



**İŞLEVSEL VE FONKSİYONEL GIDALARIN GELİŞTİRİLMESİNDE
KULLANILABİLECEK GENİŞ SICAKLIK VE pH ARALIĞINDA AKTİF
MİKROBİYAL KAYNAKLI EKSTRASELLÜLER REKOMBİNANT
PEKTAT LİYAZ**

Seda BEKLİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2018

Seda BEKLİ tarafından hazırlanan “İŞLEVSEL VE FONKSİYONEL GIDALARIN GELİŞTİRİLMESİNDE KULLANILABİLECEK GENİŞ SICAKLIK VE pH ARALIĞINDA AKTİF MİKROBİYAL KAYNAKLI EKSTRASELLÜLER REKOMBİNANT PEKTAT LİYAZ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Belma ASLIM

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Başkan: Prof. Dr. Semra MİRİCİ

Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Üye: Doç. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

.....

Tez Savunma Tarihi: 04/01/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi 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.

Seda BEKLİ

04/01/2018

İŞLEVSEL VE FONKSİYONEL GIDALARIN GELİŞTİRİLMESİNDE
KULLANILABİLECEK GENİŞ SICAKLIK VE pH ARALIĞINDA AKTİF
MİKROBİYAL KAYNAKLI EKSTRASELLÜLER REKOMBİNANT PEKTAT LİYAZ
(Yüksek Lisans Tezi)

Seda BEKLİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ocak 2018

ÖZET

Pektik maddeler yüksek bitkilerin hücre duvarlarından ekstrakte edilen başlıca kompleks heteropolisakkaritlerdir. Pektik maddelere etki eden ve kısaca pektik enzimler denilen grupta çok sayıda enzim yer almaktadır. Biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilecek, farklı koşullarda yüksek aktivite gösterebilecek yeni enzimlerin bulunmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada 7 bakteri ve 5 maya türü taranmıştır. Yüksek PEL aktivitesine sahip bakteri türlerinin moleküler düzeyde tanımlanması yapılarak doğrulanmıştır. PEL enziminin optimizasyon çalışmalarına göre optimum koşulları tespit edilmiştir. En yüksek Pektat Liyaz Enzim (PEL) aktivitesine sahip olan *B. amyloliquefaciens* BS6 suşundan elde edilen gen bölgesi (-1600 bp) belirlenmiş olup, Pet-20b(+) vektörüne klonlaması yapılarak *Escherichia coli* BL 21 (D3) suşuna aktarımı yapılmıştır. Klonlama sonrası elde edilen rekombinant PEL BS6 (RPEL BS6) enziminin karakterizasyon çalışmaları sonrasında 0,5 mM CaCl₂ en yüksek aktivite (49,8 Units/mg) göstermiş olup, 15-90°C sıcaklık aralığında ve 4,0-14,0 pH aralığında aktivitesini yüksek ölçüde korumuştur ($p<0,01$). 18 aylık depolama stabilitesi kontrol edilmiş ve aktivitesini % 98 oranında koruduğu gözlenmiştir ($p<0,01$). Molekül ağırlığı ise western ile 65,75 kDa olarak tespit edilmiştir. PEL BS6 geni ile termostabil PEL genleri hizalanmış, gen kalıntılarının olduğu bölgeler ve Ca⁺² bağlanma bölgeleri gösterilmiştir(Clustal W). Elde edilen RPEL BS6 enzimi ile portakal ve elma suyunda kısa sürede etkin berraklaştırma başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. *B. amyloliquefaciens* (BS6)'den elde edilen RPEL BS6, özellikleri bakımından literatürdekiler ile farklılık göstermiştir. Bu enzim termostabil, termotolerant ve pH tolerant özelliği bakımından ve moleküler özellikleri ile de değerlendirildiğinde yeni bir enzim bulunmuştur. RPEL BS6 enzimi, farklı koşullarda yüksek aktivite göstermesi ve bunu koruması nedeniyle farklı endüstri alanlarında başarı ile kullanımı mümkün olabileceği gibi, bu enzimi kullanarak farklı fonksiyonel gıdalar geliştirmekte mümkün olacaktır. PEL BS6 enziminin rekombinant olarak elde edilmiş olması ve raf ömrünün uzun olması ticari kullanım potansiyelini daha da güçlendirmiştir.

Bilim Kodu : 20309

Anahtar Kelimeler : Pektat liyaz (PEL), rekombinant enzim, pektin, enzim biyoteknolojisi, *Bacillus* spp.

Sayfa Adedi : 99

Danışman : Prof. Dr. Belma ASLIM

OPTAINING OF MICROBIAL-DERIVED EXTRACELLULAR RECOMBINANT
PECTATE LYASE WICH CAN BE USED IN THE DEVELOPMENT OF
OPERATIONAL AND FUNCTIONAL FOODS IN WIDE RANGE OF TEMPERATURE
AND pH
(M. Sc. Thesis)

Seda BEKLİ

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
January 2018

ABSTRACT

Pectic substances are the major complex heteropolysaccharides extracted from the cell walls of higher plants. So-called pectic enzymes, the group affecting the pectic substances, contain many enzymes. There is a need for novel enzymes which can be used in biotechnology applications and are able to exhibit high activity under various conditions. In this study, 7 bacteria and 5 yeasts were screened for their Pectate Lyase Enzyme (PEL) activity. Types of bacteria with high PEL activity identification, were made at the molecular level. According to the study of the optimization of the optimal enzyme, PEL conditions have been identified. Moreover strains selected based on the high PEL activity were verified by describing them on a molecular level based on their 16S rRNAs. The gene domain (~1600 bp) obtained from the *B. amyloliquefaciens* BS6 strain with the highest Pectate Lyase Enzyme (PEL) activity was identified, and cloned to the Pet-20b(+) vector and transfected into *Escherichia coli* BL 21(D3) strain. The characterization studies of the recombinant PEL BS6 (RPEL BS6) enzyme obtained after cloning revealed that the highest activity was exhibited at 0.5 mM CaCl_2 (49,8 Units/mg) and the activity was maintained in the temperature range of 15-90°C and the pH range of 4.0-14.0 to a significant extent ($p < 0.01$). Its 18-month storage stability was checked and it was found to maintain its activity by 98% ($p < 0.01$). The molecular weight was determined by Western i-blot as 65.75 kDa. The PEL BS6 gene and the thermostable PEL genes were aligned using the Clustal W software and the regions with gene residues and the Ca^{+2} binding sites were identified. Using the obtained RPEL BS6 enzyme, effective clarification in orange and apple juices was successfully performed in a short time. Regarding its properties, the RPEL BS6 obtained from the *B. amyloliquefaciens* BS6 differs from those in the literature. Considering its molecular characteristics, a novel thermostable, thermotolerant and pH-tolerant enzyme was found. Due to its high and well-maintained activity under different conditions, the RPEL BS6 enzyme can be successfully used in various industry fields. Moreover, its use would allow for the development of diverse functional foods. The recombinant production and the long shelf-life of the PEL BS6 enzyme increase its potential for commercial use.

Science Code : 20309

Key Words : Pectate lyase (PEL), recombinant enzyme, pectin, enzyme biotechnology, *Bacillus* spp.

Page Number : 99

Supervisor : Prof. Dr. Belma ASLIM

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım için bana her türlü araştırma olanağını ve desteğini sağlayan ve her aşamada bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli tez danışmanım Prof. Dr. Belma ASLIM'a, tez çalışmam sırasında laboratuvarlarını kullanma imkânı sağlayan Karadeniz Teknik Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. İsmail Demir'e ve Doktora öğrencisi Dönüş Genç'er'e, laboratuvarında desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen Seda Şirin'e ve bugünlere gelmemde en sıkıntılı zamanlarda bile esirgemedikleri maddi, manevi desteklerini ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim başta annem Miyase Bekli ve babam Halil Bekli olmak üzere abilerim; Selçuk Bekli, Serdar Bekli, Serkan Bekli, ablalarım; Hidayet Bekli, Saliha Bekli, yeğenlerim; Berra Bekli, Çağan Alp Bekli, Halil Eymen Bekli, Yağmur Bekli, Arhan Alp Bekli ve yol arkadaşım Taha Berber'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2016-25 kodlu proje ile desteklenmiştir. Maddi desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Pektik Maddeler	3
2.2. Pektik Maddelerin Yapısı, Sınıflandırılması ve Adlandırılması	4
2.3. Pektinolitik Enzimler ve Sınıflandırılması	6
2.3.1. Protopektinazlar	6
2.3.2. Esterazlar	7
2.3.3. Depolimerazlar	7
2.3.4. Pektinin yan zincirini parçalayan enzimler	10
2.4. Pektinazların Endüstriyel Uygulamaları	13
2.4.1. Alkalın pektinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları	13
2.4.2. Asidik pektinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları	18
2.5. Farklı Organizmalardan Elde Edilmiş Pektat Liyaz Enziminin Stabilizasyon ve Karakterizasyonu ile İlgili Çalışmalar.....	19
2.6. PEL Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Çalışmalar.....	22
2.7. Farklı Organizmalardan Elde Edilen PEL Protein Moleküler Ağırlıkları	23
2.8. PEL Enziminin Klonlanma ve Klonlama Sonrası ile İlgili Çalışmalar.....	24

	Sayfa
2.9. Ticari Pektinazlar	25
3. MATERYAL VE METOD.....	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Araştırmada kullanılan organizmalar ve temini	27
3.2. Metod	28
3.2.1. Araştırmada kullanılan organizmaların moleküler düzeyde tanınlanması	28
3.2.2. Pektat liyaz enzim ekstraksiyonu ve protein miktar tayini	28
3.2.3. Enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	29
3.2.4. Pektat liyaz enziminin optimizasyonu	29
3.2.5. Pektat liyazın depolama stabilitesinin belirlenmesi.....	31
3.2.6. Pektat liyaz enziminin kısmi saflaştırılması	32
3.2.7. Pektat liyaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS- PAGE).....	32
3.2.8. PEL enzimin kodlayan geninin PCR ile çoğaltılması ve çoğaltılan genin belirlenmesi.....	34
3.2.9. PEL geninin klonlanması.....	36
3.2.10. Klonlama sonrası pektat liyaz proteininin Western i-Blot ile belirlenmesi.....	41
3.2.11. Klonlama sonrası karakterizasyon deneyleri.....	42
3.2.12. Rekombinant PEL BS6 (RPEL BS6) enzim ile meyve suyu berraklaştırma etkinlik testi.....	42
3.2.13. İstatiksel analiz.....	43
4. DENEYSEL BULGULAR	45
4.1. PEL Protein Miktar Tayini ve Enzim Aktivite Sonuçları	45
4.2. Araştırmada Kullanılan Mikroorganizmalar Moleküler Tanımlama Sonuçları..	46
4.3. Bakteri ve Mayalardan Elde Edilen PEL Enziminin Optimizasyonu	48
4.3.1. PEL enzim aktivitesine pH'nın etkisi.....	48

	Sayfa
4.3.2. PEL enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	49
4.3.3. PEL enzim aktivitesine substrat konsatrasyonunun etkisi	50
4.3.4. PEL enzim aktivitesine kimyasal ve metallerin etkisi.....	52
4.3.5. Reaksiyon süresinin etkisi	54
4.4. PEL Enziminin Klonlama Öncesi Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi	56
4.5. PEL Geninin Klonlama Sonuçları.....	56
4.5.1. PEL enzimini kodlayan genin belirlenmesi ve klonlanması	57
4.6. Klonlama Sonrası Rekombinant PEL BS6 Geninin Tanımlanması ve RPEL BS6 Enziminin Karakterizasyonu	62
4.6.1 Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi	62
4.6.2. Rekombinant PEL BS6 enzime pH'nın etkisi.....	63
4.6.3. Rekombinant PEL BS6 enzime sıcaklığın etkisi	64
4.6.4. Rekombinant PEL BS6 enzime subtrat konsatrasyonunun etkisi	65
4.6.5. Rekombinant PEL BS6 enzime çeşitli kimyasal ve metallerin etkisi ...	66
4.6.6. Rekombinant PEL BS6 enzime reaksiyon süresinin etkisi	68
4.7. Klonlama Sonrası PEL Proteininin SDS-Page ve Western Blot İle Belirlenmesi	68
4.8. Pektat Liyaz Ailesine Ait Dört Aminoasit Dizisinin CLUSTAL W İle Hizalanması	70
4.9. PEL BS6 Enziminin Klonlama Sonrası Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi.....	74
4.10. Klonlama Öncesi ve Sonrası PEL BS6 Enzim Aktivitesi Meyve Suyu Deneyleri.....	74
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	99

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı pektik maddelerin moleküler ağırlıkları	3
Çizelge 2.2. Bazı meyve ve sebzelerin pektin içeriği	3
Çizelge 2.3. Pektik bileşikler ve özellikleri	6
Çizelge 2.4. Pektinolitik enzimlerin ayrıntılı sınıflandırılması.....	12
Çizelge 2.5. Bazı liyazların biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri.....	21
Çizelge 2.6. Ticari pektinazlar	26
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve izolasyon kaynakları.....	27
Çizelge 3.2. Tasarlanan primerler	35
Çizelge 3.3. PEL geninin çoğaltılmasındaki PCR koşulları	36
Çizelge 3.4. pGEM-T Easy Vector ligasyon kontrol bileşenleri	39
Çizelge 3.5. pGEM-T Easy Vector kesim bileşenleri.....	39
Çizelge 3.6. PCR ürünü (PEL geni) kesim bileşenleri.....	40
Çizelge 4.1. Bakterileriyal ekstrasellüler PEL'lerin enzim ve spesifik enzim aktiviteleri	45
Çizelge 4.2. Mayaların PEL'lerinin enzim ve spesifik enzim aktiviteleri	46
Çizelge 4.3. Yüksek PEL aktivitesine sahip tanımlama sonuçları.....	47
Çizelge 4.4. <i>B. amyloliquefaciens</i> BS6'e ve <i>D. hansenii hansenii</i> M1'e ait ekstrasellüler PEL'e pH'nın etkisinin rölatif (%) aktivite olarak gösterimi	49
Çizelge 4.5. <i>B. amyloliquefaciens</i> BS6'dan ve <i>D. hansenii hansenii</i> M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL'in değişen sıcaklıklardaki rölatif enzim aktivitesi.....	50
Çizelge 4.6. <i>B. amyloliquefaciens</i> BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi	53
Çizelge 4.7. <i>D. hansenii hansenii</i> M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi	54
Çizelge 4.8. <i>B. amyloliquefaciens</i> BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine değişen reaksiyon süresinin etkisi	55

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. <i>D. hansenii hansenii</i> M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi	55
Çizelge 4.10. Rekombinant PEL BS6 enziminin protein miktarı, PEL enzim ve spesifik enzim aktivitesi (Units/mg)	63
Çizelge 4.11. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine değişen pH'nın etkisi	64
Çizelge 4.12. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi	65
Çizelge 4.13. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi..	67
Çizelge 4.14. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine değişen reaksiyon süresinin etkisi.....	68

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Pektinin yapısı	5
Şekil 2.2. Pektin-esteraz enziminin etki mekanizması	7
Şekil 2.3. Poligalakturonaz enziminin etki mekanizması	8
Şekil 2.4. Pektat-liyaz enziminin etki mekanizması	9
Şekil 2.5. Pektin-liyaz enziminin etki mekanizması.....	10
Şekil 2.6. Pektinazların hareket şekli: a) Poligalakturonazlar için R=H ve Polimetilgalakturonazlar için CH ₃ b) Pektin estrazlar c) Pektat liyaz için R=H ve Pektin liyaz için CH ₃	11
Şekil 3.1. Bovin Serum Albumin (BSA) protein standart eğrisi.....	29
Şekil 3.2. PEL BS6 geninin klonlanmasında vektörler ve kesim bölgeleri a: pGEM-T Easy Vector (Klonlama vektörü) ve b: Pet-20b(+) (Ekspresyon Vektörü) ve c: Pet-20b(+) T7 promotor, T7 Terminatör ve kesim bölgeleri.....	37
Şekil 4.1. Subtrat konsatrasyonunun <i>B. amyloliquefaciens</i> BS6'den elde edilen ekstrasellüler PEL enzim aktivitesine etkisi.....	51
Şekil 4.2. Subtrat konsatrasyonunun <i>D. hansenii hansenii</i> M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enzim aktivitesine etkisi.....	52
Şekil 4.3. PEL BS6 enziminin bir yıllık süreçteki depolama stabilitesi.....	56
Şekil 4.4. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine subtrat konsatrasyonunun etkisi.	66
Şekil 4.5. Rekombinant PEL BS6 rölatif enzim aktivitesine CaCl ₂ konsatrasyonunun etkisi	67
Şekil 4.6. Rekombinant PEL BS6 Enziminin 18 aylık süreçlerdeki depolama stabilitesi.....	74

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Enzim aktivitesi yüksek bazı bakterileri ve mayaların mikroskopik görüntüleri (100 X büyütme) a: <i>Bacillus pasteurii</i> , b: <i>B. amyloliquefaciens</i> , c: <i>D. hansenii hansenii</i> , d: <i>K. maxianus</i>	47
Resim 4.2. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 'den elde edilen PEL BS6 geninin PCR ile çoğaltılan agaroz jel görüntüsü M: Marker 1 kb DNA marker (Thermo scientific, SM031), a: PEL BS6 geni(~1600 bç).....	58
Resim 4.3. pGEMT Easy (Promega) Vektörüne klonlanan PEL BS6 gen bölgesinin BamHI ve Not I ile kontrol kesimi, M: Marker 1 kb DNA marker (Thermo scientific, SM031)	59
Resim 4.4. PEL BS6 geninin kesim bölgeleri a: PEL BS6 geninin Nebcutter programı ile belirlenen kesim bölgesi, b: PEL BS6 geninde bulunan BamHI kesim bölgesi ve gen başlangıç ve bitiş kodonu	60
Resim 4.5. Ekspresyon vektörü ve Ekspresyon vektörüne aktarılan BS6 geninin Kesim Kontrolü a: Ekspresyon vektörü olan Pet-20b(+) vektörünün kesim kontrolü, b: Ekspresyon vektörüne aktarılan BS6 geninin (insert) BamHI ve NotI ile kesimler yapılarak kontrolü, M: Marker 1 kb DNA marker (Thermo scientific, SM031).....	61
Resim 4.6. Alıcı hücre <i>E. coli</i> BL21 (DE3)'den izole edilen ekspresyon vektörünün (Pet-20b(+)) kontrol kesimi (Marker 1 kb)	62
Resim 4.7. Klonlama sonrası Rekombinant PEL proteininin SDS-page(a) BS6 ve Western i-Blot(b) görüntüsü (PEL proteinine ait tespit edilen bantın büyüklüğü 65,75 kDa'dır). M: Marker (Fermentas, 10-170 kDa)	69
Resim 4.8. RPEL BS6 proteininin 3D yapısı-Kalsiyum bağlanma bölgesi- α ve β katlanmaları (Program SWISS-MODEL)	70
Resim 4.9. RPEL BS6 gen dizi analizi: Mavi bölge: Tahmini ribozom bağlanma bölgesi, Sarı bölgeler: "TTG" başlangıç kodonu, "TAA" sonlandırma kodonu, Mor bölgeler: ters çevrilmiş tekrarlar (CGTCTTCA-TGAAGACG)	71
Resim 4.10. Pektat liyaz ailesine ait dört aminoasit dizisinin CLUSTAL W ile hizalanması Kırmızı:Kalsiyum Bağlanma Bölgesi, Gri:Konumları kısmi homoloji gösteren amino asitler, Mavi: Korunan katalitik kalıntılar	72
Resim 4.11. RPEL BS6 enzimimizin Ca^{+2} iyonu bağlanma bölgeleri (Asp 184, Asp 223 ve Asp 227: Program SWISS-MODEL)	73

Resim**Sayfa**

- Resim 4.12. Klonlama öncesi (BS6) ve klonlama sonrası (RPEL BS6) enzim aktivitesi meyve suyu berraklaştırma görüntüleri. A(Posalı portakal suyu) , B(Posalı elma suyu); 1-2-3 sırası ile; İşlem görmemiş meyve suyu, *B. amyloliquefaciens*’ den saflaştırılan enzim eklenen meyve suyu, Pel geni klonlanma sonrası saflaştırılmış enzim eklenmiş meyve suyu, C: Yüksek hacim posalı meyve suyu, D: Yüksek hacim RPEL BS6 ile muamele edilmiş portakal suyu..... 75



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
gr	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
°C	Santigrad
PEL	Pektat Liyaz Enzimi
PG	Poligalakturonaz
PGL	Pektat Liyaz
pH	Asitlik bazlık birimi
PL	Pektin Liyaz
PME	Pektin Metil Esteraz
PMG	Polimetil Galakturonaz
ppm	Milyonda bir
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

Amp	Ampisilin
APS	Amonyum Per Sülfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP/NBT	5-bromo, 4- kloro, 3-indol fosfat/nitro-mavi tetra zolium

Kısaltmalar**Açıklamalar****BSA**

Bovin Serum Albumin

Dak.

Dakika

DSMZ

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

Eliza

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Elisa)

IPTGIsopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside**LB brot**

Lysogeny Broth

NCBI

National Center for Biotechnology Information

PAE

Pektin Asetil Esteraz

PCR

Polimer Zincir Reaksiyonu

PEL

Pektat Liyaz

PVDF

poliviniliden florür

RG

Ramnogalakturonan

RPEL

Rekombinant Pektat Liyaz

SDS

Sodyum Dodesil Sülfat

TAE

Tris-Asetat-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

TCA

Trikloroasetik asit

TEMED

Tetramethylethylenediamine

Tübitak MAM

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi

XGA

Ksilogalakturonan

1. GİRİŞ

Toprak, pektini parçalayabilen mikroorganizmaların kaynağıdır. Bu mikroorganizmaların üç ana grubu, fungus, *Actinomycetes* ve diğer bakterilerdir. Pektini parçalayan enzimler *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Clostridium* gibi bakteriler tarafından üretilmektedirler. Pektini parçalayan diğer grup bakteriler ise *Micromonospora*, *Azotobacter* ve *Rhizobium*'lardır. Pektik maddeler yüksek bitkilerin hücre duvarlarından ekstrakte edilebilen kompleks heteropolisakkaritlerdir. Kısaca pektik enzimler denilen ve pektik maddelere etki eden ve grupta çok sayıda farklı enzim bulunmaktadır. Artık mikroorganizmalar ve pektinaz, ksilanaz, selülaz, mannaz, -galaktosidaz, lakkaz ve ligninaz gibi enzimleri içeren çevreyle daha dost biyoteknolojik prosesler bazı geleneksel kimyasal proseslerin yerine tercih edilmektedir. Dünya genelinde çeşitli araştırmacılar, mikroorganizmalar tarafından üretilen iyi bir biyolojik katalizör olan pektinaz enzimlerinin çeşitli endüstriyel proseslerde biyoteknolojik potansiyeline dikkat çekmektedir (Hoondal, Tiwari, Tewari, Dahiya ve Beg, 2002).

Pektinazlar, evde kullanılan ilk enzimler olmakla birlikte, ticari hayatta kullanımı 1930'larda şarap ve meyve suyu endüstrisi ile başlamıştır. 1960'lı yıllarda ise bilim insanlarının bitki dokusuna ait elde ettikleri veriler, enzimlerin endüstride daha verimli bir şekilde kullanımını sağlamıştır (Kashyap, Vohra ve Tewari, 2001). Pektinazların günümüzde, ticari sektörde oldukça yüksek düzeyde ve farklı alanlarda kullanımı mümkündür. 1995'te endüstriyel enzimlerin ulaştığı yıllık satış payı 1 milyar dolardır. Bu satış rakamının içinde pektinazların payı ise % 7,5 (75 milyon dolar) olarak belirlenmiştir. 2005'te ise toplam endüstriyel enzim payının yaklaşık olarak 1,7-2,0 milyar dolar olabileceği tahmin edilmiştir (Godfrey, Hyman, McMillan, Old ve Perombelon, 1994). Asidofilik pektinazların, meyve sularının ve şarabın ekstraksiyonu ve berraklaştırılması oldukça yaygın uygulamaları vardır. Alkali pektinazlar ise, tekstil ve bitki fiber işlenmesi, pektinli materyalleri içeren gıda işleme endüstrilerinden kaynaklanan atıksuların ilk arıtımında, çay ve kahve fermantasyonu ve yağ ekstraksiyonu gibi geleneksel endüstriyel proseslerde tercih edilmektedir. Pektini parçalayan mikroorganizmalar ve enzimler hakkındaki bilginin artması ile beraber alkali pektinazlar bitki virüslerinin saflaştırılmasında ve kâğıt yapımı vb. diğer biyoteknolojik proseslerde de dikkat çekmektedir.

Bu tez çalışmasında;

- ticari kullanım potansiyelinin daha da güçlendirilmesi Gıda endüstrisinde kullanılabilirliği bakımından, yeni yüksek pektat liyaz (PEL) üreticisi bir suş ve enzimin bulunması, bu enzimin saflaştırılması ve karakterizasyonu ticari üretim için klonlanarak rekombinant enzimin eldesi ve endüstriyel boyutta çalışmalar yapılması amaçlanmıştır.
- Çevresel kaynaklı mikroorganizmalar taranarak, yüksek ve stabil PEL aktivitesine sahip mikroorganizma bulunmuş, bu enzimin üreticisi mikorganizmadan, PEL enziminin genin klonlanarak rekombinant PEL enzimi elde edilmiştir. Rekombinant PEL enziminin, karakterizasyon ve biyoinformatik sonuçları, literatürdeki ve gen bankasındaki tanımlanmış mevcut PEL enzimleri ile karşılaştırılmış ve yeni bir Pektat Liyaz (PEL) enzimi olup olmadığı ortaya konulmaya çalışılmıştır.
- Bu çalışmada, gıda endüstrisinde ve yem endüstrisinde daha verimli ürün elde edebilmek için, yüksek aktiviteye sahip, geniş pH ve sıcaklıkta aktivitesini koruyacak mikrobiyal kaynaklı yeni PEL elde edilmesi hedeflenmiştir.
- Çalışmalarda elde edilecek PEL enzimi ile bitkisel kaynaklarda bulunan pektik-oligosakkaritlerden oligosakkarit bakımından zenginleştirilmiş fonksiyonel gıdaların ve yeni prebiyotik ürünlerin geliştirilmesinde kullanımı düşünülmektedir. Ayrıca, buradan elde edilen PEL enzimi ile prebiyotik açıdan zengin fonksiyonel hayvan yemi geliştirmekte mümkün olabilecektir. Bu enzimin yukarıda belirtilen amaçla kullanımı da ikincil hedef olabilir.
- Mevcut enzimlerden farklı özelliklere sahip olan PEL enziminin farklı uygulama alanlarında kullanımı mümkün olabilecektir. Pektinli gıda atıklarının geri dönüştürülmesi hatta bu geri dönüşüm ile elde edilecek olan yeni ürünlerin de diğer teknolojilerde kullanılabilir hale getirilmesi sağlanabilecektir. Aynı zamanda pektinli atıkların parçalanarak, temiz enerji eldesinde kullanımı mümkün olacaktır.
- Ayrıca, gıda sektöründe berraklaştırmada daha etkin olabilecek, yeni bir PEL enziminin bulunması ve bu enzimin işlevsel gıda ürünlerinin geliştirme potansiyelinin olması hedeflenmiştir.
- Yapılan bu araştırmada enzim aktivitesi yüksek PEL enziminin, raf ömrünün uzun olması ve klonlanarak rekombinant olarak elde edilebilmesi ile hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Pektik Maddeler

Pektik maddeler, pektin parçalayan enzimler tarafından etkilenen bileşikler için kullanılmış kapsamlı bir sınıflandırmadır. Pektin, bitkilerin primer hücre duvarında bulunan yapısal bir heteropolisakkarittir. Pektinler kompleks glikosidik polisakkarit yapıda, asidik yüksek moleküler ağırlıklı ve negatif yüklüdürler. Hücreler arasında orta lamellanın kalsiyum-pektat ve magnezyum-pektat formunda önemli bileşenidir (Marquez, Zavala-Paramo, Lopez-Romero, ve Camacho, 2011). Pektik maddelerin, proteinler, yağlar ve nükleik asitler gibi belirli bir molekül ağırlığı yoktur. Pektik maddelerin moleküler ağırlıkları 25-360 kDa aralığında değişebilmektedir. Bazı pektik maddelerin moleküler ağırlıkları Çizelge 2.1.' de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı pektik maddelerin moleküler ağırlıkları (Jayani, Saxena ve Gupta, 2005)

Kaynak	Moleküler Ağırlık (kDa)
Elma ve Limon	200-360
Armut ve Kuru Erik	25-35
Portakal	40-50
Şeker pancarı küspesi	40-50
Elma ve Limon	200-360

Pektinler meyve ve sebzelerin, teknolojik açıdan en önemli polisakkaritleridir. Meyvelerde pektin miktarı ise % 0,5-4,0 arasında değişmektedir. Bazı meyve ve sebzelerin pektin içeriği Çizelge 2.2.' de verilmiştir.

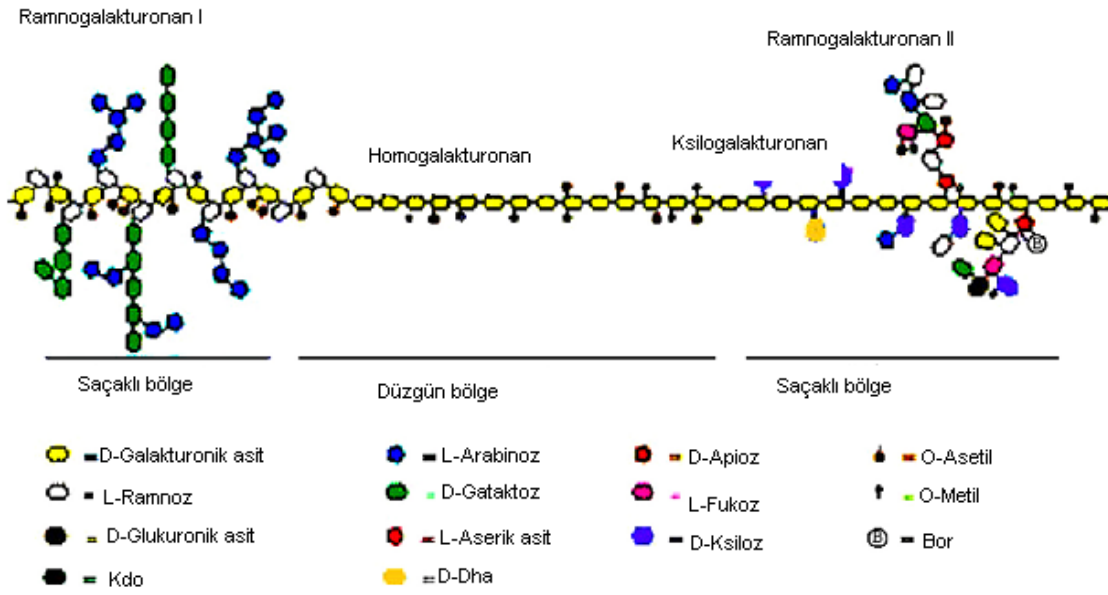
Çizelge 2.2. Bazı meyve ve sebzelerin pektin içeriği (Jayani ve diğerleri, 2005)

Meyve	Doku	Pektin, %
Elma	Taze	0,5-1,6
Muz	Taze	0,7-1,2
Şeftali	Taze	0,1-0,9
Çilek	Taze	0,6-0,7
Kiraz	Taze	0,2-0,5
Bezelye	Taze	0,9-1,4
Havuç	Kuru Madde	6,9-18,6
Portakal kabuğu	Kuru Madde	12,4-28,0
Patates	Kuru Madde	1,8-3,3
Domates	Kuru Madde	2,4-4,6

Pektin genellikle endüstriyel olarak turunçgil meyveleri ve elma posasından elde edilir. Asit ekstraksiyonu ile ham maddedeki protopektin çözünür hale getirilir ve sonrasında izopropil alkol ile çözünür pektin sulu çözeltiden ayrılır. Pektin ticari olarak sıvı veya kurutulmuş toz halde bulunur (Acar ve Gökmen, 2004).

2.2. Pektik Maddelerin Yapısı, Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Pektik maddeler rhamnogalakturnanlardan ve galakturonanlar oluşur. Rhamnogalakturnanlardan ve galakturonanlar galaktozun C-6 karbonu, bir karboksil grubuna, arabinanlara ve arabinogalakturnanlara oksitlenir. Galakturonanlar ve rhamnogalakturnanlar çoğunlukla bir anhidrogalakturnonik asit birimi kırılmasından meydana gelen bir grup kompleks kolloidal polimerik maddelerdir (Şekil 2.1.). Galakturonik asidin karboksil grupları ya kısmen metil grupları ile esterleşmiştir ya da kısmen veya tamamen Na^+ , K^+ , NH_4^+ iyonları ile nötralize edilmiş olarak bulunur. Tek çenekli bitkilerin primer hücre duvarının yaklaşık olarak % 35'i pektindir. Sekonder duvarda ise pektin içeriği önemli derecede azalmaktadır. Ancak pektin, hem primer hem de sekonder hücre duvarının yapısında ve fonksiyonunda önemli role sahiptir. Hücre duvarında bulunan pektinin; hücre duvarının yapısını oluşturma, bitkinin büyüme ve gelişmesi, tohumlara su katma, yaprak dökülmesi ve meyvenin gelişmesi, hücre adezyonu, selüler büyüme, savunma, iyon bağlama gibi görevleri bulunmaktadır (Marquez ve diğerleri, 2011). Omurga zincirine modifikasyonlarına bağlı olarak pektin, pektik maddeler pektik asit, protopektin, pektinik asit olarak sınıflandırılabilirler (Be Miller, 1986).



Şekil 2.1. Pektinin yapısı (Yadav ve diğerleri, 2009)

Protopektin: Esası pektik maddedir. Pektinin veya pektinik asitin hidroliz verimini sınırlandırır. Bitki dokularında bulunan suda çözünmeyen pektik maddeleri tanımlamak için protopektin kavramı kullanılır ve protopektinlerden çözünen pektik maddeler oluşturulur (Be Miller, 1986).

Pektik asit: Suda çözünebilir galakturonan polimeri olup, ihmal edilebilir miktarda metoksil grupları içeren, pektik asit tuzları veya pektik asitler, pektatlar olarak adlandırılır.

Pektinik asitler: Pektinik asitin eğer metil içeriği düşük ise, kalsiyum tuzları gibi diğer bileşiklerle veya şeker ve asit ile jel oluşturabilir. Çeşitli miktarda metoksil grupları içeren galakturonanlar, pektinik asitin normal veya asit tuzlarıdır (Be Miller, 1986).

Pektinler: Diğer yapısal polisakkarit ve proteinlerle bir araya gelerek çözünmeyen protopektini oluşturan pektinin, doğal formu hücre duvarında yer alır (Be Miller, 1986). Olgunlaşmamış meyvelerde, hücre duvarında pektin selüloz mikrofibrillere bağlı bulunur. Bu pektin suda çözünmez ve böylelikle hücre duvarının sertliğini sağlamış olur.

Çizelge 2.3. Pektik bileşikler ve özellikleri (Ekşi, 1988)

Bileşik adı	Özelligi
Pektik asit (poligalakturonik asit)	Esterleşmemiş galakturonik asit birimlerinden oluşan pektik asit, asit formda suda çözünmez ancak kısmen nötralizasyondan sonra suda çözünür ve Ca^{+2} ile jel oluşturur.
Pektat	Pektik asitin nötral veya asidik tuzları pektatları oluşturur. Çok az sayıda metoksil grubu içerir. (Na-pektat suda çözünebilir fakat Ca-pektat suda çözünmemektedir.)
Pektin	Pektinler, kısmen veya tümüyle metil alkolde esterleşmiş poligalakturonik asitlerdir. Metoksil grubu sayısı (esterleşme derecesi) ve polimerizasyon derecesine bağlı olarak özellikleri değişebilmektedir.
Pektinat	Düşük veya yüksek esterleşme oranı içeren pektinin tuzudur. Pektinatlarda, metoksil grupları da bulunur.
Protopektin	Pektinin zincirleri, esterleşmemiş $-COOH$ grupları üzerinden birbirine metal iyonu (Mg, Ca) ile bağlanması ile oluşan pektik ilişkilerdir. Fosforik asit üzerinden kısıtlı sayıda ester köprüsü içeren yapısına doğal pektin denilmekte ve suda çözünmemektedir.
Pektin türevleri	Poligalakturonik asit zincirine asetil vb. gibi özel grupların bağlanması ile pektinin türevleri oluşur.

2.3. Pektinolitik Enzimler ve Sınıflandırılması

Pektik maddeleri parçalayan enzimler, pektinolitik enzimler olarak tanımlanır. Pektinolitik enzimler 4 ana gruba ayrılır (Palomaki ve Saarilahti, 1997; Pedrolli, Monteiro, Gomes ve Carmona, 2009).

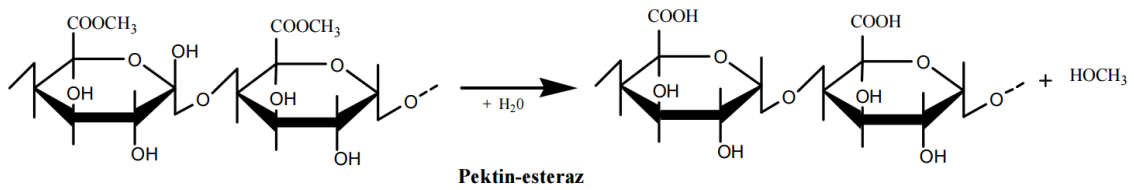
2.3.1. Protopektinazlar

Protopektinazlar çözünmeyen protopektini parçalayabilirler (degrade edebilirler) ve bunun sonucunda yüksek derecede polimerize çözünür pektin oluştururlar (Alkorta, Garbisu, Llama ve Serra, 1998; Kashyap ve diğerleri, 2001). Protopektini parçalayan protopektinazlar 2 tip olarak sınıflandırılırlar. A Tipi protopektinaz, protopektinin poligalakturonik asit bölgesine etki ederken, B Tipi protopektinaz, poligalakturonik asit

zinciri ve hücre duvarı bileşenleri ile bağlantılı polisakkarit zincirine etki eder (Sakai, Sakamoto ve Hallaert, 1993).

2.3.2. Esterazlar

Esterazlar, pektinin de-esterifikasyonunu metoksi esterlerinin uzaklaştırılması yoluyla sağlarlar. Esterazlar, pektin metil esteraz (PME) ve pektin asetil esteraz (PAE) olarak iki gruba ayrılır.



Şekil 2.2. Pektin-esteraz enziminin etki mekanizması (Yener, 2007)

Pektin metil esterazlar (PME)

Pektin metil esterazlar, pektinin metoksil gruplarının de-esterifikasyonunu katalizleyerek pektik asit ve metanol oluşturur. Enzim tercihen, esterifiye olmamış galakturonat ünitelerinin yanındaki metil ester grupları üzerine etki eder (Kashyap ve diğerleri, 2001).

Pektin asetil esterazlar (PAE)

Pektin asetil esteraz (E.C 3.1.1.-), pektinin asetil esterlerini hidrolizleyerek pektik asit ve asetat oluşumunu sağlar (Shevchik ve Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997).

2.3.3. Depolimerazlar

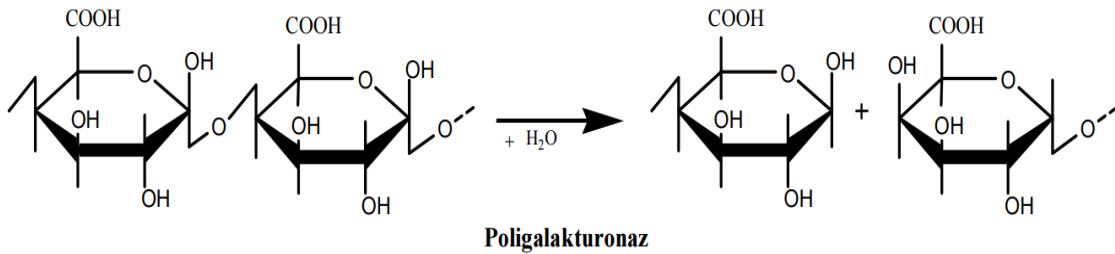
Pektik maddelerin D-galakturonik asit parçalarındaki α -(1-4) glikozidik bağlarının hidrolitik kırılmasını sağlar. Depolimerazlar, polimetil galakturonaz (PMG), poligalakturonaz (PG), pektat liyaz (PGL) ve pektin liyazlardır (PL).

Polimetilgalakturonazlar (PMG)

Polimetil galakturonaz (PMG), pektin omurgasında bulunan α -1,4 glikozidik bağın hidrolitik kırılmasını sağlar. Polimetilgalakturonazlar substrat olarak esterleşme oranı yüksek pektini tercih eder ve 6-metil D-galakturonat oluşurlar (Jayani ve diğerleri, 2005).

Poligalakturonazlar (PG)

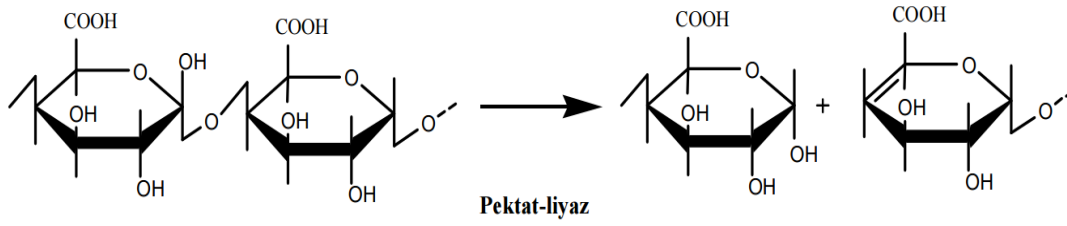
Poligalakturonazlar (PG), poligalakturonik asitteki α -1,4-glikozidik bağların hidrolizini katalizleyerek D-galakturonat oluştururlar (Jayani ve diğerleri, 2005). Hidrolaz enzimlerinin 2 grubu (PMG, PG) endo ve ekzo şeklinde etki edebilirler. Endo-polimetil galakturonaz ve endo-poligalakturonaz (3.2.1.15), substrat üzerinde rastgele kırılma meydana getirirken, Ekzo-polimetil galakturonaz ve ekzo-poligalakturonaz (E.C 3.2.1.67) substratın indirgen olmayan ucundan hidrolitik kırılmayı sağlar (Rombouts ve Pilnik, 1980; Kashyap ve diğerleri, 2001). Nötral veya asidik ortamda daha aktif olan hidrolazlar genel olarak funguslar tarafından üretilir ve 40-60 °C arasındaki sıcaklıklarda daha iyi aktivite gösterebilirler.



Şekil 2.3. Poligalakturonaz enziminin etki mekanizması (Yener, 2007)

Pektat liyazlar (PEL)

Pektat liyazlar genel olarak poligalakturonik asit üzerindeki glikozidik köprüleri transeliminasyon reaksiyonlarıyla kırar ve reaksiyon sonucunda doymamış Δ 4,5 –D-galakturonat birimleri oluşur. Pektat liyazlar ayrıca poligalakturonat liyaz olarak da adlandırılabilirler. Poligalakturonat liyazın Ca^{+2} iyonlarına ihtiyacı vardır. Bu yüzden etilen diammin tetra asetik asit (EDTA) şelatlayıcı ajanı tarafından güçlü şekilde inhibe edilir. Pektat liyazlar endo-PGL (E.C 4.2.2.2) ve ekzo-PGL (4.2.2.9) olarak sınıflandırılırlar ve endo-PGL (PEL) rastgele substrata etki ederken, ekzo-PGL(PEL) indirgen olmayan uçtan substratın kırılmasını sağlar (Rombouts ve Pilnik, 1980; Pitt,1988).

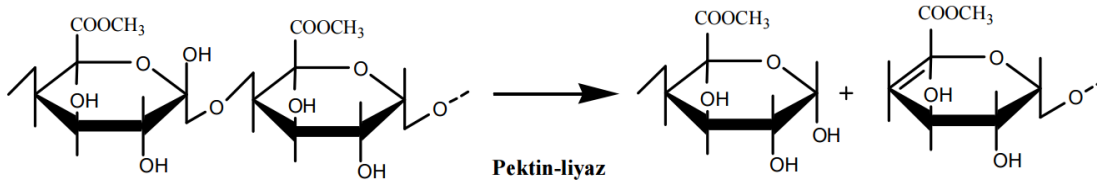


Şekil 2.4. Pektat-liyaz enziminin etki mekanizması (Yener, 2007)

Pektin liyazlar (PL)

Pektin liyaz, genellikle yüksek esterifiye pektinin rastgele kırılmasını sağlarlar. Pektin liyazlar, glikozidik köprülerin transeliminasyonu ile doymamış metil oligogalakturonat oluşturur. Bugüne kadar tanımlanan tüm pektin liyazlar endo-Pektin liyaz grubundandır (E.C 4.2.2.10) (Sinitsyna, Federov ve Semenova, 2007). Pektin omurgasına etki eden pektinolitik enzimlerin etki mekanizması Şekil 2.6'da verilmiştir (Jayani ve diğerleri, 2005).

Fungustan elde edilen liyazlar asidik ve nötr ortamda optimum aktivite göstermekteyken, bakteriden elde edilen liyazlar alkalik ortamda daha iyi aktivite gösterirler (Pedrolli ve diğerleri, 2009). Pektin substratının tamamen parçalanabilmesi için ramnogalakturonan zincirini kıran enzimlere gerek duyulur (Pedrolli ve diğerleri, 2009). Ramnogalakturonan ramnohidrolazlar (RG ramnohidrolazlar): RG ramnohidrolaz, ramnogalakturonan α -L-ramnopiranohidrolaz veya α -L-ramnosidaz (E.C 3.2.1.40) adları ile de bilinir. Bu enzimler indirgeyici olmayan uçtan ramnogalakturonan zincirinin hidrolitik kırılmasını sağlar (Mutter, Beldman, Schols ve Voragen, 1994). Ramnogalakturonan galakturonohidrolazlar (RG galakturonohidrolaz): Ramnogalakturonan galakturonohidrolaz (E.C 3.2.1.-), indirgeyici olmayan uçtan, ramnogalakturonan zincirinin hidrolitik parçalanmasını sağlar ve sonuçta monogalakturonat oluşumunu sağlar (Mutter, Renard, Beldman ve Schols, 1998).



Şekil 2.5. Pektin-lyaz enziminin etki mekanizması (Yener, 2007)

2.3.4. Pektinin yan zincirini parçalayan enzimler

Pektinin yan zincirini parçalayan enzimler, pektinin ramnogalakturonan I ve II yan zincirlerine etki ederler. Bu enzimler; ramnogalakturonan ramnohidrolazlar (RG ramnohidrolazlar), ramnogalakturonan galakturonohidrolazlar (RG galakturonohidrolaz), ramnogalakturonan hidrolazlar (RG hidrolazlar), ramnogalakturonan liyazlar (RG liyazlar), ramnogalakturonan asetilesterazlar (RG asetilesterazlar), ksilogalakturonan hidrolazlar (XGA hidrolazlar)'dır.

Ramnogalakturonan hidrolazlar (RG hidrolazlar)

Ramnogalakturonan hidrolazlar ramnogalakturonan zincirinin rastgele hidrolizini katalizleyerek oligogalakturonat birimlerinin oluşumunu sağlar (Mutter ve diğerleri, 1998).

Ramnogalakturonan liyazlar (RG liyazlar)

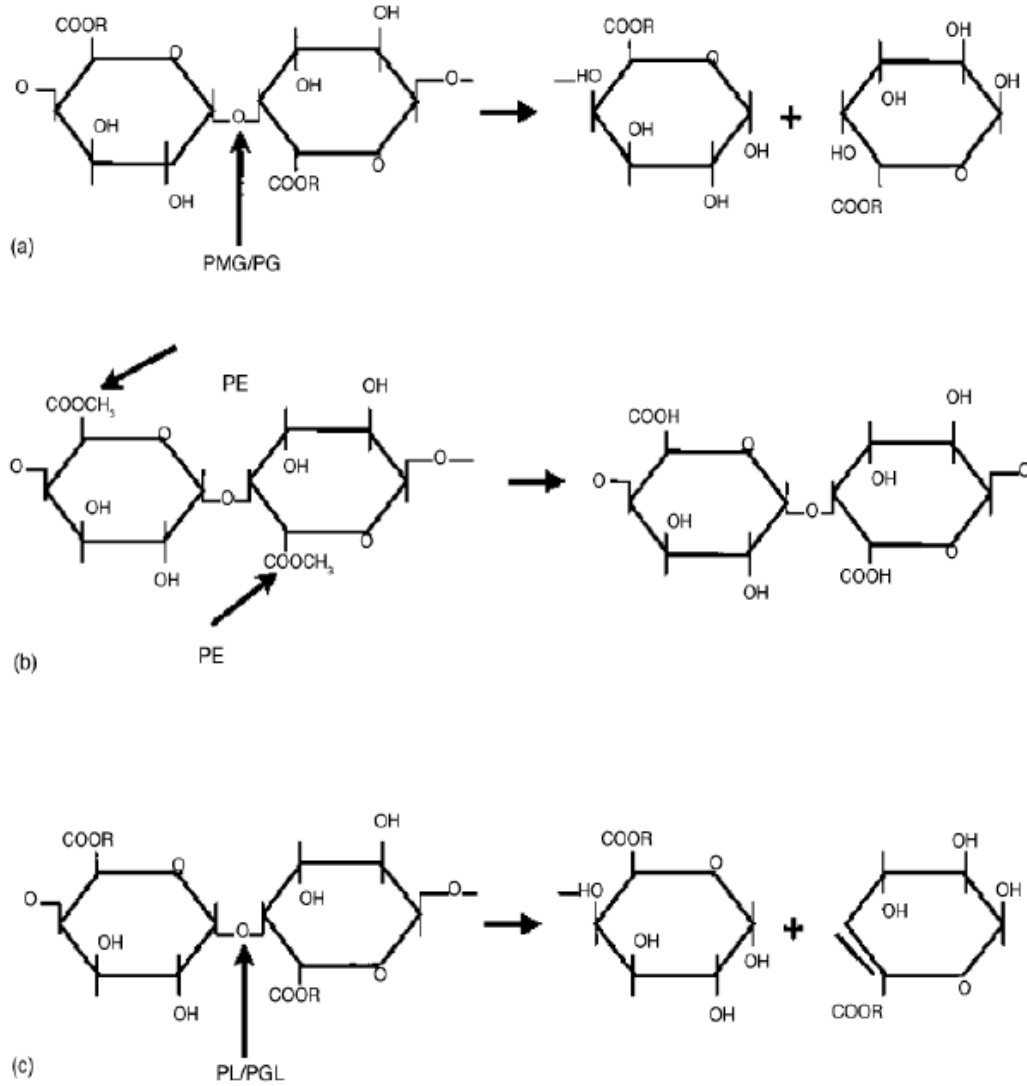
Ramnogalakturonan liyazlar (E.C 4.2.2.-), ramnogalakturonan zincirinde bulunan ramnoz-galakturonat köprüsünün rastgele transeliminasyonunu sağlar (Mutter, Colguhoun, Schols, Beldman ve Voragen, 1996).

Ramnogalakturonan asetilesterazlar (RG asetilesterazlar)

Ramnogalakturonan asetilesterazlar (E.C 3.1.1.-), ramnogalakturonan zincirinde bulunan asetil gruplarının hidrolitik kırılmasını sağlar (Searle-Van Leeuwen, Lam, Schols, Beldman ve Voragen, 1992).

Ksilogalakturnan hidrolazlar (XGA hidrolazlar)

Ksilogalakturnaz (E.C 3.2.1.-), ramnogalakturnan zincirinde bulunan iki galakturonat zinciri arasındaki glikozidik köprünün hidrolitik kırılmasını sağlayarak, ksiloz-galakturnat dimerlerini oluşturur (Vlugt-Bergmans, Meeuwsen, Voragen ve Van Ooyen, 2000).



Şekil 2.6. Pektinazların hareket şekli: a) Poligalakturnazlar için $R=H$ ve Polimetilgalakturnazlar için CH_3 b) Pektin estrazlar c) Pektat liyaz için $R=H$ ve Pektin liyaz için CH_3 (Jayani ve diğerleri 2005)

Çizelge 2.4. Pektinolitik enzimlerin ayrıntılı sınıflandırılması (Jayani ve diğerleri, 2005)

Enzim	E.C. no.	Modifiye EC sistematik adı	Hareket mekanizması	Hareket yolu	Birincil substrat	Ürün
Esteraz						
Pektin metil esteraz	3.1.1.11		Hidroliz	Rasgele	Pektin	Pektik asit + metanol
Depolimerize enzimler						
a. Hidrolazlar						
1. Protopektinaz			Hidroliz	Rasgele	Propektin	Pektin
2. Endopoligalakturonaz	3.2.1.15	Poly-(1-4)-a-D-galactosiduronate glycanohydrolase	Hidroliz	Rasgele	Pektik asit	Oligogalakturonaz
3. Ekzopoligalakturonaz	3.2.1.67	Poly-(1-4)-a-D-galactosiduronate glycanohydrolase	Hidroliz	Terminal	Pektik asit	Monogalakturonaz
4. Ekzopoligalakturonan digalakturon hidrolaz	3.2.1.82	Poly-(1-4)-a-D-galactosiduronate digalacturonohydrolase	Hidroliz	Sondan bir Önceki tahviller	Pektik asit	Digalakturonaz
5. Oligalakturonat hidrolaz			Hidroliz	Terminal	Trigalakturonat	Monogalakturonaz
6. D4:5 Doymamış Oligalakturonat hidrolaz			Hidroliz	Terminal	D4:5(Galacturonate) _n	Doymamış mono galakturonaz & doymuş (n-1)
7. Endopolimetil galakturonaz			Hidroliz	Rasgele	Yüksek ölçüde esterifiye edilmiş pektin	Oligometilgalakturonaz
8. Endopolimetil galakturonaz			Hidroliz	Terminal	Yüksek ölçüde esterifiye edilmiş pektin	Oligogalakturonaz
b. Liyazlar						
1. Endopoligalakturonaz liyaz	4.2.2.2	Poly-(1-4)-a-D-galactosiduronate lyase	Trans eliminasyon	Rasgele	Pektik asit	Doymamış Oligogalakturonaz
2. Ekzopoligalakturonaz liyaz	4.2.2.9	Poly-(1-4)-a-D-galactosiduronate exolyase	Trans eliminasyon	Sondan bir Önceki bağ	Pektik asit	Doymamış digalakturonaz
3. Oligo-D-galaktosiduronat liyaz	4.2.2.6	Oligo-D-galactosiduronate lyase	Trans eliminasyon	Terminal	Doymamış galakturonat	Doymamış mono galakturonaz
4. Endopolimetil-D-galaktosiduronat Liyaz	4.2.2.10	Poly(methyl galactosiduronate) lyase	Trans eliminasyon	Rasgele	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonaz)	Doymamış metil oligogalakturonaz
5. Ekzopolimetil-D-galaktosiduronat Liyaz			Trans eliminasyon	Terminal	Doymamış poli-(metil-D-digalakturonaz)	Doymamış metil monogalakturonaz

2.4. Pektinazların Endüstriyel Uygulamaları

Pek çok gıda maddesinin oluşumunda ve elde edilmesinde enzimlerin rol oynadığı çok uzun yıllardan bu yana kullanılmaktadır. Fakat 1930’larda pektinaz enziminin meyve suyu endüstrisinde kullanılmaya başlanmasıyla enzimlerin gıda sanayiinde kullanımı artmış bu konuda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Pektinazlar, genç bitki hücre duvarlarının orta lamel ve birinci hücre duvarında bulunan kompleks yapıdaki, uzun yapısal polisakkaritlerin (pektin) parçalamasından sorumlu enzimlerdir. Çevre dostu proseslerin endüstride kullanımının tercih edilmesi de enzimlerin endüstride kullanımını artırmaktadır (Kashyap ve diğerleri, 2001). Pektinazlar, atık suların temizlenmesinde, hayvan yemlerinde, lifli ürünlerin işlenme sürecinde, tekstil endüstrisinde, yağ ekstraksiyonunda, protoplast elde edilmesinde, bitki dokularının yumuşatılmasında, çay ve kahvenin oksidasyon sürecinin hızlandırılmasında, kâğıt yapımında, meyve suyu, sirke ve şarap üretiminde yaygın olarak tercih edilmektedir (Kashyap ve diğerleri, 2001).

Pektinazlar, tekstil ve meyve endüstrilerinin gelecek vaadeden enzimlerinden birisidir. Asidik pektinazların rolü meyve sularının bulanıklığının ve sertliğinin giderilmesi üzerine iken, alkalik pektinazların rolü ise tekstil endüstrisinde kâğıt ve kâğıt hamuru eldesinde, kahve ve çay fermentasyonu, yağ ekstraksiyonu fiberli ürünlerin zamksızlaştırılması ve havuzlanması ve pektik atık sulara muamele gibi bir çok endüstriyel kullanım alanı mevcuttur (Kashyap, Chandra, Kaul ve Tewari, 2000).

2.4.1. Alkalik pektinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları

Alkalik pektinazlar genel olarak, çay ve kahve fermentasyonu, pektinli endüstriyel atık suların arıtılması, tekstil ve bitki lif prosesleri, yağ ekstraksiyonu, gibi birçok endüstriyel proseste kullanılmakta olup, pektini parçalayan mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin özelliklerinin daha iyi anlaşılmasıyla alkalik pektinazlar bitki virüslerinin saflaştırılması, kâğıt yapımı gibi diğer birçok biyoteknolojik proseste de yer almaya başlamıştır (Kashyap ve diğerleri, 2001).

Doğada, iyi karakterize edilmiş birçok alkalik pektinazın *Bacillus* ve *Pseudomonas* (Hoondal ve diğerleri, 2002) cinsine ait olduğu araştırılmıştır (Zhuge, Du, Shen, Zhuge ve Chen, 2008; Hoondal ve diğerleri, 2002; Le Man, Behera ve Park, 2010). Alkali

pektinazlar, gıda işleme endüstrilerinden kaynaklanan pektinli atıksuların ilk muamelesinde, tekstil ve bitki liflerinin işlenmesi, çay ve kahve fermantasyonu ve yağ ekstraksiyonu gibi çeşitli geleneksel endüstriyel uygulamalarda kullanıldığı bilinmektedir. Aşağıda pektolitik enzimlerin bazı klasik ve yeni uygulamaları ele alınmıştır ve sınıflandırılmıştır (Hoondal ve diğerleri, 2002).

Pektinazların tekstil işleme ve pamuk liflerinin parlatılmasında kullanımı

Hem çevresel açıdan hem de ürün kalitesi açısından, tekstil üretiminde enzimlerin kullanımı, oldukça yararlı sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Kumaş üretiminde ipliklerin sağlamolması sağlamak için kumaş iplikleri dokumadan işleminden önce kola ajanları ile muamele edilmektedir. Düşük maliyeti, kolay elde edilebilirliği ve iyi film tabakası oluşturmamasından dolayı nişasta pamuk kumaş üretiminde, temel kola ajanı olarak kullanılmıştır. Kullanılan bu ajanlar ve iplikte bulunan selüloz olmayan maddelerin kumaş boyanmadan hemen önce iplikten ayrıştırılması gerekmektedir. Geleneksel uygulamalarda biyoteknolojik enzimler yerine yüksek sıcaklıklarda aşındırıcı özellikte olan sodalar kullanılmaktaydı. Bu yöntem, hem pamuğun doğal yumuşak dokusuna zarar vermekte olup hem de uzaklaştırılmak istenen materyallerden tamamen uzaklaştırılamaması sebebi ile etkili sonuç vermemektedir (Hoondal ve diğerleri, 2002). Geleneksel prosesler yerine amilaz, lipaz, selulaz ve diğer hemi selülotik enzimler ile birlikte pektinaz gibi enzimlerin kullanılmaya başlanması ile tekstil endüstrisinde çevreye atık kimyasalların deşarjını azaltmakta ve fabrika ürün kalitesini iyileştirilmektedir (Arunachalam ve Asha, 2010). Biyoparlatma uygulaması lifden selülozik olmayan maddelerin giderimi için kullanılan bir proses olup pektinazlarda selüloz degradasyonunda hiçbir yan etki olmaksızın bu amaç için kullanılabilir (Jayani ve diğerleri, 2005; Wang, Fan, Hua, Gao ve Chen, 2007).

Pektinazların bitki liflerinin zamksızlaştırılmasında kullanımı

Bitki dokusu, daha yumuşak ve parlak hale getirmek için zamksızlaştırma denilen işleme tabii tutulur. Bu nedenle serisini uzaklaştırılan lifler bu yabancı maddelerden arındırılırlar (Duran ve diğerleri, 2003). Pektinolitik enzimlerin en çok kullanıldığı yer ise kenevir, hint keneviri, keten, çin keneviri, kendir gibi bitki fiberlerinin zamksızlaştırıldığı uygulamalardır (Bruhlmann, Kim, Zimmerman ve Fiechter, 1994). Uygulanan bu enzimatik proses sonrasında fibere hiçbir zarar verilmemekte ve bunun yanı sıra uygulanan bu proses çevreye zarar vermemektedir (Gurucharanam ve Deshpande, 1986).

Pektinazların bitki liflerinin havuzlanması

Keten lifleri yüksek oranda selüloz, hemiselüloz ve pektin içermektedir. Havuzlama sırasında hemi-selülozik ve pektinolitik yapıların uzaklaştırılması esas alınmıştır. Yapılan bu havuzlama işleminin amacı, selüloz liflerini onları çevreleyen dokulardan ayırmaktır. Liflerin serbest bırakılabilmesi işlemi ya mikroorganizmaların bitki gövdesinin içerisine nüfuz etmesiyle ya da enzimatik işlemler ile lif yığınlarını birbirine bağlayan pektik maddelerin suda çözünebilen basit bileşiklere dönüşümü ile sağlanabilir (Pallesen, 1996).

Havuzlama bir çok prosesle kimyasal ya da enzimatik olarak yapılabilmektedir (Körlü ve Bozacı, 2006). Anaerobik bakterilerle fermentasyon esasına dayanan suda havuzlama yöntemi ile yüksek lif kalitesi elde edilmesine karşın, yüksek miktarda çevresel atıklara sebep olduğu için, batılı ülkelerde yıllarca önce bu uygulamadan vazgeçilmiştir (Körlü ve Bozacı, 2006). Fiberleri ayırmak ve pektini ortamdan uzaklaştırabilmek için hint kenevirinin ve ketenin havuzlanmasında pektinazlar kullanılır. Enzimatik proses seçilerek daha yüksek verim aynı zamanda daha az çevresel kirlilik ile endüstriyel proses uygulanabilmektedir (Hoondal ve diğerleri, 2002).

Pektinazların pektik atık suların arıtımında kullanımı

Sebze gıda işleme endüstrileri atık sularında yan ürün olarak pektin ortama deşarj edilmektedir. Pektik malzemenin uzaklaştırılması ve aktif çamur muamelesiyle bozunmaya elverişli hale getirilmesi, deşarj edilen atıksuyun pektinolitik enzimlerle ön işleme tabi tutulması kolaylaştırılmaktadır (Hoondal ve diğerleri, 2002). Geleneksel olarak, kimyasal koagülasyon, fiziksel susuzlaştırma, pektik maddeleri içeren narenciye işleme sanayilerinden gelen atıksuyun arıtılması, aktif çamur muamelesi ve metan oluşumuna neden olan kimyasal hidroliz dâhil olmak üzere birden fazla aşamada atık su arıtım prosesi uygulanır. Bu kimyasalların çevre kirliliğine ek olarak daha uzun muamele süreleri gibi birçok dezavantaja sahiptir. Böylece pektik maddeleri atık sudan seçerek uzaklaştıran bakterilerden gelen pektinazların kullanılması alternatif uygun maliyetli ve çevre dostu bir yöntem olarak tercih edilmektedir. Sebze gıda işleme endüstrilerinden pektik atık suyun alkalın pektinaz, pektinli materyalin uzaklaştırılmasını hızlandırır ve aktif hale getirilmiş çamur ile parçalanmaya hazır hale getirilir (Horikoshi 1990; Tanabe, Yoshihara, Tamura, Kobayashi ve Akamatsu, 1987; Tanabe, Kobayashi ve Akamatsu, 1988). Alkalofilik bir

toprak izolatu olan *Bacillus* sp. GIR 621' ye ait ekstraselüler pektat liyaz (optimal şekilde pH 10,0'da aktiftir) endüstriyel atık sudaki pektik maddelerin giderimi için etkili bir şekilde kullanılmış ve başarılı olmuştur (Tanabe ve diğerleri, 1987).

Pektinazların kahve ve çay fermantasyonunda kullanımı

Çayın pektinaz ile muamelesi, pektinleri yok ederek çay fermantasyonunu hızlandırır ve ayrıca çay tozlarının anlık köpük oluşturmalarını engeller (Carr, 1985). Pektinolitik mikroorganizmalardan elde edilen enzimler kahve çekirdeklerinde bulunan yapışkan müsilaj tabakanın çıkarılmasında kullanılmaktadır. Pektinazlar bazen de yumuşak yapıdaki fasulye tabakasını (pektik maddelerden oluşan) çıkarmak için kullanılabilmektedir. Selüloz ve hemiselüloz, enzim preparatlarının sindirimdeki rolünün artırılması için kullanılabilir (Carr 1985; Godfrey 1985).

Fungal pektinazlar çay işletmelerinde kullanılmakta ve fungal pektinazlar ile muamele çayın fermantasyonunu hızlandırmaktadır (Kashyap ve diğerleri, 2001). Çayda bulunan pektinlerin parçalanması sonucu oluşacak çay tozlarının köpük oluşturma ihtimalini de önlemektedir (Kashyap ve diğerleri, 2001; Hoondal ve diğerleri, 2002; Jayani ve diğerleri, 2005).

Pektinazların kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımı

Birçok ülkede biyoteknolojinin ilerlemesi ile kağıt ve kağıt hamuru sanayisinde biyolojik ağartma ve kağıt yapımı için mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerinin kullanımına olan ihtiyacın artması ile ksilanazlar ve ligninazlar dışında, mannanaz, pektinazlar ve α -galaktosidaz gibi enzimlerin kullanımı da artmıştır (Bajpai 1999; Kirk ve Jefferies 1996). Kâğıt yapımı esnasında pektinaz enzimi, galakturonik asitlerin polimerlerini depolimerize edebilmekte ve daha sonra pektin solüsyonlarının katyonik ihtiyacını düşürebilir (Reid ve Ricard 2000, Viikari, Tenkanen ve Suurnakki, 2001). Pektinazlar poligalakturonik asitleri depolimerize ederek sonuçta süzöntüdeki katyonik ihtiyacı termomekanik olarak düşürerek peroksit ağartma işlemine duyulan ihtiyacı azaltır (Viikari ve diğerleri, 2001).

Pektinazların tavuk yemi geliştirilmesinde ve prebiyotik uygulamalarda kullanımı

1980'lerin başında hayvancılıkta ve kanatlı hayvan yemlerinde çeşitli enzimlerin kullanımına yönelik yoğun bir araştırma başlamıştır. İlk ticari başarı, arpa esaslı beslenme diyetlerine β -glukanaz ilave edilmesidir. Beslemedeki enzim kullanımının gözlemlenebilir en büyük etkisi, aynı arpa miktarıyla artan hayvan ağırlık kazancıdır, bu da artmış bir yem dönüşüm oranına neden olur. Genellikle bir yem enzim preparatı, glukanazlar, ksilanazlar, proteinazlar, pektinazlar ve amilazları içeren birçok enzim kokteylinden oluşmaktadır. Enzim katkısı, besin maddelerinin emilimini artırır ve parçalanmayan liflerin hidroliziyle besin maddelerinin serbest bırakılmasını sağlar. Ya da lifler tarafından bloke edilen besin maddelerini serbest bırakarak viskoziteyi ve dışkı miktarını azaltır (Hoondal ve diğerleri, 2002). Broilerlerde yapılan çalışmalarda bu preparatların beslenmeye olan katkılarının stres koşulları altında bağışıklık kaynaklı enflamatuvar cevabı önemli ölçüde değiştirdiğini ve bunun yanında broilerlerde daha iyi mortalite, kilo alımı, yem dönüşümü ve kemik gücü ile sonuçlandığını düşündürmektedir. 49 günde broilerlerde, pektinazlar, β -glukanazlar ve çeşitli hemiselülozları içeren çoklu enzim preparatlarının etkisi incelenerek, yemin sindirilebilirliğini artırma testleri yapılmıştır. Kullanılan preparatlar ile yapılan enzim takviyesinin kilo alımı ve besleme dönüşümünü önemli ölçüde geliştirdiği gözlemlenmiştir (Petersen, 2001). PEL aynı zamanda pektinden C vitamini öncülü olan galakturonik asit eldesinde kullanılmakta olup, C vitamini içeriği zengin fonksinel gıdaların geliştirilmesi de mümkündür.

Pektinazların bitki virüslerinin saflaştırılmasında kullanımı

Bir virüs hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. Kimyasal, fiziksel ve diğer biyolojik çalışmaları yürütmek için birçok saf virüs preparatları gereklidir. Bitkilere bulaşan virüslerin çoğuna adapte edilebilecek çok sayıda saflaştırma prosedürü vardır. Bununla birlikte, virüs türüne göre kullanım için seçilebilen birçok farklı arıtma sistemi bulunmaktadır. Virüsün floem ile sınırlı olduğu durumlarda, alkalik pektinazlar ve selülozlar gibi bazı enzimler virüsü dokulardan kurtarmak için kullanılabilir (Salazar and Jayasinghe, 1999).

Pektinazların yağların ekstraksiyonunda kullanımı

Eski proseslerde, kanola, hindistan cevizi, ayçiçeği tohumu veya zeytin gibi yağlı bitki yağlarının ekstrakte edilebilmesi için organik çözücüler kullanılmaktaydı. Kullanılan organik çözücülerin en yaygın olanı kanserojen olduğu da bilinen hekzandır. Günümüzde ise yağlar, hücre duvarını parçalayan enzimler yardımı ile ekstrakte edilebilmektedir. Pektinazlar ve diğer enzimler yağlı bitkinin hücre duvarlarını parçalayarak yağların ekstraksiyon işlemine yardımcı olmaktadır. Bu yöntem organik çözücülere göre daha fazla tercih edilmektedir. Enzimle muamele sonucu zeytinyağı veriminde de artış olduğu tespit edilmiştir. Pektinolitik aktivite ve ayrıca hemiselüloz ve selulolitik aktiviteye sahip Olivex isimli enzim preparasyonu olmakla birlikte iyi bir yağ ekstraksiyonu ve depolandığında daha iyi kararlılık göstermekte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ekşimeye karşı yağın kararlılığını koruyan polifenol ve E vitamini içeriğinin de arttığı tespit edilmiştir (Kashyap ve diğerleri, 2001).

Limon yağı gibi narenciye yağları pektinazlar ile ekstrakte edilebilirler. Çünkü kullanılan bu enzimler pektinin emülsiyon özelliklerini yok eder ve bu da turuncgil özlerinden gelen yağların toplanmasını sağlar (Scott, 1978). Zeytinyağı hazırlanmasında da bitki hücre duvarı parçalayıcı enzim preparatı kullanılmaya başlanmıştır. Enzim, zeytinlerin öğütülmesi sırasında eklenir, böylece yağın kolay ayrılması, sonraki ayırma işlemlerinde başırlır.

2.4.2. Asidik pektinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları

Pektik maddeler, selüloz, polifenoller, proteinler, arabanlar, lignin ve nişasta gibi polimerler, tanenler ve metaller, hemiselüloz gibi maddeler meyve suyunda bulanıklığa yol açmaktadır. Bu nedenle berrak ve stabil meyve suyu üretimi için bu kolloidlerin küçük moleküllerine kadar parçalanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan pektik enzimler ise şunlardır; pektat liyazlar, poligalakturonazlar, pektin liyazlar ve pektin esterazlardır. Bu sayede meyve presleme, suyu verimi ve durultma verimi artmakta olup, vizkositenin düşmesine bağlı olarak filtrasyon kolaylaşmakta, daha berrak bir ürün elde edilebilmektedir. Asidofilik pektinazların, meyve sularının ve şarabın ekstraksiyonu ve berraklaştırılması, oldukça yaygın uygulamaları vardır.

Meyve suyu endüstrisinde asidik pektinazların endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları

Pektik enzimler göz önünde bulundurulduğunda Dünya'daki gıda enzim üretiminin 4'te birini oluşturmaktadır (Rombouts ve Pilnik, 1980). Pektik maddeler meyve suyunun kararlılık, bulanıklık ve görünümünden sorumludur (Borrego ve diğerleri, 1989). Örneğin; kuş üzümü, siyah kiraz gibi meyveler ezildikten sonra, bu ham meyve suları çok viskozdur ve kalan katıları meyve suyundan ayırmak çok zor olacaktır (Sakai ve diğerleri, 1993). Bu yüzden pektik maddeler, prosesin filtrasyonuna ve ardından konsantre edilmesine engel olur (Serra, Alkorta, Llama ve Alaiia, 1992). Pektik enzimler, meyve suyunun veriminin artırılmasında ve berraklaştırılmasında uzun süredir kullanılmaktadır ve bu pektik enzimlerin en eski kullanım alanlarından (Rombouts ve Pilnik, 1980). Pektinazlar, meyve suyu üretim endüstrilerinde, yüksek potansiyel biyoteknolojik uygulamalara sahiptir (Prathyusha ve Suneetha, 2011). Pektik maddelerin, meyve sularının kıvamını, bulanıklıklılığını etkileyen en önemli faktör olduğu kabul edilmektedir (Alkorta ve diğerleri, 1998). Meyve posasına bu enzimlerin uygulanmasıyla pektin parçalanır, yani viskozite azalır ve meyve suyu kolaylıkla işlenebilir. Meyve suyundaki pektinli maddeler membran teknolojisi ile de ultrafiltrason ve mikrofiltrasyon kullanılarak uzaklaştırılabilir (Arunachalam ve Asha, 2010).

Kırmızı şarapların kromatik özelliği ve stabilitesinin artırılması

Pektinolitik enzimler, kırmızı şarap endüstrisinde mayalanmış meyvelere eklenerek, işlenmemiş şaraplara kıyasla görsel niteliklerinin artmasını sağlamıştır. Enzimatik prosesle muamele edilen kırmızı şaraplar, kontrol grubu olan şaraplardan daha iyi kabul edilen kromatik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Enzimatik prosesle muamele edilen kırmızı şaraplar ayrıca kontrolle karşılaştırıldığında daha fazla kararlılık göstermiştir (Revilla ve Ganzalez-san jose, 2003).

2.5. Farklı Organizmalardan Elde Edilmiş Pektat Liyaz Enziminin Stabilizasyon ve Karakterizasyonu ile İlgili Çalışmalar

Pektinazların endüstriyel prosesler üzerinde etkili olabilmesi için, çeşitli çalışma koşulları altında tutarlı bir şekilde etkili olmaları gerekmektedir. Bu nedenle araştırmalar, pH ve sıcaklık açısından daha dayanıklı olan enzimlerin keşfedilmesine yönelmiştir.

Enzimin termosatabil, termotolerant ve pH tolerant yapıda olmaması, biyoteknolojik süreçlerin hızlı gelişiminde en büyük kısıtlayıcı etmen olduğu düşünülmektedir. Bu yüzden biyoteknolojik uygulamalarda kullanılacak enzimlerin termostabil, termotolerant, alkalotolerant gibi özelliklere sahip olması sürecin hızlanmasını sağlayacaktır. Pektinazların seçiminde ve stabillitesini arttırmak ve istenen aktivite düzeyini uzun bir süre sürdürmek en önemli iki noktadır. Pektinazların stabilitesi, hem fiziksel parametreler (pH ve sıcaklık) hem de kimyasal parametreler (inhibitörler veya aktivatörler) ile belirlenmektedir. Çizelge 2.5.'te farklı liyazların biyokimyasal ve fizikokimyasal özelliklerini özetlemektedir. Singh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre *Bacillus* sp'den elde edilen PEL'in, pH 7,0-11,0 aralığında ve 60°C'de stabil olduğu tespit edilmiştir. *Bacillus macerans*'den elde edilen PEL'in ise sıcaklık ve pH stabilitesi tespit edilemezken (Miyazaki, 1991), *Amycolata* sp'den elde edilen PEL, pH 6,0-8,0 ve 50°C'de stabil olduğu belirlenmiştir (Bruhlman,1995).

Çizelge 2.5. Bazı liyazların biyokimyasal ve fizikokimyasal özellikleri

Protein Kaynağı	Doğa	Moleküler ağırlık (kDa)	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	Sıcaklık stabilitesi (°C)	pH stabilitesi	Referans
<i>Erwinia carotovora</i>	PGL (PEL I)	36–38	50	10,0	–		(Fayyaz ve diğerleri, 1993)
	PGL (PELII)	36–38	60	10,0	–		
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	PGL (PEL)	74	–	8,7	–		Tierny ve diğerleri, 1994; McCarthy ve diğerleri, 1985)
<i>Aureobasidium pullulans LV-10</i>	PMGL (L1)	89	40	5,0	50	3,5	Perini ve diğerleri, 1988)
	PMGL (L2)	55	40	7,5	40	5,9	
<i>Penicillium italicum</i>	PMGL	22	40	6,0–7,0	50	8,0	(Alana ve diğerleri, 1990)
<i>Bacillus macerans</i>	PGL (PEL)	35	60	9,0	–		(Miyazaki, 1991)
<i>Aspergillus japonicus</i>	PMGL	–	55	6,0	–		(Dinnella ve diğerleri, 1994)
<i>Penicillium adametzii</i>	PMGL	–	60	8,0	40	7,0	(Sapunova ve diğerleri, 1995)
<i>P. citrinum</i>	PMGL	–	45	7,0	40	7,0	
<i>P. janthinellum</i>	PMGL	–	40	6,5	40	7,0	
<i>Amycolata sp.</i>	PGL (PEL)	31	70	10,3	50	6,0–8,0	Bruhlman, 1995)
<i>Pythium splendens</i>	PMGL	23	–	8,0	50		(Chen ve diğerleri, 1998)
<i>Bacillus sp.</i>	PGL (PEL)	38	69	11,0	60	7,0–11,0	Singh ve diğerleri, 1999)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	PGL (PEL)	55	–	–	–		(Kashyap ve diğerleri, 2000)
<i>Pichia pinus</i>	PMGL	90	–	4,5	50		(Moharib ve diğerleri, 2000)
<i>Bacillus sp. TS44</i>	PGL (PEL)	50	70	8,0	70	11,0	(Takao ve diğerleri, 2000)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	PMGL	–	65	10,5–11,0	70	4,0	(Takao ve diğerleri, 2001)
<i>Fusarium moniliforme</i>	PGL (PEL)	–	–	8,5	75		(Dixit ve diğerleri, 2004)

PEL Enzimine pH'nın Etkisi

Enzimatik bir reaksiyonun hızını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlardan birkaçı şunlardır: pH, sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, iyon konsantrasyonudur. Her enzimin en iyi aktivite gösterdiği koşulların belirlenmesi için optimizasyon deneyleri yapılmaktadır.

Literatürde yapılan çalışmalarda PEL enziminin optimum pH aralığı alkali uygulamalar için 7,5 ile 11,0 arasında değiştiği bulunmuştur. Alana ve diğerleri (1990), *Bacillus macerans* türüne ait PEL ezimi için optimum pH'yı 9,0 bulurken, Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp.'ye ait PEL ezimi için optimum pH'yı 11,0 bulmuştur. Takao ve diğerleri (2000), *Bacillus* sp. TS44'e ait PEL enzimi için optimum pH 8,0 bulunmuştur.

Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp.'ye ait PEL enzimi için pH'nın 7,0-11,0 aralığında pH stabil olduğunu belirtirken, Bruhlmann ve diğerleri (1995), *Amycolata* sp.'ye ait PEL enzimi için 6,0-8,0 aralığında pH stabil olduğunu bildirmiştir.

PEL enzimine sıcaklığın etkisi

Literatürde yapılan çalışmalarda PEL enziminin optimum sıcaklık aralığını 40°C ile 70 °C arasında değiştiğini bulunmuştur. Alana ve diğerleri (1990), *Penicillium italicum*'a ait PEL enzimi için uygun sıcaklığı 40°C, Dinnella ve diğerleri (1994), *Aspergillus japonicus*'a ait PEL enzimi için uygun sıcaklığı 55°C, Alana ve diğerleri (1990), *Bacillus macerans* türüne ait PEL ezimi için uygun sıcaklığı 60°C bulurken, Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp TS44.'e ait PEL enzimi için en uygun sıcaklığı 70°C olarak bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp.'ye ait PEL enziminin 60°C'de, Bruhlmann ve diğerleri (1995), *Amycolata* sp.'ye ait PEL enzimi 50°C'de, Takao ve diğerleri (2001), *Thermoascus auratniacus*'a ait PEL enziminin 70°C'de, termostabil olduğu bildirilmiştir. Çeşitli kaynaklardan izole edilen enzimin optimum pH'larındaki farklılık enzimin farklı alt birimlerinin bulunması ile enzim kaynağının olgunluk durumu ile enzimin saflaştırma derecesi ile yakından ilgilidir (Vamos-Vigyazo, 1981).

2.6. PEL Enziminin Saflaştırılması İle İlgili Çalışmalar

Enzimlerin saflaştırılması, endüstriyel kullanım ya da proteinin yapı, kompozisyon ve amino asit dizisinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Enzim saflaştırılmasında dikkat edilmesi gereken hususlar; yüksek verim ve saflıktır.

Takao ve diğerleri (2001), *Bacillus* sp. TS 47 türünün PEL enzimine saflaştırma işlemi uygulamıştır. Enzimin saflaştırılması için ham ekstrakt %50 (NH₄)₂SO₄ ile çöktürülmüştür. Butyl-Toyopaerl 650M, SP- Toyopearl 650M, Superdex 75 HR kolonları kullanılmıştır.

Sukhumsırchart, Kawanishi, Deesukon, Chansiri, Kawasaki ve Sakamoto, (2014), *Bacillus* sp. RN1 PEL enzimine saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Öncelikle Kültür filtratı (1,5 litre), ultrafiltrasyonla (10 kDa kesme) konsantre edilmiş olup enzimin saflaştırılması için ham ekstrakt %15-30 (NH₄)₂SO₄ ile çöktürülmüştür. Resource PHE kolonu kullanılmıştır. Bu saflaştırılmış enzim fraksiyonu biyokimyasal tanımlamaya tabi tutulmuştur. Enzim, %43'lük bir verim ile 185 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış enzimin Na-PGA'yi degrade etmiş olup ve 235 nm'de maksimum absorpsiyona sahip bir ürün elde edilmiştir. Reaksiyon süresi arttıkça ürün miktarı kademeli olarak artmış ve enzimin lyase aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir.

2.7. Farklı Organizmalardan Elde Edilen PEL Protein Moleküler Ağırlıkları

Western Blot; çalışmalardaki spesifik proteinini analiz etmemizi sağlayan bir tekniktir. Bu teknik sayesinde elde edilen filtratlardaki proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu, konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması araştırılabilir. Western blot, protein karışımının jel elektroforezi ile ayrıştırıldıktan sonra uygun bir membrana transferini kapsar. Protein spesifik olarak işaretli antijen veya antikora reaksiyona girerek tanımlanabilir. Bu yöntem ile özel bir proteinin moleküler ağırlığı bilgisi ve işlenmiş ürünlerden izoformların ayrımı mümkündür. Protein uygun bir membrana transfer edildikten sonra görüntüleme için boyanabilir, N-ucundan sekanslanarak direkt olarak tanımlanabilir, kütle spektrofotometri ya da immüntenpit yapılabilir. Blotlama tekniği, bir antijenin varlığı ve miktarı, moleküler ağırlığı gibi protein antijenlerinin önemli özelliklerini belirlemede kullanılabilir (Karaaslan, 2008).

Farklı literatürlerde incelenen farklı organizmalar için PEL protein büyüklükleri değişkenlik gösterebilmektedir. Western blot tekniği ile PEL proteininin büyüklüğü Moharib, El-Sayed ve Jwanny (2000), *Pichia pinus*'ta 90 kDa, Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp.'de 38 kDa, Alana ve diğerleri (1990), *Bacillus macerans*'ta 35 kDa, Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp TS44.'te 50 kDa iken, Tierny, Bechet, Joncquiert, Dubourguier ve Guillaume (1994), McCarthy, Kotarski ve Salyers (1985), *Bacteroides thetaiotaomicron*'da ise 74 kDa bulunduğu bildirilmiştir.

2.8. PEL Enziminin Klonlanma ve Klonlama Sonrası ile İlgili Çalışmalar

Günümüzde gen klonlama çalışmaları birçok amaçla gerçekleştirilmektedir. Bunlar: gen izolasyonu, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılarının oluşturulması, klonlanan genlerde mutasyonlar meydana getirilerek fonksiyonel gen bölgelerinin belirlenmesi, gen bankalarının oluşturulması, genlerin yapı ve fonksiyonları üzerine araştırmalar yapılması ve rekombinant proteinlerin elde edilmesi gibi amaçlarla yapılmaktadır (Lewin, 2000; Albert ve diğerleri, 1994; Brown, 1990).

Bacillus sp. N16-5'den saflaştırılan Bsp165PelA geninin *E. coli* BL21'e klonlaması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant enzim yüksek spesifik aktivite (1.000 U / mg) göstermiştir. Optimum pH 11,5 iken optimum sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Moleküler ağırlığı 42 kDa olan proteinini kodlayan pektat liyaz geni (pelA), 1,089 baz çiftlik bir açık okuma çerçevesine (ORF) 35 amino asit sinyal peptidi ve 35.943 molekül kütlesi ile 326 amino asitlik bir olgun proteini kodlayan protein olduğu ortaya konmuştur. PelA ORF'den türetilmiş amino asit dizisi ile polisakarit liyaz ailesindeki bilinen bir pektat liyaz ile homoloji gösterdiği belirlenmiştir. Bsp165PelA'nın amino asit dizisinde korunmuş bölgelerin olduğu tespit edilmiştir. Pektik substratlar üzerinde aktivite için Ca^{+2} ihtiyaç duymamıştır (Li ve diğerleri, 2010).

Bacillus sp. BP-23 suşundan elde edilen pektat liyazı kodlayan pelA geni, *Escherichia coli*'de eksprese edilmiştir. 1214 baz çiftlik PelA genini içeren DNA fragmanının nükleotid dizisi belirlenmiş olup, 23,233 Da'lık bir proteini kodlayan 666 nükleotidlik bir ORF belirlenmiştir. Klonlanan enzimin amino asit dizisi, *Fusarium solani*'den elde edilen A, B, C ve D pektat liyazlar ile, *Erwinia carotovora*'dan elde edilen Pel-3 ve PelB'ye ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen PelI ile homoloji göstermektedir. Fonksiyonu bilinmeyen *Bacillus subtilis* yvpA geninden çıkarılan protein ile de homoloji gösterdiği bulunmuştur. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 50 ° C ve pH 10,0 olarak belirlenmiştir. Pektik substratlar üzerinde aktivite için Ca^{+2} gerekli iken, enzim Ba^{+2} tarafından şiddetle inhibe edilir (Soriano ve diğerleri, 2000).

Bacillus sp. TS 47 suşundan elde edilen termostabil pektat liyazı (PL 47) kodlayan gen *Escherichia coli* JM109'e eksprese edilmiştir. 1326 baz çiftlik PL 47 geni 441 amino asidi kodladığı belirlenmiştir. Molekül ağırlığı 47,262 olarak saptanmış olup, *Bacillus subtilis*

SO113 ile %52 benzelik göstermiştir. Optimum aktiviteyi 70°C göstermiş olup aynı zamanda 70°C’de stabilliğini korumuştur (Takao ve diğerleri, 2001).

2.9. Ticari Pektinazlar

Pektinazlar, evde kullanılan ilk enzimler olmakla birlikte ticari hayatta kullanımları 1930’ lu yıllarda meyve suyu ve şarap endüstrisi ile başlamıştır. 1960’ lı yıllarda bilim adamlarının doğal bitki dokusuna ait elde ettikleri veriler, enzimlerin endüstride daha verimli ve etkin bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. Günümüzde pektinazlar, ticari sektörde oldukça yüksek düzeyde kullanılmaktadır. 1995’ te endüstriyel enzimlerin ulaştığı yıllık satış cirosu 1 milyar dolardır. Bu satış rakamının içinde pektinazların payı ise % 7,5 (75 milyon dolar) olarak hesaplanmıştır. 2005’ te toplam endüstriyel enzim satışlarının yaklaşık olarak 1,7-2,0 milyar dolar olduğu tahmin edilmiştir (Kashyap ve diğerleri, 2001). Günümüzde ticari olarak üretilen bazı pektinazların marka adı ve üretici firmaları Çizelge 2.6.’ da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Ticari pektinazlar (Kashyap ve diğçerleri, 2001; Prathyusha ve Suneetha, 2011)

Temin edici	Bölge	Marka adı
C.H. Boehringer Sohn	Ingelheim, West Germany	Panzym
Ciba-Geigy, A.G.	Basel, Switzerland	Ultrazyme
Grinsteelvaeket	Aarhus, Denmark	Pectolase
Kikkoman Shoyu, Co.	Tokyo, Japan	Sclase
Schweizerische Ferment, A.G.	Basel, Switzerland	Pectinex
Societe Rapidase, S.A.	Seclin, France	Rapidase, Clarizyme
Wallerstein, Co.	Des Plaines, USA	Klerzyme
Rohm, GmbH Biocon Pvt Ltd.	Darmstadt, West Germany Bangalore, India	Pectinol, Rohament Pectinase
Wallerstein, Co.	Des Plaines, USA	Klerzyme

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırmada kullanılan organizmalar ve temini

Bu tez çalışmasında kullanılan organizmalar Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nın kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve izolasyon orjinleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada Alman Kültür Koleksiyonunda (DSMZ) bulunan *Bacillus pateurii* DSM 33 suşu da kullanılmıştır. Daha önceki çalışmalarda tanımlanmış olan mikroorganizmaların morfolojik özellikleri, üreme koşulları, sporlu bakterilerin spor formlarına göre kontrolleri yapılmıştır. Yüksek aktiviteye sahip suşların, kontrol tanımlamaları moleküler düzeyde tekrar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve izolasyon kaynakları

Suş Kod	Mikroorganizmalar	İzolasyon Kaynağı
B1	<i>Bacillus pumulis</i>	Toprak
B2	<i>Bacillus subtilis</i>	Toprak
B7	<i>Bacillus licheniformis</i>	Toprak
B3	<i>Bacillus cereus</i>	Toprak
BS6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Toprak
7026	<i>Serratia marcescens</i>	Böcek
8015	<i>Debaryomyces hansenii hansenii</i>	Tarhana
8018	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Kefir
8004	<i>Pichia fermentas (tarhanadan izole)</i>	Tarhana
8001	<i>Pichia fermentas (tuşu suyundan izole)</i>	Tuşu suyu
8025	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Diyacure

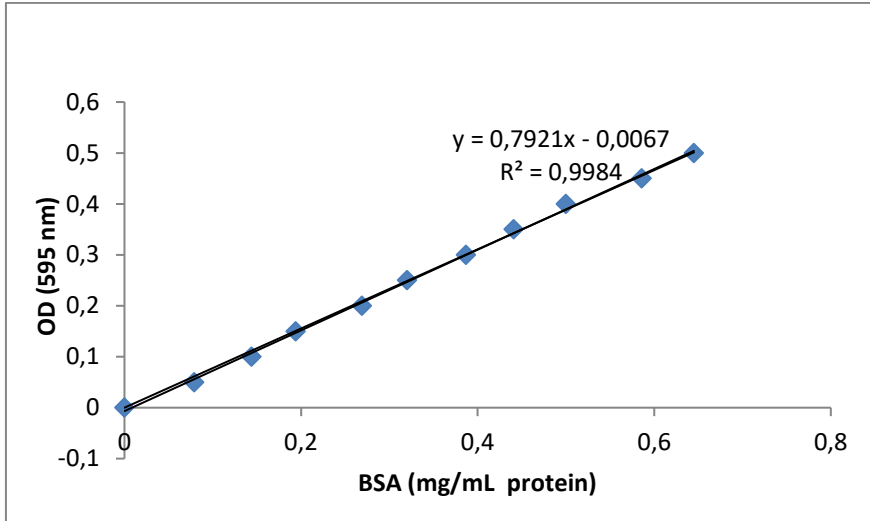
3.2. Metod

3.2.1. Araştırmada kullanılan organizmaların moleküler düzeyde tanınlanması

Yüksek enzim aktivitesine sahip basillus cinsi dört bakterinin moleküler düzeyde tanımlaması yapılmasına gerek duyulmuştur. Çalışılan organizmaların 16S rRNA tanımlamaları universal primer olan 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') ve U1492R (5' GGTTACCTTACGACTT 3') ile yapılmıştır. PCR şartları; 15 saniye 94 °C'de bekletildikten sonra 35 döngü olacak şekilde 30 saniye 95 °C'de, 1 dak. 59 °C'de ve bekletilerek, döngü tamamlanmış ve 10 dak. 72 °C'deki bekletilmenin ardından +4°C'ye alınmıştır. Elde edilen bu PCR ürünlerinin Refgen'de sekans analizi yaptırılmış olup, çıkan sonuçların tanımlaması NCBI Blast programı ile yapılmıştır.

3.2.2. Pektat liyaz enzim ekstraksiyonu ve protein miktar tayini

Çalışılan mikroorganizmalar için uygun besiyerleri hazırlanmıştır (Nutrient, Tryptic Soy Broth, Yeast Extract Peptone Dextrose). Bakteriler 37°C'de 18 saat, mayalar ise 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde örnekler buz içindeyken, sonikatörde 1 dak. 0,6'lık döngü halinde % 80 hızda hüceler patlatılmıştır. 5000 rpm'de 4°C'de 30 dak. santrifüj edilmiş ve süpernatant alınış, steril bir eppendorfa aktarılmış ve -20°C'de saklanmıştır. Organizmalardan Pektat liyaz ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra 0-1000 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda Bovin Serum Albumin (BSA, Amresco) kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur (Şekil 3.1). Standarda göre protein miktarları mg/mL olarak Bradford (Sigma-Aldrich) yöntemine göre belirlenmiştir (Bradford, M. M. 1976).



Şekil 3.1. Bovin Serum Albumin (BSA) protein standart eğrisi

3.2.3. Enzim aktivitesinin ölçülmesi

Reaksiyon tamponu olarak bakterilerde 50 mM Glisin-NaOH tamponu (Kobayashi ve diğerleri, 1999) ve substrat olarak ise % 0,2-0,4 Elma Pektin (Soriano ve diğerleri, 2000) kullanılmıştır. Reaksiyon ise 50 mM HCl ile durdurulmuştur (Kobayashi ve diğerleri, 1999). Zamana karşı substrat konsantrasyonundaki değişim (Elma pektin'in poligalakturonata parçalanması) kaydedilmiş ve 235 nm'deki (Kobayashi ve diğerleri, 1999) poligalakturonat birimlerinin D-galakturonat birimlerine dönüşen miktarı esas alınarak hesaplanmıştır. Kullanılan bu formülde doymamış ürün için molar sönme katsayısı 4,60 olarak alınmıştır (e.g. for Megazyme Pectate Lyase Lot 111201a). Spesifik enzim aktivitesi ise formül ile elde edilen değer Bradford standardı (BSA, Şekil 3.1) ile belirlenen protein miktarına (mg/ml) bölünerek spesifik enzim aktivitesi (Unit/mg) hesaplanmıştır.

Spesifik Enzim Aktivitesi (Units/mg) = Enzim Aktivitesi (Units/ mL) / Protein Miktarı (mg/mL)

3.2.4. Pektat liyaz enziminin optimizasyonu

Yüksek Pektat Liyaz aktivitesi gösteren bakteri ve mayalar seçildikten sonra Pektat liyazın sahip olduğu çeşitli özellikler belirlenerek enzim optimize ve karakterize edilmiştir. Enzimin pH'sı, sıcaklığı, substrat konsantrasyonu, tampon konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi tespit edilmiştir. Reaksiyon süresi bitiminde numunelere (Toplam hacim

2 mL) 20 uL 50 mM HCl (Reaksiyon durdurucu) eklenmiştir ve ardından 235 nm'de absorbans ölçülüp bağıl aktivite (%) belirlenmiştir.

pH'nin etkisi

Enzim aktivitesine pH'nın etkisini araştırmak amacı ile farklı pH'larda tamponlar hazırlanmıştır. Bakteriler için 30 dak. 60°C sıcaklıkta, % 0,25 elma pektini(pH 8,0), 0,5 mM CaCl₂ ile 50 mM Glisin-NaOH tamponu (pH 4,0-11,0) kullanılarak enzimin değişen pH'lardaki aktivite ölçümü kaydedilmiştir. Mayalar için ise 30 dak. 25°C sıcaklıkta % 0,25 substrat (Elma pektini), 1,0 mM CaCl₂ ile 50 mM Tris-Glisin tamponu (pH 4,0-11,0) kullanılarak, enzimin aktivitesine iyonik gücün etkisini belirlenmiştir. Reaksiyon süresi bitiminde numunelere (Total hacim 2 mL) 20 uL 50 mM HCl (Reaksiyon durdurucu) eklenmiştir ve ardından 235 nm'de absorbans ölçülüp bağıl aktivite (%) hesaplanmıştır.

Sıcaklığın etkisi

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklığı bulabilmek için bakterilerde, 50 mM Glisin-NaOH pH 9,0, 0,5 mM CaCl₂, mayalarda ise 50 mM Tris-HCl pH 8,0 tamponu ve % 0,25 elma pektini (pH 8,0), 1,0 mM CaCl₂ kullanılarak belirlenen sıcaklık aralığında (20-70°C) 30 dak. süre ile aktivite ölçümü yapılmıştır. En yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklık değeri o enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık olarak daha sonraki deneyler için kabul edilmiştir. Reaksiyon süresi bitiminde numunelere (Total hacim 2 mL) 20 ul 50 mM HCl (Reaksiyon durdurucu) eklenmiştir ve ardından 235 nm'de absorbans ölçülüp bağıl aktivite (%) hesaplanmıştır.

Substrat konsantrasyonunun etkisi

Enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisinin belirlenebilmesi için bakterilerde, 60°C sıcaklıkta 30 dak. 0,5 mM CaCl₂, 50 mM (pH 9,0), mayalarda ise, 50 mM Tris-HCl pH 8,0 tamponu, 1,0 mM CaCl₂ kullanılarak değişen konsantrasyonlarda (% 0,20 / 0,25 / 0,30 / 0,35 / 0,40 elma pektini pH 8,0) substratlar hazırlanmış ve enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği değer, diğer deneyler için optimum substrat konsantrasyonu olarak kullanılmıştır. Reaksiyon süresi bitiminde numunelere (Total hacim 2 mL) 20 ul 50 mM HCl (Reaksiyon durdurucu) eklenmiştir ve ardından 235 nm'de absorbans ölçülüp bağıl aktivite (%) hesaplanmıştır.

Metal ve iyonların etkisi

Enzim aktivitesi ölçümleri için reaksiyon, kofaktörsüz, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Ba^{+2} , gibi kofaktörler denenmiş, enzimi aktive eden ve inhibe eden metal ve iyonlar tespit edilmiştir. Enzimin en iyi aktivite eden kofaktörün belirlenmesinin ardından (CaCl_2) değişen konsantrasyonlarda (0,1 - 5,0 mM) CaCl_2 hazırlanmış ve diğer deneylerde kullanılmak üzere optimum konsantrasyon belirlenmiştir. Reaksiyon süresi bitiminde numunelere (Total hacim 2 mL) 20 ul 50 mM HCl (Reaksiyon durdurucu) eklenmiştir ve ardından 235 nm'de absorbans ölçülüp bağıl aktivite (%) hesaplanmıştır.

Reaksiyon süresinin etkisi

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklığın belirlenmesinin ardından (60°C), belirlenen optimum koşullardaki (Bakteriler için; 50 mM Glisin-NaOH, 0,5 mM CaCl_2 , % 0,25 elma pektini, Mayalar için ise; 50 mM Tris-Glisin, 1,0 mM CaCl_2 , % 0,25 elma pektini) reaksiyon süresinin saptanabilmesi için her beş dakikada bir aktivite ölçümü yapılabilecek şekilde zaman aralıkları belirlenerek denemeler yapılmıştır. Reaksiyon süreleri (20-70 dak.) bitiminde numunelere toplam hacim 2 mL olacak şekilde 20 uL 50 mM HCl eklenmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Ardından 235 nm'de absorbans ölçülüp bağıl aktivite (%) hesaplanmıştır.

Yapılan optimizasyon deneyleri sonrasında uygun enzim aktivitesi için gerekli olan tampon, substrat, kofaktör ve enzim ile reaksiyon kurulmuş ve yine belirlenen sıcaklık ve reaksiyon süresi sonunda aktivite ölçümleri kaydedilmiştir.

3.2.5. Pektat liyazın depolama stabilitesinin belirlenmesi

Depolama stabilitesinin belirlenebilmesi için 3.2.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan Pektat Liyaz enzim ekstraktları bir yıl boyunca -20°C 'de bekletilmiştir ve bu bir yıllık süre içerisinde her ay pektat liyaz enzim aktivitesi ölçülmüştür. Reaksiyon karışımında bakteriler için; 60°C 'de 30 dak. 50 mM Glisin-NaOH, 0,5 mM CaCl_2 , % 0,25 elma pektini, mayalar için ise; 25°C 'de 30 dak. 50 mM Tris-Glisin, 1,0 mM CaCl_2 , % 0,25 elma pektini kullanılarak enzim aktivitesindeki değişiklik belirlenmiştir.

3.2.6. Pektat liyaz enziminin kısmi saflaştırılması

(NH₄)₂SO₄ çöktürmesi

Manyetik karıştırıcı üzerinde, beherin içindeki 50 ml ekstrakte edilmiş enzim, +4°C'deki bir dolaba yerleştirilmiştir. % 60 oranında (NH₄)₂SO₄ konsantrasyonun sağlanması için gereken (NH₄)₂SO₄ miktarı, (NH₄)₂SO₄ hesaplama programı (Encor Biotechnology Inc.) ile belirlenmiştir. Toz haline getirilen (NH₄)₂SO₄'tan (Merck), çözeltiye % 60 oranında yavaş yavaş eklenmiştir. Tuz ilavesinin ardından 20 dak. daha karıştırılan çözeltiye 10,000 rpm'de 30 dak. +4°C'de santrifüj işlemi uygulanmış ve çözeltinin üst kısmı atılmıştır. Pellet, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu ile süspanse hale getirilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda çözölen numunenin protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Sukhumsurchart ve diğerleri, 2014).

Diyaliz

(NH₄)₂SO₄ çöktürmesi ile elde edilen pellet, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu ile çözöndükten sonra Slide-A-Lyzer 20 kDa (Thermo Scientific) diyaliz kasedinin içersine koyulmuştur. Diyaliz kasedi, içersinde 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu bulunan erlene yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı ile çok yavaş bir şekilde karıştırılarak +4°C'de 1-2 saat bekletilmiştir. Bu aşama iki defa tekrarlanmıştır. Diyaliz kasedi, içersinde 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu bulunan erlene yerleştirilmiş ve manyetik karıştırıcı ile çok yavaş bir şekilde karıştırılacak +4°C'de 1 gün daha bekletilmiştir. Beher içine örneğin 200 katından daha fazla olacak şekilde 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) reaksiyon tamponu koyulmuş ve elde edilen diyalizat, Amicon (Millipore, UFC805024) ultrafiltrasyon kolonu ile kolonda 50 kDa üstü protein kalacak şekilde 12000 g'de 10 dak. santrifüj edilmiştir (Takao ve diğerleri, 2001).

3.2.7. Pektat liyaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi (SDS- PAGE)

Pektat Liyaz enziminin kısmi olarak saflaştırılıp saflaştırılmadığının ve moleküler ağırlığının belirlenmesinde SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Proteinlerin Bradford yöntemi ile konsantrasyonları ölçöldükten sonra, yığma (%30 akrilamid (Sigma-Aldrich)-N,N' metilen-bis-akrilamid (Sigma-Aldrich), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, %10 sodyum dodesil

sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich), %10 Amonyum Per Sülfat (APS) (Sigma-Aldrich), N, N, N',N', tetrametilenetilendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich) ve ayırma jeli (%30 akrilamid-N, N' metilen-bis-akrilamid, 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, %10 SDS, %10 APS, TEMED) olarak, dikey elektroforeze (Biorad) iki aşamalı döküldükten sonra, jelin polimerize olması için 15-30 dak. beklenmiştir. Tankın 2/3' ünü dolduracak kadar yürütme tamponu eklendikten sonra, jelle protein markerı (Tehermo Scientific Prestained Protein Marker 10-170 kDa) ve proteinler yüklenerek ilk başta 80 V'de, daha sonra 120 V'de yaklaşık 60 dak. yürütülmüştür. Elektroforez işleminin hemen ardından jeller, tespit çözeltisi içerisinde bir gece bekletilmeye bırakılmıştır. Tespitleme işleminden sonra jeller boyama çözeltisine alınmış ve ortalama bir gün bekletilip boyanmıştır. Daha sonra jeller, distile suda bekletilip jellerin boya kalıntısı temizlenmiştir.

Ayırma jelinin hazırlanması (% 10' luk, Tek camlık hacim)

dH ₂ O	1,9 mL
%30'luk Akrilamid	1,7 mL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,3 mL
%10'luk SDS	50 µL
%10'luk APS	50 µL
TEMED	2 µL

Yığılma Jelinin Hazırlanması (% 4' lük, Tek camlık hacim)

dH ₂ O	2,8 mL
%30'luk Akrilamid	330 µL
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	250 µL
%10luk SDS	20 µL
%10luk APS	20 µL
TEMED	2 µL

SDS-Page için gerekli çözeltilerin hazırlanışı: *Akrilamid Çözeltisi (% 30)*: 29,2 gr akrilamid, 0,8 gr N, N' metilen-bis-akrilamid 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti whatman 1 filtre kâğıdından geçirilerek süzölmüş ve 4°C' de muhafaza edilmiştir. *1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)*: 18,165 gr Tris 75 mL distile suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 8,8'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. *0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)*: 6,005 gr Tris 75 mL distile suda çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır. Son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. *SDS (%10)*: 10 gr SDS 100 mL distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır. *Amonyum persülfat (APS) (%10)*: 10 gr APS 100 mL distile su içerisinde çözümlenerek hazırlanmıştır. *Elektroforez stok yürütme tamponu (pH 8,3) (5x)*: 25 mM Tris, 250 mM Glisin, %1 (w/v) SDS, distile su karıştırılarak hazırlanmıştır. *Tespitleme çözeltisi*: 25 mL %100 (w/v) TCA (Trikloroasetik asit), 82.5 mL Metanol, 142.5 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır. *Stok boya çözeltisi*: 1 gr Coomassie Brilliant Mavisi G-250, 46.5 mL HCl karıştırılarak hacim distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmıştır. Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölmüş ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır. *Boyama çözeltisi*: 300 mL stok boya çözeltisi, 35 mL 10 N (w/v) KOH, 25 mL %100 (w/v) TCA karıştırılarak hazırlanmıştır (1 g KOH, 17,5 mL dH₂O).

3.2.8. PEL enzimin kodlayan geninin PCR ile çoğaltılması ve çoğaltılan genin belirlenmesi

Genomik DNA izolasyonu

İzolasyona başlamadan Önce; Gram (+) bakteri liziz tamponunu hazırlanmıştır. İlk olarak kültür 3000 g'de 30 dak. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine 5 mL sf eklenmiş ve homojen süspansiyon elde edilmiştir ve tekrar 3000 g'de 15 dak. santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. DNA izolasyonu yapılacak olan pellet mac farland 6cfu/ml'ye ayarlanmıştır (Hücre yoğunluğu 2x10⁹, aayarlanmıştır. Yoğunluğu 2 x 10⁹ 'a ayarlanan hücre kültüründen 1,5-2 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve 10 dak. 5000 q' de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pellet 180 µL Gram (+) liziz tamponu ile süspanse edilmiş ve 37 °C'de 30 dak. inkübe edilmiştir. 200 µL Lysis Solution ve 20 µL Proteinase K eklenmiş, pipet ile ya da vorteks ile homojen süspansiyon elde edilmiştir. Numune 56 °C'de 30 dak. inkübasyona bırakılmıştır. 20 µL RNase A solüsyonu eklenmiş ve vorteks ile homojen hale getirilmiştir. Oda sıcaklığında 10 dak. inkübasyona bırakılmıştır. 400 µL %50 'lik etanol eklenerek çözelti DNA saflaştırılmıştır(GeneJET

Genomic DNA Purification Kit, K0721). Elde edilen DNA daha sonraki kullanımlar için -20°C'ye koyulmuştur. DNA konsantrasyonu ve saflık ölçümleri 1' er µL DNA örneğinin Epoch Mikropipet Okuyucuda (Take 3, Biotek) ölçülmüştür. DNA konsantrasyonunu 260 nm deki optik yoğunluğundan (OD), saflığını ise 260/280 nm' deki absorbanslarından belirlenmiştir. PEL geni çoğaltılırken saflığı 1,8 ve DNA miktarıda total hacimde 100 pmol olacak şekilde çalışılmıştır (Peter J. ve Peter B., 2012).

Primer tasarımı ve PCR ile genin çoğaltılması

PCR çalışmaları, klonlama ve klonlama sonrası dizilemede kullanılmak üzere biyoinformatik araçlarla (DNA Star, NCBI, Primer) hedef gen bölgesinin çoğaltılacağı primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). Tasarlanan bu primer çifti *B.licheniformis*' in (GenBank No: AJ517194.1), *B. subtilis*' in (GenBank: X74880.1) ~1600 baz çiftlik pektat liyaz enzimini kodlayan gen dizileri temel alınarak tasarlanmıştır. Primerler tasarlanırken; tasarlanan primerr çiftinin hedef gen bölgesinin dışında ve genomdaki diğer dizilerle hiçbir benzerlik göstermemesi, primer uzunluğunun 19-22 baz çifti aralığında olmasına ve primerlerin Tm (erime sıcaklığı) değerleri arasındaki farkın maksimum 5°C olmasına dikkat edilmiştir.

Çizelge 3.2. Tasarlanan primerler

Primerler	Baz Dizilimi	Tm	% GC
BS6_F (22)	5' TTGTCACGGATAACGAAAAAGT 3'	60	65,73
BS6_R (21)	5' TCTTCCATCCCCCTATCCCAT 3'	64	70,83

PEL geni için Tag DNA Polimeraz ve Hot Start DNA Polimeraz enzimleri kullanılarak gradient PCR yapılmıştır. Hazırlanan reaksiyon tüplerinin içeriği; Tampon (5,0 µL), MgCl₂ (4,0 µL), dNTP mix (10 mM - 1,0 µL), İleri primer (10 µM – 1,5 µL), Geri primer (10 µM – 1,5 µL), Tag DNA Polimeraz (0,5 µL), DNA (3,0 µL), Steril Ultra Saf Su (33,5 µL). Her bir tüp belirlenen kuyuculara yerleştirilir ve 3.3'te açıklandığı üzere PCR programları yürütülmüştür.

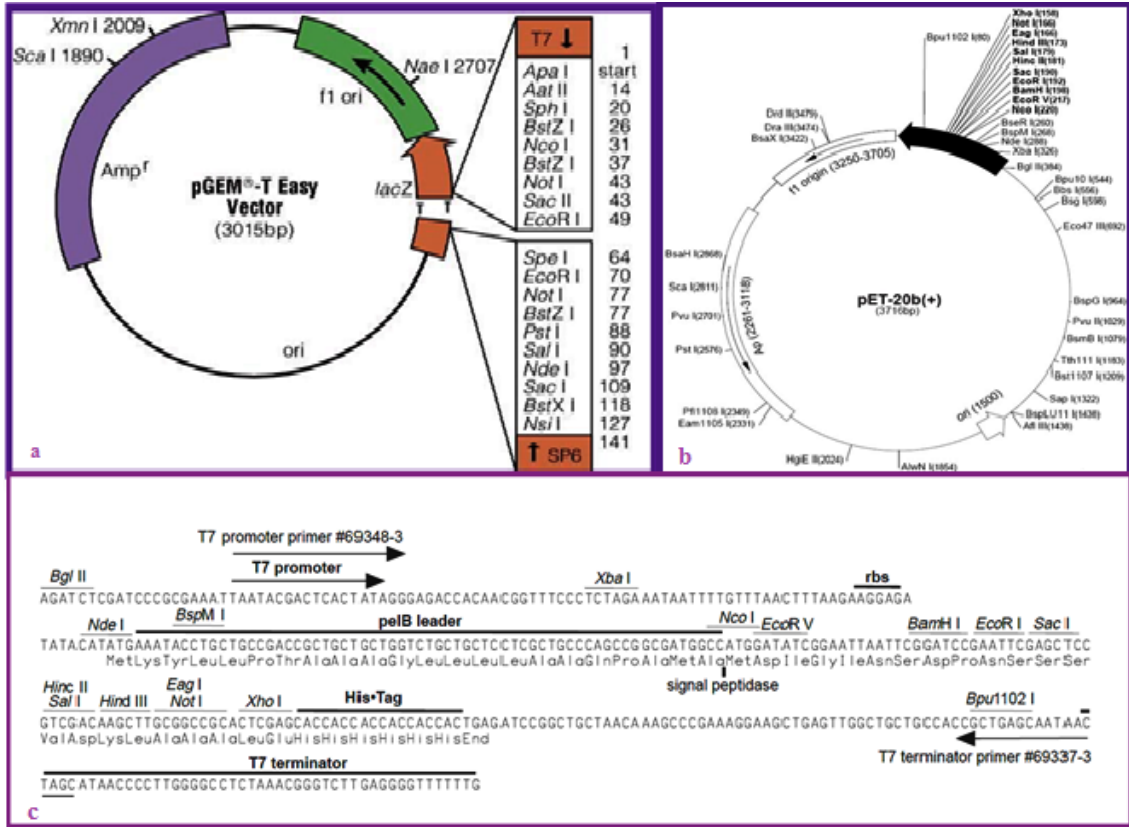
Çizelge 3.3. PEL geninin çoğaltılmasındaki PCR koşulları

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre (dak.)	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94	1	1
Denatürasyon	94	1	
Bağlanma	64	1	38
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	10	1
Bekleme	4	∞	1

3.2.9. PEL geninin klonlanması

Klonlamada kullanılan vektörler

Klonlama çalışmasında PEL geni klonlamak ve protein ekspresyonunu gerçekleştirebilmek için pGEM®-T Easy Vector (Promega a1360) ve Pet-20b(+) kullanılmıştır. pGEM®-T Easy Vector (Promega a1360) klonlama vektörü olarak kullanılırken, Pet-20b(+) ekspresyon vektörü olarak seçilmiştir. Klonlama çalışmalarında kullanılacak vektörler çoğaltılan PEL geninin sekans dizisi dikkate alınarak seçilmiştir. Çoğaltılan PEL geninde T7 promotor tarafına denk gelecek olan bölgede BamHI kesim bölgesi bulunduğundan seçilecek olan vektörde SP6 promotor bölgesinde NotI kesim bölgesi olmasına dikkat edilmiştir. Çünkü protein ekspresyonu için klonlanacak olan Pet-20b(+) vektöründe de T7 promotor bölgesinde BamHI ve SP6 promotor bölgesinde NotI kesim enzimleri olarak kullanılacaktır. Bunun yanı sıra Pet-20b(+) vektörü seçilirken de herhangi bir çerçeve kayması olmaması için, gen bölgemizde mevcut olan BamHI kesim bölgesi göz önünde bulundurulmuştur. Vektörlerin gen haritaları Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. PEL BS6 geninin klonlanmasında vektörler ve kesim bölgeleri a: pGEM-T Easy Vector (Klonlama vektörü) ve b: Pet-20b(+) (Ekspresyon Vektörü) ve c: Pet-20b(+) T7 promotor, T7 Terminatör ve kesim bölgeleri

Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi yatay jel elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1X 'lık TAE (Tris-Asetat-Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) ile %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Tanka dikkatlice dökülerek kaparcık oluşumu engellenmiş, tarak dikkatlice yerleştirilmiş ve yaklaşık 30 dakika beklenmiştir. +4°C'de bekletilen PCR ürünleri yükleme boyası ile 1/5 (boya-örnek) oranında hazırlanarak jele yüklenmiştir. İlk kuyucuğa daima marker yüklenmiştir. DNA örneklerinin yüklendiği jel yatay elektroforez sisteminde ilk 20 dak. 80 voltta sonrasında ise 100 voltta 40 dak. daha yürütülmüştür. Yürütülen jel etidyum bromürde boyandıktan sonra görüntüleme sisteminde UV ışığın altında incelenmiş ve görüntüsü kaydedilmiştir. İstenilen DNA bandına denk gelen PCR ürünü (Gene Elute PCR Clean-Up) saflaştırıldıktan sonra miktarı nano drop olarak belirlenmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

Kompotent hazırlama

E. coli JM101 ' den 3 mL LB içerisine gece kültürü alınmıştır (37 °C). İnkübasyon süresi sonunda 600 nm' de 1:10 oranında rneği sulandırarak hücre yoğunluğu ölçülmüştür (Curve: 3 mL su rnek: 300 μ L JM101 ve 2700 μ L su). Ölçülen yoğunluktan 30 μ L LB içerisine 0,1 cfu/ml yoğunluk olacak şekilde ekim yapılmıştır. 37°C'de 1 saat 20 dak. büyütülmüştür (Yoğunluk: 0,45-0,55). +4°C'de 4500 rpm'de 5 dak. santrifüjle çöktürülmüştür. Pellet alınıp ve süpernatant atılmış ve üzerine 10 mL 100 mM CaCl_2 ilave edildikten sonra 30 dk buzda bekletilmiştir. +4°C'de 4500 rpm'de 5 dak. santrifüjlenmiştir. Pellet alınıp ve üzerine 2 mL soğuk 100 mM CaCl_2 eklenmiş ve elde hassas bir şekilde çözülmüştür.

Kompetent kontrolü

Bir mL LB besiyerine 50 μ L kompetent hücre inoküle edilmiş ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bir saat sonra büyüyen hücreleri bir eppendorfa alıp 6000 q'de 3 dak. ktrlmştr. Süpernatant atılıp pellet alınmıştır. Elde edilen pellet Ampsiline (Amp⁺) LB agara (40 μ L xgal/ 40 μ L IPTG) ekilmiş ve 37°C'de büyümeye bırakılmıştır. Beyaz koloniler seçilip LB amp⁺. brota ekilmiştir.

Transformasyon

Her bir tüpe 200 μ L kompetent koyulmuş ve zerine 10 μ L ligasyon ürünü eklenmiştir. Kontrol hazırlanmış ve kontrole sadece kompetent koyulmuştur. 30 dak. buzda bekletilmiş ve 2 dak. 45°C'de sıcaklık şokuna maruz bırakılıp sonra tekrar buza alınmıştır. zerine 1000 μ L LB eklenmiş, 2 saat 37°C'de bekletilmiş ve 6000 q'de 3 dak. ktrlmştr. Sonra 40 μ L (100mM) IPTG ve 40 μ L XGAL yayılmış ampisiline (Amp⁺) LB ağara her bir tüpten ekim yapılmıştır. Seçilen beyaz kolonilerin genin tamamını alıp almadığı kontrol edilmiştir.

Kit ile plazmit izolasyonu (Promega LOT: 0000150219)

Bir gece önceden 5 mL'ye hazırlanan gece kltrleri (Amp⁺ LB) eppendorfa alınarak 1000 rpm'de 2 dak. ktrlmştr. Pellet 250 μ L "Cell resuspension solution" içinde vortekslenerek çözülmüştür. zerine 250 μ L " Cell lysis solution" eklenmiş ve 4-5 kez alt-st edilmiştir. "Alkaline protease solution" dan 10 μ L eklenmiş ve 4-5 kez alt-st

edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dak. bekletilmiş. 350 µL "Neutralization solution" eklenmiş ve 4-5 kez alt-üst edilmiştir. 13000 rpm'de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant kısım toplama tüpündeki kolonlara alınmıştır. 1 dak. 13000 rpm'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır. 750 µL "Yıkama Solüsyonu" ekleyip 13000 rpm'de 1 dak. santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmış 250 µL "Yıkama Solüsyonu" eklenmiş ve 2 dak. santrifüj edilmiştir. Mini kolonlar yeni tüplere aktarılmış ve üzerine 55 µL "Nuclease free water" eklenip 1 dak. santrifüj edilmiştir.

PEL geninin pGEMT vektörüne klonlanması

Klonlamaya başlanmadan önce kullanılan restriksiyon enzimlerinin kesimi ve ligasyonda kullanılan T4 DNA Ligaz ile 2 flexi ligaz tamponunun aktivitesi test edilmiştir. Restriksiyon enzimlerinin vektördeki kesim bölgelerinin doğrulanması için pGEM-T Easy Vector (Promega) protokolünde belirtildiği üzere ligasyon etkinliği denenmiştir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. pGEM-T Easy Vector ligasyon kontrol bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µL)
Tampon (2X)	10,0
Ligaz	1,5
PGEMT vektör	0,5
DNA (100 pmol)	3,0
Steril Ultra Saf Su ^a	5,0
Son Hacim	20,0

^a: Nükleaz yoksun saf su

Çizelge 3.5. pGEM-T Easy Vector kesim bileşenleri

Bileşen	Miktar (µL)
Tampon	2,0
Restriksiyon Enzimi	1,0
RNaz'lı su ^a	7,0
µL DNA (pGEM-T Easy Vector)	10,0
Son Hacim	20,0

^a: RNaz'lı su; 250 µL su + 10 µL RNaz (10 mg/mL) eklenerek elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. PCR ürünü (PEL geni) kesim bileşenleri

Bileşen	Miktar (µL)
Tampon	2,0
Enzim	1,0
RNaz'lı su ^a	7,0
Saflaştırılmış PCR ürünü	10,0
Son Hacim	20,0

^a: RNaz'lı su; 250 µL su + 10 µL RNaz (10 mg/mL) eklenerek elde edilmiştir.

Tag DNA Polimeraz ile PCR reaksiyonunun ardından lejde görüntülenen PCR ürününün miktarı nanodrop olarak belirlenmiş ve saflığı kontrol edilmiştir (Desjardins, P., 2010). Çıkarılan gen bölgesinin klonlama vektörüne uygun olabilmesi için (yapışkan uç) aynı kesim enzimleri ile (BamHI-(Promega) ve NotI-(Promega)) muamele edilmiştir. Bu gen bölgesi pGEM-T Easy Vector (Promega) vektörüne klonlanarak geni taşıyan koloniler seçilmiş geni taşıyıp taşımadığının kontrolü için aynı kesim enzimleri ile muamele edilerek test edilmiştir. Kesim 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakılarak yapılmıştır. 2 saat sonra 2 µL boya damlatılmış ve 65°C'de bekletilmiş ve sonrasında % 1'lik jelde yürütülmüştür. Sonrasında ise bu gen bölgesi aynı kesim noktalarını taşıyan (BamHI ve NotI) ve ekspresyon vektörü olan Pet-20b(+)'ye aktarılmıştır. Bu aktarım gerçekleştirilmeden önce pet-20b(+)'nin uygunluğu (çerçeve kayması önlemek amacı ile), belirlenen kesim enzimlerinin genimizi kesip kesmediği eğer kesiyor ise nerelerden kestiği ise nebcutter programı ile kontrol edilmiştir. Aktarılan genin ters mi düz mü olduğunu anlamak için BamHI ve NotI ile kesimler yapılarak kontroller sağlanmıştır. Genin doğrulaması sekan analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant protein ekspresyonu

Klonlama sonrası enzim ekstraksiyonu için Pet-20b(+) içeren BL21 hücrelerinden 5'er mL LB besiyerine (kan⁻ ve kan⁺) ekim yapılmış, 37°C'de 2 saat OD₆₀₀ 'de 0,6-0,9 cfu/ml oluncaya kadar büyütülmüştür. Gerekli büyüme sağlandıktan sonra 100 µL IPTG(1M) eklenmiştir. IPTG ilavesiyle 3 saat daha 37°C'de büyütülmüş ve 5000 rpm'de 4°C'de 5 dak. santrifüjlenmiştir. Süpernatant steril bir falkona alınıp pellet 2 mL 500 mM pH 7,4 tris tamponunda elle çözülmüştür. Çözülen pellete 100 µL (10 mg/mL) lizozim eklenmiş ve 30°C'lik etüvde 30 dak. bekletilmiştir. Örnekler buz içindeyken, sonikatörde 1 dak. 0,6'lık

döngü halinde %80 hızda hüceler patlatılmış ve 14000 rpm'de 4°C'de 20 dak. santrifüjlenmiştir. Süpernatant eppendorfa aktarılmış ve -80 de saklanmıştır.

3.2.10. Klonlama sonrası pektat liyaz proteininin Western i-Blot ile belirlenmesi

3.2.9 'da verildiği şekilde PEL BS6 geni klonlanmış ve kolnlanan geni içeren *E. coli* BL21 hücresinden belirtilen şekilde elde edilen süpernatant kullanılarak PEL BS6 proteininin molekül ağırlığı belirlenmiştir.

Western i-Blot için gerekli çözeltilerin hazırlanması: 2- (*N-morfolino*) *etan sülfonik asit* (MES) SDS yürütme tamponu 20X: 50 mL MES SDS yürütme tamponu 20X'den (NuPAGE®) alınmıştır. Son hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. *Bloklama solüsyonu*: 5 mL ddH₂O, 2 mL bloklayıcı seyreltici (A), 3 mL bloklayıcı seyreltici (B) karıştırılarak hazırlanmıştır. Toplam hacim 10 mL'dir. *Birincil Antikor Seyreltici*: 7 mL ddH₂O, 2 mL bloklayıcı seyreltici (A), 1 mL bloklayıcı seyreltici (B) karıştırılarak hazırlanmıştır. Birincil antikor 1:1000-1:5000 dilüsyon oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Toplam hacim 10 mL'dir. *Antikor Yıkama Solüsyonu*: 112,5 mL ddH₂O, 7,5 mL antikor yıkama solüsyonu (16X) karıştırılarak hazırlanmıştır. Toplam hacim 120 mL'dir.

Elde edilen filtratların protein miktarları Bradford yöntemi ile tespit edilmiştir. Proteinler denatüre edici ajan ile 10 dakika 90°C'de denatüre edilmiştir. Denatüre edilen proteinler jele yükleninceye kadar +4 °C'de bekletilmiştir. Proteinler ve protein markerı (10-170 kDa, Page Ruler Prestained) %4-12'lik hazır bis-tris jele (NuPAGE®) yüklendikten sonra dikey jel elektroforez sistemine (XCell Invitrogen) iç tank haznesinin tamamı tampon ile doldurulup, yaklaşık 60 dakika 120 voltta yürütülmüştür. iBlot® jel transfer cihazı kullanılarak (iBlot®; Invitrogen), proteinler jelden poliviniliden florür (PVDF) membrana (NuPAGE®) kuru transferle aktarımı sağlanmıştır.(7 dak., P3). Sonraki aşamalarda ise Western Breeze kiti (Invitrogen) kullanılmıştır. Kit bloklama solüsyonunu, birincil antikor seyrelticiğini, ikincil antikor solüsyonunu (anti-tavşan), kromojenik substratı ve yıkama solüsyonlarını içermektedir. Membran; deterjan içeren konsantre salin tampon solüsyonu ve hammerstein kazein solüsyonu ile 30 dak. bekletilerek bloke edilmiştir.

Daha sonra pektat liyaz poliklonal birincil antikoru Tübitak MAM tarafından şu şekilde sentezlenmiştir; iki Yeni Zelanda tavşanı, 2 haftalık aralıklarla 1 mg pektat liyaz enzimi (*Aspergillus* sp., Megazyme, Lot 111201a) ile subkutan ve intraperitoneal olarak bağışıklandı. Freund Komple Adjuvanı ile 1:1 oranında seyreltilmiş bir ml antijen

(*Aspergillus*'tan pektat liyaz enzimi) deri altı olarak tavşanlara uygulandı. İki haftalık aralıklarla aynı miktarda Freund'un eksik tamamlayıcı adjuvantı ile karıştırılan antijenler subkutan ve intraperitoneal uygulandı. Son enjeksiyondan sonra aşılanmış tavşanlardan 10 gün sonra kan serum örnekleri toplandı, dolaylı ELISA Yöntemi ile serumdaki antikor seviyeleri (1/100 seyreltme oranından 1/10000 seyreltme oranına kadar serum antikor seviyesi) belirlendi.

Daha sonra *Aspergillus niger*'den elde edilen pektat liyaz poliklonal birincil antikor (Tübitak MAM) ile 1 saat boyunca işaretlenmiştir. Membran deterjan içeren konsantre salin tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra pektat liyaz proteinine özgü birincil antikora bağlanacak olan alkalın fosfataz bağlı ikincil antikor (anti-tavşan IgG) ile 30 dak. muamele edilmiştir. Fazla ikincil antikor, deterjan içeren konsantre tuz tampon solüsyon yıkamaları ile uzaklaştırıldıktan sonra kromojenik substrat ile membranda mor bantlar oluşana kadar muamele edilmiştir. Mor bantların oluşumu 1 ile 60 dak. arasında gerçekleşir. Kromojenik substrat, alkalın fosfataz için 5-bromo, 4-kloro, 3-indol fosfat/nitro-mavi tetra zolium (BCIP/NBT) substratıdır. Oluşan kromojenik bant, görüntüleme sisteminde (BIO-RAD) tespit edilmiştir.

3.2.11. Klonlama sonrası karakterizasyon deneyleri

Klonlama sonrasında klonlama öncesinde de yapıldığı gibi reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi, substrat konsantrasyonu çalışmaları yapılmıştır. Buna ek olarak metal ve iyonlara dirençliliği test edilerek karakterize edilmiştir. Klonlama öncesi BS6 PEL enziminin SDS-Page ile belirlenen moleküler ağırlığı, klonlama sonrası Western i-Blot ile belirlenmiştir.

3.2.12. Rekombinant PEL BS6 (RPEL BS6) enzim ile meyve suyu berraklaştırma etkinlik testi

Rekombinat ve rekombinat olmayan saflaştırılmış PEL BS6 enzim meyve suyunu berraklaştıma etkinliği elma ve portakal olmak üzere iki farklı meyve suyunda denenmiştir. Elma ve portakal blenderdan geçirilip, süzölmüştür. Sonrasında ise, 1600 µL meyve suyu 400 µL saflaştırılmış enzim olacak şekilde, reaksiyon hacmi toplam 2 mL'ye ayarlanmıştır. Enzimler için diğer çalışmalarda kullanılan optimum pH koşulları oluşturulmuş ve 60 °C' de 30 dak. (0,5 mM CaCl₂ ilave edilmiş) olmak üzere reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Her bir meyve suyu için negatif

kontrol grubu oluşturulmuş, bu gruplara enzim ilave edilmemiş, ancak diğer gruplarla aynı işlemlere tabi tutulmuştur.

3.2.13. İstatiksel analiz

Tüm çalışmalar 3 paralelli ve 3 tekrarlı olarak yapılmış ve çalışmaların ortalama sonuçları verilmiştir. İstatiksel analizlerde SPSS Inc. Software (16.0 versiyonu; SPSS Inc.) kullanılmıştır. pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu ile PEL spesifik aktivitesi ve depolanma stabilitesi ile oransal aktivite arasındaki korelasyona bakılmıştır. Sonuçlar Spearman Brown korelasyon katsayısı ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,01$, $p<0,02$ ve $p<0,05$ alınmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak belirlenmiş ise, bulunan ilişki anlamlıdır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p>0,05$ olarak belirlenmiş ise bulunan ilişki anlamlı değildir. Aynı şekilde, istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,01$ ve $p<0,02$ olarak belirlenmiş ise, bulunan ilişki anlamlıdır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p>0,01$ ve $p>0,02$ olarak belirlenmiş ise bulunan ilişki anlamlı değildir.



4. DENEYSEL BULGULAR

Bu araştırmada PEL enzim aktivitesi bakımından taranan 7 bakteri ve 5 maya türü ile çalışılmıştır. Mikroorganizmalar Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

4.1. PEL Protein Miktar Tayini ve Enzim Aktivite Sonuçları

Çalışmalarda yer alan mikroorganizmalardan bakteriler; 18 saat 37°C’de mayalar ise 30°C’ de 48 saat inkübasyon sonucunda Bölüm 3.2.2.’de anlatıldığı gibi kültür filtratlarından PEL proteinleri elde edilmiştir. PEL enzim aktivite ölçümlerinde % 0,25’lik substrat kullanılarak, 0,5 mM CaCl₂, 60 °C’de 30 dakika reaksiyon süresinde poligalakturonik asit üzerindeki glikozidik köprülerin kırılması ile doymamış Δ4,5 –D- galakturonat ürününün 235 nm’de spektrofotometrik olarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. Protein miktarları, BSA protein standardı esas alınarak Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2. ve 4.3.’de görülmektedir.

Çizelge 4.1. Bakterileriyal ekstrasellüler PEL’lerin enzim ve spesifik enzim aktiviteleri

Tür Adları	Protein Miktarı (mg/mL)*	Enzim Aktivitesi (Unit/mL)*	Spesifik Enzim Aktivitesi (Unit/mg)*
<i>Bacillus pumulis</i> BS1	0,084 ± 0,02	0,36 ± 0,03	4,24 ± 0,03
<i>Bacillus subtilis</i> BS2	0,068 ± 0,02	0,64 ± 0,01	9,49 ± 0,01
<i>Bacillus cereus</i> BS3	0,128 ± 0,01	0,65 ± 0,04	5,08 ± 0,04
<i>Bacillus pasteurii</i> DSM 33	0,047 ± 0,03	0,60 ± 0,00	12,85 ± 0,00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BS6	0,077 ± 0,02	0,66 ± 0,03	8,56 ± 0,03
<i>Bacillus licheniformis</i> BS7	0,154 ± 0,01	0,66 ± 0,03	4,27 ± 0,03
<i>Serratia marcescens</i> BS9	0,114 ± 0,02	0,65 ± 0,01	5,73 ± 0,01

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

Yapılan çalışma sonucunda tüm filtratlarda 0,047-0,154 mg/mL protein miktarı, 0,36-0,66 U/mL PEL enzim aktivitesi, 4,24-12,85 U/mg PEL spesifik enzim aktivitesi tespit edilmiştir. *B. pumulis* BS1 hariç tüm bakterilerde enzim aktivitesi birbirine yakın bulunmuştur. *B. pasteurii* DSM 33 (12,85 U/mg), *B. subtilis* BS2 (9,49 U/mg) ve *B. amyloliquefaciens* BS6 (8,56 U/mg) suşlarının PEL enzimleri yüksek spesifik enzim

aktivitesi göstermiştir. *B. cereus* BS3 (0,128 mg/mL), *B. licheniformis* BS7 (0,154 mg/mL) ve *S. marcescens*'de BS9 (0,114 mg/mL) ise protein miktarı yüksek bulunmuş ve yüksek spesifik aktiviteyi belirleyici olan birim protein başına düşen enzim miktarı olduğundan spesifik enzim aktivitesi düşmüştür.

Çizelge 4.2. Mayaların PEL'lerinin enzim ve spesifik enzim aktiviteleri

Tür Adları	Protein Miktarı (mg/mL)*	Enzim Aktivitesi (Unit/mL)*	Spesifik Enzim Aktivitesi (Unit/mg)*
<i>Debaryomyces hansenii hansenii</i> M1	0,012 ± 0,02	0,66 ± 0,01	54,7 ± 0,01
<i>Klavyroomycetes maxianus</i> M2	0,028 ± 0,01	0,62 ± 0,03	22,3 ± 0,03
<i>Pichia fermentas</i> M3	0,029 ± 0,03	0,61 ± 0,01	21,2 ± 0,01
<i>Pichia fermentas</i> M4	0,037 ± 0,03	0,65 ± 0,02	5,1 ± 0,02
<i>Saccharomyces boulardii</i> M5	0,032 ± 0,01	0,63 ± 0,04	19,6 ± 0,04

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

Çalışmamız sonucunda *D. hansenii hansenii* M1 (54,7 U/mg), *K. maxianus* (M2, 22,3 U/mg) ve *P. fermentas* M3 (21,2 U/mg) yüksek ekstrasellüler PEL spesifik enzim aktivitesi göstermiştir. Tüm mayaların enzim aktivitesi birbirine yakın bulunurken *D. hansenii hansenii* M1'in hem enzim aktivitesi hem de spesifik enzim aktivitesi öne çıkmaktadır. *P. fermentas* M4 (0,037 mg/mL), *S. boulardii* M5 (0,032 mg/mL) ve *P. fermentas* M3'te ise protein miktarı (0,029 mg/mL) yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışma sonucun tüm mayalarda 0,012-0,037 mg/mL protein miktarı, 0,61-0,66 U/mL PEL spesifik enzim aktivitesi, 54,7-5,1 U/mg PEL spesifik enzim aktivitesi tespit edilmiştir. Ekstrasellüler PEL enzim aktivitesinin protein miktarı ile ilişkili olduğundan protein miktarı düşük olan fitratlarda PEL spesifik enzim aktivitesi yüksek bulunmuştur.

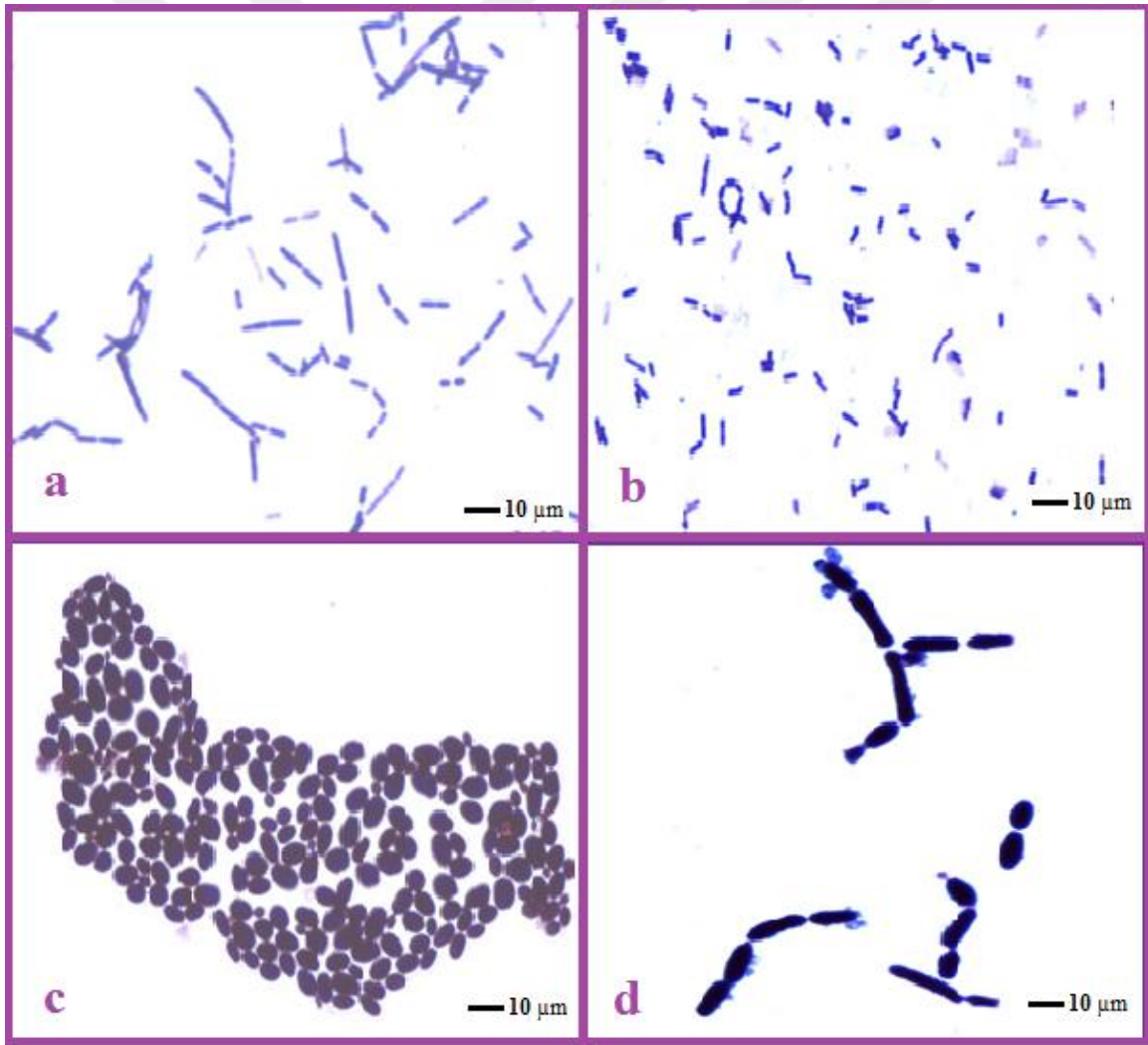
4.2. Araştırmada Kullanılan Mikroorganizmalar Moleküler Tanımlama Sonuçları

PEL enzim aktivitesi bakımından yüksek aktiviteye sahip mikroorganizmalarda doğrulama amacı ile tekrar moleküler tanımlama yapılmıştır. Doğrulama tanımlamaları sonucunda *Bacillus subtilis* (BS2) KF863785.1 GenBank numaralı suş ile % 99 benzerlik gösterirken, *Bacillus pumulis* (BS1) KM289134.1 GenBank numaralı suş ile % 99 ve *B. amyloliquefaciens* BS6 KR045286.1 GenBank numaralı suş ile % 99 benzerlik göstermiştir. Çalışmada kullanılan suşlar ve kaynakları 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Yüksek PEL aktivitesine sahip tanımlama sonuçları

Tanımlanan Mikroorganizmalar	Genbank Numaraları	% Benzerlik
<i>Bacillus subtilis</i> BS2	KF863785.1	%99
<i>Bacillus pumilis</i> BS1	KM289134.1	%99
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BS6	KR045286.1	%99

Çalışılan bazı mikroorganizmaların morfolojilerini gösteren mikroskop görüntüleri Resim 4.1.'de verilmiştir; *B. pasteurii* (Resim 4.1 a), *B. amyloliquefaciens* (Resim 4.1. b), *D. hansenii hansenii* (Resim 4.1. c) ve *K. marxianus* (Resim 4.1. d) yüksek PEL aktivitesi göstermiştir.



Resim 4.1. Enzim aktivitesi yüksek bazı bakterileri ve mayaların mikroskopik görüntüleri (100 X büyütme) a: *Bacillus pasteurii*, b: *B. amyloliquefaciens*, c: *D. hansenii hansenii*, d: *K. marxianus*

4.3. Bakteri ve Mayalardan Elde Edilen PEL Enziminin Optimizasyonu

Bakterilerden *B. amyloliquefaciens* BS6, mayalardan ise *D. hansenii hansenii* M1 yüksek PEL spesifik aktivite gösterdiği için enzim optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir. Enzimin optimum pH'sı, sıcaklığı, tampon konsantrasyonu, pH stabilitesi, sıcaklık stabilitesi, metal ve iyonların enzim aktivitesine etkisi tespit edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları esnasında amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz çalışmaları yapılmış ancak ekstrasellüler bir enzimle çalışıldığı için bu işlemler esnasında PEL proteininde de kayıplar gözlemlendiği için diğer çalışmalara sadece ultrafiltrasyon uygulanmış filtratlar (tüm çalışmalar ultrafiltre edilmiş filtratlar ile yürütülmüştür) ile devam edilmiştir.

4.3.1. PEL enzim aktivitesine pH'nın etkisi

PEL enzim aktivitesine pH'nın etkisine bakılırken 60 °C'de 30 dak., % 0,25'lik substrat (Elma pektini) ve *B. amyloliquefaciens* BS6 için 50 mM Glisin-NaOH ve *D. hansenii hansenii* M1 için ise 50 mM Tris-HCl reaksiyon tamponunun pH'sı 4,0-11,0 arasında ayarlanarak, *B. amyloliquefaciens* BS6 (50 mM Glisin-NaOH için) ve *D. hansenii hansenii* M1 (50 mM Tris-HCl için)'den elde edilen filtratların PEL enzim, spesifik enzim ve rölatif aktiviteleri belirlenmiştir.

Yapılan denemeler sonucunda iki enziminde değişen pH'larda aktivitesini yüksek oranda koruduğu, asidik (pH 4,0) ve bazik pH'ya (11,0) dayanıklı olduğu görülmüştür. *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin optimum pH'sı 9,0 olarak belirlenirken, *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen enzimin pH'sı 8,0 olarak belirlenmiştir (%100 rölatif aktivite). Her iki enzimin de alkali özellikte olduğu gözlemlenmiştir Bu enzimler alkali pH'da aktif olmakla birlikte asidik pH'larda da aktivitesini önemli ölçüde korumuştur. *D. hansenii hansenii* M1 pH 4,0'te % 82,3 rölatif aktivite, *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen PEL enzimi ise % 71,6 rölatif aktivite göstermiştir.

B. amyloliquefaciens BS6'dan elde edilen PEL için pH ile PEL rölatif aktivitesi arasında pH 4,0'ten pH 9,0'a kadar pozitif yönlü, pH 9,0'dan pH 11,0'e kadar negatif yönlü yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$). *D. hansenii hansenii* M1 için pH ile PEL rölatif enzim aktivitesi arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

Çizelge 4.4. *B. amyloliquefaciens* BS6'e ve *D. hansenii hansenii* M1'e ait ekstrasellüler PEL'e pH'nın etkisinin rölatif (%) aktivite olarak gösterimi

pH	Rölatif Aktivite (%)*	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> BS6	<i>D. hansenii hansenii</i> M1
4,0	71,6 ± 0,5	82,3 ± 0,2
4,5	74,3 ± 0,3	83,9 ± 0,4
5,0	75,6 ± 0,5	83,8 ± 0,1
5,5	78,7 ± 0,1	85,6 ± 0,1
6,0	80,5 ± 0,2	85,8 ± 0,3
6,5	82,7 ± 0,4	87,5 ± 0,5
7,0	84,9 ± 0,4	92,5 ± 0,2
7,5	92,9 ± 0,3	96,8 ± 0,1
8,0	93,8 ± 0,3	100,0 ± 0,0
8,5	96,4 ± 0,2	96,46 ± 0,2
9,0	100,0 ± 0,0	96,21 ± 0,1
9,5	96,2 ± 0,4	94,54 ± 0,4
10,0	89,4 ± 0,7	89,79 ± 0,1
10,5	89,0 ± 0,3	87,6 ± 0,3
11,0	88,6 ± 0,4	86,2 ± 0,2

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

4.3.2. PEL enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

B. amyloliquefaciens'den elde edilen ekstrasellüler PEL enzimine sıcaklığın etkisi, 30 dak. % 0,25'lik substrat (Elma pektini), 50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 9,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 15-90°C arasında ayarlanarak, farklı sıcaklıklara göre test edilmiştir. *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin optimum sıcaklığının 60°C olduğu ancak en yüksek sıcaklıkta (90°C) da aktivitesini % 64,5 oranında koruduğu belirlenmiştir. En düşük sıcaklık olarak test edilen 15°C'de rölatif (%) aktivitesinin 89 oranında korumuş ve enzim aktivitesinde dikkate değer bir düşme belirlenmemiştir. *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen PEL için sıcaklık ile PEL rölatif aktivitesi arasında 15°C'den 60°C'ye kadar pozitif yönlü, 60°C'den 90°C'ye kadar ise negatif yönlü yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

50 mM Tirs-HCl tamponunun pH'sı 8,0'e, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 20; 25; 30; 35; 40; 45; 50; 55; 60; 65; 70; 75; 80°C'ye ayarlanarak *D. hansenii hansenii* M1'in

rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin optimum sıcaklığının 25°C olduğu, hem düşük sıcaklıkta (15°C), hem yüksek sıcaklıkta (90°C) aktivitesini % 90 oranında koruduğu belirlenmiştir.

D. hansenii hansenii M1' den elde edilen enzimin *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen PEL enzimine göre daha dayanıklı olduğu görülmüştür. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL hem yüksek sıcaklıkta hemde düşük sıcaklıkta aktivite gösterdiğinden sıcaklık stabil bir enzimdir. Bu nedenle bu enzimin geniş endüstriyel kullanımı söz konusu olabilir. *D. hansenii hansenii* M1 için sıcaklık ile PEL rölatif enzim aktivitesi arasında 15°C'den 25°C'ye kadar pozitif yönlü, 25°C'den 90°C'ye kadar ise negatif yönlü yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

Çizelge 4.5. *B. amyloliquefaciens* BS6'dan ve *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL'in değişen sıcaklıklardaki rölatif enzim aktivitesi

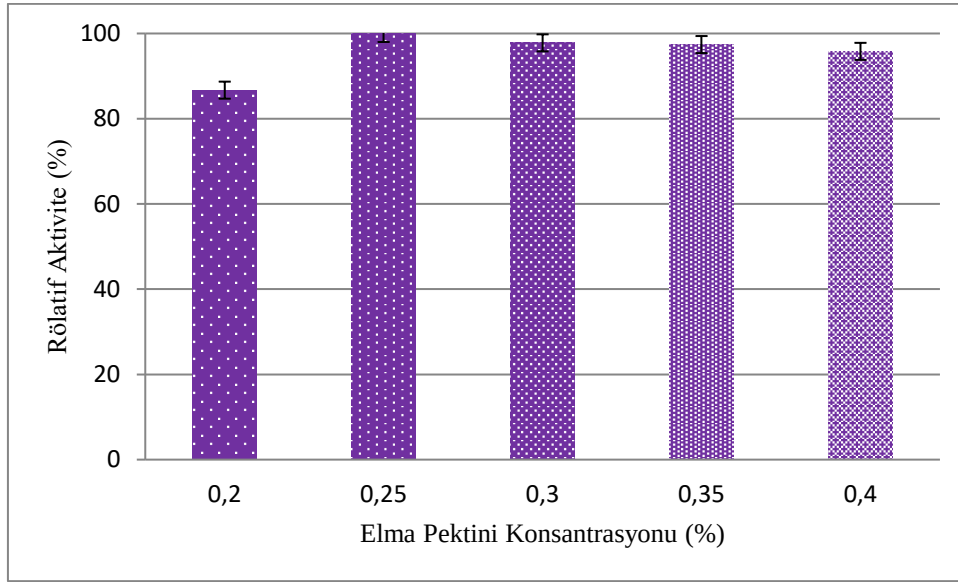
Sıcaklık (°C)	Rölatif Aktivite (%)*	
	<i>B. amyloliquefaciens</i> BS6	<i>D. hansenii hansenii</i> M1
15	88,9 ± 0,5	97,5 ± 0,3
20	89,7 ± 0,2	98,4 ± 0,1
25	91,0 ± 0,3	100,0 ± 0,0
30	93,1 ± 0,2	97,5 ± 0,1
35	94,7 ± 0,1	97,1 ± 0,1
40	95,1 ± 0,2	96,5 ± 0,4
45	96,3 ± 0,4	96,1 ± 0,2
50	97,9 ± 0,1	94,2 ± 0,1
55	97,9 ± 0,1	94,0 ± 0,1
60	100,0 ± 0,1	93,5 ± 0,3
65	97,1 ± 0,4	92,1 ± 0,5
70	75,5 ± 0,2	90,5 ± 0,2
75	73,0 ± 0,1	87,2 ± 0,1
80	71,0 ± 0,3	85,4 ± 0,1
85	66,5 ± 0,2	83,1 ± 0,2
90	64,5 ± 0,2	80,4 ± 0,1

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

4.3.3. PEL enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi

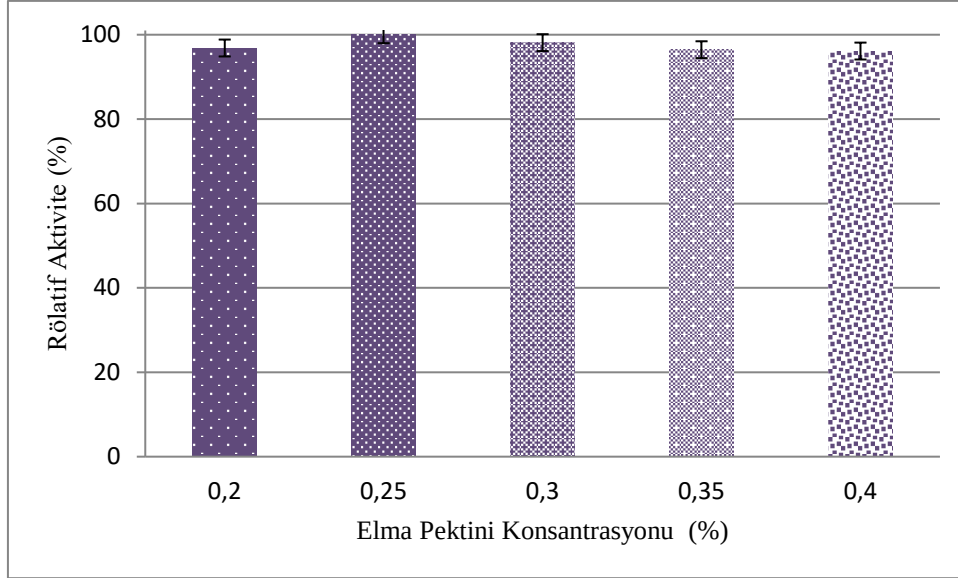
B. amyloliquefaciens den elde edilen ekstrasellüler PEL enzimine substrat konsantrasyonunun etkisi, 50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 9,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 60°C'ye, reaksiyon süresi 30 dak., substrat (Elma Pektini % 0,25)

konsantrasyonu ise % 0,20- 0,40'a ayarlanarak farklı konsantrasyonlarda denenmiş ve substrat konsantrasyonuna bağlı PEL enziminin ac enzim aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.1.). Denenen konsantrasyonların içinde optimum substrat konsantrasyonunun % 0,25 olarak belirlenmiştir. Artan substrat konsantrasyonunda kısmi bir enzim aktivite düşüşü gözlemlenmiştir. *B. amyloliquefaciens* BS6 için substrat konsantrasyonu ile PEL rölatif aktivitesi arasında % 0,25'lik substrat konsantrasyonu da dahil pozitif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuş iken ($p<0,05$), % 0,30 ve sonraki konsantrasyonlar arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuçlar Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Subtrat konsantrasyonunun *B. amyloliquefaciens* BS6'den elde edilen ekstrasellüler PEL enzim aktivitesine etkisi. *: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, $\pm$ SD

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 8,0'e, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 25°C'ye, substrat konsantrasyonu ise % 0,20-0,40 arası ayarlanarak *D. hansenii hansenii* M1'in rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin optimum substrat konsantrasyonunun % 0,25 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.). *D. hansenii hansenii* M1 için substrat konsantrasyonu ile PEL rölatif aktivitesi arasında % 0,25'lik substrat konsantrasyonu da dahil pozitif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuş iken ($p<0,01$), % 0,30 ve sonraki konsantrasyonlar arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$). Sonuçlar Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Substrat konsantrasyonunun *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enzim aktivitesine etkisi. *: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, $\pm$ SD

4.3.4. PEL enzim aktivitesine kimyasal ve metallerin etkisi

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 9,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 60°C'ye, substrat konsantrasyonu ise % 0,25'e, Ca^{+2} (CaCl_2), Mg^{+2} (MgCl_2), Mn^{+2} (MnCl_2), Fe^{+2} (FeCl_3), Ba^{+2} (BaCl_2), Tween 20, EDTA, Zn^{+2} (ZnCl_2), Ni^{+2} (NiSO_4), K^{+} (K_2SO_4) gibi kimyasal ve metal iyonların konsantrasyonları 0,5-1,0 mM olacak şekilde (Çizelge 4.6.) *B. amyloliquefaciens* BS6'nın rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin Ca^{+2} (CaCl_2), Mg^{+2} (MgCl_2), Mn^{+2} (MnCl_2), Ba^{+2} (BaCl_2), Ni^{+2} (NiSO_4) varlığında aktivitesinin arttığı, Fe^{+2} (FeCl_3), EDTA varlığında ise aktivitesinin oldukça düştüğü tespit edilmiştir. Tween 20, Zn^{+2} (ZnCl_2), K^{+} (K_2SO_4) varlığı ise aktiviteyi ne olumlu yönde ne de olumsuz yönde etkilememiştir. Fe^{+2} (FeCl_3), EDTA varlığı enzimi inhibe derken, Ca^{+2} (CaCl_2) varlığının enzimin rölatif aktivitesini oldukça yüksek oranda aktive ettiği bulunmuştur. Dolayısı ile Ca^{+2} (CaCl_2) ekstrasellüler PEL enzimi için kofaktör olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi

Kimyasallar / Metal İyonlar	Rölatif Aktivite (%) [*]	
	0,5 (mM)	1.0 (mM)
Boş ^a	100 ± 1	100 ± 1
Ca ⁺² (CaCl ₂)	524 ± 2	521 ± 1
Mg ⁺² (MgCl ₂)	132 ± 3	136 ± 2
Mn ⁺² (MnCl ₂)	154 ± 5	133 ± 3
Fe ⁺² (FeCl ₃)	54 ± 2	42 ± 1
Ba ⁺² (BaCl ₂)	138 ± 4	160 ± 1
Tween 20	103 ± 2	102 ± 1
EDTA	43 ± 1	31 ± 2
Zn ⁺² (ZnCl ₂)	99 ± 2	97 ± 1
Ni ⁺² (NiSO ₄)	132 ± 4	130 ± 2
K ⁺ (K ₂ SO ₄)	101 ± 2	101 ± 1

^a: Reaksiyon karışımına enzim, substrat ve tampon dışında herhangi bir metal veya kimyasal eklenmemiş ^{*}: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 8,0'e, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 25°C'ye, substrat konsantrasyonu ise % 0,25'e, Ca⁺² (CaCl₂), Mg⁺² (MgCl₂), gibi metal iyonlarının konsantrasyonları 0,5-1,0 mM olacak şekilde (Çizelge 4.7.) *D. hansenii hansenii* M1'in rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin Ca⁺² (CaCl₂), Mg⁺² (MgCl₂), varlığında aktivitesinin arttığı, ancak bu artışın dikkate değer düzeyde olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.7. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi

Kimyasallar / Metal İyonlar	Rölatif Aktivite (%) [*]	
	0,5 (mM)	1,0 (mM)
Boş ^a	100,0 ± 0,1	100,0 ± 0,1
MgCl ₂	107,6 ± 0,3	106,9 ± 0,1
CaCl ₂	118,9 ± 0,2	119,4 ± 0,5

^a : Reaksiyon karışımına enzim, substrat ve tampon dışında herhangi bir metal veya kimyasal eklenmemiş , ^{*}: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

B. amyloliquefaciens BS6 için iyon ve iyon konsantrasyonu ile PEL rölatif aktivitesi arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,05$). *D. hansenii hansenii* M1 için iyon ve iyon konsantrasyonu ile PEL rölatif aktivitesi arasında pozitif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

4.3.5. Reaksiyon süresinin etkisi

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 9,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 30-80°C aralığında ayarlanarak; Reaksiyon süresi 20-70 dakika olacak şekilde *B. amyloliquefaciens* BS6'nın rölatif enzim aktivitesi (%) belirlenmiştir. *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin optimum sıcaklığının Çizelge 4.6.'da da görüldüğü gibi 60°C olduğu belirlenmiş olup, optimum reaksiyon süresinin ise 30 dak. olduğu tespit edilmiştir. *B. amyloliquefaciens* BS6 için reaksiyon süresi ile PEL rölatif aktivitesi arasında 30. dak. da dahil pozitif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuş iken ($p<0,05$), sonraki reaksiyon süreleri ile arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

Çizelge 4.8. *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine değişen reaksiyon süresinin etkisi

Sıcaklık (°C)	Reaksiyon Süresi(dak.)*					
	20	30	40	50	60	70
30	98,0 ± 0,3	100 ± 0,1	96,4 ± 0,1	95,6 ± 0,1	94,8 ± 0,3	92,4 ± 0,5
40	97,5 ± 0,2	100 ± 0,4	98,5 ± 0,3	98,4 ± 0,3	96 ± 0,2	93,8 ± 0,2
50	100 ± 0,3	98,5 ± 0,2	97,4 ± 0,5	97,3 ± 0,5	95,8 ± 0,1	95,3 ± 0,3
60	96,7 ± 0,1	100 ± 0,3	99,9 ± 0,2	99,0 ± 0,2	96,7 ± 0,1	95,1 ± 0,6
70	98,8 ± 0,3	100 ± 0,1	97,2 ± 0,2	94,1 ± 0,3	92 ± 0,3	91,4 ± 0,2
80	98,6 ± 0,1	100 ± 0,2	98,1 ± 0,3	96,2 ± 0,2	94,1 ± 0,1	92,1 ± 0,3

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 8,0'e, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 25-80°C'ye ayarlanarak, her bir sıcaklı sabit tutularak; Reaksiyon süresi 20-70 dak. olacak şekilde *D. hansenii hansenii* M1'in rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin optimum sıcaklığının Çizelge 4.7.'dan da görüldüğü gibi 25°C olduğu belirlenmiş olup optimum reaksiyon süresinin ise 30 dak. olduğu tespit edilmiştir. *D. hansenii hansenii* M1 için reaksiyon süresi ile PEL rölatif aktivitesi arasında 30. dak.'da dahil pozitif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuş iken ($p<0,05$), sonraki reaksiyon süreleri ile arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

Çizelge 4.9. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL rölatif enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi

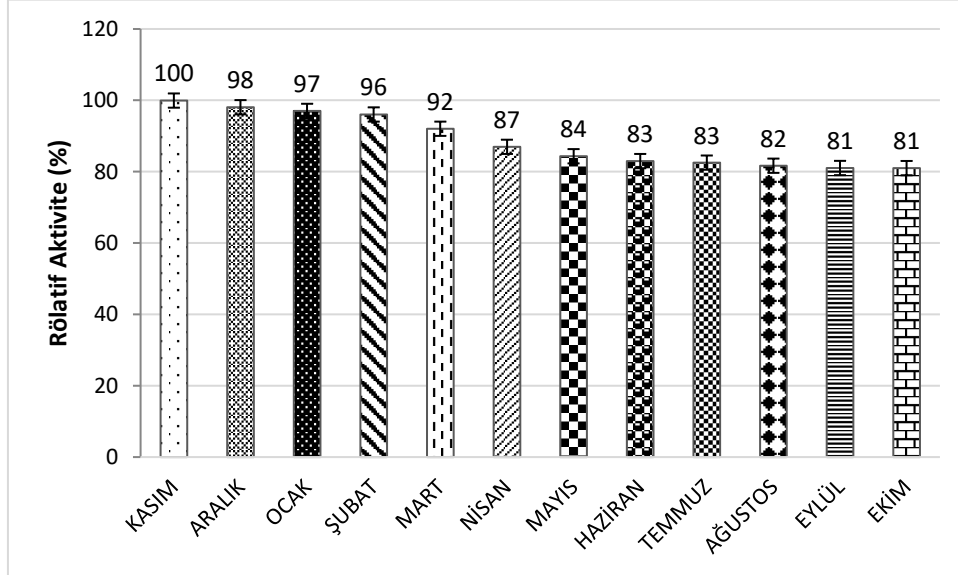
Sıcaklık(°C)	Reaksiyon Süresi(dak.)*					
	20	30	40	50	60	70
25	98,4 ± 0,1	100 ± 0	98,1 ± 0,2	96,5 ± 0,3	96,4 ± 0,1	95,2 ± 0,4
30	97,5 ± 0,3	100 ± 0	98,4 ± 0,3	95,1 ± 0,2	95,0 ± 0,1	94,8 ± 0,2
40	96,5 ± 0,2	100 ± 0	96,3 ± 0,2	92,5 ± 0,1	89,4 ± 0,3	88,2 ± 0,1
50	92,1 ± 0,2	100 ± 0	94,6 ± 0,1	90,1 ± 0,4	86,2 ± 0,1	84,6 ± 0,3
60	91,5 ± 0,1	100 ± 0	91,5 ± 0,1	86,4 ± 0,3	85,4 ± 0,1	82,8 ± 0,2
70	89,4 ± 0,1	100 ± 0	90,2 ± 0,2	85,2 ± 0,1	83,6 ± 0,2	80,1 ± 0,1
80	87,2 ± 0,1	100 ± 0	90,5 ± 0,4	81,2 ± 0,2	80,5 ± 0,4	78,4 ± 0,3

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

Yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda en yüksek aktiviteyi gösteren *B. amyloliquefaciens* BS6 ile diğer çalışmalara devam edilmiştir. Reaksiyon şartları ise; optimum sıcaklık: 60°C, optimum reaksiyon süresi: 30 dak., optimum pH 9,0, optimum substrat konsantrasyonu: % 0,25 elma pektini (pH 8,0), en iyi aktive eden metal iyonu olarak Ca^{+2} (CaCl_2) ve en iyi metal iyon konsantrasyonu ise 0,5 mM olarak tespit edildi.

4.4. PEL Enziminin Klonlama Öncesi Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi

Depolama stabilitesinin belirlenebilmesi için PEL enzimi bir yıl boyunca +4°C’de bekletilmiştir. Her ay PEL enzim aktivitesi ölçülerek enzim aktivitesindeki değişim kaydedilmiştir. 50 mM Glisin-NaOH tamponu pH 9,0, 0,5 mM CaCl_2 ve % 0,25 elma pektini (pH 8,0) kullanılarak reaksiyon 30 dak. 60 °C’de gerçekleştirilmiştir. +4°C’de bekletilen *B. amyloliquefaciens*’den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin aktivitesi başlangıçta %100 korunurken, 12. ayın sonunda % 19 oranında azalma görülmüştür. *B. amyloliquefaciens* BS6 için depolama stabilitesi ile PEL rölatif aktivitesi arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,02$).



Şekil 4.3. PEL BS6 enziminin bir yıllık süreçteki depolama stabilitesi.*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, $\pm$ SD

4.5. PEL Geninin Klonlama Sonuçları

Optimizasyon çalışmaları sonucunda *D. hansenii hansenii* M1’in öne çıkmış olmasına rağmen NCBI (National Center for Biotechnology Information) ‘da *D. hansenii hansenii*

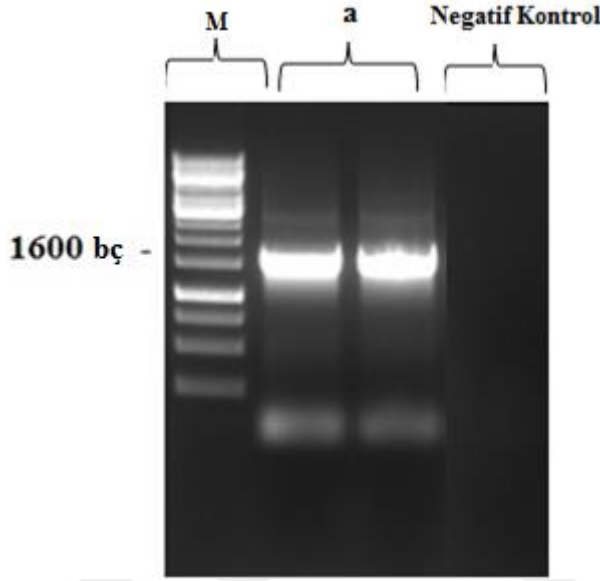
M1'in PEL genine ait bir sekans bilgisi bulunamadığından, klonlama çalışmasına *D. hansenii hansenii* M1 ile devam edilememiştir. Klonlamada kullanılan *B. amyloliquefaciens* BS6 bakterisinden elde edilen PEL enziminin klonlama sonrası tüm enzim aktivite çalışmalarında optimizasyon çalışmasında belirlenen optimum koşullar kullanılmıştır.

4.5.1. PEL enzimini kodlayan genin belirlenmesi ve klonlanması

PEL enzimini kodlayan genin belirlenebilmesi için elde edilen genomik DNA'dan (Bkz., 3.2.8), *B. licheniformis* (AJ517194.1), *Bacillus* sp. P-2850 (AB080666.1), *B. subtilis*, (X74880.1) bakterilerinin NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanındaki dizimleri esas alınarak primer tasarlanmıştır. Tasarlanan primerler Pearl Primer, DNA Star ve NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programları kullanılarak genom içerisinde istenilen bölgeyi içerip içermediği karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Primerlerin genin tamamını içerisine alacak ve gen içerisinde spesifik olmayan yerlere bağlanmayacak şekilde tasarlanmıştır. Klonlama yapılacak hedef BS6 geni ~1600 bp (baz çifti) uzunluğunda olmakla birlikte primerler genin tamamını (Başlangıç ve bitiş kodonları da göz önünde bulundurularak) almak için ~1600 baz çift'lik alanı çoğaltılmıştır.

PCR ile gen izolasyonu

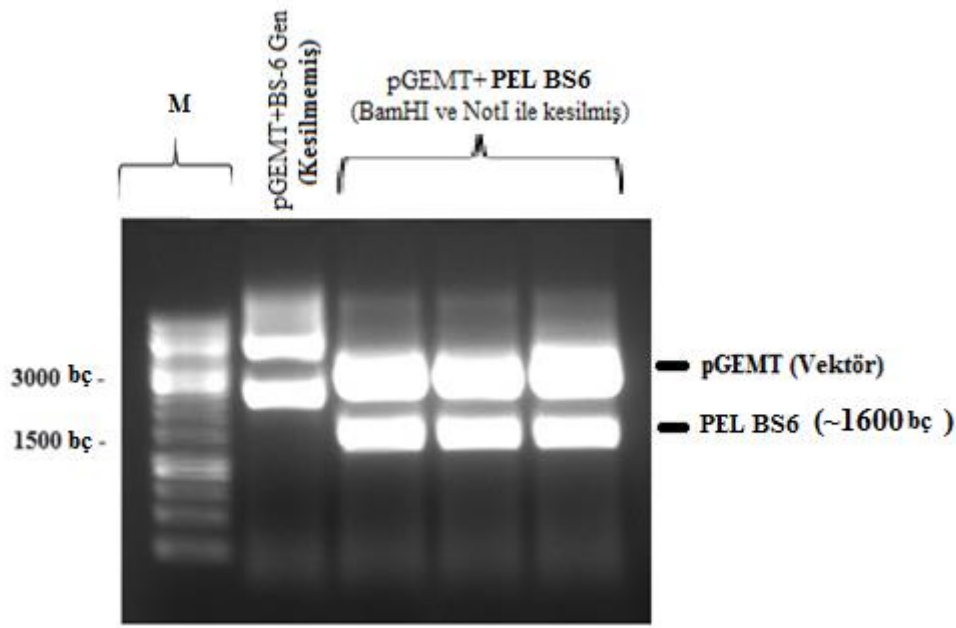
B. amyloliquefaciens BS6'dan elde edilen PEL BS6 geni agaroz jel görüntüsü Resim 4.2'de görülmektedir. Resimde görüldüğü gibi tüm amplifiye ürünlerinin tamamı yaklaşık olarak 1,6 kb aralığına denk gelmektedir. Reaksiyonda kullanılan primer çifti için ideal başlangıç denatürasyon sıcaklığı ve döngüsü sırası ile 94 °C 1 dak. iken, denatürasyon 94 °C 1 dak., bağlanma 64 °C'de 1 dak., uzama 72°C'de 1 dak. olacak şekilde bu döngünün 38 kez tekrarlanması ve ardından 72°C'de 10 dak. bekletilerek istenilen bant yoğunluğu elde edilmiştir. Dolayısı ile Tag DNA Polimeraz ile 64 °C'de PCR ürünü oluşturulmuş ve amplikon PCR clean-up gel extraction kitinden geçirilerek klonlama işlemi için hazır hale getirilmiş ve PEL gen doğrulaması için sekans analizine (Refgen) gönderilmiştir. Sekans sonucunda NCBI da GenBank No: EU925592.1 ile %99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.



Resim 4.2. *Bacillus amyloliquefaciens*'den elde edilen PEL BS6 geninin PCR ile çoğaltılan agaroz jel görüntüsü M: Marker 1 kb DNA marker (Thermo scientific, SM031), a: PEL BS6 geni(~1600 bç)

BS6 geninin pGEMT Easy (Promega) vektörüne klonlanması

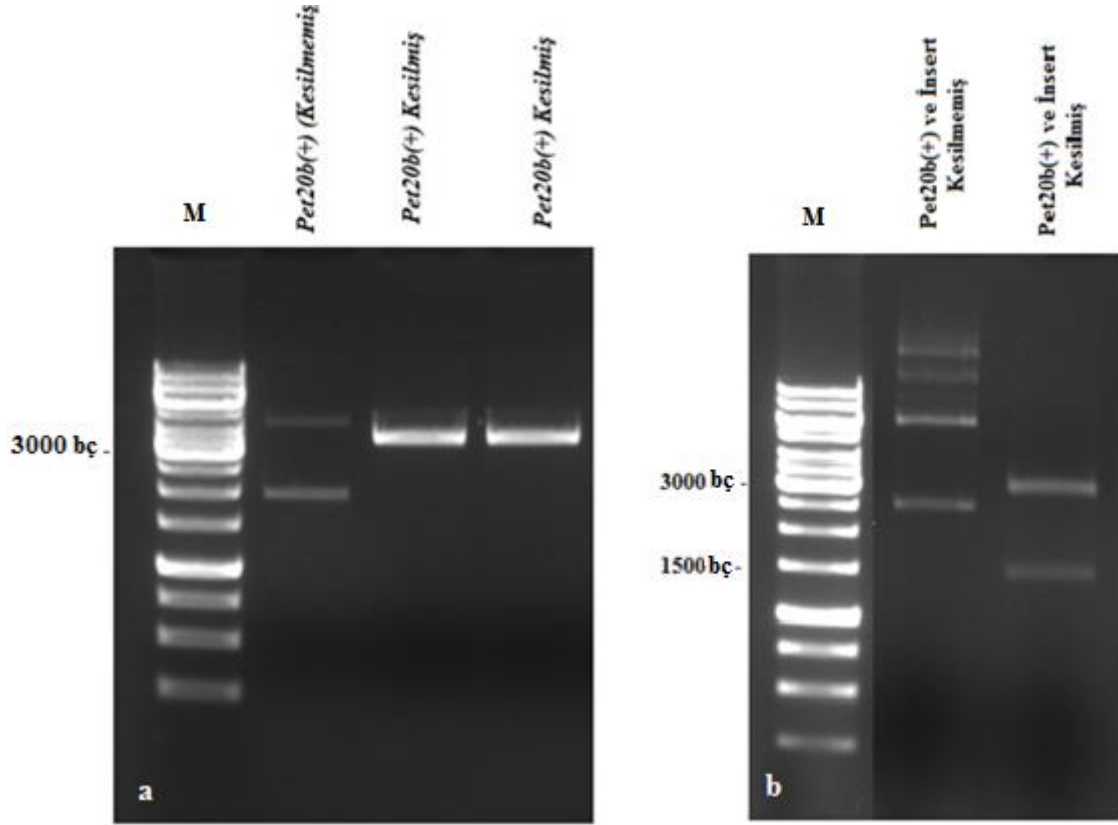
Klonlama çalışmaları öncesi klonlamada kullanılacak olan restriksiyon enzimlerinin (BamHI+NotI) ve ligasyonda kullanılacak olan T4 DNA ligaz aktivite öncesi test edilmiştir. BamHI enzimi geni 5'....GGATCC.....3', 3'....CCTAGG....5' dizilerindeki iki Guanin bazı arasından keser ve iki yapışkan uç oluşturur. pGEMT Easy vektörde (3015 bç) bulunan NotI kesim bölgesi ve BS6 geninde bulunan BamHI (GGATCC) kesim bölgesi kullanılarak Resim 4.3.'te ekspresyon vektörüne aktarılabilecek olan BS6 geni (~1600 bç) kesilip çıkarılmıştır. BS6 geninde bulunan BamHI kesim bölgesi seçilirken geni ortadan bölüp bölmediği, genin içersinde başka bir BamHI kesim bölgesinin olup olmadığı ve kesim sonrasında yapışkan uç oluşturup oluşturmadığı kontrol edilmiştir. Klonlama öncesinde aktarılan PEL geni yaklaşık olarak 1600 bç büyüklüğünde olup, klonlama sonrası da kesim yapılarak kontrol sağlanmış ve beklenen gen büyüklüğü (~1600 bç) tespit edilmiştir.



Resim 4.3. pGEMT Easy (Promega) Vektörüne klonlanan PEL BS6 gen bölgesinin BamHI ve Not I ile kontrol kesimi, M: Marker 1 kb DNA marker (Thermo scientific, SM031)

Klonlama vektörüne aktarılan insertün ekspresyon vektörüne klonlanması

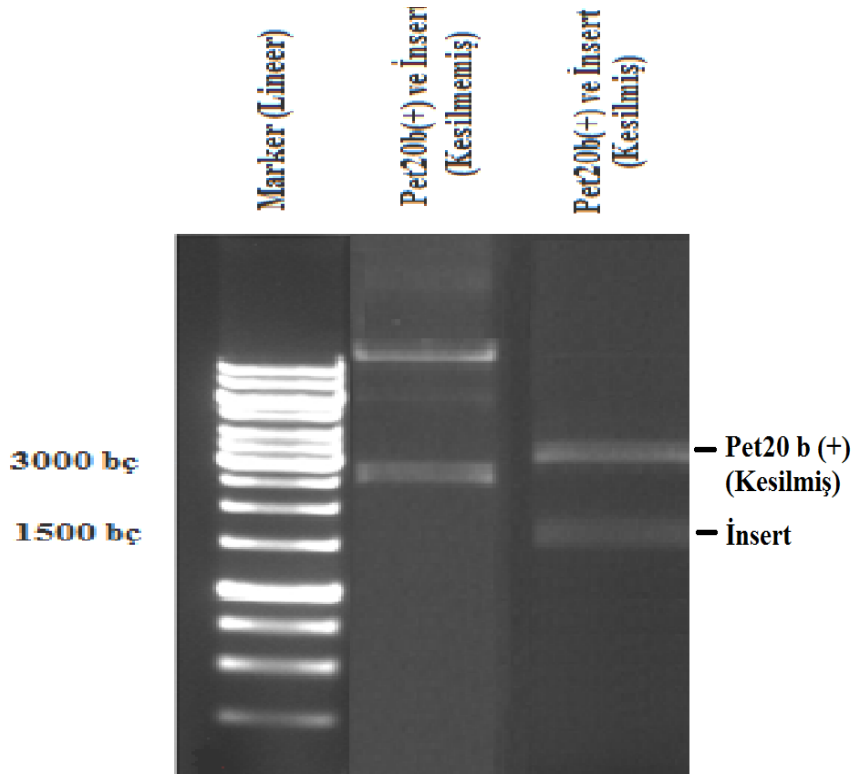
Ekspresyon vektörü seçilirken, seçilecek olan vektörün uygunluğu (çerçeve kayması önlemek amacı ile) araştırılmıştır. pGEMT Easy vektöre aktarıldıktan sonra kesim enzimleri (BamHI+NotI) ile elde edilen BS6 gen bölgesi ile aynı kesim noktalarını taşıyan (BamHI ve NotI) ve ekspresyon vektörü olan Pet-20b(+) (3716 bç) yapılacak klonlama çalışması için uygun bulunmuştur. Klonlama için seçilen kesim enzimlerinin genimizi kesip kesmediği eğer kesiyor ise nerelerden kestiği ise nebcutter programı (Resim 4.4. a) ile kontrol edilmiştir. Gen akatarımı yapılmış ve aktarılan genin Pet-20b(+) vektörüne düz girip girmediğinin kontrolü için BamHI ve NotI enzimleri ile kesimler yapılarak kontroller sağlanmıştır. Genin düz girdiğinden emin olunan vektör ise sekansa gönderilerek doğrulaması yapılmıştır (Resim 4.5. b). Pet-20b(+) ve insert ile yapılan transformasyonda IPTG ve X gal LB agara yayılmamıştır. Çünkü Lac Z geni bulunmamaktadır o yüzden de tüm koloniler seçilmiştir.



Resim 4.5. Ekspresyon vektörü ve Ekspresyon vektörüne aktarılan BS6 geninin Kesim Kontrolü a: Ekspresyon vektörü olan Pet-20b(+) vektörünün kesim kontrolü, b: Ekspresyon vektörüne aktarılan BS6 geninin (insert) BamHI ve NotI ile kesimler yapılarak kontrolü, M: Marker 1 kb DNA marker (Thermo scientific, SM031)

Ekspresyon vektörüne klonlanan BS6 geninin alıcı hücre olan *E. coli* BL21 (DE3) aktarılması

BS6 Genini (İnsert) içeren ekspresyon vektörü alıcı hücre olan *E. coli* BL21 (DE3)'e aktarılır ve sonrasında izole edilip kesilerek kontrol edilir (Resim 4.6.). Kontrol sonucunda alıcı hücre olan *E. coli* BL21 (DE3)'e ekspresyon vektörünü aktarmadan önceki kontrol (Resim 4.5.b) ile paralel sonuçlar elde edilmiş ve genimizin tamamının (~1240) aktarıldığı tespit edilmiştir (Resim 4.6.).



Resim 4.6. Alıcı hücre *E. coli* BL21 (DE3)’den izole edilen ekspresyon vektörünün (Pet-20b(+)) kontrol kesimi (Marker 1 kb)

4.6. Klonlama Sonrası Rekombinant PEL BS6 Geninin Tanımlanması ve RPEL BS6 Enziminin Karakterizasyonu

Klonlama sonrası yapılan doğrulama sekansında PEL BS6 geni *Bacillus amyloliquefaciens* TB-2 PEL enzimi (GenBank No: EU925592) ile % 99 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. na göre karakterizasyonu yapılmıştır. Klonlama sonrası *E. coli* BL21 D3’ten elde edilen kısmi olarak saflaştırılmış RPEL BS6 enziminin aktivitesi ve karakterizasyon çalışmaları (pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat konsantrasyonu, kimyasal ve metal iyonlara direnç, depolama stabilitesi, molekül ağırlığı ve biyoinformatik çalışmalar) yapılmıştır.

4.6.1 Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesi ve spesifik enzim aktivitesi

Klonlama sonrası protein miktarı (mg/ml) , Enzim Aktivitesi ((Units/ml) ve spesifik enzim aktivitesi (Units/mg) ölçülmüştür. Yapılan ölçümlerin sonucunda klonlama öncesi spesifik enzim aktivitesi 0,297 (Units/mg) iken klonlama sonrası spesifik enzim aktivitesi 49,6 (Units/mg) olarak belirlenmiştir. Spesifik enzim aktivitesinin birim protein başına düşen enzim miktarı olduğu göz önünde bulundurulur ise klonlama sonrası elde edilen BS6 PEL ekstrasellüler enzim miktarında önemli bir artış olduğu söylenilebilir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Rekombinant PEL BS6 enziminin protein miktarı, PEL enzim ve spesifik enzim aktivitesi (Units/mg)

	Protein Miktarı (mg/ml)*	Enzim Aktivitesi (Units/ml)*	Spesifik Enzim Aktivitesi (Units/mg)*
RPEL BS6	0,006 ± 0,001*	0,297 ± 0,003*	49,6 ± 0,3*

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

4.6.2. Rekombinant PEL BS6 enzime pH'nın etkisi

Bakteriler için 50 mM Glisin-NaOH reaksiyon tamponunun pH'sı 4,0-12,0 aralığında denenerek, Rekombinant PEL BS6 (RPEL BS6)'nın rölatif aktivitesi belirlenmiştir. En iyi aktivite gösterdiği pH ise 10,0 olarak tespit edilmiştir. Klonlama öncesi ise en iyi aktivite gösterdiği pH 9,0 olarak belirlenmiştir. Klonlama sonrası elde edilen PEL BS6 enziminin yüksek pH'da daha iyi aktivite gösteriyor olması alkali bir enzim olduğunu gösterir. Ancak RPEL BS6 enzimi asidik pH da (pH 4,0) aktivitesini % 80 oranında, alkali pH'da (pH 14,0) ise aktivitesinin % 93,4 oranında koruduğu için aynı zamanda pH stabil bir enzim olduğunun bilgisini de verir. *E. coli* BL21 (DE3)'den elde edilen rekombinant PEL BS6 için pH ile PEL rölatif aktivitesi arasında pH 10,0'da dahil olmak üzere pozitif yönlü, pH 10,0'un üzerindeki pH'larda ise negatif yönlü yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

Çizelge 4.11. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine değişen pH'nın etkisi

pH	Rölatif Aktivite (%)*
4,0	80,1 ± 0,06
4,5	80,8 ± 0,12
5,0	82,4 ± 0,17
5,5	83,2 ± 0,35
6,0	84,5 ± 0,06
6,5	86,4 ± 0,12
7,0	90,9 ± 0,21
7,5	95,3 ± 0,36
8,0	97,2 ± 0,06
8,5	98,1 ± 0,12
9,0	98,6 ± 0,25
9,5	99,1 ± 0,17
10,0	100,0 ± 0,00
10,5	99,6 ± 0,31
11,0	98,4 ± 0,12
12,0	97,2 ± 0,06
13,0	96,1 ± 0,20
14,0	93,4 ± 0,15

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

4.6.3. Rekombinant PEL BS6 enzimine sıcaklığın etkisi

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 10,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 15-90°C arasında değişen sıcaklıklara ayarlanarak RPEL BS6'nın enzim aktivitesi % rölatif aktiviteye göre belirlenmiştir. RPEL BS6 enzimi 15°C ve 90°C arasında enzim aktivitesini önemli ölçüde koruduğu gözlenmiştir. 15°C'de rölatif aktivitesi % 87, 90°C'de ise % 85 oranında enzim aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Bu sonuç RPEL BS6 enziminin sıcaklık stabil, soğuk ve ısıya tolerant olduğunu göstermiştir. RPEL BS6 enziminin 60°C'de %100 aktivite göstermesi ise termofilik özellikte bir enzim olduğunu göstermiştir. *E. coli* BL21 (DE3)'den elde edilen RPEL BS6 için sıcaklık ile PEL rölatif aktivitesi arasında 60 °C de dahil olmak üzere pozitif yönlü, 60 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise negatif yönlü yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

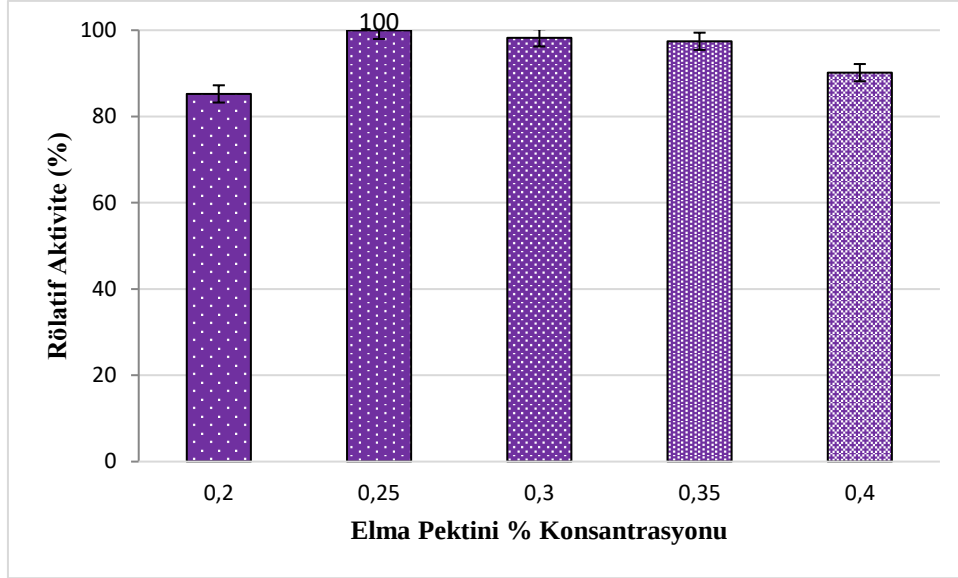
Çizelge 4.12. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine sıcaklığın etkisi

Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Rölatif Aktivite (%)*
15	87,6 ± 0,4
20	88,4 ± 0,2
25	91,2 ± 0,3
30	94,2 ± 0,2
35	95,6 ± 0,2
40	97,5 ± 0,2
45	97,9 ± 0,4
50	98,6 ± 0,1
55	99,5 ± 0,1
60	100,0 ± 0,1
65	99,6 ± 0,3
70	99,2 ± 0,2
75	95,2 ± 0,1
80	93,1 ± 0,4
85	88,2 ± 0,2
90	85,4 ± 0,2

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

4.6.4. Rekombinant PEL BS6 enzimine substrat konsantrasyonunun etkisi

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 10,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 60°C'ye, substrat konsantrasyonu ise % 0,20-0,40 arası ayarlanarak rekombinant PEL'in rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. PEL enziminin optimum substrat konsantrasyonunun % 0,25 olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* BL21 (DE3)'den elde edilen rekombinant PEL için substrat konsantrasyonu ile PEL rölatif aktivitesi arasında %0,25'de dahil olmak üzere pozitif yönlü yüksek düzeyde ($p<0,02$), %0,25'in üzerindeki konsantrasyonlarda ise negatif yönlü yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).



Şekil 4.4. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi. *: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, $\pm$ SD

4.6.5. Rekombinant PEL BS6 enzime çeşitli kimyasal ve metallerin etkisi

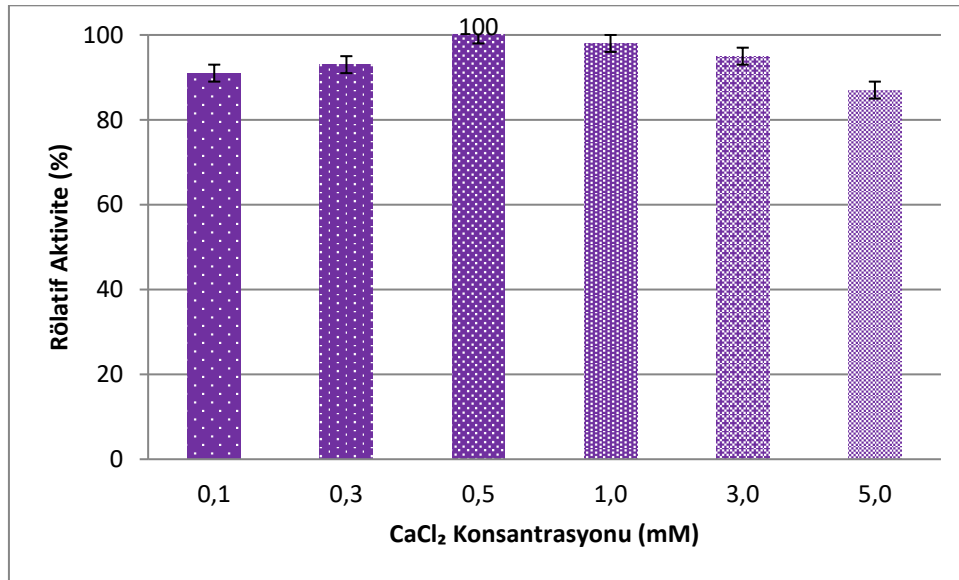
50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 10,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 60°C'ye, substrat konsantrasyonu ise % 0,25'e, Ca^{+2} (CaCl_2), Mg^{+2} (MgCl_2), Mn^{+2} (MnCl_2), Fe^{+2} (FeCl_3), Ba^{+2} (BaCl_2), Tween 20, EDTA, Zn^{+2} (ZnCl_2), Ni^{+2} (NiSO_4), K^+ (K_2SO_4) gibi kimyasal ve metal iyonların konsantrasyonları 0,5-1,0 mM olacak şekilde (Çizelge 4.13.) RPEL BS6 enziminin rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. RPEL BS6 enziminin de Ca^{+2} (CaCl_2), Mg^{+2} (MgCl_2), Mn^{+2} (MnCl_2), Ba^{+2} (BaCl_2), Ni^{+2} (NiSO_4) varlığında aktivitesinin arttığı, Fe^{+2} (FeCl_3), EDTA varlığında ise aktivitesinin oldukça düştüğü tespit edilmiştir. Tween 20, Zn^{+2} (ZnCl_2), K^+ (K_2SO_4) varlığı ise aktiviteyi ne olumlu yönde ne de olumsuz yönde etkilememiştir. Fe^{+2} (FeCl_3) (%54), EDTA(%66) varlığı enzimi inhibe ederken, Ca^{+2} (CaCl_2) varlığının enzimin rölatif aktivitesini oldukça

yüksek oranda aktive ettiği bulunmuştur. Dolayısı ile Ca^{+2} rekombinant PEL enzimi için de kofaktör olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 4,5'te de görüldüğü gibi kofaktör olarak en iyi aktivite 0,5 mM Ca^{+2} konsantrasyonunda olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant PEL için iyon ve iyon konsantrasyonu ile PEL rölatif aktivitesi arasında negatif yönlü, yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,02$).

Çizelge 4.13. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisi

Kimyasal ve Metal İyonlar	Rölatif Aktivite(%)*	
	0,5 (mM)	1.0 (mM)
Boş ^a	100 ± 1	100 ± 1
Ca ⁺² (CaCl ₂)	473 ± 2	451 ± 1
Mg ⁺² (MgCl ₂)	140 ± 3	135 ± 2
Mn ⁺² (MnCl ₂)	131 ± 5	126 ± 3
Fe ⁺² (FeCl ₂)	46 ± 2	44 ± 1
Ba ⁺² (BaCl ₂)	133 ± 4	140 ± 1
Tween 20	104 ± 2	102 ± 1
EDTA	34 ± 1	32 ± 2
Zn ⁺² (ZnCl ₂)	100 ± 1	98 ± 3
Ni ⁺² (NiSO ₄)	141 ± 2	134 ± 1
K ⁺ (K ₂ SO ₄)	103 ± 3	104 ± 2

^a : Reaksiyon karışımına enzim, substrat ve tampon dışında herhangi bir metal veya kimyasal eklenmemiş *: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

Şekil 4.5. Rekombinant PEL BS6 rölatif enzim aktivitesine CaCl₂ konsantrasyonunun etkisi.

.*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

4.6.6. Rekombinant PEL BS6 enzimine reaksiyon süresinin etkisi

50 mM Glisin-NaOH tamponunun pH'sı 10,0'a, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklık ise 30-70°C'ye aralığında ayarlanarak, her bir sıcaklık sabit tutularak; Reaksiyon süresi 20; 30; 40; 50; 60; 70 dakika olacak şekilde Rekombinant PEL'in rölatif (%) enzim aktivitesi belirlenmiştir. Rekombinant PEL enziminin optimum sıcaklığının Çizelge 4.14.'ten de görüldüğü gibi 60°C olduğu belirlenmiş olup optimum reaksiyon süresinin ise 30 dak. olduğu tespit edilmiştir.

E. coli BL21 (DE3)'den elde edilen rekombinant PEL için değişen reaksiyon süresi ile PEL rölatif aktivitesi arasında 30. dakika da dahil olmak üzere pozitif yönlü yüksek düzeyde ($p<0,01$), 30. dakika üzerindeki reaksiyon sürelerinde ise negatif yönlü yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p<0,01$).

Çizelge 4.14. Rekombinant PEL BS6 enzim aktivitesine değişen reaksiyon süresinin etkisi

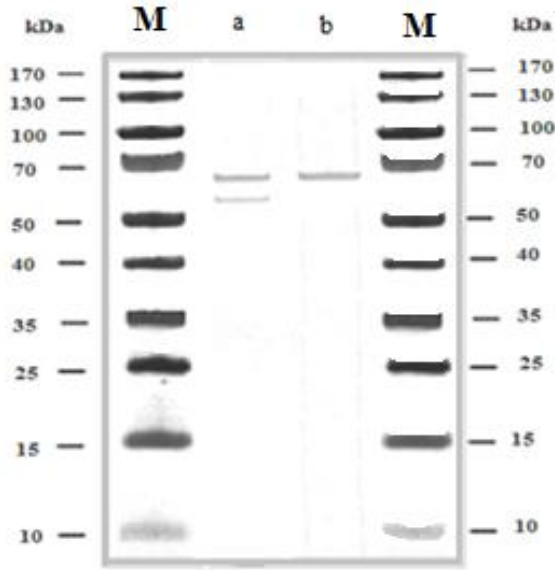
Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Reaksiyon Süresi (dak.)*					
	20	30	40	50	60	70
30	96,5 ± 0,2	100 ± 0	98,1 ± 0,3	96,5 ± 0,4	95,1 ± 0,1	93,2 ± 0,4
40	97,5 ± 0,1	100 ± 0	99,3 ± 0,2	98,8 ± 0,1	97,6 ± 0,1	95,3 ± 0,3
50	98,7 ± 0,2	100 ± 0	98,5 ± 0,4	98,3 ± 0,1	97,8 ± 0,2	97,6 ± 0,1
60	98,8 ± 0,2	100 ± 0	99,7 ± 0,1	99,4 ± 0,1	98,2 ± 0,3	97,1 ± 0,1
70	98,3 ± 0,3	100 ± 0	99,2 ± 0,1	99,0 ± 0,3	97,6 ± 0,1	96,1 ± 0,3

*: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, ± SD

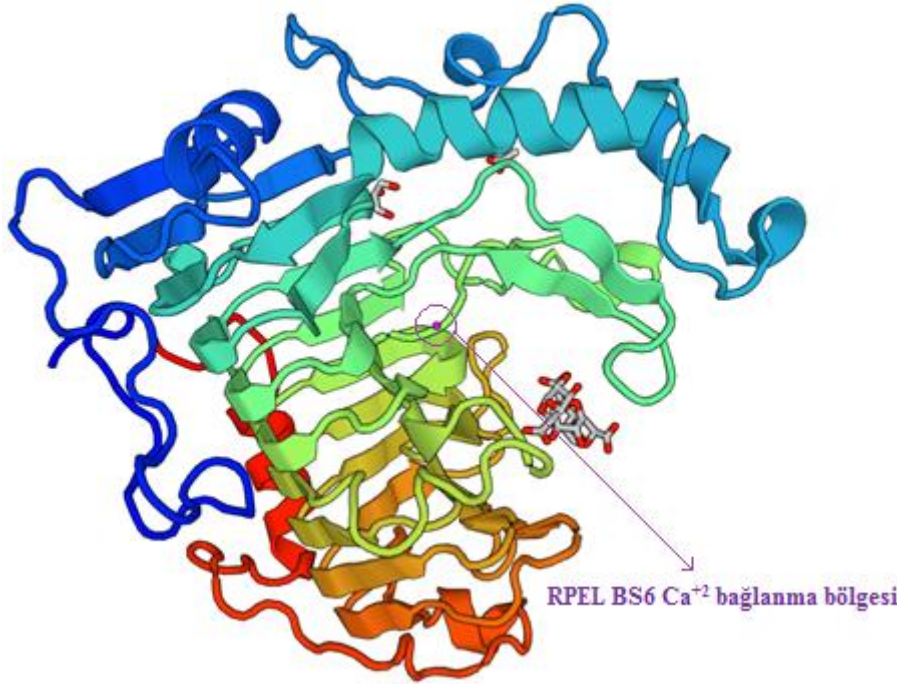
4.7. Klonlama Sonrası PEL Proteininin SDS-Page ve Western Blot İle Belirlenmesi

PEL enziminin kısmi saflaştırma sonrası SDS-PAGE ile moleküler ağırlığının belirlenmesi için elde edilen örnekler kutucuklara yüklenmiş ve elektroforez işleminin hemen ardından jeller tespit edilip, boyanmıştır. Daha sonra jel üzerinde oluşan protein bantları UVP dijital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve enzimin moleküler ağırlığı hakkında bilgi edinilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi sonrasında ortamdan 50 kDa moleküler ağırlığından küçük proteinlerin uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. SDS-Page sonucu 57,29 ve 65,75 kDa ağırlığında iki ayrı bant olduğu tespit edilmiştir. *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen proteinler SDS-PAGE jelde yürütülerek transferde kullanılacak olan jeller elde edilmiştir. Proteinler jel transfer cihazı kullanılarak, jelden PVDF membrana kuru transferle aktarılmıştır. Bundan sonraki aşamalar Western Breeze kiti kullanılarak

yapılmıştır. Membran bloke edildikten sonra birincil antikor ile işaretlenmiştir. Daha sonra ikincil antikor ve kromojenik substrat ile muamele edilmiştir. Bitki örneklerinin membran üzerinde oluşturduğu kromojenik protein bantları UVP dijital görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirilmiş ve proteinin moleküler ağırlığı hakkında bilgi edinilmiştir. PEL enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 65,75 kDa olduğu bulunmuştur (Resim 4.7.). RPEL BS6 proteininin 3D yapısı ise Resim 4.8’de gösterilmiştir.



Resim 4.7. Klonlama sonrası Rekombinant PEL proteininin SDS-page(a) BS6 ve Western i-Blot(b) görüntüsü (PEL proteinine ait tespit edilen bantın büyüklüğü 65,75 kDa’dır). M: Marker (Fermentas, 10-170 kDa)



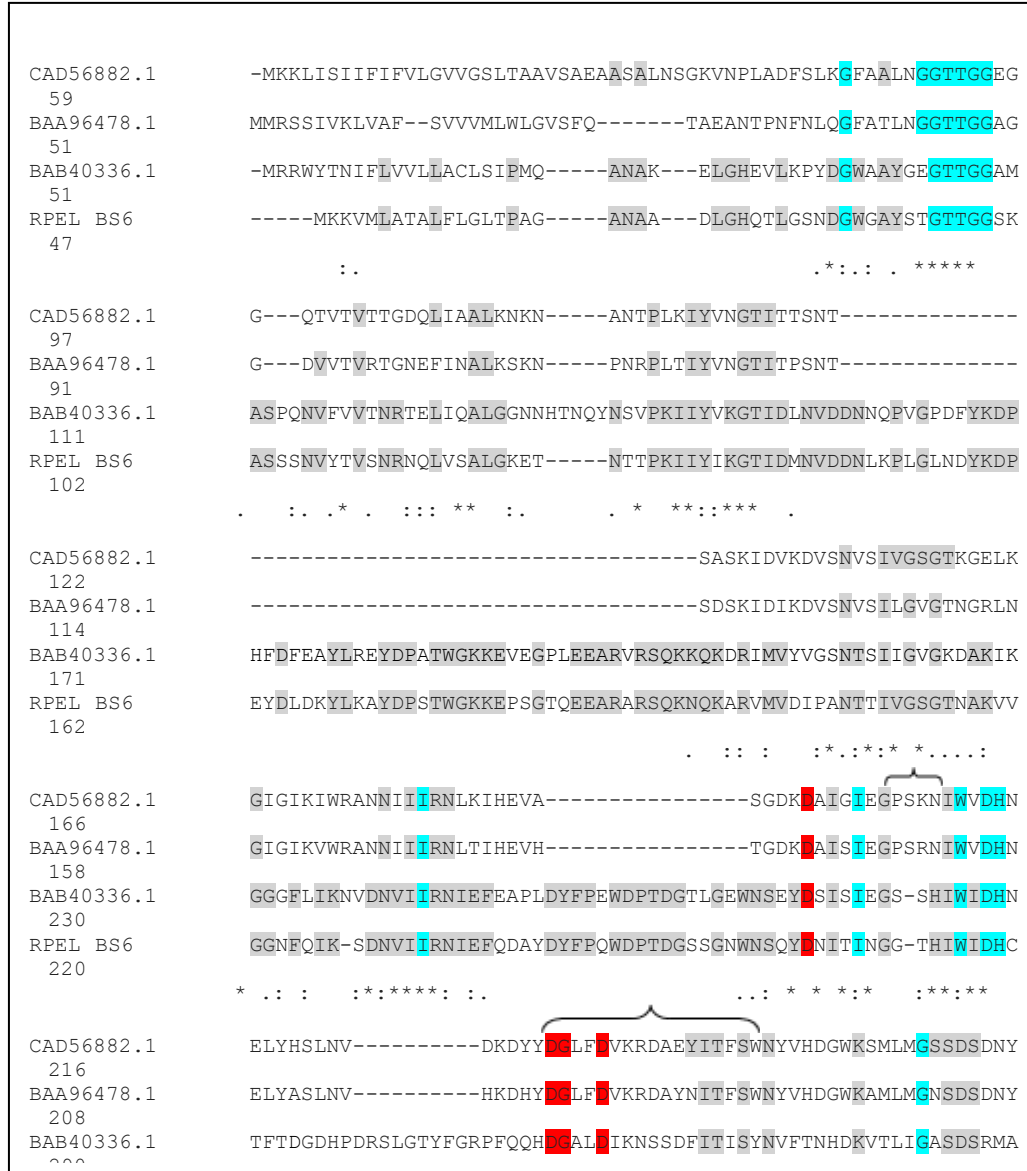
Resim 4.8. RPEL BS6 proteininin 3D yapısı-Kalsiyum bağlanma bölgesi- α ve β katlanmaları (Program SWISS-MODEL)

4.8. Pektat Liyaz Ailesine Ait Dört Aminoasit Dizisinin CLUSTAL W İle Hizalanması

RPEL BS6 açık okuma çerçevesi, başlama kodonu olarak “TTG”, sonlanma kodonun ise “TAA” belirlenmiş, gen büyüklüğü ~1600 bç olarak tespit edilmiştir (Resim 4.9). Bu başlangıç kodonu sıklıkla *Bacillus* cinsi genlerinde bulunur ve bazı durumlarda translasyon etkinliği ile ilişkilendirilmektedir (Vellonoweth, 1993). Başlangıç kodonunun akış yukarısında tahmini ribozom bağlanma bölgesi bulunmaktadır (GGAGAGGA). Bir transkripsiyonel sonlandırıcı olarak işlev görebilen sekiz nükleotidlik ters çevrilmiş tekrarlar bulunmaktadır (CGTCTTCA-TGAAGACG).

TAGTGAACGCGTGTGTGGAGAGGATCCCAGGGGGTTTTTCGGTCCCTTGGGATTTTCTTTGCGGTTTCCGCAAT
 AAAACCGAAAGGCACATTCTGTACATTTTCGGTGCTGTTTCTCAACTGATTTGATACAATTCATCTGTAATAAAT
 TGGAAACAAAGAATCAGGAGGAGCACAATTCATGAAAAAATGTTATTTATGCTGGCGGTTTGTATGTATGA
 TCCCTGCGGACGTCTATGCCGCTGATCTGGGACGGCAGACGTTAGGAACAAATGACGGCTGGGGAGCCGCTT
 CCGGCGGGACAACCGGCGGCGGAAAGCCTCTTCATCGAATGTATACACCGTATCAAAACAGACAGCAGCTCGT
 TTCTGCATTAGGGGGAAGCGCCAACAGCACGCCGAAGATTATTACATACAAGGCACAATCAATATGAATACG
 GACGACCGCAATAAAACGCTCGGCTTTTCATGATTATAAAGATCCGGCATATGATCCGAACGCCTATCTGAAGG
 CGTACGACCCGGACAAATGGGGAAAAAAAAAAGCGCCGTCTGCACCAGAAGAAGCAGACAGCGATCGC
 AAAAATCAGAAGCACGGTCGTGTTGACATCTCAAATACGACGATCATCGCTTGGGTCAAATGCCAAAGTGAC
 AGGAGGGAATTTAATATTAAGAAGCGGCTCGACAAATGTCATCATCCGCAACATTGAATTTCAAGACGCTTAC
 GACTATTTCCGCAATGGGACCCGACGGACGGCAGCAGCGGCAACTGGAACCTCGGGAATATGACAATATCACC
 ATTAACGGCGCGACGCACATCTGGATCGATCATTGCACCTTAAATGACGGATCGAATCCCGACAGCGGTTTTCC
 CTACTATTACGGGAGAAAATATCAGCACCATGACGGCCAGACGGATATAGCCAACGGGGCGAATTATATTACA
 TTGTCCTATAATAAATATCATGACCATGACAAAGGCTCCGTCATCGGAAACAGCGACAGCAAGACGTCCGATG
 AGGGAAAACGAAGGTGACCCTTACCATAACTATTACCAGAACATCGTCCAGCGCGCGCCGCGGGTCCGGTA
 CGGGCAGGTTTCATATTTATAATAATTTTACGCAGGCTCGAAAAGCGCTGCATACCCGTTTCAGCTATGCGTGGG
 GCGCGGGCCGCGCGTCAAAAATATATGCCAGAATAATGTTTTGAAGTGCCGGGGCTGGCTGCTGATTAAGT
 CATCAGCGTCTTCA GCGGCGGAAAAGCACTTCATGAAGACGGCACTCTTTAAACGGCTCCTCCATTAACGCGT
 CGGCCCAACGGATTAAGTCAGTCCGTCGGCTGGACACCGTCATTGCACGGTTCATCGGCTCATCATCAAT
 GTAAAATCAGATGTTATATCTAAAGCCGGGGCGGGCATATTAATAAAGAAACAAGAAACACAAAGGAAAAAT
 ATTCCTTTGTGTTTGAATAACCAAAAACGAGTATCAACCGA

Resim 4.9. RPEL BS6 gen dizi analizi: Mavi bölge: Tahmini ribozom bağlanma bölgesi,
 Sarı bölgeler: ‘TTG’ başlangıç kodonu, ‘TAA’ sonlandırma kodonu, Mor
 bölgeler: ters çevrilmiş tekrarlar (CGTCTTCA-TGAAGACG)



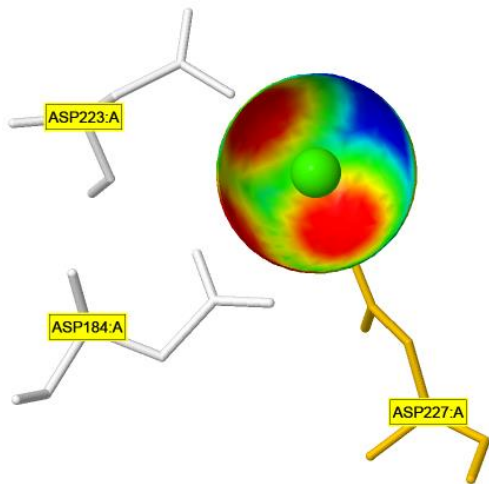
Resim 4.10. Pektat liyaz ailesine ait dört aminoasit dizisinin CLUSTAL W ile hizalanması
Kırmızı:Kalsiyum Bağlanma Bölgesi, Gri:Konumları kısmi homoloji gösteren amino asitler, Mavi: Korunan katalitik kalıntılar

*:" korunmuş kalıntıları, "." yarı korunmuş kalıntıları, "-" Aynı amino asitleri temsil eder.

Resimde yer alan sekanslar şunlardır: BS6 geni ile BAA76885.1 pektate lyase (*Bacillus* sp.) ve BS-6: % 30 benzerlik, CAA57041.1 pektate lyase (*Dickeya chrysanthemi*) ile % 27 benzerlik, BAA81753.1 pektate lyase H (*Bacillus* sp. KSM-P15) ile ise % 31 benzerlik göstermiştir. PEL BS6'nın aminoasit dizisi ve BAA76885.1, CAA57041.1, BAA81753.1 amino asit dizileri ile yapılan hizalamada (Resim 4.11) Asp 184, Asp 223 ve Asp 227 konumlarında bulunan aspartatlar ile benzer kalıntıları vermesi, RPEL BS6 enzimimizin Ca^{+2} iyonuna bağlandığı bölgeler hakkında öngörude bulunmamıza kaynak sağlamıştır (Resim 4.10.). NCBI BlastX çalışmasında RPEL BS6 enziminin PL-6 ailesinden

(superfamily) olduğu tespit edilmiştir. Açık okuma çerçevesi başlama kodonu olarak ‘‘TTG’’ ile başlamaktadır (Resim 4.9). Bu başlangıç kodonu sıklıkla bacillus genlerinde bulunur VE bazı durumlarda translasyon etkinliği ile ilişkilendiriliyor (Vellonoweth, 1993). Başlangıç kodonunun akış yukarısında tahmini ribozom bağlanma bölgesi bulunmaktadır (GGAGAGGA). Bir transkripsiyonel sonlandırıcı olarak işlev görebilen sekiz nükleotidlik ters çevrilmiş tekrarlar bulunmaktadır (CGTCTTCA-TGAAGACG).

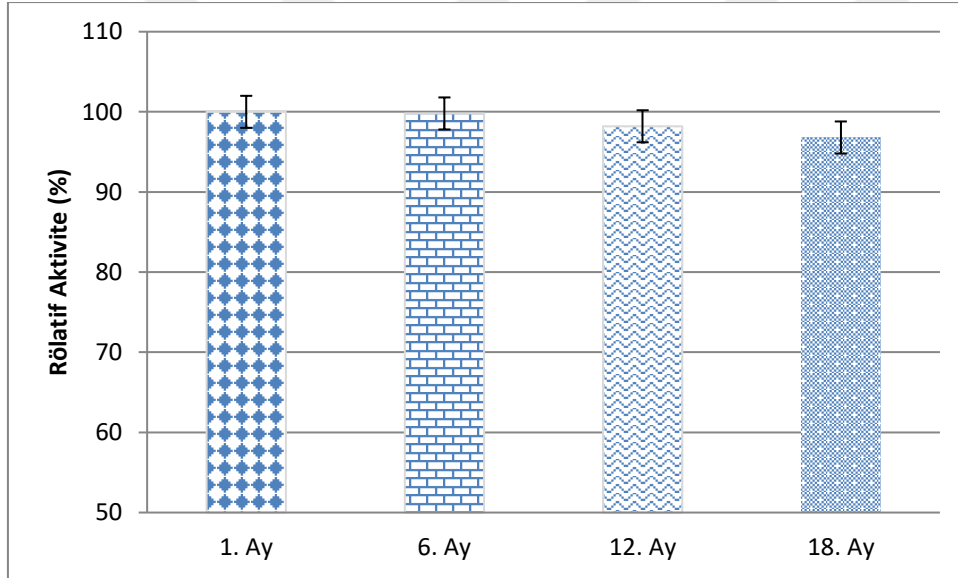
RPEL BS6 enziminin 420 amino asitden oluştuğu belirlenmiştir. Şekil 4.6’da bulunan aminoasit dizilerini pektat liyaz genlerinin N-terminalinde bulunan başlangıç aminoasidi ile başlar ve boşluklar tire (-) ile gösterilir. Yıldız işaretleri aynı amino asitleri gösterir; İki nokta üst üste ve nokta sırasıyla korunmuş (:) ve yarı korunmuş (.) kalıntıları temsil eder. Şekil 4.6’de yer alan amino asit dizileri şunlardır: CAD56882.1, *Bacillus licheniformis* 14A; BAA96478.1, *Bacillus* sp. P-4-N; BAB40336.1, *Bacillus subtilis* TS-47; RPEL BS6, *Escherichia coli* BL21 D3 RPEL BS6. RPEL BS6 aminoasit dizisi; BAA76885.1 pectate lyase *Bacillus* sp. % 30, CAA57041.1 pectate lyase (*Dickeya chrysanthemi*) ile % 27, BAA81753.1 pectate lyase H (*Bacillus* sp. KSM-P15) ile ise % 31 benzerlik göstermiştir. RPEL BS6 aminoasit dizisi ve BAA76885.1, CAA57041.1, BAA81753.1 amino asit dizileri ile yapılan hizalamada (Şekil 4.6.) Asp 184, Asp 223 ve Asp 227 konumlarında bulunan aspartatlar ile benzer kalıntıları vermesi, RPEL BS6 enzimimizin Ca^{+2} iyonuna bağlandığı bölgeler hakkında öngörude bulunmamıza kaynak sağlamıştır (Resim 4.10: Şekil 4.6). NCBI BlastX programında yapılan blast sonucunda RPEL BS6 enziminin PL-6 ailesi (superfamily) ve PEL B ailesi ile oldukça yüksek benzerlik göstermiştir.



Resim 4.11. RPEL BS6 enzimimizin Ca^{+2} iyonu bağlanma bölgeleri (Asp 184, Asp 223 ve Asp 227: Program SWISS-MODEL)

4.9. PEL BS6 Enziminin Klonlama Sonrası Depolama Stabilitesinin Belirlenmesi

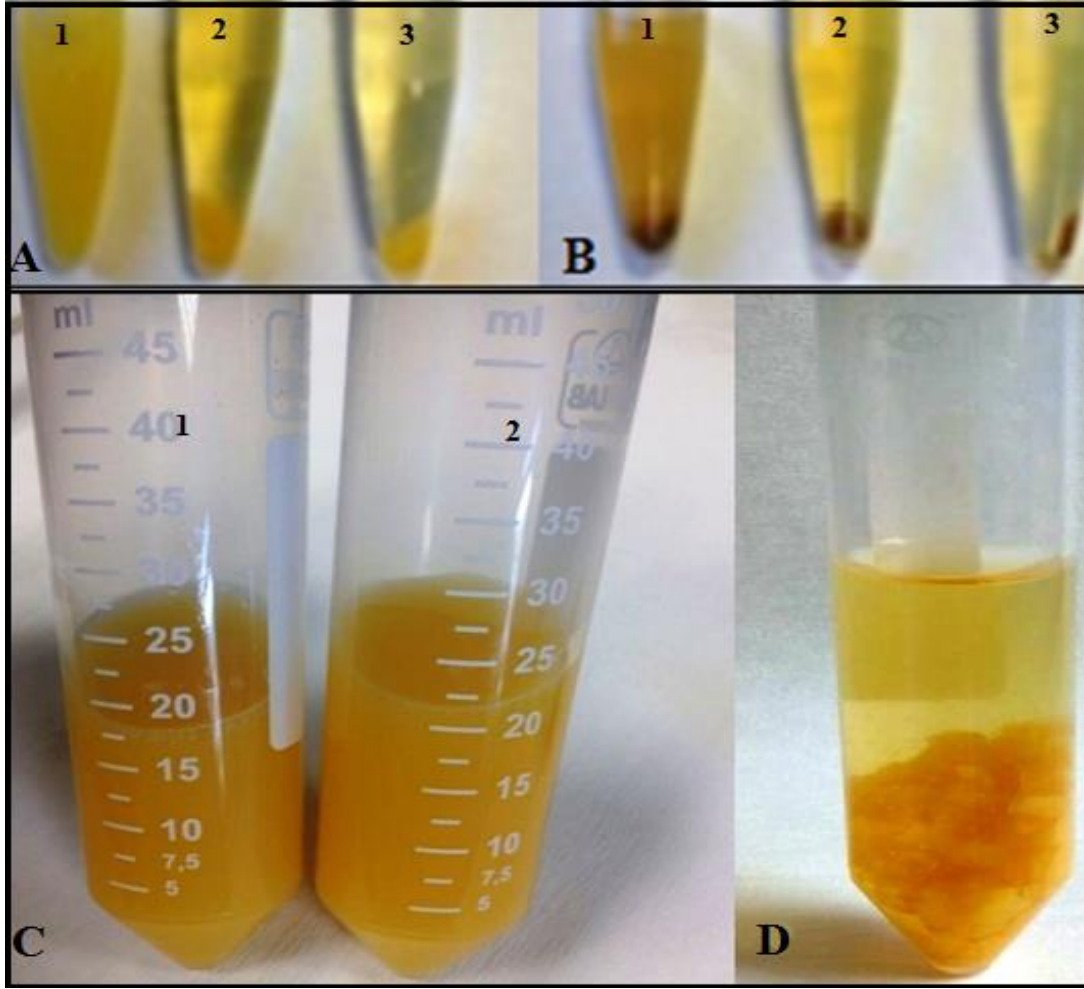
Depolama stabilitesinin belirlenebilmesi için PEL enzimi 18 ay boyunca +4°C’de bekletilmiştir. Her 6 ay PEL enzim aktivitesi ölçülerek enzim aktivitesindeki değişim kaydedilmiştir. 50 mM Glisin-NaOH tamponu (pH 10,0), 0,5 mM CaCl₂ ve % 0,25 elma pektini (pH 8,0) kullanılarak reaksiyon 30 dak. 60 °C’de gerçekleştirilmiştir. Klonlama öncesi PEL enzimi bir yıllık süreçte aktivitesini % 81 oranında korurken, klonlama sonrası 18 aylık süreçte enzim aktivitesini % 97 oranında koruduğu belirlenmiştir. Rekombinant olarak elde edilen PEL BS6 enziminin raf ömrünün daha uzun olması ticari potansiyelini oldukça güçlendirmektedir. Şekil 4.8’ de görüldüğü gibi rekombinant PEL enzimi, 18 aylık süreçte aktivitesini % 96 oranında korumuştur.



Şekil 4.6. Rekombinant PEL BS6 Enziminin 18 aylık süreçlerdeki depolama stabilitesi. *: üç paralel üç tekrar olarak enzim aktivite ortalamaları, $\pm$ SD

4.10. Klonlama Öncesi ve Sonrası PEL BS6 Enzim Aktivitesi Meyve Suyu Deneyleri

Pel BS6 enzim etkinliği öncesi elma ve portakal blenderdan geçirilip ön süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise klonlama öncesi ve sonrası aktivite ölçümünde olduğu gibi, 2 ml’lik total hacmin 1/5 i enzim olacak şekilde reaksiyon kurulmuştur (Klonlama öncesi reaksiyon koşulları: 60 °C 30 dak. Glisin NaOH Buffer pH 9.0 substrat % 0.25, 0.5 mM CaCl₂; Klonlama sonrası reaksiyon koşulları: 60 °C 30 Glisin NaOH Buffer pH 10.0 substrat % 0.25, 0.5 mM CaCl₂).



Resim 4.12. Klonlama öncesi (BS6) ve klonlama sonrası (RPEL BS6) enzim aktivitesi meyve suyu berraklaştırma görüntüleri. A(Posalı portakal suyu) , B(Posalı elma suyu); 1-2-3 sırası ile; İşlem görmemiş meyve suyu, *B. amyloliquefaciens*' den saflaştırılan enzim eklenen meyve suyu, Pel geni klonlanma sonrası saflaştırılmış enzim eklenmiş meyve suyu, C: Yüksek hacim posalı meyve suyu, D: Yüksek hacim RPEL BS6 ile muamele edilmiş portakal suyu



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvan kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları bulunmaktadır (Wiseman, 1987). Yapılan bu çalışmada 12 mikroorganizma taranmıştır ve bu izolatlardan yüksek aktiviteye sahip olanlar için moleküler düzeyde kontrol tanımlamaları yapılmıştır. Seçilen yüksek PEL aktivitesine sahip suşlar ile optimizasyon deneyleri (pH, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi, kafaktör, substrat konsantrasyonu) gerçekleştirilmiş ve uygun pH, sıcaklık, süre, kofaktör ve substrat konsantrasyonu tespit edilmiştir. Yüksek PEL aktivitesine sahip olan *B. amyloliquefaciens* BS6'nın PEL gen bölgesi çoğaltılarak tanımlanmıştır. PEL geni olarak doğrulanan gen bölgesi *Escherichia coli* BL 21 D3 suşuna klonlanmış ve saflaştırılmıştır. Klonlama sonrası elde edilen rekombinant PEL (RPEL)'in karakterizasyon çalışmaları sonrasında 0.5 mM CaCl_2 en yüksek aktivite (49,8 Units/mg) gösterdiği, 15-90°C sıcaklık aralığında ve 4,0-14,0 pH aralığında aktivitesini yüksek ölçüde koruduğu belirlenmiştir. Bir yıllık depolama stabilitesi hem klonlama öncesi hemde klonlama sonrası kontrol edilmiş ve klonlama öncesi aktivitesini % 85 oranında korurken klonlama sonrası aktivitesinin % 94 oranında korunduğu gözlenmiştir. PEL BS6 geninin biyoinformatik çalışmalarda 65,75 kDa ağırlığında olduğu ve 420 amino asitten oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen rekombinant enzim ile portakal ve elma suyunda kısa sürede etkin berraklaştırma başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bulduğumuz sonuçlarımız mevcut çalışmalarla değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre RPEL BS6 önemli farklılıklar göstermiştir. Klonlama öncesi PEL BS6'nın spesifik enzim aktivitesi 8,56 Units/mg iken klonlama sonrası spesifik enzim aktivitesi 49,6 Units/mg olarak tespit edilmiştir. RPEL BS6 enziminin ekstrasellüler yapıda olması ise biyoteknolojik açıdan oldukça önemlidir (Silva, Borges, Medina ve Piccoli, 2005). Çünkü elde edilen bu enzim endüstriyel uygulamalarda hem süpernatant olarak hemde sıcaklığı yüksek olmayan deşarj ortamları içerisinde alıcı hücre olan *Escherichia coli* BL 21(D3) suşu geliştirilerek de mevcut uygulama başarı ile gerçekleştirilebilir. Şu ana kadar karakterize edilen en termoaktif PEL *T. margarita* 'dan elde edilmiştir (Van Alebeek Voragen De Vos ve Van Der, 2003). RPEL BS6 aktivitesi için optimum sıcaklık değeri

mezofilik bakterilerden elde edilen PEL için oldukça yüksek değerdedir. Kaydedilen en yüksek sıcaklık ve pH'da aktivite gösteren mezofilik bakteri kökenli (*Bacillus* sp.) PEL pH 11,0 ve 69°C'de aktivite göstermektedir (Singh ve diğerleri, 1999). Yapılan bu çalışmada bakteriler arasından yüksek PEL aktivitesi gösteren *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin reaksiyon sıcaklığı 60°C, Rekombinant PEL BS6 enziminin de 60°C'de en aktif olduğu tespit edilmiştir. Literatürlerde yapılan çalışmalarda ise PEL enziminin optimum sıcaklık aralığını 40°C ile 70°C arasında değiştiği bulunmuştur. Alana ve diğerleri (1990), *Bacillus macerans* türüne ait PEL enzimi için uygun sıcaklığı 60°C bulurken, Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp TS44.'e ait PEL enzimi için en uygun sıcaklığı 70°C olarak bildirmişlerdir. Alana ve diğerleri (1990), *Penicillium italicum*'a ait PEL enzimi için uygun sıcaklığı 40°C bulurken, Dinnella ve diğerleri (1994), *Aspergillus japonicus*'a ait PEL enzimi için uygun sıcaklığı 55°C olarak tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp.'ye ait PEL enziminin 60°C'de, Bruhlmann ve diğerleri (1995), *Amycolata* sp.'ye ait PEL enzimi 50°C'de, daha aktif olduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra enzimler için önemli özelliklerden biri de aktif oldukları sıcaklıkta aktivitelerini koruyabildikleri süredir. Dolayısı ile enzim ile muamelede ortam sıcaklığına dayanıklılık endüstriyel uygulamalarda esas alınan en önemli özelliklerden biri ve en önemlisidir. RPEL enzimi ise aktivitesini, 60°C'de 70 dakikaya kadar aktivitesini % 97 oranında koruduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç literatürdekiler ile oldukça farklılık göstermektedir. Yapılan stabilite çalışmalarında yüksek (60°C ve üstü) ve düşük sıcaklıklarda (10-50°C aralığında) PEL enziminde aktivite kaybı oldukça yüksektir (Singh, Plattner and Diekmann, 1999; Takao ve diğerleri, 2001; Soriano, Diaz and Javier Pastor, 2006). RPEL BS6 enzimi ise 70°C 70 dak. boyunca aktivitesinin % 96,1'ini muhafaza edebilmektedir. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enzimi ise 25°C'de 70 dak. aktivitesini yalnızca % 5 oranında kaybetmiştir. Kaydedilen bu değerler bize çalıştığımız PEL enziminin termostabil yapıda olduğunu göstermiştir. Termostabil proteinler değişik denatüre edici şartlara karşı yüksek tolerans gösterirler. Bu proteinler mezofilik proteinlere nazaran daha yüksek a heliks ve b tabakası içeriğine sahiptirler. Ayrıca, bu proteinler çok yavaş katlanma hızı gösterirler. Bu özelliğin değişik denatüre edici şartlara karşı doğal yapıyı korumada önemli olduğu sanılmaktadır (Fujiwara, 2002; Haki ve Rakshit, 2003; Van Den Burg, 2003). Termostabil enzimler biyolojik olarak oldukça güç bir şekilde parçalanabilen ve çözünmeyen çevresel kirleticilerin oluşumunu da engeller (Gül-Güven, 2007). Termostabil proteinlerin sıcaklığa dayanıklılık stratejileri mevcuttur. Termostabil proteinler ve mezofilik olanları benzer

sekonder ve tersiyer yapılarına sahiptir. Termostabil ve mezofilik proteinler arasındaki birçok karşılaştırmalı analizler aminoasit içeriklerinin ve yan zincir etkileşimlerinin az oranda fakat açık bir şekilde farklı olduğunu göstermektedir. Termostabil proteinler çok sayıda yüklü ve hidrofobik aminoasitleri ihtiva eder (Fujiwara, 2002). Çok farklı termostabilite özelliklerine rağmen termofilik enzimler ve onların mezofilik homologları aynı katalitik mekanizmayı, yüksek dizi benzerliği ve üç boyutlu yapı benzerliği gösterirler. Farklı termozimlerde termostabilitenin genel bir evrensel strateji şeklinde değil, daha çok bireysel stratejilerin bir kombinasyonu ile başarıldığı görülmektedir. Örneğin; artan hidrojen sayısı ve tuz köprüleri, hidrofobik merkezin optimize olan paketlenmesi, artan prolin aminoasit sayısı ve gömülü olan amino asitlerde artış Protein esnekliği aynı zamanda termal adaptasyonun anahtar elamanlarından biri olarak görülmektedir (Fitter ve diğerleri, 2001). Hem RPEL BS6 enzimi hem de *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enzimi mevcut termostabil enzimler ile kıyaslandığında mevcut uygulamalar için kullanılabilirliği ile öne çıkmaktadır. Bunun yanı sıra elde edilen bu iki PEL enzimi de düşük ve yüksek sıcaklıklara oldukça dayanıklıdır (Bkz. Çizelge 4.5.- Çizelge 4.12.). Bu sonuçlar göz önüne alındığında çalıştığımız PEL enziminin termotolerant olduğu söylenebilir. Bu da elde edilen bu PEL enziminin biyoteknolojik ve endüstriyel çalışmalarda kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Şöyle ki; Yüksek termal dayanıklılık birçok endüstriyel enzimlerde aranan önemli bir özelliktir. Çünkü enzimlerin kullanıldığı işlemler genellikle yüksek sıcaklıklarda (>50 °C) gerçekleştirilir (Kristjansson ve diğerleri, 2002). Özellikle termofillerden elde edilen enzimler sahip oldukları dayanıklılıktan dolayı günümüzde oldukça fazla pratik ticari kullanım alanı bulmuştur (Demirjian ve diğerleri, 2001; Gül-Güven, 2007). Yüksek sıcaklıklarda biyoteknolojik işlemleri gerçekleştirmek pek çok fayda sağlamaktadır. Sıcaklığın artırılması organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskozitenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleştirilmektedir (Gül-Güven, 2007). Proteinlerin konformasyonel dayanıklılığı iki zıt faktör olan fleksibilite ve sertlik arasındaki dengenin sonucudur. Termozimler mezofilik olanlara nazaran oda sıcaklığında daha fazla sert yapıdadırlar. Bu sertlik onları bozulmadan korur ve katalitik olarak aktif yapıyı korumalarını sağlar. Bundan dolayı daha denatüre edici şartlar altında optimal olarak daha aktiftirler (Bruins ve diğerleri, 2001).

Elde edilen RPEL BS6'nın en çekici özelliklerinden biri de, sağlam alkalın özelliğidir. Fiber biyolojik arıtmada, alkalın ortam ve ılımlı sıcaklık, etkili gevrekleştirme ve lif kalitesi iyileştirme için gereklidir. Dahası, bu enzimin geniş bir pH aralığında çok dengeli olduğu ve güçlü alkalın reaksiyon ortamında (pH 10,0) en yüksek kararlılığı sergilediği bulunmuştur; böylece tekstil endüstriyel biyolojik arıtma gibi yüksek pH ortamı içeren proseslerinin gerekliliklerini karşılar. Bu nedenle, belirli bir pH'daki enzim kararlılığı, ticari açıdan uygun biyoproseslerin anahtar özelliğidir. Bazı literatürlerde bakteri kaynaklı PEL enzimleri pH 5,0- 7,0 arasında, fungal ve bitki kaynaklı pel enzimlerinin ise pH 4,0- 5,5 arasında aktivite gösterdiği bildirilirken farklı literatürlere bakıldığında alkalın peller pH 8,0 ve 10,0 arasında aktivite göstermektedir (Kobayashi ve diğerleri, 2001, Sakai ve diğerleri, 1993, Tardy ve diğerleri, 1997, Kozianowski ve diğerleri, 1997, Hasegawa ve diğerleri, 1966, Nasser ve diğerleri, 1990, Nasser ve diğerleri, 1993). Çeşitli kaynaklardan izole edilen enzimin optimum pH'larındaki farklılık enzimin farklı alt birimlerinin bulunması, enzim kaynağının olgunluk durumu ve enzimin saflaştırma derecesi ile yakından ilgilidir (Vamos-Vigyazo 1981). Çeşitli araştırmacılar yapmış oldukları farklı çalışmalarda alkali özellik gösteren pektinaz enzimi izole etmişlerdir. *Bacillus* sp. DT7' den elde edilen pektinaz pH 7,5-8,5 alkali şartlarda oldukça kararlı olduğu bildirilmiştir (Kashyap ve diğerleri, 2000). Parisot ve diğerleri (2002) *Thermotoga maritima*' dan elde edilen Pel enzimin optimum pH'sını 9,5 olarak tespit etmişlerdir. Daha alkali aralıkta (10,5-11,0) pH optimumuna sahip pektinazlar *Bacillus* sp. NT-2, NT-6, NT-33 ve NT-82 ve *Bacillus* sp. KSM-P15' den elde edilmiştir. Alkali şartlar altında aktif pektinazlar ticari açıdan daha önemlidirler. Çünkü alkalofilik pektinolitik mikroorganizmalar, pektinli materyalleri daha kolay gidermekte ve aktif çamur işleminde daha kolay parçalanmalarını sağlamakta, dolayısı ile, pektik maddelerin pektik atık sulardan uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Kapoor ve diğerleri, 2000). Yapılan bu tez çalışmasında, *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL enzimi için optimal pH 9,0 bulunurken, RPEL BS6 enziminin için optimal pH 10,0 olarak kaydedilmiştir. Klonlama öncesi yapılan PEL enzim aktivite çalışmalarında PEL BS6 enzimi pH 4,0-11,0 aralığında aktif olarak çalışılmış olup pH 11,0'de % 88,6 aktivite kaydedilmiş iken, klonlama sonrası RPEL BS6 enzimi pH 11,0 de aktivitesini % 98,0 oranında korumuştur (Bkz. Çizelge 4.4. ve Çizelge 4.11.). RPEL BS6 enziminin pH 11,00'de de aktivitesini yüksek oranda koruduğu tespit edilince daha yüksek pH denemeleri de yapılmış ve pH 14,0'te de rölatif aktivitesi % 93,0 oranında koruduğu belirlenmiştir. RPEL BS6 enzimi pH 4,0'te ise aktivitesini % 80 oranında korumuştur Bu geniş pH aralığında % aktivitede kayda değer

bir azalma kaydedilmediği için ve her pH da aktivitesini yüksek oranda koruduğu için *B. amyloliquefaciens* BS6'dan elde edilen ekstrasellüler PEL enzimi ve RPEL BS6 enzimi için pH 4,0-14,0 aralığında stabil denilebilir. pH 4,0 ila 14,0 arasında oldukça yüksek stabilite göstermiş olması, enzime asidik ortamlarda da alkali ortamlarda da kullanım imkânları tanımaktadır. Enzim aktivitesini etkileyen diğer bir etmen ise ortamda enzimi aktive ya da inhibe edecek metal iyonları ve kimyasalların bulunmasıdır. Çünkü kofaktörler, inhibitörün etkisini ortadan kaldırabilir, çoğu durumlarda substratın veya bir koenzimin, enzimin protein kısmına bağlanmasını ve böylece reaksiyonun başlamasını sağlayabilirler. Metal iyonları, enzim molekülünün üç boyutlu yapısının kararlılığını artırır ve enzim konformasyonunda meydana getirdikleri değişimler sebebiyle, katalizlenen reaksiyonu hızlandırır veya durdururlar. Genelde, bakteriyal pektat liyazlar, enzimin kalsiyum bağlama bölgesi ve poligalakturonik zincirleri arasında tuz köprüsü oluşumu için kalsiyuma ihtiyaç duyarlar. Ayrıca, kalsiyum iyonları, enzimin yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılığını da arttırabilmektedir (Shevchik ve diğerleri, 1997; Kobayashi ve diğerleri, 1999). Verilen bu bilgiler ışığında, metal iyonlarının enzim üretimine etkisini belirlemek amacıyla çeşitli kimyasal ve metal iyonları incelenmiştir. PEL BS6 ve RPEL BS6 enzim aktivitesinde önemli rol oynayan kalsiyum iyonlarının etkisine bakıldığında enzim aktivitesi, doyumluğa ulaşmaya kadar kalsiyum konsantrasyonunun artması (0,5 mM'ye kadar) ile enzim aktivitesi de artarken daha yüksek konsantrasyonlarda (1,0-5,0 mM) azalmıştır. Öte yandan Zheng ve arkadaşları farklı pellerin kristallerinde, Ca^{+2} iyonlarının sayısı ve karşılık gelen bağlanma kalıntılarının birbirinden farklı olduğunu bildirmiştir. Bu Ca^{+2} bağlayıcı kalıntıların sayısının ve çeşitliliğinin PEL kalsiyum bağımlılığının farklılığından sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada aminoasit dizisinde bulunan üç aspartatın (Asp 151, Asp 173 ve Asp 177) Ca^{+2} iyonuna bağlandığı ön görülmüştür. Dolayısı ile RPEL BS6'nın aminoasit dizisi ve BAA76885.1, CAA57041.1, BAA81753.1 amino asit dizileri ile yapılan hizalamada (Şekil 4.8.) Asp 184, Asp 223 ve Asp 227 konumlarında bulunan aspartatlar ile benzer kalıntıları vermesi, RPEL BS6 enzimimizin Ca^{+2} iyonuna bağlandığı bölgeler hakkında öngörude bulunmamıza kaynak sağlamıştır. Ortam pH'sının enzime Ca^{+2} bağlanmasını ve dolayısı ile de aktiviteyi etkilediği düşünülmektedir. *B. subtilis*'ten elde edilen PEL aktivitesi üzerinde yapılan çalışma sonucunda düşük ve yüksek pH değerlerinde aktivitede düşüş gözlemlenmiş olup, yaklaşık 8,4 civarında bir pH optimumuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Seyedarabi, 2010). Aktivitedeki azalmaya üretken Michaelis kompleksinin

(Enzim ve Ca^{+2} iyonları) oluşumunu düzenleyen karboksilatların protonlaşmasına bağlı üretken olmayan substrat bağlamasından kaynaklandığını bildirmişlerdir (Ali ve diğerleri, 2015). Enzimlerin başarılı bir şekilde kullanımı için aktivite gösterdiği pH aralığının geniş olması biyoteknolojik uygulamalar açısından önemlidir. *B. amyloliquefaciens*'den elde edilen RPEL BS6 enzimi ise geniş pH aralığında (pH 4,0-14,0) aktivitesinin % 80'ini korumaktadır. Dolayısı ile RPEL BS6 enzimi geniş pH aralığında aktif olması ve değişen pH'nın aktiviteyi önemsenecek seviyede etkilememesi biyoteknolojik uygulamalar için tercih sebebi olabilecektir. Ca^{+2} (CaCl_2) varlığının enzimin rölatif aktivitesini oldukça yüksek oranda aktive ettiği bulunmuştur (Herron, 2003). Dolayısı ile Ca^{+2} RPEL BS6 enzimi için kofaktör olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. RPEL BS6 enzim aktivitesine çeşitli kimyasalların etkisine bakıldığında Mg^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} ve Ba^{+2} gibi iki değerlikli katyonlar kullanıldığında enzim aktivitesini hafif de olsa arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum ise Aspartatların çeşitli katyonlara da bağlanabilme özelliği ile açıklanabilmektedir (Shevchik ve diğerleri, 1999, Ouattara ve diğerleri 2010). Fe^{+2} (FeCl_3), EDTA varlığında ise aktiviteyi inhibe ettiği tespit edilmiştir. Tween 20, Zn^{+2} (ZnCl_2), K^+ (K_2SO_4) varlığı ise aktiviteyi ne olumlu yönde ne de olumsuz yönde etkilememiştir. Berensmeier ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *B. licheniformis* 14A PelA'da (Asp 111, Asp 141, Asp 145) da aynı kalsiyum bağlanma bölgelerinin korunduğu tespit edilmiştir. Fe^{+2} (FeCl_3), EDTA benzeri kompleksleştirici maddeler ise, enzim aktivitesinde kuvvetli inhibisyon etkisine sahiptir (Klug-Santner ve diğerleri, 2006; Ouattara ve diğerleri, 2008). Ca^{+2} (CaCl_2) varlığının enzimin rölatif aktivitesini oldukça yüksek oranda (4-5 kat) aktive ettiği bulunmuştur. *D. hansenii hansenii* M1'den elde edilen ekstrasellüler PEL enziminin Ca^{+2} (CaCl_2), Mg^{+2} (MgCl_2), varlığında aktivitesinin arttığı, ancak enzimin önemli ölçüde aktive edilmediği tespit edilmiştir. Dolayısı ile bu enzim kofaktör bağımlı olmadığı için birçok biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği açısından önem arz etmektedir. Kofaktörün yanı sıra aktiviteyi etkileyen bir diğer etmen ise, substrat konsantrasyonudur. Denenen konsantrasyonlarda aktiviteyi önemli ölçüde etkileyecek bir değişim gözlenmemiştir. Tüm çalışılan PEL enzimleri için doygunluğa en iyi ulaştığı konsantrasyon % 0,25 substrat (Apple Pectin, pH 8,0, Sigma Aldrich) konsantrasyon değeri olarak saptanmıştır. Enzim aktivitesi için gerekli en iyi koşullar tespit edildikten sonra enzimler saflaştırılarak aktivitesi daha da spesifikleştirilebilir. Enzimlerin saflaştırılması, endüstriyel kullanım ya da proteinin yapı, kompozisyon ve amino asit dizisinin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır. Enzim saflaştırılmasında dikkat edilmesi gereken hususlar; yüksek verim ve saflık aynı zamanda düşük fiyattır. Sukhumsıurchart ve

diğerleri (2014), *Bacillus* sp. RN1 PEL enzimine saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Enzimin saflaştırılması için ham ekstrakt % 15-30 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmüştür. Takao ve diğerleri (2001), *Bacillus* sp. TS 47 türünün PEL enzimine saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Enzimin saflaştırılması için ham ekstrakt % 50 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile çöktürülmüştür. Bu tez çalışmasında, kısmi saflaştırma yöntemlerinden ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz kullanıldı. Ancak çalıştığımız enzim esktrasellüler yapıda olduğu için, elde edilen filtratlardaki protein miktarı çok az olduğundan deneylerin devamında sadece filtratların ultrafiltre edilerek konsantre etme yolu seçildi.

Biyoinformatik çalışmalar neticesinde elde edilen verileri değerlendirilecek olur ise; Yapılan dizi hizalamasında, PEL BS6 geni ile BAA76885.1 pectate lyase (*Bacillus* sp.) ve BS-6: % 30 benzerlik, CAA57041.1 pectate lyase (*Dickeya chrysanthemi*) ile % 27 benzerlik, BAA81753.1 pectate lyase H (*Bacillus* sp. KSM-P15) ile ise % 31 benzerlik göstermiştir. NCBI –nükleotid blast programı ile yapılan analizde ise *B. amyloliquefaciens* TB-2 ve *Bacillus subtilis* BS-2 ile % 95 oranında benzerlik göstermiştir. *B. amyloliquefaciens* TB-2 1719 bç uzunluğunda olup 421 aa'i, *Bacillus subtilis* BS-2 1476 bç uzunluğunda olup 421 aa'i, RPEL BS6 geni ise; ~1600 bç uzunluğunda olup 420 aa'di kodlar. Elde edilen bu RPEL BS6 geninin, 420 aa'lık bir proteini kodladığı belirlenmiştir. RPEL BS6 proteininin molekül ağırlığını belirlerken yapılan çalışmalarda, SDS-Page neticesinde iki ayrı bant gözlemlenirken (65,75 kDa ve 57,29 kDa), Western I-blot hibridizasyon yöntemi ile tek bant (65,75 kDa) elde edilmiştir. Teorikte 420 aa'lık bir proteinin molekül ağırlığının amino asit dizisine dayandırılarak hesaplanan molekül kütlesi 46,2 kDa'dır. Ancak, RPEL BS6, bir posttranslasyonel modifikasyona uğrayabilir ve glikosilasyon gibi amino asit diziliminde eksik olan ilave fonksiyonel gruplar alabilir. Zhang ve diğerleri (2013) pektat liyaz ekspresyonu için iki farklı konakçıda (*E. coli* ve *P. pastoris*) *B. subtilis* 168'den gelen PEL enziminin ekspresyon seviyesini incelemiş ve klonlanan proteinler bir SDS-PAGE üzerinde çalıştırıldığında, *E. coli*'de klonlanan PEL enzimi beklendiği gibi 46 kDa'lık bir moleküler kütleye sahip bir bant göstermiş olup, diğer konakta klonlanan PEL enzimi, tahmin edilenden (48,6 kDa ve 51,4 kDa) daha büyük iki farklı bant göstermiştir. SDS çalışmasından önce enzimler üzerinde bir deglikosilasyon sindirimi yapıldıktan sonra, jel üzerinde aynı büyüklükteki bantları (46 kDa) elde etmişlerdir. *B. subtilis* 168'in PEL'in farklı bir konakçıda eksprese edildiğinde farklı derecede glikosile edildiğini ileri sürmüşlerdir (Sakai ve diğerleri, 1993; Zhang ve diğerleri, 2013). Farklı literatürlerde incelenen farklı organizmalar için PEL protein

büyüklikleri değişkenlik gösterebilmektedir. Western i-blot tekniği ile PEL proteininin büyüklüğü Moharib ve diğerleri (2000), *Pichia pinus*'ta 90 kDa, Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp.'de 38 kDa, Alana ve diğerleri (1990), *Bacillus macerans*'ta 35 kDa, Singh ve diğerleri (1999), *Bacillus* sp TS44.'te 50 kDa iken, Tierny ve diğerleri (1994), McCarthy ve diğerleri (1985), *Bacteroides thetaiotaomicron* ise 74 kDa bulunduğu bildirilmiştir. Ancak, literatürde bakteri kökenli olup, bu molekül ağırlığında (65,75 kDa) bir PEL proteinine rastlanılmamıştır. Dolayısı ile bu çalışmada yeni bulunan RPEL BS6 enzimi literatür için kaynak teşkil edebilir. Şekil 4.6'da verilen PEL gen hizalamasında katalitik tabakalar ve korunmuş kalıntılar tespit edilmiştir. Yapılan bu analiz aktif alan kalıntılarının RPEL BS6'da Asp 184, Asp 223 ve Asp 227 pozisyonunda muhafaza edildiğini göstermiştir. Literatürlerde bu aspartat kalıntılarının kalsiyum-substrat bağlanmasında rol aldığı ortaya koyulmuştur (Hatada, Kobayashi and Ito, 2001; Scavetta, Herron, Hotchkiss, Kita, Keen, Benen, Kester, Visser ve Jurnak, 1999). Genel olarak, PEL aktivitesi için kalsiyum gereklidir. Örneğin, *E. chrysanthemi*'den elde edilen PelC ve *Bacillus* sp.'den Pel-15E Ca^{+2} olmaksızın aktivite göstermez. KSM-P15, enzimatik aktivitenin ortaya çıkması için Ca^{+2} 'ye mutlak bir gereksinim duyar. Ca^{+2} iyonunun, paralel β -helis alanı ile ilmek bölgesi arasında belirgin bir yarıktaki alanda üç Asp kalıntısına bağlandığı bildirilmiştir (Pickersgill, Jenkins, Harris, Nasser and Robert-Baudouy, 1994). Bunun yanı sıra bu korunmuş bölgeler (Aspartat kalıntıları), Arg 218'in (aktif bölgenin) proton alıcısı olarak daha iyi aktivite göstermesini, substratın düzgün ve aktif hale getirilmesi için kritik önem taşır site (Herron ve diğerleri, 2003). Bununla birlikte, RPEL BS6, daha önce bildirilen diğer pektat liyazlardan farklı olarak, Ca^{+2} 'den bağımsız da etkinlik göstermiştir. Bunun iki nedeni olabileceğini düşünmekteyiz. Birinci neden RPEL BS6 enziminin diğer PEL grupları ile dizi hizalamasında kalsiyum bağlanması ile ilgili bazı kalıntılardan yoksun olduğu tespit edilmiştir. İkinci sebep ise Li ve diğerlerinin (2010) yaptığı çalışmada ortamın pH'sının yüksek olması (RPEL BS6'nın optimum pH 10,0) ortamda Ca^{+2} 'ye doğrudan koordinasyon için amino asitlerle etkili bir şekilde rekabet edecek çok sayıda hidroksil iyonu bulunması olabileceği bilgisini vermektedir (2010).

Gerçekleştirilen meyve suyu stabilite deneyleri sonucunda rekombinant olarak elde edilen PEL'in klonlama öncesi elde edilen filtrata göre daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Resim 4.11.'e bakıldığında her iki filtratta meyve suyunda askıda bulunan posaların parçalanıp çökmesini sağlamıştır. Bu bize bu kadar geniş pH aralığında çalışan ve aslında bazik

pH'larda daha etkin olabilecek RPEL BS6 enziminin biyoteknolojik uygulamalarda geniş kullanım alanı bulabileceğinin bir göstergesidir.

Son otuz yılda özellikle genetik ve protein mühendisliği alanındaki biyoteknolojik ilerlemeler, enzimleri birçok yeni endüstriyel proseslere dahil etmiştir. Mikrobiyal enzimler, çevreyle dost ve ekonomik birçok endüstriyel sektörde rutin olarak kullanılmaktadır. Çevre kirliliği, teknolojik toplumlarda artık kaçınılmaz olarak kabul edilemez bir olgudur. Bazı geleneksel kimyasal proseslerin yerine, mikroorganizmalar ve pektinaz, ksilanaz, selüloz, mannaz, galaktosidaz, lakkaz ve ligninaz gibi enzimleri içeren çevreyle daha dost biyoteknolojik proseslerin kullanılmasına artan talep vardır. Dünya genelinde çeşitli araştırmacılar; mikroorganizmalar tarafından üretilen ve çeşitli endüstriyel proseslerde iyi bir biyolojik katalizör olan pektinaz enzimlerinin biyoteknolojik potansiyeline dikkat çekmektedir (Hoondal ve diğerleri, 2002). Genellikle yüksek sıcaklık ve yüksek alkalik koşullarında, ciddi çevre etkileri ve hammadde kaybı meydana gelir. Bu nedenle, ticari olarak uygulanabilir ve çevresel olarak uygun biyoprosesler için ideal adaylar olarak kullanılabilecek, yüksek termostabilite ve alkali özelliğe sahip PEL'lerin geliştirmesi istenir. Pektinolitik enzimler doğada her yerde bulunur ve daha önce bildirilen PEL'lerin çoğu bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalardan izole edilmektedir (Yadav ve diğerleri, 2009). Bakteriyel alkalik Pellerin çoğunluğu *Bacillus* ve *Pseudomonas* cinsine ait PEL'ler endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak incelenmiştir (Hoondal ve diğerleri, 2002, Sarethy ve diğerleri, 2011). Bununla birlikte, pratik biyoprosesler açısından, sadece birkaçı uzun süre biyolojik işleme tabi tutulacak kadar sağlamdır. Son zamanlarda, termofilik veya alkalifilik mikroorganizmalardan kaynaklanan enzimler aşırı sıcaklık veya pH'da iyi performansı nedeniyle daha fazla ilgi uyandırmaktadır (Kluskens ve diğerleri 2003; Ko, Tsai, Tu, Tang ve Liu, 2011) . Asidofilik pektinazların, meyve sularının ve şarabın ekstraksiyonu ve durultulmasında (berraklaştırılması) oldukça yaygın uygulamaları vardır. Alkali pektinazlar ise, pektinli materyalleri içeren gıda işleme endüstrilerinden kaynaklanan atıksuların ilk arıtımında, tekstil ve bitki fiber işlenmesi, çay ve kahve fermentasyonu ve yağ ekstraksiyonu gibi çeşitli geleneksel endüstriyel proseslerde kullanılmaktadır. Pektini parçalayan mikroorganizmalar ve enzimler hakkındaki bilginin artması ile beraber alkali pektinazlar bitki virüslerinin saflaştırılması ve kâğıt yapımı gibi diğer biyoteknolojik proseslerde de dikkat çekmektedir. Aşağıdaki bölümlerde pektolitik enzimlerin bazı klasik ve yeni uygulamaları ele alınmıştır (Hoondal ve diğerleri, 2002). Pektinazlar, meyve suyu üretim endüstrilerinde, potansiyel biyoteknolojik uygulamalara

sahiptir (Prathyusha ve Suneetha, 2011). Pektik maddelerin, meyve sularının kıvamlarını, bulanıklıklarını ve görünüşlerini etkileyen en önemli faktörler olduğu kabul edilmektedir (Alkorta ve diğerleri, 1998). Meyve küspesine bu enzimlerin uygulanmasıyla pektin parçalanır, yani viskozite azalır ve meyve suyu kolaylıkla işlenebilir. Bu enzimler, meyvelerin etli kısımlarının yumuşatılması, çözülmesi ve çöktürülmesinde önemli bir role sahiptir. Pektin içeren meyve suyunun geleneksel çöktürme metodu; santrifüjleme, enzimatik olarak pektinin parçalanması, bentonit ve jelatin gibi maddelerle bulanıklığı giderme ve diatomik toprakla filtrasyonu içermektedir. Meyve suyundaki pektinli maddeler membran teknolojisi ile de ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon kullanılarak uzaklaştırılabilir (Arunachalam ve Asha, 2010).

Bu çalışma sonucunda;

- Mikrobiyal kaynaklı yüksek aktiviteye sahip PEL BS6 enzimi elde edilmiştir.
- PEL BS6 enziminin klonlama sonrası aktivitesini koruduğu gibi daha yüksek aktivitede etkin olabilecek stabil bir enzim olduğu belirlenmiştir.
- RPEL BS6 enziminin geniş sıcaklık aralığında (15-90°C) aktivitesini % 85,5 aktivitesini koruması nedeniyle termotabil bir enzim olduğu belirlenmiştir.
- Aynı zamanda elde edilen RPEL BS6 enzimi geniş pH aralığında yüksek aktivitesini koruması bu enzimin pH tolerant yapıda olduğunu, en iyi aktivite gösterdiği pH'nın 10,0 olması ise bu enzimin alkalın yapıda olduğunu göstermektedir.
- PEL BS6 ve RPEL BS6 optimal pH'sı, pH kararlılığı, optimal sıcaklığı ve termal kararlılığı kıyaslandığında Rekombinant PEL BS6 enziminin daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Klonlama sonrası RPEL BS6 enziminin pH kararlılığının ve termal kararlılığının artmış olması bu enzimin endüstride farklı uygulamalarda kullanılabilecek ve farklı fonksiyonel gıdaları geliştirmek mümkün olabilecektir.
- Hem asidik hem bazik pH'da ve ayrıca yüksek sıcaklıkta aktivitesini büyük ölçüde koruması, RPEL BS6 enziminin farklı endüstriyel alanlarda kullanımını mümkün kılacaktır.
- Elde edilen RPEL BS6 enziminin geninde bulunan katalitik kalıntılar ve bu kalıntıların ona kazandırdığı özellikler açısından diğer PEL enzimlerinden farklılık göstermektedir.
- RPEL BS6 proteininin moleköl ağırlığı letartürdekiler ile farklılık göstermektedir. Bu da bize bulunan bu enzimin yeni bir enzim olduğunu düşündürmektedir.

- Sonuç olarak, RPEL BS6 enzimi, termostabil, termotolerant, pH tolerant ve alkalın bir pektat liyaz tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bilinen pektatlar arasında bulunan bu yeni RPEL BS6 enzimi geniş bir pH çalışma aralığında çalışabilmesi ve uzun raf ömrü ile ayırt edilebilir özelliktedir.
- Ayrıca, RPEL BS6 enzimi gıda sektöründe berraklaştırma amacıyla mevcut PEL enzimlerinden daha etkin olarak, işlevsel gıda ürünleri geliştirmede kullanımı mümkün olabilir.
- Farklı pH ve sıcaklık aralığında aktivitesini kaybetmeden pektinli gıda atıklarının geri dönüştürülmesi hatta bu geri dönüşüm ile elde edilecek olan yeni ürünlerin de diğer teknolojilerde kullanılabilir hale getirilmesi sağlanabilecektir.
- PEL genin klonlanarak rekombinant olarak elde edilmiş olması ve raf ömrünün uzun olması ticari kullanım potansiyelini daha da güçlendirecektir.



KAYNAKLAR

- Acar, J. ve Gökmen, V. (2004). *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*. (Birinci Baskı). Ankara: Hacettepe Üniversitesi Basımevi, 674.
- Alana A., Alkorta I., Dominguez J.B., Llama M.J. and Serra J.L. (1990). Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Applied Environmental Microbiology*, 56(12), 3755–3759.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, 308-318.
- Ali, S., Chresten, R. S., Susana, T. and Richard, W. P. (2015). Structural insights into the loss of catalytic competence in pectate lyase activity at low pH. *FEBS Letters*, 589(21), 3242–3246.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review, *Process Biochemistry*, 33(1), 21-28.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J. L., (1996). Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(2), 141-146.
- Arunachalam, C. and Asha, S. (2010). Pectinolytic enzyme - a review of new studies. *Advanced Biotechnology Journal*, 9, 1-5.
- Astapovich, N. I. and Ryabaya, N. E. (1997). Isolation and characterization of polygalacturonase from *Saccharomyces pastorianus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 33(3), 287-291.
- Athanosopoulos, P. E. and Heldman, D. R. (1980). Kinetics of thermal inactivation for a pectolytic enzyme in sweet cherry brine. *Journal of Food Process Engineering*, 3, 91-104.
- Bajpai, P. (1999). Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnology Progress*, 15(2), 147-157.
- Beg, Q. K., Brushan, B., Kapoor, M. and Hoondal, G.S. (2000). Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 396-402.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Tiwari, R.P. and Hoondal, G.S. (2001). Bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp using combination of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Research Bulletin of The Panjab University*, 57, 71-78.
- BeMiller, J.N. (1986). An introduction to pectins: structure and properties. *ACS Symposium Series*, 310, 2-12.
- Benkova, L.R. (1967). Characterization of extracellular polygalacturonase of *Aspergillus niger*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 32(12), 4504-4509.

- Berensmeier, S., Singh S. A., Meens, J. and Buchholz, K. (2004). Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 560-567.
- Blanco, P., Sieiro, C. Dtaz, A. and Villa, T.G. (1997). Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(6), 711-712.
- Borrego, F., Tari, M., Manjon, A. and Iborra, J.L. (1989). Properties of pectinesterase immobilized on glycophasse-coated controlled-pore glass. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 22(2), 129-140.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brown, T.A. (1990). *Gene cloning and DNA anaylsis*. (Yedinci Baskı). İngiltere: Wiley Blackwell, 3-11.
- Bruhlmann, F. (1995). Prufucation and characterization of an extracellular pectate lyase from an *Amycolata* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3580-3585.
- Bruhlmann, F., Kim, K.S., Zimmerman, W. and Fiechter, A. (1994). Pectinolytic enzymes from Actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 2107-2112.
- Bruins, M. E., Jansen, A. E. M. and Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patentes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90(2), 155-186.
- Carr, J. G. (1985). Tea, coffee and cocoa. *Microbiology of Fermented Food*, 2, 133-154.
- Chen, W.C., Hsieh, H.J. and Tseng, T.C. (1998). Purification and characterization of a pectin lyase from *Pythium splendens* infected cucumber fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39, 181-186.
- Demirjian, D.C., Moris-Vara, F. and Sassidy, C.S. (2001). Enzymes from Extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 144-151.
- Desjardins, P. and Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of Visualized Experiments*, 45, 2565.
- Dinnella, C., Lanzarini, G. and Stagni, A. (1994). Immobilization of an endopectin lyase on g-alumina: study of factors influencing the biocatalytic matrix stability. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59, 237-241.
- Dixit, V.S., Kumar, A.R., Pant, A. and Khan, M.I. (2004). Low molecular mass pectate lyase from *Fusarium moniliforme*: similar modes of chemical and thermal denaturation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(2), 477-484.

- Duran, K., Özdemir, D. ve Namlıgöz, E.S. (2007). The enzymatic degumming of silk fibers. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3, 182-186.
- Edstrom, R.D. and Phaff, H.J. (1964). Eliminative cleavage of pectin and of polygalacturonide methyl ester by pectin trans eliminase. *International Journal Biological Chemistry*, 239, 2409-2415.
- Edstrom, R.D. and Phaff, H.J. (1964). Purification and certain properties of pectin transeliminase from *Aspergillus fonsecaeus*. *Journal Biological Chemistry*, 239(8), 2403-2408.
- Ekşi, A. (1988). *Meyve suyu durultma tekniği*. (Dokuzuncu Baskı). Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği, 127.
- Fayyaz, A., Asbi, B.A., Ghazali, H.M., Che Man, T.B. and Jinap, S. (1993). Pectinesterase extraction from papaya. *Food Chemistry*, 47(2), 183-185.
- Federici, F. (1985). Production purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *Journal of Microbiology*, 51(2), 139-150.
- Fitter, J., Hermann, R., Dencher, N.A., Blume, A., and Hauss, T. (2001). Activity and stability of a thermostable alfa-amylase compared to its mesophilic homologue, mechanism of thermal adaptation. *Biochemistry*, 40(35), 10723-10731.
- Fujiwara, S. (2002). Extremophiles: developments of their special functions and potential resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 518-525.
- Godfrey, A. (1985). Production of industrial enzymes and some applications in fermented foods. *Microbiology of Fermented Foods*, 1, 622-657.
- Godfrey, Y., Hyman, L.J., McMillan, G.P., Old, D.C. and Perombelon, M.C.M. (1994). Purification and characterization of mitomycin C-induced pectin lyase of *Erwinia carotovora* sub sp. *Atroseptica* strain SCRI 1043. *Journal of Applied Microbiology*, 76(1), 13-21.
- Gurucharanam, K., Deshpande, K.S. (1986). Polysaccharides of *Curvularia lunata* – used in degumming of ramie fibers. *Indian Phytopathology*, 3, 385-389.
- Gül-Güven, R. (2007). *Sıcak Su Kaynaklarından Bakteri İzolasyonu, Tanımlanması Ve Alicyclobacillus acidocaldarius sub sp. rittmanii'nin B-Galaktozidaz Enziminin Saflaştırılması*. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 196.
- Haki, G.D. and Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Hasegawa, S. and Nagel, C.W. (1966). A new pectic acid trans-eliminase produced exocellularly by a *Bacillus*. *Journal of Food Science*, 31(6), 838-845.
- Hatada, Y., Kobayashi, T. and Ito, S. (2001). Enzymatic properties of the highly thermophilic and alkaline pectate lyase Pel-4B from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain

- P-4-N and the entire nucleotide and amino acid sequences. *Extremophiles*, 5(2), 127-133.
- Herron S.R., Scavettas R.D., Garrett, M., Legner, M. and Jurnak, F. (2003). Characterization and implications of Ca^{+2} binding to pectate lyase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12271-12277.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. and Beg, Q.K. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59(4-5), 409-418.
- Horikoshi, K. (1990). Enzymes from alkalophiles. *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2, 275-295.
- İnternet 1: Pectate lyase from *Aspergillus* sp. lot 111201a megazyme. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.yumpu.com%2Fen%2Fdocument%2Fview%2F37611913%2F&date=2018-01-29>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2017.
- İnternet 2: BioTek Instruments, DNA Quantification using Gen5™. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.biotek.com%2Fresources%2Ftechnical-notes%2Fdna-quantification-using-gen5%2F&date=2018-01-29>, Son Erişim Tarihi: 26.12.2017.
- Jayani, S.R., Saxena, S. and Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.
- Kapoor M., Beg Q.K., Bhushan B., Dadhich K.S. and Hoondal G.S. (2000). Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochemistry*, 36(5), 467-473.
- Karaaslan, Ç. (2008). “Western Blott” tekniği. *Astım Allerji İmmünoloji*, 6(1), 38-40.
- Kashyap, D.R., Chandra, S., Kaul, A. and Tewari, R. (2000). Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 277–282.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K. and Tewari, R. (2001). Application of pectinases in the commercial sector. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227.
- Kirk, T.K. and Jefferies, T.W. (1996). Role of microbial enzymes in pulp and paper processing. *ACS Symposium Series*, 655, 2-14.
- Klusken, L.D., Van Alebeek, G.J., Voragen A.G., De Vos, W.M., and Van Der, O.J. (2003). Molecular and biochemical characterization of the thermoactive family 1 pectate lyase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *The Biochemical Journal*, 370(2), 651-659.
- Ko, C.H., Tsai, C.H., Tu, J., Tang, S.H. and Liu, C.C. (2011). Expression and thermostability of *Paenibacillus campinasensis* BL11 pectate lyase and its applications in bast fibre processing. *Annals of Applied Biology*, 158(2), 218-225.

- Kobayashi, T., Koike, K., Yoshimatsu, T., Higaki, N., Suzumatsu, A., Ozawa, T., Hatada, Y., 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.
- Kobayashi, T., Hatada, Y., Higaki, N., Lusterio, D. D., Ozawa, T., Koike, K., Kawai, S. and Ito, S. (1999). Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1427(2), 145-154.
- Koller, A. (1966). Fraktionierung und charakterisierung der pektolytischen enzyme von *Aspergillus niger*. *Eidgenossische Technische Hochschule Zurich*, 3374.
- Koller, A., and Neukom, H. (1967). Ontersuchungen über den pektolytischen enzyme von *Aspergillus niger*. *Mitt Geb Lebensmittelunter Hug*, 58, 512.
- Kozianowski, G., Canganella, F., Rainey, F.A., Hippe, H., and Antranikian, G. (1997). Purification and characterization of thermostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter italicus* sp. nov. *Extremophiles*, 1(4), 171-182.
- Körlü, A.E. ve Bozacı, E.G. (2006). Properties of flax and retting of flax. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 16(1), 276-280.
- Kristjansson, M.M. and Asgeirsson, B. (2002). Properties of extremophilic enzymes and their importance in food science and technology. *Handbook of Food Enzymology*, 77-99.
- Le Man, H., Behera, S.K. and Park, H.S. (2010). Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(1), 157-164.
- Lewin, B. (Editör). (2000). *Gene vii*. New York: Oxford University Press, 52-60.
- Li, G., Rao, L., Xue, Y., Zhou, C., Zhang, Y. and Ma, Y. (2010). Cloning, expression, and characterization of a highly active alkaline pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(4), 670-677.
- Li, X., Wang, H., Zhou, C., Ma, Y., Li, J. and Song, J. (2014). Cloning, expression and characterization of a pectate lyase from *Paenibacillus* sp. 0602 in recombinant *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, 14, 18.
- Liu, Y.K. and Luh, B.S. (1978). Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Food Science*, 43, 721-726.
- Manachini, P.L., Fortina, M.G. and Parini, C. (1987). Purification and properties of endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnology Letters*, 9(3), 219-224.

- Marquez, A.L., Zavala-Paramo, M.G., Lopez-Romero, E. and Camacho, H.C. (2011). Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. *Biotechnology Letters*, 33(5), 859-868.
- McCarthy, R.E., Kotarski, S.F. and Salyers, A.A. (1985). Location and characteristics of the enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Bacteriology*, 161(2), 493-499.
- Miyazaki, Y. (1991). Purification and characterization of an endo-pectate lyase from *Bacillus macerans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(1), 25-30.
- Moharib, S.A., El-Sayed, S.T. and Jwanny, E.W. (2000). Evaluation of enzymes produced from yeast. *Nahrung*, 44(1), 47-51.
- Mutter, M., Beldman, G., Schols, H.A. and Voragen, A.G.J. (1994). Rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranohydrolase: a novel enzyme specific for the terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin. *Plant Physiology*, 106(1), 241-250.
- Mutter, M., Colguhoun, I.J., Schols, H.A., Beldman, G. and Voragen, A.G.J. (1996). Rhamnogalacturonase b from *Aspergillus aculeatus* is a rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranosyl-(1-4)- α -D-galactopyranosyluronide lyase. *Plant Physiology*, 110(1), 73-77.
- Mutter, M., Renard, C.M.G.C., Beldman, G. and Schols, H.A. (1998). Mode of action of rg-hydrolase and rg-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers: characterization of degradation products using rg-rhamnohydrolase and rg-galacturonohydrolase. *Carbohydrate Research*, 311(3), 155-164.
- Naidu, G.S.N. (1999). *Studies on Behavior and Production of Extracellular Pectinases From Aspergillus niger*. PhD thesis, Indian Institute of Technology-Madras, Chennai: India, 9-127.
- Naidu, G.S.N. and Panda, T. (1998). Application of response surface methodology to evaluate some aspects on stability of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 2(1), 71-77.
- Nasser, W., Awade, A.C., Reverchon, S. and Robert-Baudouy, J. (1993). Pectate lyase from *Bacillus subtilis*; molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Letters*, 335(3), 319-326.
- Nasser, W., Chalet, F. and Robert-Baudouy, J. (1990). Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie*, 72(9), 689-695.
- Ouattara, H.G., Reverchon, S., Niamke, S.L., and Nasser, W. (2010). Biochemical properties of pectate lyases produced by three different *Bacillus* strains isolated from fermenting cocoa beans and characterization of their cloned genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), 5214-5220.
- Pallesen, B.E. (1996). The quality of combine-harvested fibre flax for industrial purposes depends on the degree of retting. *Industrial Crops and Products*, 5(1), 65-78.

- Palomaki, T. and Saarilahti, H.T. (1997). Isolation of characterization of new c-terminal substitution mutation affecting secretion of polygalacturonases in *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *FEBS Letters*, 400(1), 122-126.
- Parini, C., Fortina, M.G. and Manachini, P.L. (1988). Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Journal of Applied Microbiology*, 65(6), 477-481.
- 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.
- Petersen, S. (2001). Enzymes to upgrade plant nutrients. *Feed Mix*, 9, 12-15.
- Pickersgill, R., Jenkins, J., Harris, G., Nasser, W. and Robert- Baudouy, J. (1994). The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium. *Nature Structural Biology*, 1(10), 717-723.
- Pitt, D. (1988). Pectin Lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Methods in Enzymology*, 161, 350-354.
- Polizeli, M.D.L.T.M., Jorge, J.A. and Terenzi, H.F. (1991). Pectinase production by *Neurospora rassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal of General Microbiology*, 137, 1815-1823.
- Prathyusha, K. and Suneetha, V. (2011). Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/juice production industry. *Journal of Phytology*, 3(6), 16-19.
- Reid, I. and Ricard, M. (2000). Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 115-123.
- Revilla, I. and Ganzalez-san Jose, M.L. (2003). Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(1), 29-36.
- Rombouts, F.M. and Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes: microbial enzymes and bioconversions. *Economic Microbiology*, 5, 227-282.
- Sakai, T., Sakamoto, T. and Hallaert, J. (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39, 213- 294.
- Salazar, L. and Jayasinghe, U. (1999). Fundamentals of purification of plant viruses. *International Potato Center*, 1-10.
- Sapunova, L.I., Mikhailova, R.V. and Lobanok, A.G. (1995). Properties of pectin lyase preparations from the genus *Penicillium*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 31, 435-438.

- Sarethy, I.P., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S.K., Gupta, V. and Gupta, S. (2011). Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(7), 769-790.
- Scavetta, R. D., Herron, S. R., Hotchkiss, A. T., Kita, N., Keen, N. T., Benen, J. A., Kester, J. Visser H. C. and Jurnak. F. (1999). Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C. *Plant Cell*, 11(6), 1081-1092.
- Scott, D. (1978). Enzymes applications, industrial. *Kirk-Othmer Encyclopedia Of Chemical Technology*, 173-224.
- Searle-Van Leeuwen, M.J.F., Lam, V.D.B., Schols, H.A., Beldman, G. and Voragen, A.G.J. (1992). Rhamnogalacturonan acetylsterase: a novel enzyme from *aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(3), 347-349.
- Serra, J.L., Alkorta, I., Llama, M.J. and Alaiia, A. (1992). Aplicacion industrial de 10s enzimas pecticos, production, purification, inmovilizacion y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*. *Alimentacion Equiposy Tecnologia*, 11, 127-134.
- Seyedarabi, A., To, T.T., Ali, S., Hussain, S., Fries, M., Madsen, R., Clausen, M.H., Teixeira, S., Brocklehurst, K. and Pickersgill, R.W. (2010). Structural insights into substrate specificity and the anti beta-elimination mechanism of pectate lyase. *Biochemistry*, 49(3), 539-546.
- Shevchik, V.E. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology*, 24(6), 1285-1301.
- Shevchik, V.E., Kester, H.C., Benen J.A., Visser, J., Robert-Baudouy, J. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1999) Characterization of the exopolygalacturonate lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1652-1663.
- Shevchik, V.E., Robert-Baudouy, J. and Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (1997). pectate lyase peli of *Erwinia chrysanthemi* 3937 belongs to a new family. *Journal of Bacteriology*, 179(23), 7321-7330.
- Silva, E.G., Borges, M.F., Medina, C. and Piccoli, R.F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeast from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 859-865.
- Singh, S.A., Plattner, H. and Diekmann, H. (1999). Exo polygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 420-425.
- SinitSYna, O.A., Federova, E.A. and Semenova, M.V. (2007). Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. *Biochemistry*, 72(5), 565-571.
- Soriano M., Blanco A., Diaz P. and Javier Pastor F. I. (2000). An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. *Microbiology*, 146(1), 89-95.

- Soriano, M., Diaz, P. and Javier Pastor, I.F. (2006). Pectate lyase C from *Bacillus subtilis*: a novel endo-cleaving enzyme with activity on highly methylated pectin. *Microbiology*, 152(3), 617–625.
- Sukhumsiirchart, W., Kawanishi, S., Deesukon, W., Chansiri, K., Kawasaki, H., and Sakamoto, T. (2014). Purification, characterization, and overexpression of thermophilic pectate lyase of *Bacillus* sp. RN1 isolated from a hot spring in Thailand. *Biotechnology and Biochemistry*, 73(2), 268-273.
- Takao, M., Nakaniwa, T., Yoshikawa, K., Terashita, T. and Sakai, T. (2001). Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(2), 322-329.
- 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.
- Tanabe, H., Kobayashi, Y. and Akamatsu, T. (1988). Pretreatment of pectic waste water with pectate lyase from an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(7), 1855-1856.
- Tanabe, H., Yoshihara, Y., Tamura, K., Kobayashi, Y. and Akamatsu, T. (1987). Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 65(2), 243-246.
- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J., Hugouvieux- Cotte-Pattat, N. (1997). Comparative analysis of the ve major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2503-2511.
- Tierny, Y., Bechet, M., Joncquiart, J.C., Dubourguier, H.C. and Guillaume, J.B. (1994). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of genes encoding pectate lyase and pectin methylesterase activities from *Bacteroides thetaiotaomicron*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 76(6), 592-602.
- Vamos-Vigyazo, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15(1), 49-127.
- Van Den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213-218.
- Viikari, L., Tenkanen, M. and Suurnakki, A. (2001). Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Science and Technology*, 24(1), 79-101.
- Vlugt-Bergmans, C.J.B., Meeuwsen, P.J.A., Voragen, A.G.J. and Van Ooyen, A.J.J. (2000). Endo-xylogalacturonan hydrolyase, a novel pectinolytic enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 36-41.

- Wang, Q., Fan, X., Hua, Z., Gao, W. and Chen, J. (2007). Degradation kinetics of pectins by an alkaline pectinase in bioscouring of cotton fabrics. *Carbohydrate Polymers*, 67(4), 572-575.
- Wiseman, A. (1987). Handbook of enzymes biotechnology. *The Application of Enzymes in Industry*, 3, 274-373.
- Yadav, S., Yadav, P.K., Yadav, D., Yadav, K.D.S. (2009). Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*, 44(1), 1-10.
- Yener, F. (2007). *Pektinaz Enziminin Farklı İki Destek Üzerine İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 15-16.
- Zhang, C., Yao, J., Zhou, C., Mao, L., Zhang, G., Ma, Y. (2013). The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. *BMC Biotechnology*, 13, 26.
- Zheng, Y., Huang, C.H., Liu, W., Ko, T.P., Xue, Y., Zhou, C., Guo, R.T. and Ma, Y. (2012). Crystal structure and substrate-binding mode of a novel pectate lyase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 420(2), 269-274.
- Zhuge, B., Du, G.C., Shen, W., Zhuge, J. And Chen, J. (2008). Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. *Biochemical Engineering Journal*, 40(1), 92-98.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BEKLİ, Seda
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01.10.1989, Trabzon
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (531) 720 32 16
e-mail : bekli.seda@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Çevre Bilimleri	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji	2018
Lisans	Gazi Üniversitesi / Biyoloji Eğitimi	2013
Lise	Yomra Lisesi	2006

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016- Halen	Bilimsel Araştırma Projesi	Proje Asistanı

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Bilimsel faaliyetler, doğa yürüyüşleri



GAZİ GELECEKTİR..