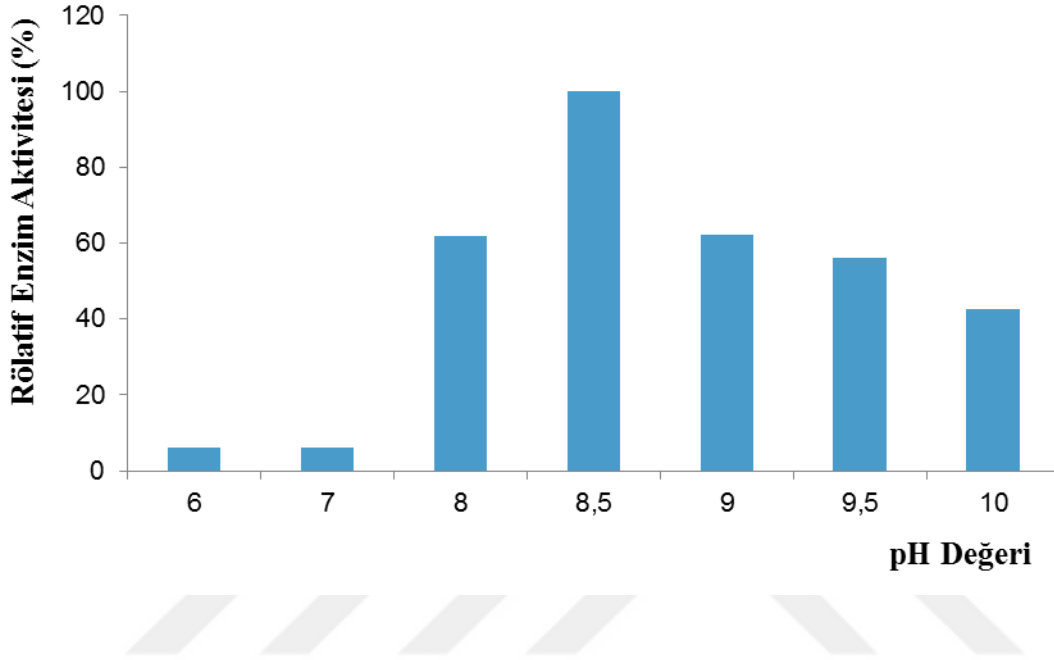
Saflaştırılan enzim farklı sıcaklık değerlerinde inkübasyona bırakılarak aktivite ölçümü yapıldı. 30°C 'de elde edilen enzim aktivitesi baz alınarak rölatif enzim aktivitesi grafiği çizildi. En yüksek aktivitenin 80°C'de elde edildiği görüldü.



Şekil 4.6. Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi

4.1.9. Optimum pH

Saflaştırılan enzim farklı pH değerlerinde çalıştırıldığında en yüksek aktivitenin pH 8,5 değerinde elde edildiği tespit edildi.



Şekil 4.7. Farklı pH değerlerinin enzim aktivitesine etkisi

4.2. Tartışma

Pektinaz enzimi doğal olarak pek çok canlı tarafından üretilmektedir. Ancak ticari olarak üretiminde çoğunlukla mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır. Pektinaz üretimi için tercih edilen mikroorganizmalar genellikle topraktan izole edilmektedir.

Bu çalışmada, Amasya meyve bahçelerinden alınan toprak örneklerinden mikroorganizma izolasyonu yapılmış ve bu izolatlar içerisinde 15 türün pektinaz üretimi yaptığı belirlenmiştir. Pektinaz üretimi yaptığı belirlenen 15 tür içerisinde en yüksek pektinaz aktivitesini K2 kodlu izolat gösterdiği için çalışmaya K2 kodlu izolatın tanımlanmasıyla devam edilmiştir. K2 kodlu izolatın tür tanımlanması yapıldığında %99 oranında *Bacillus mojavensis* ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Literatür taraması yapıldığında, *Bacillus mojavensis* (Ghazala, Sayari, Romdhane, Ellouz-Chaabouni ve Haddar, 2015), *Bacillus subtilis* (Tripathi, Zoya ve Singh, 2014), *Bacillus macerans* (Miyazaki, 1991), *Bacillus*

pumilus (Tepe ve Dursun, 2012) *Bacillus cereus* ve *Bacillus stearothermophilus* (Torimiro ve Okonji,2013) gibi *Bacillus* türleri ile pektinaz üretiminin yapıldığı çalışmalara rastlanmaktadır.

Çalışmada elde edilen pektinaz enziminin molekül ağırlığının 20 kDa civarında olduğu belirlenmiştir. Benzer molekül ağırlığındaki pektinaz enzimi Kobayashi ve arkadaşlarının çalışmasında da elde edilmiştir. Kobayashi ve arkadaşları çalışmalarında, *Bacillus* KSM-P15 suşundan elde ettikleri pektinazın molekül ağırlığının, analitik ultrasantrifüj sonuçlarına göre 20 kDa, SDS-PAGE sonuçlarına göre ise 26 kDa civarında olduğunu belirtmişlerdir (Kobayashi ve diğerleri, 1999). Klug-Santner ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus pumilus* BK2 olarak tanımladıkları izolatla ürettikleri pektinazın molekül ağırlığını 37,3 ± 4,8 kDa olarak belirlemişlerdir (Klug-Santner ve diğerleri, 2006). Miyazaki'nin *Bacillus macerans* IFO 3490 ile yaptığı pektinaz üretimi çalışmasında elde ettiği pektinazın molekül ağırlığını 35 kDa olarak saptamıştır (Miyazaki, 1991). Takao ve arkadaşlarının *Bacillus* sp. TS 47 türü ile elde ettiği pektinazın molekül ağırlığı ise 50 kDa olarak tespit edilmiştir (Takao, Nakaniwa, Yoshikawa, Terashita ve Sakai, 2000). Kashyap ve arkadaşları *Bacillus* sp. DT7'den elde ettikleri pektinazın molekül ağırlığının 106 kDa civarında olduğunu belirtmiştir (Kashyap ve diğerleri, 2000). Belirtilen çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre *Bacillus* türlerinden elde edilen pektinazların molekül ağırlıklarının 20 kDa ile 106 kDa arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir.

Bu çalışmada, *Bacillus mojavensis* K2 suşu ile elde edilen pektinazın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 80°C, pH ise 8,5 olarak saptanmıştır. Ghazala ve arkadaşları Tunus'un Sfax şehrinde topraktan pektinaz üretimi yapan mikroorganizma izole etmiş ve bu izolatın türünü *Bacillus mojavensis* I4 olarak tanımlamışlardır. *Bacillus mojavensis* I4 ile elde ettikleri pektinazın en iyi aktiviteyi pH 8,0'da ve 60°C'de gösterdiğini belirtmişlerdir (Ghazala ve diğerleri, 2015). Bir başka çalışmada, *Bacillus macerans* IFO 3490 ile elde edilen pektinazın maksimum aktiviteyi 60°C'de ve pH 9,0'da gösterdiği belirtilmiştir (Miyazaki, 1991). Klug-Santner ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise *Bacillus pumilus* BK2 tarafından üretilen pektinazın optimum aktiviteyi pH 8,5 değerinde ve 70°C'de gösterdiği saptanmıştır (Klug-Santner ve diğerleri, 2006). Torimiro ve Okonji yaptıkları çalışmalarda optimum sıcaklık değerlerini *B. stearothermophilus*'dan elde ettikleri pektinaz için 60°C, *B. cereus* ve *B. subtilis* türlerinden elde ettikleri pektinaz için

ise 50 °C olarak belirlemiştir. Optimum pH değerlerini ise, *B. stearothermophilus*'dan elde ettikleri pektinaz için 7,5; *B. cereus*'dan elde ettikleri pektinaz için 8,0 ve *B. subtilis*'ten elde ettikleri pektinaz için 9,0 olarak belirlemiştir (Torimiro ve Okonji, 2013). Kashyap ve arkadaşlarının *Bacillus* sp. DT7'den elde ettikleri pektinazla yaptıkları çalışmada optimum sıcaklık 60°C, optimum pH ise 8,0 olarak elde edilmiştir (Kashyap ve diğerleri, 2000). Belirtilen çalışmalarda elde edilen sonuçlara bakıldığında, *Bacillus* türlerinden elde edilen pektinazların alkali pektinazlar olduğu ve optimum pH değerlerinin 7,5 ile 9,0 aralığında bulunduğu görülmektedir. Çalışmamızda elde edilen pektinazın optimum pH değeri 8,5 ile bu aralığın içinde bulunmaktadır. Endüstriyel alanlarda kullanılan alkali pektinazların çoğunlukla *Bacillus* türlerinden elde edildiği bilinmektedir (Kashyap ve diğerleri, 2001). Alkali pektinazlar genellikle kağıt imalatı, atık suların arıtılması, bitkisel liflerin ayrıştırılması ve pamuğun işlenmesi gibi endüstriyel işlemlerde kullanılmaktadır (Ghazala ve diğerleri, 2015). Bu çalışmada elde edilen pektinazın alkali bir pektinaz olması belirtilen endüstriyel alanlarda kullanıma uygun olduğunu göstermektedir.

Belirtilen çalışmalarda *Bacillus* türlerinden elde edilen pektinazlar için optimum çalışma sıcaklığı 50°C ile 70°C arasındadır. Çalışmamızda elde edilen pektinazın optimum çalışma sıcaklığı ise 80°C ile bu aralığın üzerindedir. Yüksek sıcaklıklarda çalışabilme kapasitesi endüstriyel enzimlerde aranan bir özelliktir. Çünkü yüksek sıcaklık, biyoteknolojik işlemlerin gerçekleştirilmesinde kontaminasyon riskini azaltılan ve reaksiyon hızını artıran bir faktördür (Güven, 2011). Bu çalışmada elde edilen pektinazın 80°C gibi yüksek bir optimum sıcaklığa sahip olması, endüstriyel alanlarda kullanılabilirlik açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Amasya ilinde bulunan çeşitli meyve bahçelerinden alınan toprak örneklerinden mikroorganizmalar izole edildi. Pektinli katı besiyerinde geliştirilen izolatlardan 15 tanesinde pektinaz aktivitesine rastlandı. Pektinaz üretimi yaptığı belirlenen 15 izolattan en yüksek aktiviteyi K2 kodlu izolatın gösterdiği saptandı.

Gram boyama yapılarak mikroskopta incelenen K2 izolatının gram pozitif özellik taşıdığı ve hücrelerinin çubuk şeklinde olduğu gözlemlendi. Makrogen (Hollanda) firmasına yaptırılan 16S rRNA gen bölgesi nükleotit dizi analizi sonuçlarına göre K2 izolatının *Bacillus mojavensis* türü ile % 99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi.

Bacillus mojavensis K2 suşu ile enzim üretiminde optimum inkübasyon süresi belirlenmesi için 18, 20, 22, 24 ve 36 saatlik inkübasyonlar sonrasında elde edilen ham enzimlerle yapılan aktivite ölçümlerinde en yüksek aktivitenin 18 saatlik inkübasyon sonrasında elde edildiği görüldü.

Bacillus mojavensis K2 suşu, pektin içeren sıvı besiyerinde 18 saat inkübasyona bırakılarak pektinaz üretimi sağlandı. Elde edilen ham enzim amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve iyon değişimi kromatografisi yöntemleri ile saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığının, SDS-PAGE ve zimogram analizleri sonuçlarına göre 20 kDa civarında olduğu saptandı.

Farklı pH değerlerinde yapılan çalışmalar sonucunda, *Bacillus mojavensis* K2 suşundan elde edilen pektinazın pH 8,5'de optimum aktivite gösteren alkali bir pektinaz olduğu belirlendi. Çalışmada elde edilen pektinazın farklı sıcaklıklarda çalıştırılmasıyla optimum sıcaklık değerininin 80°C olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Amasya meyve bahçelerinden izole edilen *Bacillus mojavensis* K2 suşundan pektinaz enzimi üretilerek saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimin yüksek sıcaklıklarda ve yüksek pH değerlerinde çalışabilme yeteneğine sahip termofilik ve alkalifilik bir enzim olduğu belirlendi.

Endüstriyel çalışmalarda enzimlerin kullanılması, sağlığa ve çevreye zararlı kimyasalların kullanımının azaltılması açısından önemlidir. Ayrıca enzim kullanımı, endüstriyel işlemlerin daha kısa sürede gerçekleştirilmesi, veriminin ve ürün kalitesinin artırılması gibi avantajlar sağlaması bakımından da önem taşımaktadır. Ticari kullanım alanları her geçen gün artmakta olan enzimlerin, mikroorganizmalardan ucuz ve basit yöntemlerle elde edilmesi ülke ekonomisine fayda sağlamanın yanı sıra çevre ve insan sağlığı için de önem taşımaktadır. Bu nedenle mikroorganizmalardan enzim üretimi çalışmalarının artırılması gerekmektedir. Ayrıca elde edilen enzimlerin maksimum kapasiteyle kullanılabilmesi için, optimum ortam şartlarının belirlenmesine yönelik çalışmalara ağırlık verilmelidir.



KAYNAKLAR

- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J. J. (1998). Industrial Applications of Pectic Enzymes: A Review. *Process Biochemistry*, 33 (1), 21-28.
- Anisa, S.K., Ashwini, S. and Girish, K. (2013). Isolation and Screening of *Aspergillus* spp. For Pectinolytic Activity. *Electronic Journal of Biology*, 9 (2), 37-41.
- Arslan, N. (1994). Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri, Üretimi ve Gıdalarda Kullanımı. *Gıda*, 19 (3), 187-192.
- BeMiller, J.N. (1986). An Introduction to Pectins: Structure and Properties. *Chemistry and Function of Pectins*. Washington, DC: American Chemical Society, 2 -12.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Chen, Y. L., Lee, C. C., Lin, Y. L., Yin, K. M., Ho, C. L., and Liu, T. (2015). Obtaining Long 16S rDNA Sequences Using Multiple Primers and Its Application on Dioxin-containing Samples. *BMC Bioinformatics*, 16 (18), 13.
- Doesburg, J.J. (1965). *Pectic Substances in Fresh and Preserved Fruits and Vegetables* (First Edition). Wageningen The Netherlands: Institute for Research on Storage and Processing of Horticultural Produce, 13.
- Favela-Torres, E., Volke-Sepulveda, T. and Viniegra-Gonzalez, G. (2006). Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2), 221- 227.
- Ghazala, I., Sayari, N., Romdhane, M.B., Ellouz-Chaabouni, S. and Haddar, A. (2015). Assessment of Pectinase Production by *Bacillus mojavensis* I4 Using an Economical Substrate and Its Potential Application in Oil Sesame Extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (12), 7710-7722.
- Güven, R.G. (2011). Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9 (1), 1-10.
- Jayanni, R.S., Saxena, S. and Gupta, R. (2005). Microbial Pectinolytic Enzymes: A Review. *Process Biochemistry*, 40 (2005), 2931-2944.
- Johnson, M. J., Thatcher, E. and Cox, M. E. (1995). Techniques for Controlling Variability in Gram Staining of Obligate Anaerobes. *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (3), 755-758.
- Kashyap, D.R., Chandra, S., Kaul, A. and Tewari, R. (2000). Production, Purification and Characterization of Pectinase from *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (2000), 277-282.

- Kashyap, D.R., Soni, S.K. and Tewari, R. (2003). Enhanced Production of Pectinase by *Bacillus* sp. DT7 Using Solid State Fermentation. *Biosource Technology*, 88 (2003), 251-254.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S. and Tewari, R. (2001). Applications of Pectinases in the Commercial Sector: A Review. *Bioresource Technology*, 77 (2001), 215-227.
- Katı, H., Karaca, B. ve Gülşen, Ş.H. (2016). Toprakтан İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 20 (2), 281-290.
- Kertesz, Z. I. (1951). *The Pectic Substances* (Birinci Baskı). New York: Interscience Publishers, Inc., 44, 67-71.
- Klug-Santner, B.G., Schnitzhofer, W., Vrsanska, M., Weber, J., Agrawal, P.B., Nierstrasz, V.A. and Guebitz, G.M. (2006). Purification and Characterization of a New Bioscouring Pectate Lyase from *Bacillus pumilus* BK2. *Journal of Biotechnology* 121, 390-401.
- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T., Hatada, Y. and Ito, S. (1999). Purification and Properties of a Low-Molecular-Weight, High-Alkaline Pectate Lyase from an Alkaliphilic Strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63 (1), 65-72.
- Konak, Ü.İ., Turhan, İ. ve Certel, M. (2014). Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Akademik Gıda*, 12 (2), 79-87.
- Laha, S., Sarkar, D. and Chaki, S. (2014). Optimization of Production and Molecular Characterization of Pectinase Enzyme From *Penicillium chrysogenum*. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2 (5), 326-335.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. and Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, (62), 3923.
- Madigan, M. T. and Martinko, J. M. (2012). *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*. Cumhuriyet (çev.). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Miyazaki, Y. (1991). Purification and characterization of endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (1), 25-30.
- Mukesh, K. D. J., Saranya, G. M., Suresh, K., Andal, P. D., Rajakumar, R. and Kalaichelvan, P. T. (2012). Production and Optimization of Pectinase from *Bacillus* sp. MFW7 using Cassava Waste. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2 (3), 369-375.
- Muslu, A. (2016). *Gıda Atıklarından Elde Edilen Pektinin Modifiye Edilmesi, Moleküler ve Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Pedrolli, D.B. and Carmona, E. C. (2014). Purification and Characterization of a Unique Pectin Lyase from *Aspergillus giganteus* Able to Release Unsaturated Monogalacturonate during Pectin Degradation. *Enzyme Research*, 2014.
- Pedrolli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E. and Carmona, E.C. (2009). Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3, 9-18.
- Pitt, D. (1988). Pectin Lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Methods in Enzymology*, 161, 350-354.
- Priya, V. and Sashi V. (2014). Pectinase Enzyme Producing Microorganisms. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 4 (3).
- Raju, E.V.N. and Divakar, G. (2013). Screening and Isolation of Pectinase producing Bacteria from Various Regions in Bangalore. *International Journal of Research in Pharmaaceutical and Biomedical Sciences*, 4 (1), 151-154.
- Semenova, M.V., Sinitsyna, O.A., Morozova, V.V., Fedorova, E.A., Gusakov, A.V., Okunev, O.N., Sokolova, L.M., Koshelev, A.V., Bubnova, T.V., Vnetskii, Yu.P. and Sinitsyn A.P. (2006). Use of a Preparation from Fungal Pectin Lyase in the Food Industry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42 (6), 598-602.
- Soares, M.M.C.N., Da Silva R. and Gomes, E. (1999). Screening of Bacterial Strains for Pectinolytic Activity: Characterization of the Polygalakturonase Produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30 (4).
- Takao, M., Nakaniwa, T., Yoshikawa, K., Terashita, T., and Sakai, T. (2000). Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64 (11), 2360-2367.
- Tamaru, Y., and Doi, R. H. (2001). Pectate lyase A, an enzymatic subunit of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (7), 4125-4129.
- Temizkan, G. ve Arda, N. (Editörler). (2008). *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM).
- Tepe, Ö. ve Dursun, A.Y. (2012, 3-6 Eylül). *Bacillus pumilus* ile Ekzo Pektinaz Üretiminde Ortam pH'nın Etkisi. Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Koç Üniversitesi, İstanbul.
- Torimiro, N. and Okonji, R. E. (2013). A Comparative Study of Pectinolytic Enzyme Production by *Bacillus* Species. *African Journal of Biotechnology*, 12 (46), 6498-6503.

- Tripathi, G. D., Zoya, J., and Singh, A. K. (2014). Pectinase Production and Purification from *Bacillus subtilis* Isolated From Soil. *Advances in Applied Science Research*, 5 (1), 103-105.
- Udenwobele, D.I., Nsude, C.A., Ezugwu, A.L., Eze, S.O.O., Anyawu,C., Uzoegwu, P.N. and Chilaka, F.C. (2014). Extraction, Partial Purification and Characterization of Pectinases Isolated from *Aspergillus* species Cultured on Mango (*Mangifera indica*) Peels. *African Journal of Biotechnology*, 13 (24), 2445-2454.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D. and Yadav, K.D.S. (2009). Pectin Lyase: A Review. *Process Biochemistry*, 44 (2009), 1-10.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Elif SERBESTOĞLU
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Doğum tarihi ve yeri : 02.04.1978 - Bursa
Medeni hali : Evli
e-posta : elifserbestoglu@gmail.com

Eğitim Derecesi

Lisans

Okul/Program

Orta Doğu Teknik Üniversitesi

Mezuniyet Yılı

2001

İş Deneyimi/Yıl

2001-

Çalıştığı Yer

Milli Eğitim Bakanlığı

Görevi

Biyoloji Öğretmeni

Yabancı Dili

İngilizce

Bilimsel Faaliyetler

1. Serbestoğlu, E., Kılınç, Ç., Güçkan, R. and İdil, Ö. (2016, October 19-24). *Changing Antibiotic Resistance of Escherichia coli and Clinical Isolates During Photooxidative Stress*. 3rd International Conference On Computational and Experimental Science and Engineering (ICCESEN), Antalya.
2. Serbestoğlu, E., İdil, Ö., Çelikoğlu, E. ve Çelikoğlu U. (2019, 26-27 Nisan). *Amasya Meyve Bahçelerinden İzole Edilen Mikroorganizmalardan Pektinaz Enzimi Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu*. 6. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Kongresi, Gaziantep.