



***Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-2641) ile
PEKTİNAZ ÜRETİMİNİN İNCELENMESİ**

Çevre Müh. Fadile Gül PAMPAL

**Yüksek Lisans Tezi
Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Arzu Y. DURSUN**

OCAK-2018

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-2641) ile PEKTİNAZ ÜRETİMİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çevre Müh. Fadile Gül PAMPAL

(091112102)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.01.2018
Tezin Savunulduğu Tarih : 17.01.2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Arzu Y. DURSUN (Fırat Üni.)

Diğer Jüri Üyeleri : Doç. Dr. Gülşad USLU ŞENEL (Fırat Üni.)

Yrd. Doç. Dr. Mehtap TANYOL (Munzur Üni.)

OCAK-2018

ÖNSÖZ

Tez konumun seçiminde, planlamasında, tezimin yazımında yardımını hiç esirgemedi bütünü desteğiyle her an her konuda yanımda olan ve bilgi ile deneyimlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Arzu Y. DURSUN' a;

Deneysel çalışmalarımda yardımını hiç esirgemeyen ve tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem TEPE' ye;

Laboratuar çalışmalarımda desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Burçin YILDIZ, Işıl ÖZDEMİR ve Halime DURAN' a;

Tez yazım aşamasında bana manevi destek sağlayan çok değerli Başmühendisim Adnan BEŞİROĞLU' na;

Hayatıma anlam katan çok değerli Annem Naciye ŞEKER, Babam Selim ŞEKER ve kardeşlerime;

Hayatıma mutluluk, huzur, sevinç katan çok kıymetli Eşim Mehmet PAMPAL' a;

Çalışmamın yürütülmesinde maddi destek sağlayan FÜBAP' a ve sağladığı çalışma olanaklarıyla Çevre Mühendisliği Bölümü' ne en samimi duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Fadile Gül PAMPAL
ELAZIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	X
SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler.....	3
2.1.1. Enzimin Yapısı ve Fonksiyonu.....	5
2.1.2. Enzimlerin Aktif Merkezi.....	6
2.1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması	8
2.1.4. Enzim Kaynakları.....	9
2.1.4.1. Hayvansal Enzimler.....	10
2.1.4.2. Bitkisel Enzimler.....	10
2.1.4.3. Mikrobiyal Enzimler	11
2.1.5. Enzimlerin Aktivitesi.....	11
2.1.5.1. pH' ın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	12
2.1.5.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	12
2.1.5.3. Enzim Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	13
2.1.5.4. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	13
2.1.5.5. Aktivatör ve İnhibitör Varlığının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	14
2.1.5.6. Zamanın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	14
2.1.6. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	15
2.1.7. Enzimlerin Seçiciliği	16
2.1.8. Enzimatik Aktivitenin Kontrolü.....	16
2.2. Mikrobiyal Enzim Üretimi.....	17
2.2.1. Enzim Üretimine Uygun Türlerin Seçimi.....	17
2.2.2. Enzim Üretimi için Optimum Şartların Düzenlenmesi	19
2.2.2.1. Karbon Kaynağı	19
2.2.2.2. Azot Kaynağı	20
2.2.2.3. Enerji Kaynağı	20
2.2.2.4. Eser Elementlerin Kaynağı	21
2.2.2.5. Su Kaynağı.....	21
2.2.2.6. Diğer Besin Maddelerinin Kaynağı.....	22
2.3. Fermantasyon	22
2.3.1. Fermantasyonla Enzim Üretim Yöntemleri.....	23
2.3.1.1. Derin Kültür Fermantasyonu (Daldırmalı Fermantasyon Yöntemi)	24
2.3.1.2. Katı Substrat Fermantasyon Yöntemi (Yüzey Kültür Fermantasyonu)	25
2.4. Pektinazlar.....	30
2.4.1. Pektin Hakkında Genel Bilgiler	30
2.4.1.1. Pektinin Tanımı ve Elde Edilişi	30

2.4.1.2.	Pektinlerin Biyolojik Olarak Parçalanması.....	32
2.4.1.3.	Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri.....	32
2.4.1.4.	Pektinlerin Endüstriyel Önemi.....	33
2.4.2.	Pektik Enzimler.....	33
2.4.2.1.	Pektik Enzimlerin Genel Özellikleri	33
2.4.2.2.	Pektin Esterazlar (Ester Bağını Parçalayanlar)	35
2.4.2.3.	Depolimerize Eden Enzimler (Zincir Kırıcı Enzimler)	35
2.4.2.4.	Protopektinaz	38
2.4.3.	Pektinazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	38
2.4.3.1.	Pektinazların Tekstil İşlemleri ve Pamuk Liflerinin Parlatılmasında Kullanımı	38
2.4.3.2.	Pektinazların Kümes Hayvanlarının Yemlerinde Kullanımı	39
2.4.3.3.	Pektinazların Kağıt ve Kağıt Hamuru Sanayisinde Kullanımı	39
2.4.3.4.	Pektinazların Meyve Suyu Üretiminde Kullanımı.....	39
2.4.3.5.	Pektinin Farmasötik Teknolojide Kullanımı.....	40
2.4.3.6.	Pektinazların Diğer Alanlarda Kullanımı	40
2.4.4.	Katı Hal Fermentasyonu ile Pektinaz Üretimi Çalışmaları	41
2.5.	<i>Pseudomonas</i> Ailesi ve <i>Pseudomonas fluorescens</i>	42
2.5.1.	<i>Pseudomonas</i> Ailesinin Genel Özellikleri.....	42
2.5.2.	<i>Pseudomonaslar</i> ' ın Mikrobiyolojik Özellikleri.....	43
2.5.3.	<i>Pseudomonaslar</i> ' ın Biyokimyasal Özellikleri	44
2.5.4.	Pigmentasyon	45
2.5.5.	Plazmid DNA	46
2.5.6.	<i>Pseudomonas</i> ' lar Tarafından Üretilen Ekstraselüler Enzimler	47
2.5.6.1.	Proteazlar	47
2.5.6.2.	Lipazlar	47
2.5.7.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	48
3.	MATERYAL ve METOT.....	50
3.1.	Mikroorganizma ve Üretimi	50
3.2.	Enzim Üretim Ortamı	51
3.3.	Analiz Yöntemleri	52
3.3.1.	Mikroorganizma Derişimi Tayini.....	52
3.3.2.	Enzim Aktivite Tayini	52
3.3.2.1.	Pektin Liyaz Aktivitesi	52
3.3.2.2.	Ekzo Pektinaz Aktivitesi.....	53
3.3.2.3.	Endo Pektinaz Aktivitesi	54
3.3.2.4.	Protein Tayini.....	55
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	56
4.1.	Derin Kültür Fermantasyon Çalışmaları.....	56
4.1.1.	Başlangıç pH' ının Etkisi	56
4.1.2.	Başlangıç Pektin Derişiminin Etkisi.....	60
4.1.3.	Azot Kaynaklarının Etkisi	64
4.1.3.1.	Amonyum Sülfat Derişiminin Etkisi	64
4.1.3.2.	Maya Özütü Derişiminin Etkisi	68
4.1.3.3.	Pepton Derişiminin Etkisi.....	71
4.1.4.	Metal Tuzların Etkisi	74
4.1.5.	Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi.....	79
4.2.	Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri.....	80
4.2.1.	Ortam Seçimi	81

4.2.2.	Tanecik Boyutunun Etkisi	83
4.2.3.	Şeker Pancarı Küspesi Derişiminin Etkisi	85
5.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	88
6.	KAYNAKLAR	90
7.	EKLER	100
	ÖZGEÇMİŞ	102



ÖZET

Bu çalışmada, kesikli sistemde *Pseudomonas fluorescens* ile pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz üretimi gerçekleştirilmiş ve enzim üretimine başlangıç pH' ı, başlangıç pektin derişimi, farklı azot kaynakları ve metal tuzlarının etkileri incelenmiştir. Daha sonra farklı tarımsal atıklar kullanılarak katı hal fermantasyonu ile enzim üretimi yapılmış ve pektinaz grubu enzimlerin üretiminde kullanılabilecek tarımsal atıklar belirlenmiştir.

Çalışmanın ilk kısmında derin kültür fermantasyonu deneyleri yapılmış ve pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz üretimine başlangıç pH' ının etkisi araştırılmış, maksimum enzim üretimi pH : 8' de elde edilmiştir. Başlangıç pektin derişiminin enzim üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, pektin derişimi % 0.5-1.5 (w/v) aralığında değiştirilmiştir. % 1 (w/v) pektin derişimi optimum pektin derişimi olarak belirlenmiştir. Daha sonra farklı azot kaynaklarının etkisi incelenmiş; amonyum sülfat, maya özütü ve pepton azot kaynağı olarak kullanılmıştır. En yüksek aktivite % 0.14 amonyum sülfat içeren ortamda elde edilmiştir. Derin kültür fermantasyonu deneylerinin son bölümünde farklı metal tuzların etkileri araştırılmış ve % 0.02 (w/v) derişiminde $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, NaCl, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ bu amaç için kullanılmıştır. En yüksek aktivite değerleri % 0.02 (w/v) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ içeren ortamda elde edilmiştir.

Araştırmanın ikinci aşamasında pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz enzimlerinin aktivitelerine sıcaklık ve pH' ın etkisi incelenmiştir. Bu amaçla pH 6-11 aralığında değiştirilirken sıcaklık ise 30-70 °C aralığında değiştirilmiştir. Pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri için optimum pH sırasıyla 8, 10 ve 9 olarak; optimum sıcaklıkları ise sırasıyla 50, 40 ve 40 °C olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın son kısmında katı hal fermantasyonu deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla, buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ay çekirdeği tablası, portakal kabuğu, muz kabuğu ve elma posası gibi çeşitli tarımsal atıklar kullanılmış ve en yüksek pektin liyaz aktivitesi şeker pancarı küspesi, ekzo pektinaz aktivitesi elma posası ve endo pektinaz aktivitesi ise portakal kabuğu içeren ortamlarda elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pektinaz, *Pseudomonas fluorescens*, Derin Kültür Fermantasyonu, Katı Hal Fermantasyonu, Tarımsal Atıklar

ABSTRACT

Investigation of Production of Pectinase by *Pseudomonas fluorescens* (NRRLB-2641)

In this study, production of pectin lyase, exo-pectinase and endo-pectinase was performed by *Pseudomonas fluorescens* in a batch system and the effects of initial pH, initial pectin concentration, different nitrogen sources, and metal salts on enzyme production were investigated. Then, the enzyme production was achieved with solid state fermentation using different agricultural wastes and the agricultural wastes that can be used in the production of pectinase group enzymes were determined.

At the first stage of the research, submerged culture fermentation experiments were studied and the effect of initial pH on the production of pectin lyase, exo-pectinase and endo-pectinase was investigated, maximum enzymes production were obtained at pH : 8. In order to investigate the effect of initial pectin concentration on enzyme production, pectin concentration was varied in the range of % 0.5-1.5 (w/v). 1.0 % (w/v) pectin was determined as optimum pectin concentration. Then the effects of different nitrogen sources were investigated, ammonium sulfate, yeast extract and peptone were used as nitrogen sources. The highest activity was observed at 0.14 % (w/v) ammonium sulfate. At the last part of the submerged culture fermentation experiments, the effects of metal salts were examined and $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ at the concentration of 0.02 % (w/v) were used for this purpose. The maximum activity values were obtained in a medium containing 0.02 % (w/v) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

At the second stage of the research, the effects temperature and pH on pectin lyase, exo-pectinase and endo-pectinase enzymes activities were tested. For this purpose pH was varied in the range of 6-11, where as temperature was varied from 30°C to 70 °C. The optimum pH were found as 8, 10 and 9; optimum temperatures were found as 50, 40 and 40 °C for pectin lyase, exo and endo pectinase activities, respectively.

At the last stage of the research, solid state fermentation studies were performed. Agricultural wastes such as wheat bran, sugar beet pulp, sunflower tray, orange peel, banana peel and apple pomace were used and the maximum pectin lyase, exo-pectinase and endo-pectinase activities were determined in the medium containing sugar beet pulp, apple pomace and orange peel, respectively.

Key words: Pectinase, *Pseudomonas fluorescens*, Submerged Culture Fermentation, Solid State Fermentation, Agricultural Wastes

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Enzimin yapısı.....	5
Şekil 2.2.	Anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyuma modeli.....	7
Şekil 2.3.	Tepkime hızına substrat derişiminin etkisi	14
Şekil 2.4.	Fermantasyon akış şeması	23
Şekil 2.5.	Pektin-esteraz enziminin etki mekanizması.....	35
Şekil 2.6.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> hücrelerine ait taramalı elektron görüntüsü	49
Şekil 4.1.	Farklı pH değerlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	57
Şekil 4.2.	Farklı pH değerlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	58
Şekil 4.3.	Farklı pH değerlerinde toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi.....	59
Şekil 4.4.	Farklı pektin derişimlerinde kuru mikroorganizma derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi.....	61
Şekil 4.5.	Farklı pektin derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları	61
Şekil 4.6.	Farklı pektin derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	62
Şekil 4.7.	Farklı pektin derişimlerinde toplam protein derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	63
Şekil 4.8.	Farklı pektin derişimlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi	64
Şekil 4.9.	Farklı amonyum sülfat derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları	65
Şekil 4.10.	Farklı amonyum sülfat derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	66
Şekil 4.11.	Farklı amonyum sülfat derişimlerinde toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi	67
Şekil 4.12.	Farklı maya özütü derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları.....	68
Şekil 4.13.	Farklı maya özütü derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	69
Şekil 4.14.	Farklı maya özütü derişimlerinde toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi	70
Şekil 4.15.	Farklı pepton derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları	71
Şekil 4.16.	Farklı pepton derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	72
Şekil 4.17.	Farklı pepton derişimlerinde toplam protein derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi	73
Şekil 4.18.	Farklı pepton derişimlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi	74
Şekil 4.19.	Farklı metal tuzlarında [%0.02 (w/v)] elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları	75

Şekil 4.20.	Farklı metal tuzlarında [(%0.02 (w/v))] enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	77
Şekil 4.21.	Farklı metal tuzlarında [(0.02 (w/v))] toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi	78
Şekil 4.22.	Farklı ortam bileşenlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi	82
Şekil 4.23.	Farklı ortam bileşenlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi	83
Şekil 4.24.	Farklı şeker pancarı küspesi boyutlarında enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi.....	84
Şekil 4.25.	Farklı şeker pancarı küspesi boyutlarında ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi	85
Şekil 4.26.	Farklı şeker pancarı küspesi derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi.....	86
Şekil 4.27.	Farklı şeker pancarı küspesi derişimlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi.....	87
Ek şekil 1.1.	Yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu	100
Ek şekil 1.2.	Yaş-kuru ağırlık kalibrasyon doğrusu	100
Ek şekil 2.1.	Galakturonik asit kalibrasyon grafiğı.....	101
Ek şekil 3.1.	Toplam protein kalibrasyon grafiğı.....	101

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	Enzimin holoenzim, apoenzim ve koenzimin özellikleri.....	6
Tablo 2.2.	Enzimlerin sınıflandırılması.....	9
Tablo 2.3.	Ticari olarak önemli olan bazı enzimlerin organizmaları	17
Tablo 2.4.	Fermantasyon için gerekli hammaddeler	22
Tablo 2.5.	Katı substrat proseslerinde kullanılan temel mikroorganizma grupları.....	29
Tablo 2.6.	Derin kültür ve katı hal fermantasyonu arasındaki farklar.....	30
Tablo 2.7.	Pektik bileşikler ve özellikleri.....	31
Tablo 2.8.	Pektik enzimlerin sınıflandırılması.....	34
Tablo 2.9.	Bazı <i>pseudomonaslar</i> ' ın biyokimyasal özellikleri.....	45
Tablo 3.1.	<i>P. fluorescens</i> ' in üretiminde kullanılan zengin sıvı besiyerinin bileşimi....	50
Tablo 3.2.	Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı	51
Tablo 4.1.	pH ve sıcaklığa karşı % aktivite değişimleri	80

SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

X : Kuru mikroorganizma konsantrasyonu (g/L)

S : Substrat konsantrasyonu (g/L)

μ : Özgöl üreme hızı (sa^{-1})

KH : Karıştırma hızı (rpm)

DKF : Derin kültür fermantasyonu

KSF : Katı substrat fermantasyonu



1. GİRİŞ

Enzimler, canlı hücrelerde oluşan ve organizmadaki tüm reaksiyonların çok yumuşak koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bunları düzenleyen biyolojik katalizatörlerdir. Enzimlerle katalizlenen reaksiyonlar katalizlenmemiş karıştlarına göre 107-1016 kez daha hızlı gerçekleşirler. Enzimler son derece özgün olup birbirinin aşağı yukarı aynısı olan enantiomerleri bile ayırt edebilirler.

Enzimlerle ilgili biyoteknolojik ilerleme çok hızlı olup dünya çapında da büyük ilgi çekmektedir. Günümüzde selülozlar, hemiselülozlar ve pektinazlar başta olmak üzere enzimler; gıda, bira ve şarap, hayvan yemi, tekstil ve yıkama, ağaç ve kağıt endüstrisinde kullanılmaktadır. Bu uygulamaların bazılarında enzimlerin biri ya da ikisi tercih edilirken bazılarında ise azami yarar sağlamak için bunların karışımına ihtiyaç duyulmaktadır. Biyokimya, genetik ve protein yapılar hakkında olduğu kadar bakterilerden ve mantarlardan elde edilen selülozom içeren selülozlar ve ilgili enzimler hakkında bugün ulaşılan gelişmeler bunlar hakkında tahminlerin ortaya atılmasına ve beklentilerin oluşmasına sebep olmuştur. Bu sebeple, enzimlere olan talebi karşılamak ve bunların biyoteknolojideki ve araştırmalardaki potansiyellerini tamamen kavramak için temel ve uygulamalı alanlardaki çok disiplinli araştırmalara devam edilmesi hayati önem taşımaktadır.

Enzimler, önemli mikrobiyal metabolitler olarak düşünölmekte ve ticari ölçekte birçok gelişmiş ölkede özellikle Avrupa, ABD ve Japonya' da başarılı olarak üretilmektedir. Çalışılmış olan enzimler; lipaz, lipoprotein lipaz, proteaz, selulaz, lignin degrade eden enzimler (lignin peroksidaz manganez peroksidaz), lakkaz, mannanaz, kitinaz, fitaz, beta-glukosidaz ve pektinazdır.

Pektinaz, pektik polimerdeki glikozidik bağların hidrolizini katalizleyen enzim ailesinin genel bir adıdır. Pektik maddeler, bitki duvarlarında ve orta lamelde oluşan yapısal polisakkaritlerdir. Pektik enzimler, pektin molekülünün galakturonan omurgasına olan etkilerine göre pektinesterazlar (ester bağıını hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayrılır. Pektin; meyve, sebze gibi daha yüksek bitkilerde bulunan bir polisakkarittir. D-Galakturonik asit üniteleri ve metoksil gruplarını oluşturmak için α -1,4 bağlanmasıyla oluşan uzun zincirli bir dizidir. Pektinaz, endüstriyel pektik enzim preparatları için kullanılan genel bir isimdir. *Pseudomonas* ailesi, doğada geniş

yayılım gösteren, aerob, oksidaz testi pozitif, nonfermentatif, gram negatif bakterilerdir ve gıda sanayi, kimya endüstrisi, biyolojik ve tıbbi bilimler de çok geniş kullanım alanına sahip bir çok enzim bu mikroorganizmalar ile üretilirler. Bu çalışmada, *Pseudomonas fluorescens* ile pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz üretimi kesikli sistemde derin kültür ve katı hal fermantasyonu yöntemleri ile gerçekleştirilerek, enzim üretimine; pH, başlangıç pektin konsantrasyonu, farklı azot kaynakları ve metal iyonlarının etkileri incelenecek, enzimin optimum pH ve sıcaklığı belirlenecektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

Enzimler, protein yapısında olup hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen moleküllerdir (Kıran vd., 2006). Hücrelerde çok önemli metabolik vazifeleri olan enzimler, çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere hayatımıza girmiştir (Wiseman, 1987). Enzimler, canlı için hayati önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde görev almakla birlikte organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, oluşumlarını ciddi boyutlarda hızlandırırlar. Reaksiyona girdikleri halde işlem sonunda herhangi bir değişikliğe uğramadan ilk hallerindeki gibi reaksiyondan çıkarlar. Bu sebeple, enzimler biyokatalizörlerdir. Başka bir deyişle enzimler; enerji açısından normal şartlarda hiç oluşmayacak ya da çok yavaş oluşacak biyolojik reaksiyonlara katılarak, kendileri herhangi bir değişikliğe uğramadan, reaksiyonların süratli bir şekilde oluşmasını sağlarlar (Sağiroğlu, 1999).

Enzimlerin eldesinde genellikle bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır. Bitkisel kaynaklı enzim aktivitesinin çoğu kez mevsimlere bağlı olması, ayrıca diğer ekonomik ve çevresel faktörler bunların endüstriyel enzim üretiminde kullanılmalarını sınırlar. Oysa ki mikroorganizmaların çok hızlı büyüme ve üreme güçleri dolayısıyla aktivitelerinin çok fazla olması, fermantasyonun kısa sürmesi ve fermantasyon ortamının hazırlanmasındaki maliyet düşüklüğü nedeniyle büyük ölçekteki fermantasyon işlemlerinin ekonomik olması, endüstriyel enzim üretiminde mikrobiyal kaynakların kullanılmasını arttırmıştır.

Kimyasal katalizörlere nazaran enzimlerin üstünlükleri incelendiğinde; enzimlerin, yüksek oranda substrat spesifikliğine sahip olmaları sebebiyle istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu engelledikleri görülür. Enzimlerin katalizör görevini üstlendikleri reaksiyonlarda verim hemen hemen % 100' dür. Enzimler, stereospesifik reaksiyonları katalizleyebilirler. Ilımlı şartlarda (pH 7.0, oda sıcaklığı) çalıştıkları için düşük tepkime maliyetine sebep olurlar ve ayrıca çevresel sorunlara yol açmazlar. Eğer yeterli ve gerekli koşullar sağlanacak olursa enzimlerden birçok sahada faydalanabilme olanağı vardır. Enzimler; tıbbi, endüstriyel, bilimsel ve analitik amaçlı olmak üzere çeşitli alanda kullanılmaktadır ve fiyatları beklenen özelliklerine göre değişebilmektedir.

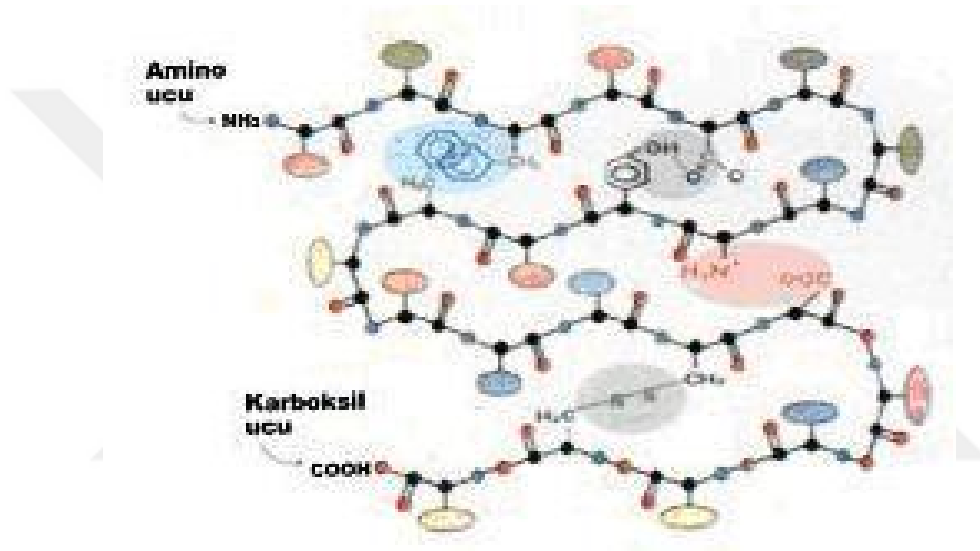
İnsanlar aslında binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden faydalanmaktadır. Ekmek ve bira yapımı, alkol fermantasyonu gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilirler. Ancak; enzimler üzerine bilimsel kabul edilebilecek araştırma ve bulgular geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. Enzimoloji konusundaki ilk çalışmalara örnek olarak; 1783 yılında Spallanzani' nin atmaca mide suyunun eti eritebildiğini bulması, 1811 yılında Kirchoff' un buğday nişastasının zamanla dekstrin ve şekerlere dönüştüğünü belirlemesi, 1830 yılında Robiquet, Boutron ve Chalan' nın amigdalinin acı badem tarafından hidrolizlendiğini keşfetmesi gösterilebilir. Enzimoloji alanındaki en önemli kilometre taşlarından biri de; Payen ve Persoz' un 1833 yılında nişastayı şekerle dönüştüren termolabil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleridir. Günümüzde amilaz olarak bilinen bu enzim o günlerde diastaz olarak adlandırılmıştır. Enzim terimi ilk kez 1878 yılında Kühne tarafından kullanılmıştır. Enzimlerin spesifikliği ve anahtar-kilit modeli gibi kavramlar ise 19. yüzyılın sonlarında Fischer tarafından ortaya konmuştur.

Son yıllarda biyoteknoloji uygulamalarındaki hızlı gelişmeler ve rekombinant DNA teknolojisinin kullanılması ile enzimlerin daha ekonomik ve etkin tekniklerle elde üretilmesi mümkündür. Enzimlerin uygulama alanlarının her geçen gün artması enzimlerin daha ekonomik, daha da etkin tekniklerle üretilmesini daha da önemli kılmıştır. Bu nedenle de büyük ölçekli enzim üretim tesislerinin kurulması ve optimizasyonu çalışmaları son 20 yıldan beri gündemdedir.

Enzimlerin ılımlı koşullarda ilgili reaksiyonları çok hızlı ve spesifik bir şekilde katalizlemeleri, çeşitli pratik uygulamalarda kullanımlarını gündeme getirmiştir. Bir enzimden herhangi bir alanda yararlanılabilmesi de daha çok ekonomik parametrelerle ilgilidir. Çünkü bilindiği üzere enzimlerin canlı materyallerden elde edilmesi gerekmektedir. Ayrıca izolasyon ve saflaştırma işlemleri de çok emek gerektiren pahalı proseslerden oluşmaktadır. Bu nedenlerden dolayı enzimler genellikle pahalı materyallerdir. Ticari konularda daha ucuz olan öncelik taşıyacağı için aynı sonucun alınabildiği kimyasal bir yöntem eğer daha ucuz ise enzimatik bir yöntemle tercih edilecektir. Ancak; kimyasal yöntemle göre çok daha olumlu sonuçlar alınabiliyorsa ya da özellikle sağlık alanında başka hiçbir yöntemin çözüm getiremediği bazı konularda ancak enzimatik bir yöntemle sonuca ulaşılabiliyorsa, enzim ne kadar pahalı olursa olsun kullanılabilir. Enzim ne kadar pahalı olursa olsun kullanılabilir.

2.1.1. Enzimin Yapısı ve Fonksiyonu

Enzimler; arka arkaya dizilmiş peptit moleküllerinin meydana getirdiği uzun zincirli yapılar olup kimyasal reaksiyonların hızını arttıran karmaşık bileşiklerdir (Şekil 2.1.). Keşfedilmiş olan enzimlerin hemen hemen tümünün yapı taşı proteinlerdir (Pyler, 1952). Bazı enzimlerin yapısında sadece proteinler yer alırken, birçok enzimin yapısında proteinlere ilaveten karbonhidrat, yağ, metal, fosfat veya diğer organik bileşenlere de rastlanılabilmektedir (Göğüş ve Fadiloğlu, 2006).



Şekil 2.1. Enzimin yapısı (Anon, 2004b).

Bazı enzimlerin aktif hale gelmelerini sağlayan metal iyonlarından oluşan yan gruplarına “kofaktör” adı verilmektedir. Kalsiyum, magnezyum, potasyum, çinko gibi mineraller kofaktör olarak bazı enzimlerin aktiviteleri için gereklidir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için ihtiyaç duyduğu kompleks organik moleküllere ise “koenzim” adı verilmektedir. Koenzimlerin yapısında genellikle vitaminler bulunmaktadır. Bazı durumlarda enzim; aktivite göstermek için hem kofaktöre hem de koenzime ihtiyaç duymaktadır. Kofaktörler genellikle ısıya dayanıklıdır. Kofaktörler ve koenzimler enzime sıkı ya da gevşek olarak bağlıdır.

Enzimler, koenzim veya kofaktör ile birlikte katalitik bakımdan tamamen aktif durumda iseler, “holoenzim” adını alırlar. Koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olursa ve enzim inaktif hale gelirse enzimin proteinden meydana gelen bu inaktif haline de “apoenzim” adı verilmektedir (holoenzim→ apoenzim+koenzim) (Gözükara, 2001). Tablo 2.1.’

de holoenzim, apoenzim ve koenzimin özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Enzimin holoenzim, apoenzim ve koenzimin özellikleri (Gözükara, 2001).

	Holoenzim	Apoenzim	Koenzim
Dializ	Enzim aktivitesini kaybeder	Diyaliz edilemez, yarı geçirgen zardan geçmez	Diyaliz edilir, yarı geçirgen zardan geçer
Isı	Enzim aktivitesi kaybolur	Isıya dayanıksız	Isıya dayanıklı
Enzim Aktivitesi	Var	Yok	Yok
Kimyasal Yapı	Konjuge protein	Protein	Protein olmayan organik bileşik
Moleküler Ağırlık	Yüksek	Yüksek	Düşük
Rölü	Enzim aktivitesi	Substrat özgüllüğü	Reaksiyon özgüllüğü

Birçok bakımdan enzimler diğer katalizörlerden farklılık göstermektedir. Protein oldukları için enzimler, uygun olmayan fizyolojik koşullara maruz kaldığında (ısı veya güçlü kimyasallar gibi) doğal özelliklerinden uzaklaşarak denatüre olup etkisiz hale gelmektedir. Bu nedenle enzimlerin iki belirgin özelliği; kendi termal eğilimleri ve asit ve bazlara karşı olan duyarlılıkları olmasına rağmen, enzimlerin en önemli farkı kendi hareket özgüllükleridir. Örneğin, asitler gibi kimyasal hidrolitik katalizörler; esterler, asetallar, glikosidler (şekerler) veya peptidleri (proteinler) içeren birçok farklı maddenin hidrolizini katalize ederken, bu birleşiklerin tiplerinin her birini ve hatta her sınıfın özgül üyelerinin hidrolize olması için özgül farklı enzimler gerekir. Bu yüzden sakkarozu hidrolize eden enzim olan sükrasin, laktozu ya da maltozu ve diğerleri üzerinde hiçbir etkisi yoktur.

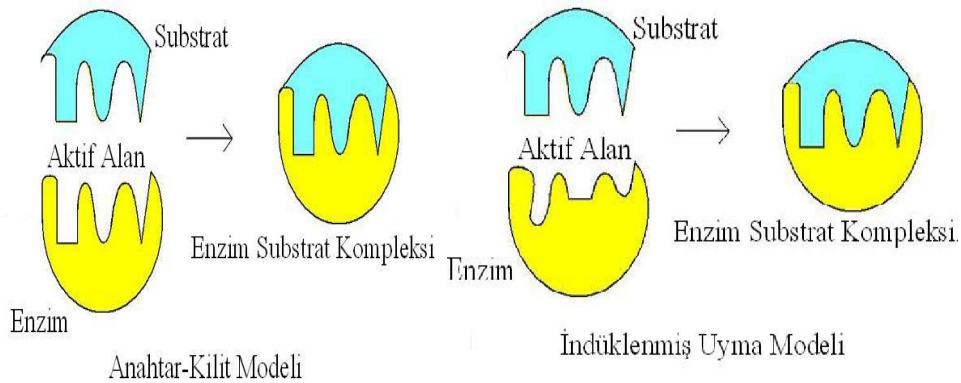
2.1.2. Enzimlerin Aktif Merkezi

Enzimlerde substrat ve koenzimin bağlanarak biyokimyasal reaksiyonların olduğu yerlere “aktif merkez” denilir. Bunlar amino asit kalıntılarından oluşmuş ve özel geometrisi olan yerlerdir. Aktif merkez, büyük enzim molekülünün sadece küçük bir kısmını kaplar. Enzim molekülünün büyük olması, aktif merkezin geometrik yapısının oluşması için gereklidir. Aktif merkezlerin gösterilişi, en az üç bağlama yeri olan girinti ve/veya çıkıntı şeklinde olabilir (Tüzün, 1997).

Sonuçta aktif bölgeye bağlanan substrat, “geçiş durumu yapısı” denen ve normalde çok

kararsız olan bir yapıya dönüşür. Daha sonra bu yapı ya ürünü oluşturacak ya da substrata geri dönecektir. İşte enzimin aktif bölgesinde oluşan bu bağlar, kararsız yapıyı kararlı kılmaya yarar ve böylece, ürünün oluşması için enzime daha fazla zaman tanınmış olur. Normalde kimyasal tepkimenin oluşması için bu geçiş durumu yapısının oluşması, bunun içinse aktivasyon enerjisinin sağlanması gerekir. Katıldıkları tepkimelerde enzimler, aktif bölgelerinin üç boyutlu özel şekilleri sayesinde, bu geçiş durumunun oluşumunu kolaylaştırır ve dolayısıyla gerekli enerjiyi azaltırlar. Böylece tepkimeyi cazip hale getirip, tepkimenin daha az enerjiyle daha çabuk gerçekleşmesini sağlarlar.

Enzimin aktif merkezde substrata bağlanması hakkında iki hipotez mevcuttur. Birinci model, 1894' te Fischer tarafından ileri sürülen anahtar-kilit modelidir. Bu modele göre enzimler hangi tepkimeyi katalizledikleri ve bu tepkimeye hangi substratın girdiğine çok büyük bir özgüllük gösterirler. Bunun nedeni ise enzim ve substratın birbirine tam uyan tamamlayıcı geometrik şekilleri olmasından kaynaklanmaktadır. 1958' de Koshland, anahtar ve kilit modelinin bir modifikasyonu olan indüklenmiş uyma modelini öne sürmüştür. Bu modele göre; aktif merkez esnek bir durum göstermekte, ancak substrat, enzim yüzeyine bağlanınca belirli bir şekil almaktadır. Bu modellerden anahtar ve kilit modeli artık yetersiz sayılmaktadır. İndüklenmiş uyum modeli halen en yaygın kabul gören enzim-substrat-koenzim şeklidir (Kalaycıoğlu vd., 2000). Şekil 2.2.' de anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyma modeli şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Anahtar-kilit modeli ve indüklenmiş uyma modeli (Kalaycıoğlu vd., 2000).

2.1.3. Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Enzimlerin çok çeşitlilik göstermesi ve birçok enzimin ard arda keşfedilmeleri, bunların sistematik olarak isimlendirilmeleri ve sınıflandırılmaları gereğini ortaya çıkarmıştır.

Enzimler; amilaz, proteaz, lipaz, hemiselülaz vb. örneklerde de görüleceği üzere genellikle etki ettikleri substratın sonuna “az” eki getirilerek isimlendirilmiştir. Bazı durumlarda ise dehidrazlar, transferazlar, dehidrogenazlar, oksidazlar fosforilazlar vb. örneklerinde de görüleceği üzere enzimin katalizlediği tepkime dikkate alınmış olup, tepkimenin adının sonuna “az” eki getirilerek isimlendirilme yapılmıştır (Pyler, 1952; Temiz, 1998). Polifenol oksidaz örneğinde olduğu gibi, bazı enzimlerin adlandırılmasında hem etki ettiği substrat hem de katalizlediği reaksiyon tipi yer almıştır. Bu arada pepsin, tripsin gibi bazı enzimlerin isimlerinde “az” ekinin olmadığı ve kendine has bir isimlendirme yapıldığı da gözden kaçmamalıdır.

1964 yılında, Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) Enzim Komitesi (EC) sistematik bir isimlendirme ve sınıflandırma yapmıştır. 1972 ve 1978 yıllarında yapılan düzenlemelerle enzimlere kod numaraları verilerek 6 ana gruba ayrılmıştır (Tablo 2.2.). Enzim kod numaraları noktalarla ayrılmış 4 rakamdan oluşmakta; ilk rakam enzimin 6 ana enzim grubundan hangisine girdiğini, ikinci rakam etki ettiği kimyasal yapıyı ve fonksiyonel grubu, üçüncü rakam akseptörü, dördüncü rakam ise belli bir sınıfta enzimin aldığı sıra numarasını göstermektedir (Kalaycıoğlu vd., 2000). Sistematik adlandırmaya örnek olarak ATP-kreatin fosfotransferaz (EC 2.7.3.2) verilebilir. Burada EC harfleri enzim komisyonunu ifade eder. Enzimin adı, ATP ile kreatin arasında fosfat transferi yapan bir enzimi belirtir. Numaralandırmada yer alan ilk sayı (2) enzim sınıfını (transferaz), ikinci sayı (7) alt sınıfı (fosfat), üçüncü sayı (3) alıcı grubun azotlu olduğunu, dördüncü sayı (2) enzime ait bir seri numarasını gösterir (Pamuk, 2000). Sistematik isimlerin çok uzun olmaları sebebiyle çoğu kez geleneksel isimler tercih edilmektedir.

Tablo 2.2. Enzimlerin sınıflandırılması (Telefoncu, 1986).

EC 1 Oksidoredüktazlar	redox reaksiyonlarını katalizlerler, örneğin; dehidrogenaz, oksidaz $(AH + B \rightarrow A + BH \text{ (redüksiyon)}, A+O \rightarrow AO \text{ (oksidasyon)})$ 1.1. CH – OH grubuna etkileyenler 1.2. C – O grubuna etkileyenler 1.3. C – CH grubuna etkileyenler 1.4. CH – NH ₂ grubuna etkileyenler 1.5. CH – NH grubuna etkileyenler
EC 2 transferazlar	fonksiyonel grupların transferinden görev alırlar örneğin; transaminaz, kinaz $AB + C \rightarrow A + BC$ 2.1. C1 gruplarını transfer edenler 2.2. karbonil gruplarını transfer edenler 2.3. açıl gruplarını transfer edenler 2.4. glukozil gruplarını transfer edenler 2.5. N- içeren grupları transfer edenler 2.6. fosfat gruplarını transfer edenler 2.7. S- içeren grupları transfer edenler
EC 3 hidrolazlar	hidroliz reaksiyonlarını katalizlerler örneğin; lipaz, amilaz, peptidaz $AB + H_2O \rightarrow AOH + BH$ 3.1. esterleri hidrolizleyenler 3.2. glukozid bağlarını hidrolizleyenler 3.3. peptid bağlarını hidrolizleyenler 3.4. diğer C – N bağlarını hidrolizleyenler 3.5. asit anhidritlerini hidrolizleyenler
EC 4 liyazlar	çift bağa katılma ve çift bağ oluşturma reaksiyonları atalizerler örneğin; dekarboksilaz $RCOCOOH \rightarrow RCOH + CO_2$ or $[x-A-B-Y] \rightarrow [A=B + X-Y]$ 4.1. C – C liyazlar 4.2. C – O liyazlar 4.3. C – N liyazlar
EC 5 izomerazlar	izomerleşme reaksiyonlarını katalizlerler örneğin; izomeraz, mutaz $AB \rightarrow BA$ 5.1. resamezlar 5.2. intramoleküler oksidoredüktazlar 5.3. intramoleküler transferazlar
EC 6 ligazlar	sentez reaksiyonlarını katalizlerler örneğin; sentetaz $X + Y + ATP \rightarrow XY + ADP + P_i$ 6.1. C – O bağını oluşturanlar 6.2. C – S bağını oluşturanlar 6.3. C – N bağını oluşturanlar 6.4. C – C bağını oluşturanlar

2.1.4. Enzim Kaynakları

Enzimler; bitki, hayvan ve mikroorganizmalar gibi farklı kaynaklardan elde edilmektedir. Ancak endüstriyel uygulamalarda daha çok mikrobiyal enzimler tercih edilmektedir (Sağıroğlu, 1999). Hayvansal kaynaklardan enzim üretimi; pahalı olmakla birlikte arz ve

talep gibi pazar faktörlerinden de etkilenmektedir. Buna karşılık birçok bitkisel kaynaklı enzim nispeten daha kolay elde edilebilir. Fakat bitkisel kaynakların da endüstriyel ham madde olarak kullanılmaları gıda ihtiyaçlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler ise büyük çapta üretimi mümkün kılacak şekilde üretilbilirler. Ayrıca, mikroorganizmaların üreme süreleri kolaylıkla enzimlerin pazar ihtiyaçlarına uyarlanabilir (Telefoncu, 1986). Günümüzde doğal kaynakların azalması sebebiyle mikroorganizmalar birçok üretim alanı için potansiyel olarak görünmekte ve bu konuda yoğun çalışmalar da yapılmaktadır (Topal vd., 2000).

Enzimler, ticari olarak mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilirler. Üretim için patates nişastası, soya fasulyesi, tuz, mısırozü ve şeker gibi doğal ürünler kullanılır. Örneğin, pankreatik enzimler, pankreas, pıhtılaşmış kan, karaciğer gibi kesim evi atıklarından hazırlanırken, malt enzimleri ise filizlenmiş arpalardan ayrıştırılır. Bu maddeler, istenilen enzimi oluşturmak üzere patojenik olmayan belli mikroorganizmalar ile işleme sokulurlar (Shukla, N ve Shukla, P.K., 2009).

Endüstriyel öneme sahip mikrobiyal enzimler dünyada Genencor International, Amano Pharmaceuticals, Biocatalysts, Novo Nordisk vs (Gupta vd., 2004) gibi çeşitli firmalar tarafından üretilmektedir. Endüstriyel olarak üretilen enzimlerin % 75' i gıda ve deterjan endüstrilerinde kullanılmaktadırlar. Proteaz, amilaz, lipaz, selülaz, pektinaz gibi hidrolazlar en yaygın kullanılan enzim gruplarındandır. Bu alanda her gün yeni potansiyel kaynaklar aranmakta ve gündeme gelmektedir (Topal vd., 2000).

2.1.4.1. Hayvansal Enzimler

Bu enzimler hayvanların atılan veya az değerli olan organlarından elde edilir. Örneğin pankreas çok zengin bir enzim kaynağıdır. Buradaki proteinin % 23' ü tripsinojen, % 10-14' ü ise kimotripsinojenden ibarettir. Hazmı kolaylaştıran ve pankreatin olarak isimlendirilen amilaz, proteaz ve lipaz gibi enzimleri içerir.

2.1.4.2. Bitkisel Enzimler

Bitkiler de birçok enzime kaynak olmuştur. Tropik bölgelerde uzun zamandan beri kullanılan eti yumuşatma etkisine sahip ve çok yüksek proteolitik aktiviteye sahip olan

papaya bitkisi proteaz ailesinden papain enzimi üretimi için yetiştirilmektedir.

2.1.4.3. Mikrobiyal Enzimler

Mikrobiyal enzimler; sınırsız ve ucuz bir kaynak olması, elde edilen katalitik aktivite çeşitliliği, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, yüksek verim, genetik değişikliğin kolaylığı, mevsimsel değişimlerin olmaması, düzenli kullanım ve pahalı olmayan ortamlarda mikroorganizmaların hızlı büyümesi, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları gibi sebeplerle bitki veya hayvanlardan elde edilen enzimlere göre kullanımı daha fazla tercih edilmektedir. Mikrobiyal enzimler, karşılık gelen bitki ve hayvan enzimlerinden daha kararlı olup, üretimi daha elverişli ve emniyetlidir. Bununla birlikte dünyadaki mikroorganizmaların sadece % 2' si enzim kaynağı olarak test edilmiştir. Bakteriyel türler, mayalarla karşılaştırıldığında daha yüksek aktiviteler sağladığından enzim üretiminde daha fazla tercih edilirler ve doğal ve alkali pH' ya sahiptirler ve genellikle termostabil enzim üretirler (Hasan vd., 2006; Miller ve Litsky, 1976; Wiseman, 1987).

2.1.5. Enzimlerin Aktivitesi

Enzimin reaktif bölgelerinde kimyasal bir tepkimenin katalizlenerek, bir molekülün bir diğerine çevrilmesi işlemine enzimatik tepkime denilmektedir. Enzimlerin doğal karmaşık yapıları dikkate alındığında katalitik aktivitelerini etkileyen birçok parametrenin olduğu söylenebilir. Enzimatik aktiviteyi etkileyen parametreler aşağıda sıralanmıştır (Pyler, 1952; Göğüş ve Fadiloğlu, 2006):

- pH
- Sıcaklık
- Enzim derişimi
- Substrat derişimi
- İnhibitör varlığı

2.1.5.1. pH' ın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Enzimler protein yapısında olduklarından pH değişimlerinden etkilenmektedirler. Her enzimin en üst düzeyde aktif olabildiği bir pH aralığı vardır. pH değişimi;

- Enzimin substrata bağlanmasına,
- Enzimin katalitik aktivitesine,
- Substratın iyonizasyonuna ve
- Protein yapısının değişmesine etkili olmaktadır.

Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH' a optimum pH denir. Bu değerden yüksek ya da düşük pH' larda enzimlerin etken grupları değişime uğrayarak veya kendileri belirli ölçülerde bozularak etkisiz hale geçerler. Aktif merkezlerinde asidik veya bazik gruplar taşıyan enzimler ve hidralazlar, H^+ iyonu derişimindeki değişme karşı duyarlıdır ve enzimin aktivite gösterdiği pH aralığı oldukça dardır. Kullanılan tampon çözelti de optimum pH' da kaymalara sebep olabilir. İzole edilip saflaştırılmış bir enzimin laboratuvar koşullarında ölçülen optimum pH değerinin canlı hücredeki doğal ortamında optimum etki gösterdiği pH değeri ile çakışması beklenmemelidir. Optimum pH bazı durumlarda substrata bağımlılık gösterir. Örneğin; pektinaz enzimi pektik aside karşı pH 5.0' de trigalakturonik aside karşı ise pH 3.5' ta optimum aktivite göstermektedir. Özellikle bitkisel proteazların optimum pH değerleri substrata çok bağımlıdır (Telefoncu, 1986).

2.1.5.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Sıcaklık, enzimlerin hem kararlılığını hem de hızını etkileyen önemli bir etkidir. Enzimler, sıcaklıktan iki şekilde etkilenmektedir. Birinci etki aktivitelerini kaybetmeleridir. Yüksek sıcaklıklar, enzim proteininin doğal yapısının bozulmasına sebep olmakta, bu da katalitik özelliklerin azalmasına yol açmaktadır. Birçok enzim için ısısal aktivite kaybı 50 °C' nin üstündeki sıcaklıklarda hızlıyken, bazı enzimler ise yüksek sıcaklıklara daha dayanıklıdır. Enzimatik reaksiyonlarda sıcaklığın ikinci etkisi, enzimlerin hızları üzerinedir. Çoğu kimyasal reaksiyonda olduğu gibi ısıyı yükseltmek enzimatik tepkimelerin hızını artırır. Genellikle sıcaklığın her 10 °C artışında çoğu kimyasal tepkimenin hızı yaklaşık iki kat artar. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığa da optimum sıcaklık denir. En-

zim aktivitesi belirli bir optimum sıcaklığa kadar artmaktadır. Sıcaklık daha fazla yükseltildiğinde enzimler, yapısal değişmeye ve bozunmaya başlamakta ve bunun sonucunda aktiviteleri azalmaktadır (Miller ve Litsky, 1976).

2.1.5.3. Enzim Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Enzim tarafından katalize olunan bir reaksiyonun başlangıç hızı enzim konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Bunun nedeni de her enzim molekülünün diğerlerinden bağımsız olarak olarak çalışmasıdır. Bu nedenle de ne kadar fazla enzim molekülü varsa ve çalışıyorsa, tepkime o kadar hızlı olacaktır (Erşan, 2011).

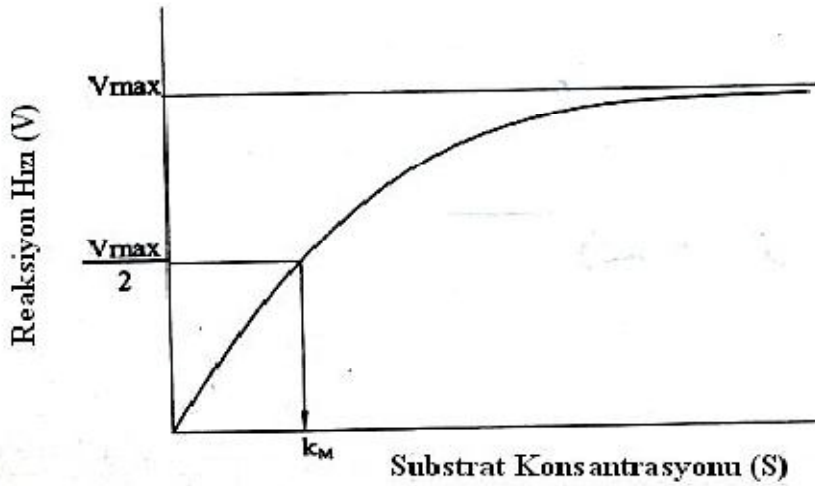
2.1.5.4. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Enzimler, bir ortamda bulunan ve yapıları birbirine çok benzeyen çeşitli substratlardan yalnız biriyle reaksiyon verir. Her enzim belli bir substrat için spesifiktir. Substrat açısından enzim spesifikliğin protein kısmı tarafından gerçekleştirildiği kabul edilmektedir (Goodenough, 1992).

Michaelis-Menten kinetiğine göre enzim-substrat ilişkisi iki temel reaksiyondan meydana gelmektedir. İlk olarak, substrat enzimle kompleks bir yapı oluşturmakta, ikinci aşamada ise kompleks yapıdan ürün açığa çıkıp enzim reaksiyondan ayrılmaktadır.



Enzimatik tepkimenin hızı belirli bir substrat derişimine kadar artmakta ve bu derişimden sonra sabit kalmaktadır. Bunun nedeni; ortamda bulunan bütün enzimlerin aktif merkezlerine substrat moleküllerinin bağlanarak enzim moleküllerinin substrat molekülleri ile doymuş hale gelmesi şeklinde açıklanabilir. Bu yüzden substrat derişiminin daha fazla artırılması tepkime hızını etkilemeyecektir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Tepkime hızına substrat derişiminin etkisi (Göğüş ve Fadiloğlu, 2006).

2.1.5.5. Aktivatör ve İnhibitör Varlığının Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Bazı enzimler aktiviteleri arttırmak için aktivatör adını alan iyonlar veya küçük moleküllere ihtiyaç duymaktadırlar. Aktivatörler genellikle metal iyonlarıdır. Aktivatörlerin bir kısmı yalnızca substratla, diğer kısmı ise enzimle birleşerek aktivatör görevi görmektedir.

Enzim inhibisyonuna neden olan maddeler enzimatik katalizleri azaltan veya engelleyen maddelerdir. Pratik uygulamalarda engelleyicilerin varlığı çoğunlukla istenmeyen bir durumdur. Bazen enzimatik reaksiyonları durdurmada, kontrol etmede veya yavaşlatmada faydalıdırlar. Bu maddeler, istenmeyen enzim aktivitesinin önlenmesi veya kontrol altına alınması amacıyla kullanılmaktadırlar. Özgül olan ve özgül olmayan, tersinir ve tersinmez enzim inhibitörlerinin birçok örneği vardır. Örneğin bazı ağır metal iyonları enzimin yapısının bozulmasına ya da denatürasyon sonucu tersine dönüşemez bir inhibisyona neden olmaktadır (Miller ve Litsky, 1976).

2.1.5.6. Zamanın Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Enzimatik tepkimelerin başlangıç hızları genellikle çok hızlıdır ve reaksiyon ilerledikçe hızları azalır. Reaksiyon hızının azalmasının en önemli nedenleri, substratın tükenmesi ve oluşan son ürünlerle reaksiyonun engellenmesidir. Birçok enzim kullanımları için, reaksiyonun tamamlanması gerekli olmayabilir hatta istenmeyebilir. Örneğin α -amilaz ile

yoğun nişasta macununun sıvılaşması ve yapışkanlığının azalması için birkaç dakika yeterlidir. Bununla birlikte reaksiyonun tamamlanmasının istendiği durumlarda enzim reaksiyonlarının tamamlanması için birkaç saat hatta günler gerekebilir (Miller ve Litsky, 1976).

2.1.6. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik tepkime hızının, enzim etkisiyle optimum koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Genel olarak enzim aktivitesi denince, enzim katalizli reaksiyonun hızı ve aktivitesi anlaşılmaktadır. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür. En çok kullanılan enzim aktivitesi birimi, IU' dir. 1 IU enzim aktivitesi; optimal koşullarda, 1 dakikada 1 μ mol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki bu da 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılıktır.

Uluslararası Birim (U): Standart koşullar altında (doymuş substrat konsantrasyonu, optimum pH, inhibitörsüz fakat aktivatör içeren ortam) dakikada 1 μ mol substratı dönüşüme uğratan enzim aktivitesidir.

Spesifik aktivite: 1 mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substratın μ mol olarak miktarıdır.

Aktif Merkez Aktivitesi: Bir aktif merkez tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substrat moleküllerinin sayısıdır.

Moleküler Aktivite (Turnover Sayısı): Bir enzim molekülü tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substrat moleküllerinin sayısıdır.

Katal (SI birimleri kullanılarak oluşturulan birim): Saniyede bir mol substratı dönüşüme uğratan enzim aktivitesidir. Katal çok büyük bir birimdir ($1\text{ kat} = 6.109\text{U}$). Bu nedenle pratikte, mikrokatal (μkat) veya nanokatal (nkat) birimleri kullanılır (Telefoncu, 1986).

2.1.7. Enzimlerin Seçiciliği

Biyolojik ve biyolojik olmayan katalizörler arasında tek bir temel fark vardır. Kimyasal katalizörler belirli bir reaksiyonun hızını arttırmaktadırlar. Buna örnek olarak; sukrozun veya proteinlerin asitler ile hidrolizi verilebilir. Ancak enzimler belirli reaksiyonları ya da tek bir reaksiyonu katalizleme yeteneğine sahiptirler. Her ne kadar enzimler belirli reaksiyonları katalizleme özelliğinde olsalar da aynı durum etki ettikleri substratlar için geçerli değildir. Enzimlerin kullanabileceği birçok substrat mevcuttur ve aynı substrat üzerinde birçok enzimin etkisi olsa da genelde en fazla etkiledikleri tek bir substrat bulunmaktadır.

2.1.8. Enzimatik Aktivitenin Kontrolü

Bir enzimin aktivitesi yalnız fiziksel etkenlerden değil aynı zamanda kimyasal etkenlerden de etkilenmektedir. Bu etki olumlu (aktivasyon) veya olumsuz (inhibisyon) yönde gelişebilir. Uyumlu bir metabolizma için metabolik reaksiyon dizisinin her reaksiyonunun kontrol altında tutulması zorunludur. Evrimleşme sürecinde dışarıdan bilerek (ilaçlar) ve istemeyerek (zehirler) alınan maddelerin metabolizmayı etkiledikleri de bir gerçektir. Bazı enzimlerin katalitik aktivitesi allosterik efektörlerin tersinir biçimde bağlanmasına dayanır (modulatörler, regülatörler). Bu efektörler enzimin aktif merkezine değil enzim üzerindeki allosterik merkeze bağlanırlar ve proteinin üç boyutlu yapısını değiştirerek aktiviteyi etkilerler (allosterik aktivatörler, allosterik inhibitörler). Enzimatik reaksiyon dizisinin düzenlenmesinde hücre bu prensipten yararlanmaktadır. Örneğin; bir reaksiyon dizisinin son ürünü dizinin ilk reaksiyonunu katalizleyen enzim için belirli bir konsantrasyondan sonra inhibitör etkisi göstermektedir ki buna geri besleme inhibisyonu (feed-back inhibition) adı verilir. Enzim aktivitesinin kontrolü için diğer bir olanak hücredeki enzim miktarının düzenlenmesidir. Bu, indüksiyon ve represyon yardımıyla enzim biyosentezinin kontrolü ile veya proteolitik enzimlerin etkisi ile sağlanır (enzim aktivitesinin biyojen regülasyonu). Birçok enzim hücre tarafından zimogen halde salgılanmakta ve bir proteazın etkisiyle aktif forma dönüşmektedir. Enzimlerin termal kararlılığı düşük olduğundan aktivitelerini uzun süre korumaları mümkün değildir. Bu nedenle sürekli sentezlenmeleri gerekir. Enzimatik aktivitenin kontrol altında tutulmasının bir yolu da biyosentezin kontrolüdür (Telefoncu, 1986).

2.2. Mikrobiyal Enzim Üretimi

2.2.1. Enzim Üretimine Uygun Türlerin Seçimi

Ticari olarak kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kaynaklardan üretilir. Bunların bazıları Tablo 2.3' te gösterilmiştir. Tablo 2.3' te de görüleceği gibi burada iki grup vardır; bakteriler ve mantarlar (Rehm vd., 1987).

Tablo 2.3. Ticari olarak önemli olan bazı enzimlerin organizmaları (Rehm vd., 1987).

Bakteriyel enzimler		Mantar enzimleri	
Enzim	Kaynağı	Enzim	Kaynağı
α -amilaz	<i>Bacillus sp.</i>	α -amilaz	<i>Aspergillus oryzae</i>
β -amilaz	<i>Bacillus cereus.</i>	Amiloglikoksidaz	<i>Aspergillus niger</i>
Dekstransukraz	<i>Leuconostoc mesenteroids</i>	Katalaz	<i>Aspergillus niger</i>
β -1,3-gluconaz	<i>Bacillus subtilis.</i>	Selülaz	<i>Trichoderma reesei,</i> <i>Penicillium funiculosum</i>
Glikoz izomeraz	<i>Arthobacter globiformis,</i> <i>Bacillus coagulans,</i> <i>Actinoplanes missouriensis</i>	Dekstranaz	<i>Penicillium spp.</i>
		Glikoz oksidaz	<i>Aspergillus niger</i>
		İnvertaz	<i>Saccharomyces spp.</i>
		Laktaz	<i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Aspergillus niger</i>
Penisilin asilaz	<i>Bacillus megaterium</i>	Lipaz	<i>Candida lipolytica,</i> <i>Rhizopus delemar</i>
Proteinaz	<i>Escherichia coli,</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Mikrobiyal renin	<i>Mucor meiehei</i>
		Pektinaz	<i>Aspergillus niger</i>
		Proteinaz	<i>Aspergillus oryzae</i>
Pullulanaz	<i>Klebsiella aerogenes.</i>	Rafinaz	<i>Mortierella vinacea</i>

Mikrobiyal enzimlerin endüstriyel üretimlerinde, uygun suşun seçimi en önemli basamak olup, büyük bir özen göstererek belli bir sistem dahilinde yapılmalıdır. Potansiyel enzim üreticileri çok sayıda faktörü göz önüne alarak düşünülmelidir. Bunlar;

1. Enzim hücre içi mi, hücre dışı mı olmaktadır. Enzimlerin çoğu ya hücre içi ya da hücre dışıdır, her iki yerde olan enzim sayısı çok azdır. Mikroorganizmanın seçiminde; üretilen enzim kararlılığı, yüksek verimle kaliteli ürün vermesi, yan ürünlerinin az olması, ortam kompleksliği ve hücrenin parçalanma kolaylığı gibi faktörler göz önüne

alınır.

2. Üretici organizmanın emniyet yönü hayati önem taşır. Burada ilgilenilen iki konu vardır. Birincisi, ürünlerin üretici organizmaya olan potansiyel zararları ki bunlar metabolizma ürünleriyle kısa veya uzun süreli temas sonucunda olabilir. İkincisi ise, enzim hazırlanan türlerin patojenik olma veya toksik ürünleri üretme tehlikesidir. Yiyecek sektöründe çalışılan enzimlerde bu son düşüncenin daha önem taşıdığı görülmektedir. İnsan yiyeceklerinde sıklıkla geleneksel olarak maya ve mantar gibi organizmalar kullanılır. Ticari olarak çoğu enzimler genel olarak zararsız mikroorganizma olarak bilinen *Bacillus* ve *Aspergillus* suşlarından üretilir.

3. Pahalı promotorlara ihtiyaç duymayan basit ve ucuz ortamlarda gelişebilen mikroorganizmalar tercih nedenidir. Genetik özellikleri kararlı olmalı, istenen enzimi yüksek verimle üretmeli, fermantasyon sonunda ortamdan kolayca ayrılabilmesi ve (intraselüler enzimler için) kolayca parçalanabilmelidir (Rehm vd., 1987).

Çoğunlukla enzimler kararlılıklarına ve aktivitelerine göre tercih edilir ve bunu belirlemek özel tarama metotlarını gerektirir. Tarama için kültürler, kültür koleksiyonlarından ve doğal kaynaklardan özellikle istenilen enzimin hareket edebildiği substratça zengin kaynaklardan yeni izole edilerek elde edilmektedir (Reed, 1981).

Genellikle hücre dışı enzim üreticiler, geri kazanım ve saflaştırma işlemleri daha basit olduğu için hücre içi enzim üreticilere tercih edilmektedir. Hücre içi enzimler binlerce farklı hücre proteininden ve diğer bileşiklerden saflaştırılmak zorundadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde enzim üretimi, bir enzimin üretiminde kullanılacak mikroorganizmanın emniyetli olup olmadığını gösteren GRAS (generally recognised as safe) statüye sahip olmalıdır. Bu özellik, özellikle organizma tarafından üretilen enzim, gıda proseslerinde kullanıldığı zaman önemlidir.

Lipaz üreten mikroorganizmalar; endüstriyel atıklar, bitkisel yağ işleyen fabrikalar, süt mamülleri, petrolle kirlenmiş toprak, yağ tohumları, çürüyen gıdalar, gübre yığınları, kömür parçaları ve sıcak kaplıcalar gibi farklı habitatlarda bulunmuştur (Sharma vd., 2001).

2.2.2. Enzim Üretimi için Optimum Şartların Düzenlenmesi

Yaklaşık olarak 50 yıl aşkın bir süredir geleneksel fermantasyon proseslerinin çoğu derin kültürde yapılmaktadır. Proses kontrolündeki ilerlemeler, elle müdahalenin ve enfeksiyon riskinin azalması derin fermantasyon tekniklerinin kullanımı ile başarılmıştır. Prosesi etkileyen çeşitli faktörler aşağıda verilmiştir:

a) Aşının Hazırlanması: Spesifik enzimlerin üretiminde mutant türler kullanılabildiğinden fermantasyon tankında aşı kültürünün üretilmesi sırasında kararlılığı birincil öneme sahiptir. En iyi metot, yeterince aşığı temin edecek tek bir üretme tankına tohumları aşılama olacaktır. Aşı tankındaki ortam gerçek fermantasyon ortamına benzer.

b) Üretim ortamının formülasyonu ve hazırlanması (Kulkarni ve Deshpande, 2007).

Fermantasyon ortamının mikroorganizmanın fonksiyonlarını desteklemesi istendiği için ortamın ihtiyaçları da mikroorganizmalara göre belirlenir. Bu nedenle ortam ihtiyaçları:

- Karbon kaynağı,
- Azot kaynağı,
- Enerji kaynağı,
- Mineraller,
- Vitaminler gibi diğer nütrientler,
- Aerobik prosesler için oksijen/hava,
- Ve su' dur (Rao, 2010).

2.2.2.1. Karbon Kaynağı

Karbon kaynağı olarak genellikle karbonhidratlar kullanılır. Genel olarak ortama katılan karbon kaynakları mikroorganizmalar tarafından hücre yapısını oluşturmak ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Sentetik ortamlar teknik olarak tercih edilebilmesine rağmen çoğu durumda bu ortamlardaki büyüme hızı ve verim, kompleks ortamlara göre daha düşük olabilmektedir. Ayrıca son zamanlarda çok yaygın, ucuz ve bol olduklarından hidrokarbonların kullanımı önem kazanmaktadır. Literatürde; şeker pancarı, şeker kamışı melasları, mısır şurubu, mısır veya mısır nişastası, hububat (buğday, arpa) gibi doğal kompleks ortamlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Pekin, 1980).

Biyokütlenin kuru ağırlığının % 50' si karbondur. Karbon kaynakları enerji kaynağı olarak da kullanılırlar. Bu sebeple karbonun çoğu enerji oluşturan metabolizma yollarına girer ve sonunda CO₂' e dönüştürülür. Birçok mikroorganizma enerji ve karbon ihtiyaçlarının temini için tek organik kaynağı kullanabilir. Bazı mikroorganizmalar ise ilave birçok organik bileşiğe ihtiyaç duyar. Bu ilave organik maddeler büyüme faktörleri olarak adlandırılır ve mikroorganizmanın sentezleyemediği organik hücre bileşenlerinin öncülleri olarak işlev görürler.

Bazı karbon ve enerji kaynaklarının fazlası inhibitör ya da katabolik geriletici etkisi göstererek ürün oluşumunu yavaşlatabilir. Bu tür etkilerin, karbon kaynaklarının uygun olarak seçilmesinde göz önüne alınması ve besi ortamına konulacak karbon kaynağının en iyi biçimde kullanılma koşullarının saptanması gerekir (Pekin, 1980).

2.2.2.2. Azot Kaynağı

Azot, basit inorganik kaynaklardan (amonyak, nitrat, amonyum tuzları gibi) kompleks karışımlara (maya ekstraktı, pepton, pamuk çekirdeği unu gibi) kadar geniş bir alandan sağlanabilir. Saf azot kaynaklarının kullanımı oldukça pahalıdır. Soya, kazein, mısır altı şurubu, balık unu, maya unu, maya suyu, peynir altı suyu gibi kompleks azot kaynaklarının kullanımı ise oldukça ekonomiktir. Hem karbon hem de azot kaynaklarının fazlası üretimi olumsuz yönde etkileyebilir. Bu kaynakların fazlası bazen metabolik yolu değiştirerek başka ürünlerin oluşumunu artırabilir. Bu tür durumlarda, enzim üretimini azaltan kaynaklardan kaçınılmalı ve ürün oluşum hızını etkilemeyen veya artıran kaynaklar tercih edilmelidir. Fosfor, sülfür ve esansiyel katyonlar genellikle inorganik tuzlardan sağlanır. İz elementler bazen özellikle ortama eklenir; fakat sıklıkla su ve diğer ortam bileşenlerindeki safsızlık olarak bulunur. Bazı durumlarda mikroorganizmaların büyümeleri için ortamda vitamin (tiamin, biyotin) gibi büyüme faktörüne de ihtiyaç vardır (Rehm vd., 1987; Pekin, 1980).

2.2.2.3. Enerji Kaynağı

Enerji, ortam bileşenlerinin oksidasyonunda ya da ışıktaki meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar için gereklidir. Fotosentetik bakteri ve algler, ışık enerjisinden faydalanırlar

fakat mikroorganizmaların çoğu karbon kaynaklarından enerji sağlayan kemoorganotrofturlar. Kardenhidratlar, yağlar ve proteinler enerji elde edilen genel kaynaklardır.

2.2.2.4. Eser Elementlerin Kaynağı

Demir (Fe^{+2} ve Fe^{+3}), Çinko (Zn^{+2}), Mangan (Mn^{+2}), Molibden (Mo^{+2}), Kobalt (Co^{+2}), Bakır (Cu^{+2}) ve Kalsiyum (Ca^{+2}) gerekli olan iz elementlerdir. İhtiyaçlar çok düşük seviyededir ve bazen suda bulunan miktardan dahi temin edilebilir. İz elementler hem birincil hem de ikincil metabolit üretimine iştirak edebilir. Mangan, enzim üretimini etkileyebilir. Demir ve çinkonun antibiyotik üretimini etkilediği bulunmuştur. Birincil metabolit üretimi genelde iz element konsantrasyonuna çok duyarlı değildir, ancak ikincil metabolit üretiminde bu farklıdır. Mineraller, üreme sırasında hücrelere gerekli elementleri temin eder. Fosfor inorganik halde kullanılır. Fosfor atomunun değeriği değişmez ve bir fosfat grubunun kısmı olarak kalır. Hücre öldüğünde hidrolizle inorganik fosfor olarak tekrar serbest kalır. Bu elementlerin birçoğu enzimlerle örneğin; Mg^{+2} fosfojidalaz ve fosfotransferaz ile, K^{+} pürivar fosfokinaz ile kompleksleşmiş olarak bulunur (Kampen, 1997).

2.2.2.5. Su Kaynağı

Hücrelerin % 80' i ya da daha fazlası sudur ve kantitatif ifade ile bu gerekli bir maddedir. Su hücre içinde bir çözücüdür. Birçok fermantasyonda, mikroorganizmalar hücre içinden daha yüksek su konsantrasyonlarındaki çevrelerde bulunur. Hücre duvarları suyu serbestçe geçirir. Su, iç ve dış su konsantrasyonu dengelenene kadar hücreye dolar. Oksijen, sudan temin edilir. Bazı organizmalar, aerobik solunum sırasında moleküler oksijene ihtiyaç duymaktadır. Bunlar, zorunlu aerobiklerdir. Zorunlu anaerobikler için moleküler oksijen toksik maddedir. Bazı organizmalar, fakültatif anaerobiktir ve O_2 ya da O_2 ' siz ortamlarda büyüyebilir.

2.2.2.6. Diğer Besin Maddelerinin Kaynağı

Fermantasyon ortamında gerekli olabilecek diğer besin maddeleri genellikle bazı vitaminlerdir. Ancak; mikroorganizmalar bazı karbon ve azot kaynaklarından da vitamin ihtiyaçlarını karşılayabilirler.

2.3. Fermantasyon

Fermantasyon, organik maddelerin enzim katalizli dönüşümlerini gerçekleştirmek için mikroorganizmalar kullanılarak belirli ürünlerin oluşturulma prosesi olarak tanımlanır. Molekül ağırlıkları büyük organik maddelerin, havalı ya da havasız şartlarda, molekül ağırlığı daha küçük organik maddelere mikroorganizmalar tarafından parçalanmasıdır (Pekin, 1980).

Fermantasyon prosesi için genel eşitlik şu şekilde ifade edilebilir:

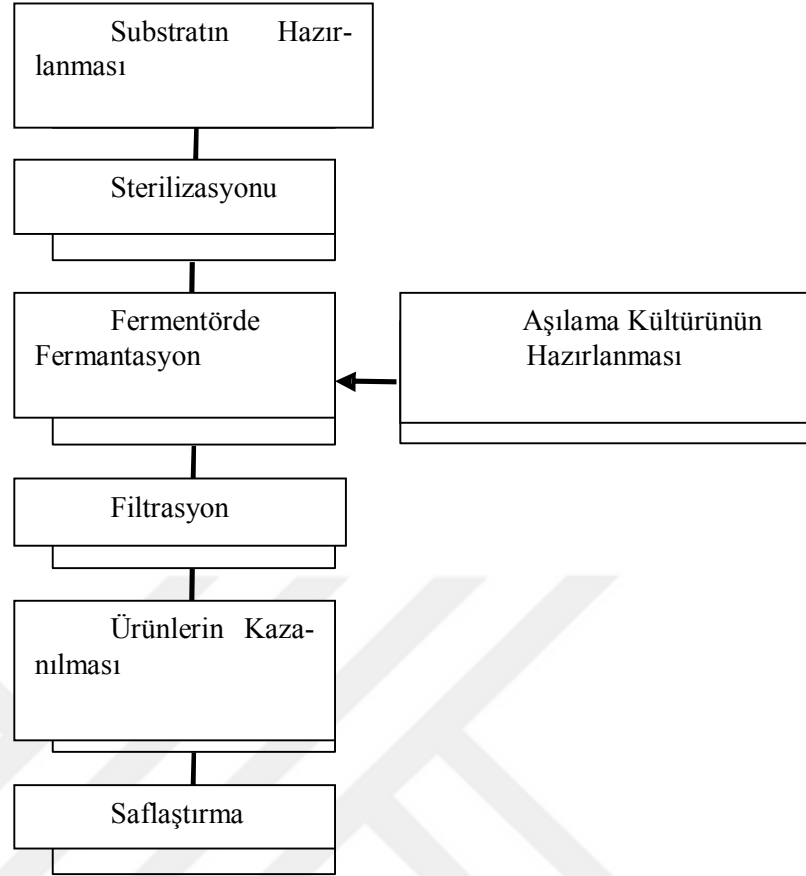
Mikroorganizma + Substrat $\longrightarrow$ Daha Fazla Mikroorganizma + Fermantasyon Ürünleri

Tipik bir fermantasyon prosesinde kullanılan substratlar Tablo 2.4.' te verilmiştir. Burada açığa çıkan enerji miktarı tam oksidasyonun 1/3' ü kadardır. Enerjinin geri kalan kısmı, son ve ara ürünlerin bünyesinde tutulmaktadır.

Tablo 2.4. Fermantasyon için gerekli hammaddeler

C- içeren saf substratlar	Karbonhidratlar, Hidrokarbonlar, Alkoller, CO ₂
Kompleks Substratlar	Melas, Selüloz içeren atık sular, Ksiloz çözeltisi (odunun şekerleştirilmesinden), Hayvan yemi (pancar küspesi gibi), Mandıra atıkları, Maya ekstraktı, Soya unu, Protein hidrozilatı
N- Kaynaklar	NH ₃ , Nitrat, Üre, Amino Asitler, Soya
Elementler	Fosfat, Sülfat, Klorür, K, Na, Mg, Ca, Fe, Ca, Zn

Fermantasyon için uygulanan teknik işlemler Şekil 2.4.' te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Fermentasyon akış şeması

2.3.1. Fermentasyonla Enzim Üretim Yöntemleri

Endüstriyel enzim üretiminde kullanılan mikroorganizmalar bakteri, maya, mantar ve küf olabilir. Seçilen bir tek organizma 1000’ den fazla farklı enzim çeşidine sahiptir. Enzim üretimi kısaca şu şekilde özetlenebilir; laboratuvar ölçekli çalışmalarda istenen enzimi üreten mikroorganizma bulunduktan sonra bu organizmanın genetiği enzimi daha fazla üretecek şekilde değiştirilir. Daha sonra mikroorganizma endüstriyel büyüklükteki fermentörlerde büyütülerek istenen enzim üretilir. Fermentasyon sonucu oluşan atıklar ise gübre olarak kullanılmaktadır (Sağiroğlu, 1999; Tatar, 1997). Buna göre mikrobiyal fermentasyonla enzimlerin üretimi iki temel şekilde gerçekleştirilir. Bunlar, katı hal fermentasyonu (yüzey kültür yöntemi) ve derin kültür yöntemidir.

2.3.1.1. Derin Kültür Fermantasyonu (Daldırmalı Fermantasyon Yöntemi)

Derin kültür fermantasyonda (DKF); mikroorganizmalar ve substrat, büyük miktarlarda ve çözücü şeklinde mevcut olan sıvı ortamda batık haldedir. Bu yöntem, katı substrat fermantasyonuna göre birçok avantaj sağlar. Bileşenler sıvı ortamda batık halde olduğundan ısı ve kütle aktarımları, prosesin modellenmesi, kontrolü ve ölçek büyütme daha kolaydır (Rao, 2010). Karbon ve azot kaynakları, vitaminler ve mineralleri içeren kültür ortamı bileşenleri, pahalı olmayan maddelerden seçilir (Sabu vd., 2005). Yüksek su içeriğinden dolayı bakteriler için idealdir (URL- 1, 2011).

Endüstride kullanılan birçok fermentör, derin kültür tipindedir. Çünkü derin kültür fermentrlerinin kontrol ve dizayn tekniği daha kolaydır (Okafor, 2007). Derin kültür fermantasyonları için kullanılan fermentrlerin önemli tipleri; karıştırımalı tank fermentr, kabarcık kolonları, hava köprülü (airlift) fermentrler, akışkan yataklı fermentrler ve damlatmalı filtrelerdir (Chisti, 2010). Endüstriyel fermantasyonlar; kesikli, yarı kesikli ve sürekli olarak işletilmektedir. Kesikli ve yarı kesikli işlemler daha yaygın olarak kullanılmakta iken sürekli fermantasyonlar nispeten daha az olarak kullanılmaktadır. Aktif amur metoduyla atıksu arıtımı genelde sürekli fermantasyonla yürütülmektedir (Chisti, 2010).

Kesikli fermantasyonda, besiyeri başlangıçta fermentöre konularak sterilize edilir. Daha sonra mikroorganizma ile aşılanarak karıştırılır ve gerekli dönüşüm sağlanıncaya kadar belirli bir süre beklenir. Bir kesikli fermantasyon için gerekli zaman, sağlanacak çalışma koşullarına göre bira saatten bira haftaya kadar değişebilir. Bu süre boyunca mikrobiyal kirlenmeden sakınılmalı ve kaptaki bileşenler karıştırılıp, sıcaklık kontrolü sağlanmalıdır.

Yarı kesikli fermantasyonda, fermantasyon maksimuma ulaştığı zaman fermentrdeki maddenin tamamı boşaltılmaz. Bir kısmı aşılama kültürü olarak fermentörde bırakılır ve bunun üzeri yeni substrat ile doldurulur.

Sürekli fermantasyonda, fermentöre ilave edilen yeni substrat miktarı kadar fermentrden fermante olmuş besin ve üretilen ürün alınır. Bu sistemde yeni substrat mikroorganizmanın eksponansiyel geşişme fazının sona erdiği anda fermentöre verilir ve aynı miktar ürün alınır. Böylece mikroorganizma sürekli maksimum ürün üretebileceği yerde tutulmuş olur. Mevcut sistemlerin çeşitliliğine rağmen pratikte ticari enzim fermentrleri ağırlıklı olarak sürekli karıştırımalı tank fermentrlerinde gerçekleştirilir. Bu

yöntemde uygun büyüklükteki (10-15 L) karıştırılmalı bir tanka gerekli bileşimde hazırlanan hammaddeler beslenir. Burada istenen pH değerine ayarlanır ve sürekli HTST (yüksek sıcaklık kısa süreli) sterilizasyon birimi yardımıyla daha önceden buharla sterilize edilmiş fermentöre beslenir. Eğer gerekirse bazı köpük kırıcı maddeler ve viskozite ve çözünübilirliğini ayarlayan maddeler steril ortama ayrıca ilave edilir (Topal, 1985). Diğer koldan mikroorganizma fermentasyon prosesi üretim tankına gelmeden önce birkaç aşı hazırlama safhasından geçer. Kullanılan tanklar fermentasyon ortamının korozif özelliklerine uygun bir paslanmaz çelikten geniş bir basınç aralığında (tipik olarak vakumdan 20 kPa basıncına kadar) çalışacak şekilde dizayn edilir. Tipik enzim üretim sistemlerinde kullanılan tankların hacmi ise 0.1-250 m³ arasında değişmektedir. Endüstriyel enzimler aerobik mikroorganizmalar kullanılarak üretilmektedir. Bu nedenle fermentasyon ortamına steril hava verilmesi gerekir. Ayrıca oksijenin gaz fazdan sıvı faza transferi için ortamın karıştırılması gerekmektedir. Verilen hava içerisindeki mikrobiyal hücrelerin uzaklaştırılmasında endüstride kullanılan temel iki prosesten birincisi hidrofobik silikon esaslı membran filtreler kullanarak yapılır, diğeri ise ısıyla ön sterilize edilebilen lifli maddeleri içeren filtreler kullanılarak yapılır (Rehm vd., 1987).

2.3.1.2. Katı Substrat Fermentasyon Yöntemi (Yüzey Kültür Fermentasyonu)

Katı substrat fermentasyonu (KSF), serbest suyun yokluğunda (veya çok az) katıların fermentasyonu olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte substrat, mikroorganizmanın gelişimi ve metabolizması için yeterli derecede neme sahip olmalıdır (Pandey, 2003). Bu yöntemle üretilen enzimlere örnek olarak proteaz, amilaz, laktaz, pektinaz, amiloglikozidaz ve renin verilebilir.

Katı substrat fermentasyonunun tipik örnekleri; Japonya’ da “koji” olarak adlandırılan katı substrat olarak buhar verilmiş pirinç, Endonezya’ da "Tempe" veya Hindistan’ da "ragi" olarak adlandırılan, katı substrat olarak buhar verilmiş ve kırılmış bakla tohumları, Fransa’ da "mavi damarlı peynir" elde edilmesinde substrat olarak delikli taze peynirin kullanıldığı fermentasyonlardır (Raimbault, 1998; Couto ve Sanroman, 2005).

2.3.1.2.a. Katı Substrat Fermantasyonunun Avantajları ve Dezavantajları

Katı substrat fermantasyonunun avantajlarını aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür (Raimbault, 1998):

- Genel olarak birkaç inorganik tuzun ilave edildiği buharla muamele edilmiş hububat gibi çok basit ortamlar kullanılmakta ve kullanılan ekipmanlar düşük güç harcamaktadır.
- Düşük nemli ortamlarda çalışıldığı için çoğu kontaminant bakteri türlerinin üremesi inhibe olmaktadır ve kapsamlı sterilizasyon proseslerine olan ihtiyaç azalmaktadır.
- Nem miktarı düşük olduğundan substratın birim ağırlığı başına olan hacmi düşük olacağından, kepekdeki enzim aktivitesi çok yüksek olabilir. Böylece verilen fermantör hacmindeki enzim verimi derin kültür fermantör sistemlerinden çok daha büyük olabilmektedir. Ayrıca atıkların işleme gereksinimleri azalabilir.
- Aşılama basamakları gereksizdir, genelde sporlarla yapılan ekim yeterli olmaktadır.
- Küçük hacimli suyla fermantasyon kepeğinden nispeten konsantre enzim çözeltileri elde edilebilir.

Katı substrat fermantasyonuyla enzim üretiminin dezavantajları ise aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Düşük nem konsantrasyonunda gelişebilen organizmalar veya mantarlarla sınırlıdır.
- Proses parametrelerinin ölçümü kültürün homojen olmamasından dolayı güçtür.
- Sıcaklık, oksijen transferi, pH gibi fermantasyon parametrelerinin kontrolü güçtür.
- Substratların çoğu ön işlemler, özel ekipmanlar ve çok fazla el emeği gerektirmektedir.

Enzimlerin mikrobiyal yolla üretimlerinin yanı sıra ortamdaki izole edilmeleri oldukça pahalı işlemler gerektirir. Bu nedenle bazı proseslerde eğer enzim çözeltileri daha az saflık derecelerinde kullanılabiliriyorsa işlemleri kolaylaştırmak ve maliyeti düşürmek amacıyla saflaştırma işlemlerine geçilmeden kullanılabilir.

2.3.1.2.b. Katı Substrat Fermantasyonunu Etkileyen Faktörler

KSF proseslerini etkileyen faktörler, kullanılan substrat ve mikroorganizma tipine ve prosesin büyüklüğüne bağlı olarak değişir. Bu faktörler biyolojik, fizikokimyasal ve çevresel faktörler şeklinde sınıflandırılabilir (Krishna, 2005).

KSF kullanılan katı substratın yapısına bağlı olarak iki kısma ayrılabilir. Birincisi, yaygın olarak kullanılan ve KSF denilince genelde anlaşılan sistem ekimin doğal ortama yapıldığı fermantasyon şeklidir. Burada kullanılan katı madde hem destek materyali hem de karbon ve nütrient kaynağı olarak işlev görmektedir. Substrat olarak genellikle hem ekonomik açıdan hem de çevre faktörleri yönünden tarımsal ve endüstriyel yan ürünler kullanılmaktadır. İkincisi ise (çok fazla kullanılmayan) sıvı ortamla doyurulan katı destek malzemesi üzerine ekimin yapıldığı sistemdir. Buradaki katı sadece mikroorganizmanın tutuklamasına yardımcı olur. Bu fermantasyonda tipik olarak kendir tohumu, perlit, poliüretan köpükler, şeker kamışı küspesi ve vermikulit (Mg, Al, Fe, Si, H, O içeren mineral) kullanılmaktadır (Ooijkaas vd., 2000).

Çoğu ticari ürün üretimi için baskın maliyet karbon kaynağıdır. Bu ortamın toplam maliyetinin yaklaşık % 80' ini oluşturmaktadır. Bundan dolayı karbon maliyetinin minimize edilmesi istenir. Bu amaçla hububat, soya unu gibi katılar veya melas gibi sıvı kompleks kaynaklar ve bunların fermantasyonuna uygun katı substrat fermantasyonu üzerinde çalışılmaktadır (Rehm vd., 1987).

Düşük nem seviyesi; besin maddelerinin difüzyonunu, mikrobiyal büyümeyi ve enzim kararlılığını azaltmaktadır. Daha yüksek nem seviyelerinde ise, partikül topaklanması, gaz transfer sınırlaması oluşur. Bu nedenle, işlem süresince optimum nem seviyesi korunmalıdır. Optimum nem seviyesi, bakteriyel kültürlerde de baskıya neden olmaktadır. Çünkü büyüme kinetiklerinin ve katının fizikokimyasal özelliklerinin etkilenmesi sonucu üretilebilirlik değişir. Genelde KSF proseslerinde nem seviyesi % 30-85 arasında olmaktadır. Bakteriyel fermantasyon proseslerinde katı matriksin nemi % 70' den daha yüksek, filamentli mantarlar için ise % 20-70 aralığında olmalıdır.

Fermantasyon proseslerinde diğer önemli faktör pH' dır ve metabolik aktivitelerden dolayı değişebilir. KSF prosesi süresince organik asitlerin salgılanması, asimilasyonu ve üre hidrolizi nedeniyle pH değişmektedir.

Katı substrat fermantasyonlarında maksimum mikrobiyal biyokütle konsantrasyonu 10-30 kg/m³ olarak, derin kültür feröantasyonunda tipik olarak görülen 40-50 kg/m³, ten daha

düşüktür. Ancak su miktarının az olması, fermante olan kütle başına ısı üretiminin katı hal fermentasyonlarında daha büyük olmasına yol açar. Isıyı absorbe edecek az su olduğu için sıcaklık tekrar hızla yükselebilir. Sonuç olarak, özellikle büyük ölçekli fermentasyonlarda sıcaklık kontrolü zor olmaktadır. Metabolik ısıнын gideriminde özellikle gözenekli fermentasyon kütlesi, zayıf ısı iletkenliği nedeniyle bazen önemli sınırlamalara neden olmaktadır. Fermentasyon sırasında sıcaklık kontrolü çoğunlukla buharlı soğutma ile sağlanır, dolayısıyla kuru hava daha iyi bir soğutma etkisi sağlamaktadır.

KSF' da uygun substrat seçimi diğer bir önemli konudur. KSF' da katı substrat, hem fiziksel bir destek hem de besin kaynağı olarak işlem görmektedir (Pandey, 2003).

Bütün katı substratların ortak özelliği makro moleküler bir yapıya sahip olmalarıdır. Genellikle, KSF substratları tarımsal veya tarımsal artıklarının kompozit ve heterojen yanürünleridir. Bu substratlar, karbon ve enerji kaynağı içeren (şekerler, yağlar, organik asitler) inert bir madde (şeker kamışı bagası, inert fiberler, reçineler) yapısındadır.

KSF' nunda kullanılan substratların tipik özelliği aşağıdaki şekilde sıralanabilirler (Raimbault, 1998):

- Katı substrat mikrobiyal aktivitelere inhibitör olarak etki etmemelidir. Ayrıca selüloz, nişasta, şeker gibi karbonhidratları, peptid, üre, amonyak gibi azot kaynaklarını ve mineral tuzları absorblamamalıdır.
- Birim hacimde büyük yüzey alanına sahip, mikrobiyal büyümeye müsait bir yapıda olmalıdır.
- Substrat, kuru ağırlığa göre bir veya birkaç kat su absorblayabilmeli.
- Nispeten düşük basınç ve fermentasyon karıştırma koşulları altında oksijenle birlikte diğer gazları içeren hava ortamında akabilmelidir.
- Katı substrat, fermentasyon proseslerindeki karıştırma sonucu oluşan mekanik bozulmalara dayanıklı olmalıdır.

İşlenmemiş substratları mikroorganizmaların kullanabilmesi için gerekli olan hazırlama ve ön işlem basamakları şu şekilde sıralanabilir:

- Öğüterek ya da keserek boyut küçültme,
- Mikroorganizmaların substratları kullanabilmesini kolaylaştırmak için polimerlerin fiziksel, kimyasal veya enzimatik hidrolizi,
- Mineral çözeltisi içerisine gerekli nütrientlerin (fosfor, azot, tuzlar vb.) ilavesi,
- pH ve nem içeriğinin ayarlanması,

- Makro moleküler yapıların ön parçalanma işlemi için pişirme yada buhar muamelesi ve ana kontaminantların elimine edilmesi.

2.3.1.2.c. Katı Substrat Fermantasyonunda Kullanılan Mikroorganizmalar

Bakteri, maya ve mantarlar katı substratlar üzerinde gelişebilirler. KSF' na en iyi adaptasyon filamentli mantarlarla sağlanır ve araştırmalarda da bu tür mikroorganizmalar daha baskındır. Katı substrat fermantasyonunda kullanılan bazı mikroorganizmalar ve kullanım alanları Tablo 2.5.' te görülmektedir.

Tablo 2.5. Katı substrat proseslerinde kullanılan temel mikroorganizma grupları (Raimbault, 1998).

Mikroorganizmalar	Kullanılan prosesler
Bakteriler	
<i>Bacillus sp.</i>	Amilaz, Organik maddelerin bozunması
<i>Pseudomonas sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Serratia sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Streptococcus sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Lactobacillus sp.</i>	Gıda, silolama
<i>Clostridium sp.</i>	Gıda, silolama
Mayalar	
<i>Endomycopsis burtonii</i>	Kassava, pirinç
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gıda, Etanol
<i>Schwanniomyces castelli</i>	Etanol, Amilaz
Mantarlar	
<i>Alternaria sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Aspergillus sp.</i>	Organik maddelerin bozunması, Gıda
<i>Fusarium sp.</i>	Organik maddelerin bozunması
<i>Monilia sp.</i>	Organik maddelerin bozunması,
<i>Mucor sp.</i>	Organik maddelerin bozunması, Gıda, Enzim
<i>Rhizopus sp.</i>	Gıda, Enzim, Organik Asitler
<i>Trichoderma sp.</i>	Organik maddelerin biyolojik kontrolü,
<i>Amylomyces rouxii</i>	Koji, Gıda, Sitrik asit

2.3.1.2.d. Derin Kültür ve Katı Substrat Fermantasyonu Arasındaki Farklar

Tablo 2.6.' da derin kültür ve katı hal fermantasyonu karakteristik özelliklerine göre karşılaştırılmıştır.

Tablo 2.6. Derin kültür ve katı hal fermentasyonu arasındaki farklar (Rao, 2010).

Karakteristik özellik	Katı hal fermentasyonu	Derin kültür fermentasyonu
Mikroorganizma ve substrat şartları	Durgun	Çalkalamalı
Substratın durumu	Ham	İşlenmiş
Su mevcudiyeti	Sınırlı	Yüksek
Oksijen kaynağı	Difüzyon ile	Kabarcık/serpme ile
Oksijenle temas	Doğrudan	Çözünmüş oksijen
Fermentasyon ortamı ihtiyacı	Az	Fazla
Enerji ihtiyacı	Düşük	Yüksek
Kinetik çalışmalar	Kompleks	Kolay
Sıcaklık ve konsantrasyon gradyanları	Aşırı	Sorunsuz
Reaksiyon kontrolü	Zor	Kolay
Bakteriyel bulaşma olasılığı	İhmal edilebilir	Yüksek
Bertaraf edilecek sıvı miktarı	Düşük	Yüksek
Kirlilik problemleri	Düşük	Yüksek

2.4. Pektinazlar

2.4.1. Pektin Hakkında Genel Bilgiler

2.4.1.1. Pektinin Tanımı ve Elde Edilişi

Pektin; selüloz ve hemiselüloz ile birlikte bitkilerin hücre duvarında bulunan ve yapısında poligalakturonik asit, rhamnogalakturonik asit, galaktanlar ve arabinogalaktanlar bulunan bir polisakkarittir (Celestino vd., 2006). Pektinler; pektik maddeler, protopektinler ve pektik asitler şeklinde sınıflandırılırlar. Pektik maddeler; bir kısmı veya tamamı esterleşmiş poligalakturonik asitlerlerdir. Protopektinler; suda çözünmez pektin çeşidi olup selüloz, xylan ve glukomannan gibi hücre duvarı maddelerine kimyasal ve fiziksel olarak bağlıdır. Pektik asitler ise; çok az esterleşmiş veya hiç esterleşmemiş poligalakturonik asitlerdir. Bu asitler; şekerlerle, asitlerle veya divalent iyonların yardımıyla katı jel formuna getirilebilirler.

Pektik asit terimi çoğunlukla kolloidal poligalakturonik asitlerden oluşan pektik madde-

ler için kullanılır (Lower, 1992, 1993). Pektik asitlerin içerdği poligalakturonat birimlerinde bulunan karboksil gruplarının çok az bir miktarı metille esterleşmiştir. Normal tuzları veya asit tuzları pektat olarak isimlendirilmektedir (Kilara, 1982).

Pektinik asitler terimi ise ihmal edilebilir oranda metil ester grupları içeren kolloidal ve doğrusal olan poligalatronik asitler için kullanılır. Bu asitler, uygun koşullar altında, şeker ve asitlerle veya uygun derecede düşük metoksil grubu varlığında metal iyonlarıyla jel oluştururlar (Lower, 1992, 1993). Pektin elde etmek için, elma, limon, portakal gibi narenciye meyveleri ufalanır ve sıkıldıktan sonra kalan kısım kullanılır. Elma posası önce kurutulur, sonra ekstrakte edilir. Narenciye meyvelerinin posalarını ekstraksiyondan sonra kurutmaya gerek yoktur. Ekstraksiyon seyreltik asitlerle ısıtmak suretiyle yapılır. Böylece pektin, pektik asit haline geçer ve suda daha kolay çözünür. Pektin çözeltisinden etanolle çöktürülür veya çözelti vakumda yoğunlaştırıldıktan sonra püskürtülerek kurutulur (Baytop, 1989; URL-2, 1996). Diğer bir yöntem ise pektin içeren kabukların veya posanın 850 °C' de su buharıyla muamele edilmesidir. Suyu ekstraksiyondan sonra etanolle çöktürülür. Çökelek tekrar çözülüp hidrolize edilir ve sonunda kalsiyum pektinat olarak çöktürülür (Lower, 1993). Tablo 2.7.' de pektik bileşikler ve özellikleri yer almaktadır.

Tablo 2.7. Pektik bileşikler ve özellikleri (Ekşi, 1988).

Bileşik adı	Özelliği
Pektikasit	Esterleşmemiş galakturonik asit birimlerinden oluşan zincir. Asit formda suda çözünmez, kısmen nötralizasyondan sonra suda çözünür ve Ca ile jel oluşturur.
Pektat	Pektik asitin nötral veya asidik tuzudur.Çok az sayıda metoksil grubu içerir. (Na-pektat suda çözünmekte,ancak Ca-pektat suda çözünmemektedir.)
Pektin	Kısmen ve tümüyle metil alkolde esterleşmiş (metilize olmuş) poligalakturonik asittir. Metoksil grubu sayısı (esterleşme derecesi) ve polimerizasyon derecesine bağlı olarak özellikleri değişmektedir.
Pektinat	düşük ve yüksek esterleşme oranı içeren pektinin tuzudur.Molekülde metoksil grupları da bulunur.
Protopektin	Pektin zincirleri, esterleşmemiş –COOH grupları üzerinden birbirine metal iyonu (Mg, Ca) ile bağlanmıştır.Kısıtlı sayıda fosforik asit üzerinden ester köprüsü de içeren doğal pektin olup, suda çözünmez.
Pektin türevleri	Ana valenslerine asetil vb. gibi özel grupların bağlandığı pektindir.

2.4.1.2. Pektinlerin Biyolojik Olarak Parçalanması

Mantarlar, pektini etkin olarak parçalayabilen geniş bir pektinolitik enzim yelpazesine sahiptir. “Pektinazlar” terimi genelde pektin ana zincirine etki eden enzimler için kullanılır. Pektinin polimer yapısının enzimatik olarak bozulması hücre duvarını zayıflatır. Bunun sonucunda hücre duvarında yer alan diğer polimerler de hücre duvarını parçalamayan enzimlerin hedefi haline gelir. Bir çok bitki bu enzimatik saldırıya karşı bitki koruyucu proteinler geliştirmiştir. Bu proteinler poligalakturonaz inhibe edici proteinler olarak da adlandırılır (Kubicek ve Druzhinina, 2007).

Pektinazlar etki mekanizmalarına göre hidrolazlar ve liyazlar olarak iki alt gruba ayrılırlar. Bunun yanısıra pektinazlar substratlarına özgü olarak da alt gruplara ayrılır (poligalakturonaz ve ramnogalakturonazlar gibi). Pektinolitik sistem *Aspergillus* türlerinde detaylı olarak incelenmiştir (Vries ve Visser, 2001). Poligalakturonazlar (PGA) pektinazların en detaylı incelenmiş sınıfıdır. PGA' lar bir çok saprofit ve bitki patojeni mantardan izole edilmiştir. Endopoligalakturonazlar zincir içinde yer alan α -1,4-D-galakturonik asid bağlarının hidrolitik olarak parçalanmasını kataliz eder. Ekzopoligalakturonazlar (galakturon 1,4- α -galakturonidaz) (PGX) indirgen olmayan uçtan başlayarak polimeri parçalarlar.

2.4.1.3. Pektinin Fizikokimyasal Özellikleri

Pektin; ince veya kaba görünümlü, kokusuz müsilaajımsı lezzette, sarımsı beyaz renkte bir tozdur. Molekül ağırlığı 100.000 - 250.000 arasında değişir. 20 kısım suda çözünerek, kolloidal, negatif yüklü, viskoz ve opak bir çözelti oluşturur. Turnusol kağıdına karşı asit reaksiyondadır. Alkol, seyreltik alkol veya diğer organik çözücülerde çözünmez. Suda çözünmeden önce alkol, gliserin, basit gruplarla nemlendirilir veya üç katı kadar sukrozla karıştırılırsa suda daha kolay çözünür (Gürsoy vd., 1989; Lower, 1992; Mccarthy vd., 1985; URL-2, 1996).

Pektin, suda %5 çözünerek viskoz bir jel oluşturur. Polimerizasyon oranı düşük veya fazla esterleşmiş olan pektinler suda daha kolay çözünürler. Pektin zayıf anyonik bir polielektrolittir. Elektrik yüklü olduğu için, diğer elektrik yüklü maddelerle etkileşebilir. Pektinler jel oluşturabilme özelliklerine göre de ayrılırlar. Jelleşme yeteneği, elde edildiği meyveye, üretim şekline, moleküldeki galakturonik asit miktarına, ester oranına, pH değerine,

su içeriğine, sıcaklığa ve molekül ağırlığına bağlı olarak değişir (Lower, 1993).

2.4.1.4. Pektinlerin Endüstriyel Önemi

Pektin (E 440) bir gıda katkı maddesidir. Gıda endüstrisinde reçel ve marmelat üretimi sırasında jelleşmeyi sağlamak amacıyla pektin kullanılmaktadır. Meyve suyu üretiminde mayşe enzimasyonu uygulansa bile pres suyu koloidal olarak çözünen pektin içerir. Pektin koruyucu özelliğinden dolayı, diğer bileşikler de meyve ham suyu içinde askıda tutulmaktadır. Bu nedenle berrak meyve suyu üretimi için öncelikle pektik bileşiklerin enzimatik yolla degradasyonu gereklidir (Ekşi, 1988).

Pektin endüstriyel olarak elma ve turunçgil meyveleri posasından elde edilir. Ham maddedeki protopektin asit ekstraksiyonu ile çözünür hale getirilir ve daha sonra izopropil alkol ile çözünerek sulu çözeltiden ayrılır. Pektin piyasada sıvı veya kurutulmuş toz halinde bulunur (Acar ve Gökmen, 2004).

2.4.2. Pektik Enzimler

2.4.2.1. Pektik Enzimlerin Genel Özellikleri

Pektik maddeleri substrat olarak kullanan enzimler; pektik enzimler, pektinazlar veya pektinolitik enzimler olarak isimlendirilmektedir. Pektik enzimler, pektik maddelerin omurgalarını oluşturan galakturonat gruplarında bulunan bağlar üzerindeki aktivitelerine göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.8.).

Tablo 2.8. Pektik enzimlerin sınıflandırılması (Alkorta vd., 1998). [Enzimler Enzim Komisyonuna (EC) göre sınıflandırılmış ve isimlendirilmiştir]

Enzimin ismi (EC tarafından önerilen)	Yaygın ismi	EC Numarası	Substrat	Aktivite endo-, ekzo-
Ester bağı parçalayan enzimler				
Polimetilgalakturonat esteraz (PMGE)	Pektin esterazlar	3.1.1.11	Pektin	Rasgele
Depolimerize eden enzimler; Hidrolazlar				
Endopoligalakturonaz (Endo-PG)	Poligalakturonaz	3.2.1.15	Pektat	Rasgele
Ekzopoligalakturonaz 1 (Endo-PG1)	Poligalakturonaz	3.2.1.67	Pektat	Uç
Ekzopoligalakturonaz 2 (Endo-PG2)	Poligalakturonaz	3.2.1.82	Pektat	Sondan bir önceki bağ
Endopolimetilgalakturonaz (endo-PMG)	Pektin hidrolaz		Pektin	Rasgele
Ekzopolimetilgalakturonaz (ekzo-PMG)	Pektin hidrolaz		Pektin	Uç
Liyazlar				
Endopoligalakturonatliyaz (endo-PGL)	Pektat liyaz	4.2.2.2	Pektat	Rasgele
Ekzopoligalakturonatliyaz (ekzo-PGL)	Pektat liyaz	4.2.2.9	Pektat	Sondan bir önceki bağ
Endopolimetilgalakturonat liyaz (endo-PMGL)	Pektin liyaz	4.2.2.10	Pektin	Rasgele
Ekzopolimetilgalakturonat liyaz (ekzo-PMGL)	Pektin liyaz		Pektin	Uç

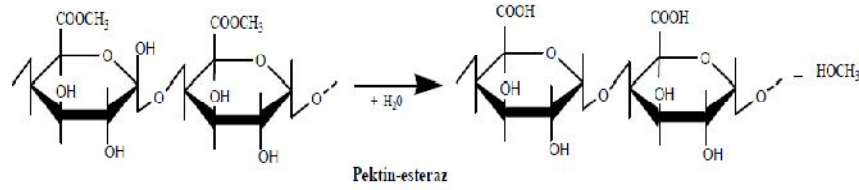
Pektinleri parçalamakla görevli olan pektik enzimlerin üretimi daha çok yüzey kültür tekniği ile katı besiyerlerde gerçekleştirilir. Üretimde *A. niger*, *A. oryzae*, *A. wentii*, *A. flavus*, *Rhizopus liquefaciens* ve *Penicillium* türleri kullanılır. Pektik enzimlerin biyosentezi indüksiyon veya katabolik represyon mekanizması ile kontrol edilir (Telefoncu, 1997). Bitki hücrelerinin orta lamelinin ve primer hücre duvarının yapısını oluşturan pektik asit ve pektini parçalayan bu enzimler bakteri, mantar, böcek, nematod ve protozoada bulunmaktadır. Bitkisel kaynaklı pektik enzimler oldukça yüksek molekül ağırlıklı pektik asitleri tercih ederler.

Temel olarak üç tip pektik enzim varlığı bilinmektedir. Bunlar;

1. Ester bağı parçalayanlar (pektin esterazlar),
2. Depolimerize edenler (pektinazlar: hidrolaz veya liyaz),
3. Protopektinazlar (Alkorta vd., 1998).

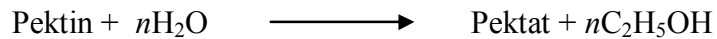
2.4.2.2. Pektin Esterazlar (Ester Bağını Parçalayanlar)

Bu gruba giren enzimler, ester bağının parçalanmasını katalizlemektedir. Bu enzimler; mantar, bakteri, maya ve yüksek bitkilerden elde edilmektedir (Sakai vd., 1993). Şekil 2.5.'te pektin-esteraz enziminin etki mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Pektin-esteraz enziminin etki mekanizması

Pektik substratların galakturonan omurgasındaki metil ester bağlarının deesterifikasyonunu katalizleyerek asidik pektinleri ve metanolü açığa çıkarmaktadır (Cosgrove, 1997). Açığa çıkan pektin üzerine poligalakturonazlar ve liyazlar etkili olmaktadır. Pektinesterazların etki mekanizması kaynağına göre çeşitlilik göstermektedir (Micheli, 2001). Fungal pektinesterazlar metil gruplarını rastgele uzaklaştırarak çoklu zincir mekanizması ile etki eder. Buna karşılık bitki pektinesterazları ya indirgen olmayan uca ya da yanındaki serbest karboksil grubuna etki etme eğiliminde olup molekül boyunca tek zincir mekanizması ile ilerlemektedir. Pektinesterazın katalizlediği reaksiyon:



2.4.2.3. Depolimerize Eden Enzimler (Zincir Kırıcı Enzimler)

Depolimerazlar, pektik maddeler üzerinde hidrolitik reaksiyon ve trans-eliminasyon reaksiyonu olmak üzere iki farklı mekanizmayla çalışırlar. Hidrolitik reaksiyon; glikozidik bağları hidroliz eder. trans-eliminasyon reaksiyonu ise; glikozidik bağları su katılması olmaksızın kıran reaksiyondur. Depolimerazların trans-eliminasyon reaksiyonu ile çalışan sınıfı liyazlar olarak adlandırılır. Bu farklı kırılma reaksiyonları pektinazların sınıflandırılmasında kullanılır (Soares vd., 1999).

Hidrolazlar dört ana grup altında toplanmıştır:

- Pektini rasgele parçalayan endopolimetilgalakturonazlar,
- Pektini sadece uçtan parçalayabilen ekzopolimetilgalakturonazlar,
- Pektatı rasgele parçalayan endopoligalakturonazlar,
- Pektatı sadece uçtan parçalayabilen ekzopoligalakturonazlar.

Poligalaktrunozlar, oksijen köprüsü üzerinden su katılımıyla poligalakturonik asit zincirinin hidrolitik olarak kırılmasını katalizler. Pektinolitik enzim ailesi içinde en çok çalışılan gruptur. Poligalakturonazlar pektik maddeleri hidrolizleyen endopoligalakturonaz (E.C. 3.2.1.15) ve ekzo-poligalakturonazdan (E.C. 3.2.1.67) oluşmaktadır. Poligalakturonazların bitki-patojen ilişkileri ile gıda proseslerinde biyolojik, fonksiyonel ve teknik uygulamaları vardır.

Endo-poligalakturonazlar mantarlar, bakteriler ve birçok maya türünde yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca yüksek bitkiler ve bazı bitki paraziti nematodlarda da mevcuttur. Buna karşılık ekzo-poligalakturonazlara bakteri ve mantarlarda daha az rastlanmaktadır. Ekzo-poligalakturonazlar iki tipe ayrılabilir: Fungal kaynaklı ekzo-poligalakturonazlar son ürün olarak monogalakturonik asit açığa çıkartırken bakteriyel ekzo-poligalakturonazlar son ürün olarak digalakturonik asit açığa çıkarırlar (Sakai vd., 1993). Bitkilerde de poligalakturonaz varlığı rapor edilmiştir (Pressey ve Avants, 1973, 1975; Pressey ve Puri, 1984; Alonso vd., 2003).

Endo-poligalakturonazlar, poligalakturonat için spesifiktir. Enzim aktivitesi için substratın kalsiyum tuzu gereklidir. Serbest tetragalakturonat anyonu, kompetitif bir inhibitördür (Romboutz ve Pilnik, 1980). Endo-poligalakturonaz aktivitesi substrat yoğunluğunun azalması veya indirgen grupların artma hızı ölçülerek saptanmaktadır. Pektinlerin hidroliz oranı ve derecesi, esterifikasyonun artışıyla hızlıca azalmaktadır. Endo-poligalakturonazlar, substrat olarak oligogalakturonatlar kullanıldığında farklı atak mekanizmaları göstermektedirler. Bu farklar enzimin aktif merkezinin yapısı ile yakından ilgili olmakla birlikte, özellikle katalitik grupların durumu ve substrat bağlama bölgesinin büyüklüğü ile ilgilidir. Substrat molekülündeki karboksil gruplarının ve bazı ikincil alkol gruplarının enzim-substrat ilişkisinde rol aldığı sanılmaktadır (Pickersgill vd., 1998).

Endo-pektinazlar endo enzim olup, substrattaki glikozidik bağları kopararak substrat çözeltisinin viskozitesini hızlı bir şekilde düşürmektedir. En düşük molekül ağırlıklı ve tamamen metillenmiş tetra ve tri galakturonatları parçalayan endo-pektinaz, *Aspergillus*

niger ve *Aspergillus foncecanus*' tan saflaştırılmış enzim, substratı ile bağlandığında substratta yer alan karboksil gruplarının ve tirozin kalıntılarının etkin olduğuna ait deliller bulunmaktadır. Bir pektik asit (substrat) çözeltisinin endo-poligalakturonazlarla etkileşimi sonucunda, yoğunluğunun % 50 düşmesi, α -1,4 glikozit bağlarının ancak % 2 kadarının hidrolize olduğunu göstermektedir (Hirose vd., 1999). Ekzo-poligalakturonaz, pektin polimerinin dış kısımlarındaki α -1,4 glikozit bağlarını hidrolize eder, galakturonik asit kalıntılarını açığa çıkartır. Ekzo-poligalakturonazlar, yüksek bitkilerde, bazı böceklerin barsak sistemlerinde, bazı fungus ve bakterilerde bulunmaktadır. Bu enzimin varlığı genellikle galakturonik asit monomerlerinin serbest indirgenmiş gruplarının tayini ile yapılmaktadır (Kawano vd., 1999).

Trans-eliminazlar olarak da adlandırılan liyazlar, hem pektatın (endo- ve ekzopoligalakturonat liyaz) hem de pektinin (endo- ve ekzo-polimetilgalakturonat liyaz) glikozidik bağlarını parçalamaktadırlar. Reaksiyon sonunda polisakkarit zincirinin indirgen olmayan ucunda bir çift bağ oluşturmaktadırlar. Pektin veya pektat liyazın aktivite tayinleri bu doymamış uronik estere dayanmaktadır (Sakai vd., 1993). Liyazlar etki mekanizmasına ve etki ettiği substrata göre sınıflandırılmaktadır:

- Endo-poligalakturonat liyaz (Endo-PGL, E.C. 4.2.2.2)
- Ekzo-poligalakturonat liyaz (Ekzo-PGL, E.C. 4.2.2.9)
- Endo-polimetilgalakturonat liyaz (Endo-PMGL, E.C. 4.2.10)
- Ekzo-polimetilgalakturonat liyaz (Ekzo-PMGL)

Poligalakturonat liyazlar (Pektat liyaz veya PGLs) birçok bakteri ve bazı patojenik mantarlar tarafından endo-poligalakturonat liyazla birlikte az miktarda ekzo-poligalakturonat liyaz şeklinde üretilmektedir. Bakteri ve mantarlardan izole edilen poligalakturonat liyazlar gıdaların bozulmasına sebep olmaktadır. Polimetilgalakturonat liyazların (pektin liyaz veya PMGL) üretimiyle ilgili olarak literatürde birkaç yayın bulunmaktadır. *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretildiği rapor edilmiştir. Pektin liyazların çoğu mikroorganizmalardan izole edilmiştir. Bitki ve hayvanlardaki varlığına dair yayımlanan çalışma sayısı azdır (Whitaker, 1990). Liyazlar bakterilerdeki pektinolitik enzimlerin en büyük grubunu oluşturur ve direkt olarak bitki patojenitesiyle ilişkilidir (Dixit vd., 2004).

2.4.2.4. Protopektinaz

Temel pektik maddelerden biri olan protopektin, genellikle bitki dokusunda bulunan suda çözünmeyen pektik maddeler olarak tanımlanmaktadır. Protopektinlerin pektin ve pektinik asitlerin hidrolizlenmesini sınırladığı da bilinmektedir (Be Miller, 1986).

2.4.3. Pektinazların Endüstriyel Kullanım Alanları

2.4.3.1. Pektinazların Tekstil İşlemleri ve Pamuk Liflerinin Parlatılmasında Kullanımı

Tekstil üretiminde enzimlerin kullanımı, hem çevresel açıdan hem de ürün kalitesi açısından oldukça yararlı sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Kumaş üretimi sürecinde ipliklerin aşınmasını engellemek için kumaş iplikleri dokumadan önce kola ajanları ile kaplanmaktadır. Pamuk kumaş üretiminde; düşük maliyeti, kolay elde edilebilirliği ve iyi film tabakası oluşturmamasından dolayı nisasta temel kola ajanı olarak kullanılmaktadır. Kullanılmış olan kola ajanları ve ipliğin yapısındaki selüloz olmayan maddelerin kumaş boyanmadan önce ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Geleneksel yöntemde ise bu maddeleri uzaklaştırmak için kumaşlar, enzimler yerine aşındırıcı soda ile yüksek sıcaklıkta muamele edilmektedir. Soda kullanımı yöntemi, hem pamuğun doğal yumuşak dokusuna hasar vermekte hem de safsızlıkların tamamen uzaklaştırılmasında etkili sonuç vermemektedir (Hoondal vd., 2002).

Amilaz, lipaz, selulaz ve diğer hemi selülotik enzimlerle beraber pektinaz gibi enzimlerin kullanılması, tekstil endüstrilerinde sert kimyasalların kullanımını ve çevreye atık kimyasalların deşarjını azaltmakta ve tekstil çalışanlarının çalışma şartlarının ile fabrika kalitesini iyileştirmektedir (Arunachalam ve Asha, 2010).

Pektinaz enzimleri selüloz liflerin arasında bulunan suda çözünmeyen pektinleri uzaklaştırarak pamuğun su tutma kapasitesini arttırmaktadır. Enzimlerin kullanılması ile çevreye daha az zarar verilmekte, enerji tasarrufu sağlanmakta ve selüloz liflerinin zarar görmesi engellenmektedir (Hoondal vd., 2002).

2.4.3.2. Pektinazların Kümes Hayvanlarının Yemlerinde Kullanımı

1980' lerin başlarında kümes ve diğer hayvan yemlerine çeşitli enzimler ilave edilmeye başlanmıştır. Enzim ve yem karışımı hazırlanmasında genellikle, glukanaz, proteaz, pektinaz ve amilaz enzimleri kullanılmaktadır. Hayvan yemlerine enzim ilave edilmesinin amacı, hayvanlar için aynı miktarda yem tüketerek daha fazla et verimi elde etmektir. Enzimlerin yemlere ilave edilmesi; besinlerin absorpsiyonunu artırmakta, dışkı miktarlarını azaltmakta, lifleri hidrolizleyerek aralarında bulunan besinlerin serbest kalmasını sağlamakta ve böylece besin değerini yükselterek hayvanların aynı miktarda yem yiyerek daha fazla kilo almasını sağlamaktadır. Petersen (2001); piliçlerin sebze ve protein karışımı olan yiyeceklerine pektinaz, glukanaz ve selüloz içeren enzim karışımını ilave etmiştir. İlave edilen bu enzimlerin etkisiyle piliçlerin kilolarının nasıl değiştiği 49 gün boyunca incelenmiş ve sonuçta piliçlerin önemli ölçüde kilo aldıkları belirlenmiştir (Hoondal vd., 2002).

2.4.3.3. Pektinazların Kağıt ve Kağıt Hamuru Sanayisinde Kullanımı

Kağıt yapımı sırasında, pektinaz pektinleri depolimerize etmekte ve sonrasında peroksit ağartmasından süzülen sıvının ve pektin solüsyonlarının katyonik ihtiyacını düşürmektedir.

2.4.3.4. Pektinazların Meyve Suyu Üretiminde Kullanımı

Pektik maddeler, taze meyve ve sebzelerin % 0,5-4,0' ını oluşturmaktadır. Dokular ezildiğinde, meyve suyunun viskozitesini artıran ve bulanıklık yapan tanecikleri oluşturan çözülebilir pektin sulu faza geçmekte, diğer pektinler ise hemiselüloz vasıtasıyla selüloz liflerine bağlı olarak kalmaktadır. Pres veya diğer mekanik metotlar kullanarak meyve suyunu ekstrakte etmek oldukça zor olmaktadır. Pektinazların ilavesi meyve suyunun viskozitesini azaltmakta ve preslenebilirliğini artırarak daha verimli meyve suyu üretimini sağlamaktadır (Kashyap vd., 2001).

İşlem görmemiş meyve suyu, temel olarak pektik maddelerin oluşturduğu çözünmeyen taneciklerce zengindir. Bu tanecikler pozitif yüklü proteinlerin negatif yüklü pektinlerce sarılması sonucunda oluşmaktadır. Bu negatif yüklü tanecikler ayrıca birbirlerini de itmek-

tedir. Pektinazlar pektinleri parçalayarak, birbirlerini iterek büyük moleküllü agregatlar oluşturan bu partiküller arasındaki itmeyi azaltmakta ve böylece meyve suyundaki bulanıklığın giderilmesine yardımcı olmaktadır (Kashyap vd., 2001).

Özellikle *Aspergillus niger*' den üretilmiş pektinazlar meyve suyu ve şarap endüstrisinde kullanılmaktadır. Ticari olarak üretilen meyve suları berrak ve bulanık olmak üzere iki çeşittir. Pektinazlar, berrak meyve sularının üretiminde presleme ve süzme esnasında meyve suyunun verimini artırmak ve asılı duran parçacıkların neden olduğu bulanıklığı gidermek için kullanılırlar. Limon suyu, nektar ve püreler gibi bulanık meyve sularının bulanıklık stabiliteyi, oldukça yüksek poligalakturonaz aktivitesi içeren pektik enzimlerle sağlanır (Kashyap vd., 2001).

2.4.3.5. Pektinin Farmasötik Teknolojide Kullanımı

Pektin, süspansiyon yapıcı ajan olarak süspansiyon bileşimine girer. Krem ve merhemlerde, emülsiyon ve jel yapıcı olarak kullanılır (Lower, 1992, 1993).

Etkin madde içeren pektin çözeltisi CaCl_2 çözeltisine damlatılarak katyonik özellikte bir madde olan atenolol ve anyonik özellikte bir madde olan piroksikam içeren pektin boncukları hazırlanmıştır. Bu çalışmada, iyonotropik jelleşme denilen bu yöntemle yüksek miktarda etkin madde tutulduğu görülmüştür (Aydın ve Akbuga, 1996).

Pektin özellikle kontrollü olarak ilaç serbestleştiren tabletlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Mide ve ince bağırsak ortamlarındaki asit ve enzimlere karşı dayanıklı olması ve kolonda bulunan bakteriyel enzimler tarafından parçalanabilmesi nedeniyle, özellikle oral yoldan kolona ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu özelliği nedeniyle, etkin maddelerin kolonda lokal ve sistemik etki göstermesini sağlar (Ashford vd., 1993; Rubinstein vd., 1993).

2.4.3.6. Pektinazların Diğer Alanlarda Kullanımı

Kullanım alanlarına göre pektinazlar ikiye ayrılır; asidik pektinazlar (optimum pH < 7) ve alkali pektinazlar (optimum pH > 7). Gıda endüstrisinde ve şarap yapımında kullanılan asidik pektik enzimler genellikle mantar kökenlidir ve özellikle *A. niger*' den gelmektedir. Asidik pektinazlar elma suyu ve şarabı, armut suyu, üzüm suyu ve şarabı, çilek suyu,

böğürtlen suyu, portakal suyu ve limon suyu yapımı, trunçgil kabuklarından yağ eldesi, kuru hayvan yemi, mango, şeftali, guava, papaya, ananas ve muz sularının yapımıdır.

Alkali pektinazlar genellikle bakteri kökenlidir ve endüstride en çok *Bacillus spp.* kökenli olanlar kullanılırlar. Alkali pektinazların endüstride kullanıldığı alanlar; keten, kenevir ve rami liflerinin ayrılması, pektik atık suların muamelesi, japon kağıdı üretimi, kağıt üretimi, yağ ekstraksiyonu, çay ve kahve fermentasyonudur.

Pektin; kozmetikte, koruyucu el kremi ve losyonların yapısına girmektedir. *Stratum corneum*' un rehidrasyonunu sağlar ve deri yüzeyinde koruyucu olarak görev yapar. Ayrıca, saç bakımı preparatlarında ve saç jölesi formülasyonlarında da kullanılır (Strianse, 1957).

Gıda Biyoteknolojisinde, çözünebilen pektin ve hücre duvarı bileşenlerinin hidrolizi vizikoziteyi düşürür ve meyve suyunun tekstüresini sağlar. Meyve sıkılabilirliğini arttırmak, zeytinden yağını çıkarmak, aromanın, enzimlerin, proteinlerin, polisakkaritlerin ve nişatanın giderilmesinde kullanılır.

Turunçgilleri işleyen endüstrilerin atık suları, aktifleştirilmiş sulu çamur işlemleri süresince mikroorganizmalar tarafından kolayca parçalanamayan pektik maddelerce zengin olduğu bilinmektedir (Tanabe vd., 1986). Tanabe (1987) alkali mikroorganizmaları kullanarak yeni bir atık su işleme süreci geliştirmeye çalışmıştır. Toprakta izole edilen alkali *Bacillus sp.* (GIR 621) pH 10' da alkali ortamda ekstraselüler endopektat liyaz üretmektedir. İzole edilen bu türlerin, atık sulardan pektik maddeleri uzaklaştırmak için oldukça kullanışlı oldukları bulunmuştur.

Limon yağı gibi turunçgil yağları pektinazlar kullanılarak ekstrakte edilebilmektedir. Pektinin emülgatör özelliğini ortadan kaldırarak narenciye kabuğu ekstraktlarından elde edilen yağın topaklanmasını engellemektedir (Scott, 1978).

2.4.4. Katı Hal Fermentasyonu ile Pektinaz Üretimi Çalışmaları

Endüstrilerde, çoğunlukla alkali enzimler kullanılmaktadır. Mantarlar tarafından üretilen enzimlerin pH optimumu nötral ve asidik aralıktadır. Bu nedenle bu enzimlerin kullanımı daha sınırlıdır. Bakteriler tarafından üretilen birçok ekstraselular enzim yüksek pH optimumuna sahiptir. Literatürde KSF tekniği ile bakterilerden pektinaz enzimi üretimi konusunda çok az sayıda yayın mevcuttur (Kashyap vd., 2003). Ticari pektinaz üretimi iki farklı fermentasyon tekniğiyle ve çoğunlukla *Aspergillus niger* türleri kullanılarak

yapılmaktadır. Her iki teknikteki pektinaz üretimi karşılaştırıldığında katı substrat fermentasyonunun daha verimli olduğu ortaya çıkmıştır. Diğer bir ilginç bulgu ise KSF ile üretilmiş pektinazların pH ve sıcaklığa karşı daha kararlı olduğu ve katabolik baskılamadan daha az etkilendiğidir (Blandino vd., 2002). Buğday kepeği, soya kepeği, yaban mersini, çilek posası, kahve özü ve kahve kabuğu, kakao, limon ve portakal kabuğu, portakal küspesi, şeker kamışı küspesi, elma posası, mısır kepeği ve turuçgil atıkları gibi farklı tarımsal ve tarıma dayalı endüstriyel katı atıklar pektinaz üretiminde substrat olarak kullanılmaktadır (Martins vd., 2002; Couto ve Sanroman, 2006; Aguilar vd., 2008).

Diaz -Godinez ve arkadaşları (2001), *Aspergillus niger* ile derin kültür ve katı substrat fermentasyonunda ekzo-pektinaz üretimi yapmış ve KSF' nda sakkaroz ilavesi ile enzim aktivitesinin arttığını gözlemlemişlerdir. Bunu, katabolik baskılama olmaması sonucu daha fazla biyokütle üretimi ile açıklamışlardır.

Patil ve Dayanand (2006) limon kabuğu, sorgum sapı ve ay çiçeği başı gibi pektince zengin tarımsal atıklardan *Aspergillus niger* DMF 27 ve *Aspergillus niger* DMF 45 ile pektinaz üretimini derin kültür ve katı substrat fermentasyon sistemlerinde incelemişlerdir. Katı substrat sistemde maksimum endo pektinaz (4.8 U/g) ve ekzo pektinaz (17.2 U/g) aktivitesini ay çiçeği başından elde etmişler ve limon kabuğundan ise endo pektinaz (2.0) ve ekzo pektinaz (10.2) izlemişlerdir.

Kapoor ve Kuhad (2002), farklı büyüme şartlarında *Bacillus* sp. MG -cp-2 ile alkali poligalakturonaz üretimini araştırmışlar ve DKF' nda 342 U ve KHF' nda 23.076 U maksimum aktivite elde etmişlerdir.

2.5. *Pseudomonas* Ailesi ve *Pseudomonas fluorescens*

2.5.1. *Pseudomonas* Ailesinin Genel Özellikleri

Pseudomonaslar, bakteriler aleminin Protobacteria filumunun Gamma Proteobacteria sınıfının Pseudomonadales takımının Pseudomonadaceae ailesinde sınıflandırılan bakterilerdir. *Pseudomonas* cinsinde, toprakta ve suda yaygın olarak bulunan, gram negatif, non-fermentatif ve aerobik birçok basil yer alır. Bazı türleri insan, hayvan ve bitkiler için patojendir. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ve *P. stutzeri* insanlarda enfeksiyon etkeni olan önemli türlerdir. *P. solanacearum* ve *P. syringae* ise bitkilerde patojen olan türlerdir (Palleroni, 2005).

Pseudomonas spp. doğada ve insanların normal florasında bulunur. Hastaneye başvuran sağlıklı kişilerde düşük oranlarda bulunur. Ancak; hastaneye başvuran yanıklı hastaların derilerinde, solunum cihazına bağlı olan hastaların alt solunum yollarında, kemoterapi alan hastaların gastrointestinal yolunda ve antibiyotik alan hastaların herhangi bir bölgesinde bulunabilme oranının oldukça artabilmesi de söz konusu olabilmektedir. Bu oran normal haldekine göre % 50 artabilmektedir.

Bu cinsin üyeleri; ancak birkaç bakterinin tolere edebildiği koşullarda canlılıklarını sürdürebilmekte ve ayrıca birçok antibiyotiğe dirençli olduklarından dolayı bu bakterilerin varlığı klinik açıdan önemlidirler (URL-3, 2009). *Pseudomonas* türlerinin en önemli özelliği çok farklı yapıdaki organik bileşikleri kullanacak metabolik mekanizmaya sahip olmalarıdır. Mikroorganizmanın bazı türleri proteolitik ve lipolitik aktiviteye sahiptir (Ünlütürk ve Turantaş, 1998). *Pseudomonas*' lar lipolitik ve proteolitik aktiviteleri sonucunda gıdalarda istenmeyen tat, renk ve koku oluşumuna sebep olurlar. Taze etlerde ve diğer gıdalarda kalite kriterlerini belirlemede *Pseudomonas*' ların izolasyonu ve sayımı önemlidir. *Pseudomonas* cinsi bakteriler buzdolabı ortamında depolanan birçok gıdadaki bozulmalardan sorumludurlar. Buzdolabında birkaç gün depolanmış olan taze etlerdeki hakim florayı oluştururlar. Raf ömrünün başlangıcında toplam mikroflorada az bir yer kaplarlar ancak; yüksek su aktivitesi, nötr pH, uygun sıcaklık ve O₂ kaynağının olması durumunda hızlı bir gelişme göstererek florada çok fazla yer kaplama durumuna geçerler (Solberg vd, 1972; Jeppesen, 1995).

Gıdaların (özellikle süt, tavuk, balık, et ve sebze) bozulmasından sorumlu olan *Pseudomonas* türleri şunlardır: *P. ambigua*, *P. coharens*, *P. convexa*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. incognata*, *P. ovalis*, *P. perolens* ve *P. putrefaciens*' dir (Keskin, 2007).

2.5.2. *Pseudomonaslar*' ın Mikrobiyolojik Özellikleri

Pseudomonas bakterileri, mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan besiyerlerinde kolaylıkla ürediklerinden dolayı izolasyonları basittir. Düşük molekül ağırlığına sahiptirler. Organik üreme faktörlerine ihtiyaçları yoktur ve otuzdan fazla organik maddeyi üremeleri için kullanırlar. Bazı türler kemolitotrofdur, hidrojen ve karbonmonoksidi enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Bu cins bakteriler aerob olmalarına rağmen nitratlı ve arjinin varlığında anaerob olarak da üreyebilirler. Çoğu türler sudanofilik cisimler halinde görülen poli β-hidroksibütirat üretir ve depo maddesi olarak bulundurur. Katı besiyerle-

rinde yuvarlak, yassı, metalik parlaklık veren koloniler halinde, kanlı besiyerinde düz, pürüzlü, tüysü kenarlı veya buzlu cam görünümde β hemolitik koloniler şeklinde, kistik fibroz hastalarında ise mukoid, yumuşak, jelatinöz koloniler şeklinde ürerler (Koneman vd., 1997; Palleroni, 1984).

Pseudomonas bakterileri pH = 5.6 ve pH = 8.0 arasında üremelerine rağmen pH = 6.6-7.0 aralığında en iyi ürerler ve ürettikleri amonyak ve bazik maddelerin etkisiyle pH değerleri yükselmektedir. pH 3.6' da ve pH 8.0' de gelişemez. Dendritik uzantısı yoktur ve ksantomonadin pigmenti üretemez. Gen transferini konjugasyon ve transdüksiyonla gerçekleştirir ve DNA' da ki G+C oranı % 58-70' dir. Halofilik bakteriler, üremeleri için minimum seviyede NaCl' e ihtiyaç duyarlar ve % 0.5-3 tuz konsantrasyonunda yaşayabilmeleri sebebiyle *Pseudomonas* bakterileri, önemsiz halofilikler olarak da bilinmektedirler (Palleroni, 1984; Gilligan, 1995).

2.5.3. *Pseudomonaslar'* ın Biyokimyasal Özellikleri

Pseudomonas' ların çoğu aerob ortamda ekstrasellüler pigment sentezler ve üredikleri ortamı da bu renklere boyarlar. Pigment özelliği, sadece *Pseudomonas'* lara özgüdür. Bu nedenle tanısal önemi vardır. Buyyonda yüzeyde zar oluşturur ve zarın altında ise mavi yeşil pigment oluşturur. Müller hinton besiyerinde mavi yeşil renginde piyosyanin üretir. Bazı türler sarı yeşil piyoverdin, kırmızı renkli piyorubin ve kahverenkli piyomelanin üretir. *Pseudomonas* kültürleri tatlı, aromatik meyve ya da trimetilamin kokusuna benzer karakteristik kokusu mevcuttur. Bu özellik 2 amino asetofenona bağlıdır. Bu oluşum sadece *Pseudomonas'* larda görülmektedir. Bu türlerde pigment üretimi yüksek fosfat konsantrasyonlarında artarken, stoklanan izolatlarda pigment oluşturma özelliklerini kaybedebilirler (Erdem, 1999; Pollack, 1995).

Pseudomonas F(flo) agarda; *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* türlerinin oluşturduğu piyoverdin (fluorescein) pigmenti, tüpte sarı renkli olarak gözlenmiştir. Wood lambası altında, UV ışığında, sadece flo agarda oluşan piyoverdin pigmenti belirlenebilmiştir. *Pseudomonas* P (tech) agarda ise sadece *P. aeruginosa'* nın oluşturduğu piyosyanin pigmentini, içinde sıvı besiyeri bulunan tüpte mavi renkli olarak gözlenmiştir (Koneman vd., 1997). Bazı *Pseudomonaslar'* ın biyokimyasal özellikleri Tablo 2.9.' da gösterilmektedir.

Tablo 2.9. Bazı *Pseudomonaslar'*ın biyokimyasal özellikleri

Biyokimyasal Testler	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>
hareket	+	+	+
Katalaz	+	+	+
Oksidaz	+	+	+
Hemoliz	+	+	+
420'de üreme	+	-	-
40°C'de üreme	-	+	+
Glukoz	+	+	+
Ksiloz	+	+	+
Mannitol	+/-	+/-	+/-
Laktoz	-	-	-
Maltoz	-	-	-
Üre	+	-/+	-/+
İndol	-	-	-
Piyosiyenin	+/-	-	-
Fluorescein	+	-/+	-/+
Pigment	Y, F, K	F	F
H ₂ S	-	-	-
Eskülin	-	-	-
DNaz	-	-	-
ONPG	-	-	-
Kirpik	1	>1	>1
N ₂ gaz	+/-	-	-

Y: Yeşil F: Floresan K: Kahverengi >1: Tek kutupta birden fazla kirpik (Erdem, 1999).

2.5.4. Pigmentasyon

Pigmentasyon, bakteriler tarafından renkli koloni üretimi veya besiyeri yüzeyine pigment salgılanması olup pigment üreten *Pseudomonas* türlerinin ayrımında kullanılan önemli bir özelliktir (Keskin ve Ekmekçi, 2003). *Pseudomonas'* lar tarafından üretilen pigmentlerin antibiyotik ve bakteriyosin özelliğine sahip olduğu belirtilmiştir (Vachee vd., 1997). Bakteriyel pigmentler sekonder metabolitlerden olup, optimum şartları çok değişken olmakla birlikte, gelişme sıcaklığı, ortamı ve besiyeri içeriklerine bağlı olarak farklı renklerde oluştururlar (Kanner vd., 1978). Hassen vd. (1998b), çalışmalarında kullandıkları *Pseudomonas* cinsine ait türlerin, çinko varlığında piyoverdin pigmentini daha fazla sentezlediklerini ve çinkonun pigment üretimini arttırdığını göstermişlerdir (Hassen vd., 1998b).

P. aeruginosa, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichorii* gibi türler, düşük demir içerikli besiyerlerinde bol miktarda floresans pigmentleri üretmekte-

dirler (Meyer ve Hohnadel, 1990; Vachee vd., 1997). Günümüzde King A (*Pseudomonas* Agar F) ve King B (*Pseudomonas* Agar P) gibi spesifik besiyerleri kullanılarak *Pseudomonas* cinsine ait türlerinin fluoresans pigmentleri üretilip üretilmediği tespit edilebilmektedir (Vachee vd., 1997; Keskin ve Ekmekçi, 2003). *P. fluorescens*' in King B besi ortamında flouresin ürettiği bildirilmiştir (Baumann vd., 1972).

Fenazinler *Pseudomonas*' ların suda çözünabilir pigmentleridir. Suda çözünen pigmentler içinde en çok bilinenleri pyoverdin ve pyocyanindir. Diğer fenazin pigmenti ise, özellikle *P. chlororaphis* için karakteristik olan, suda diğer pigmentlere kıyasla daha az çözünebilen ve koloni etrafında kristalize olma özelliğine sahip yeşil bir pigment olan klororafin (chlororaphin) dir (Kanner vd., 1978).

Lemonnierin *P. lemonnierin* suşu için karakterize olan hücre içinde bulunan çözünmeyen bir pigmenttir (Fuller ve Mellows, 1971).

Karotenoidler genellikle sarı veya turuncu renkli, suda çözünmeyen ve *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. versicularis*, *P. flava*, *P. pseudoflava*, *P. palleronii*, *P. rhodos*, *P. echinoides*, *P. radiora* gibi birçok tür tarafından üretilen pigmentlerdir (Fuller ve Mellows, 1971).

Yaşlı *Pseudomonas* kültürlerinde (10 günlük) melanin pigmentlerinin üretildiği de tespit edilmiştir (Hassen vd., 1998b).

2.5.5. Plazmid DNA

Pseudomonas' lar antibiyotiklere, metallere, antibakteriyel ajanlara, bakteriofajlara, bakteriosinlere, fiziksel ajanlara karşı dirençlilik sağlayan ve farklı metabolik özellik kazandıran, plazmidlerce taşınan genler bakımından oldukça zengindirler. Plazmidlerin bazıları gelişme şartlarında rol alırken, bazıları çeşitli ajanlara (R plazmidleri) karşı dirençliliğe, bazıları daha önce kullanılmamış karbon kaynaklarını kullanabilme kapasitesine etki ederler (Bruins vd., 2003). Böylece bu cinsin üyelerine çok yönlü fayda sağlamış olur. Son zamanlarda *Pseudomonas* cinsine ait birçok plazmid yapısı açıklanmıştır. En iyi bilineni bazı *P. putida* suşlarında bulunan TOL adındaki katabolik plazmid olup toluen, ksilen ve benzer aromatik bileşikler varlığında gelişme yeteneğini kodlamaktadır (Silver, 1992).

2.5.6. *Pseudomonas*' lar Tarafından Üretilen Ekstraselüler Enzimler

Lipazlar ve proteazlar en önemli endüstriyel enzim gruplarını oluşturmaktadır. Bu enzimler gıda sanayi, deterjan, kimya endüstrisi, biyolojik ve tıbbi bilimler gibi çok geniş kullanım alanına sahip enzimlerdir. Son zamanlarda fungal ve bakteriyel enzim eldesi biyoteknolojide büyük ilgi görmektedir. Lipaz üreten organizmalar arasında *Candida*, *Geotrichum*, *Rhizopus* ve *Thermomyces* cinsleri büyük önem görürken, bakteri grupları arasında ise *Pseudomonas* cinsi bakterilerin önem taşıdığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada izole edilen tüm *Pseudomonas* suşlarının lipaz ürettiği bildirilmiştir (Arpigny ve Jaeger, 1999).

2.5.6.1. Proteazlar

Proteazlar; doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamakta olup böylece besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerine yardımcı olmaktadır. Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık % 60' ını oluşturmaktadır. Proteazlar; çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde kullanılmaktadır. Proteazlar arasında bakteriyel proteazlar, diğer türlere göre daha etkindir (Kıran vd., 2006).

Sütte bulunan birçok *Pseudomonas* türü tarafından üretilen proteazlar; UHT ve pastörizasyon işlemlerine dayanıklıdır (Koka ve Weimer, 2000; Rajmohan vd., 2002). *Pseudomonas* spp. ve özellikle de *Pseudomonas fluorescens*; süttten izole edilen ve proteolitik aktivite gösteren psikrotrof bakteriler arasında en yaygın olanıdır (Akoğlu, 2006).

2.5.6.2. Lipazlar

Süt ve süt ürünlerinde *Pseudomonas*' lar tarafından üretilen bir başka yapı da lipolizdir. Lipazlar, suda çözünmeyen trigliseritleri; di ve mono- gliseridlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Çiğ sütlerden izole edilen lipolitik bakterilerin idenfikasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda bu enzim ile ilgili olarak en yüksek aktivitesinin *Pseudomonas* türlerinde sağlandığı belirlenmiştir (Akoğlu, 2006).

Lipaz üreten mikroorganizmalar doğada çok geniş bir yayılım göstermektedir. Lipolitik

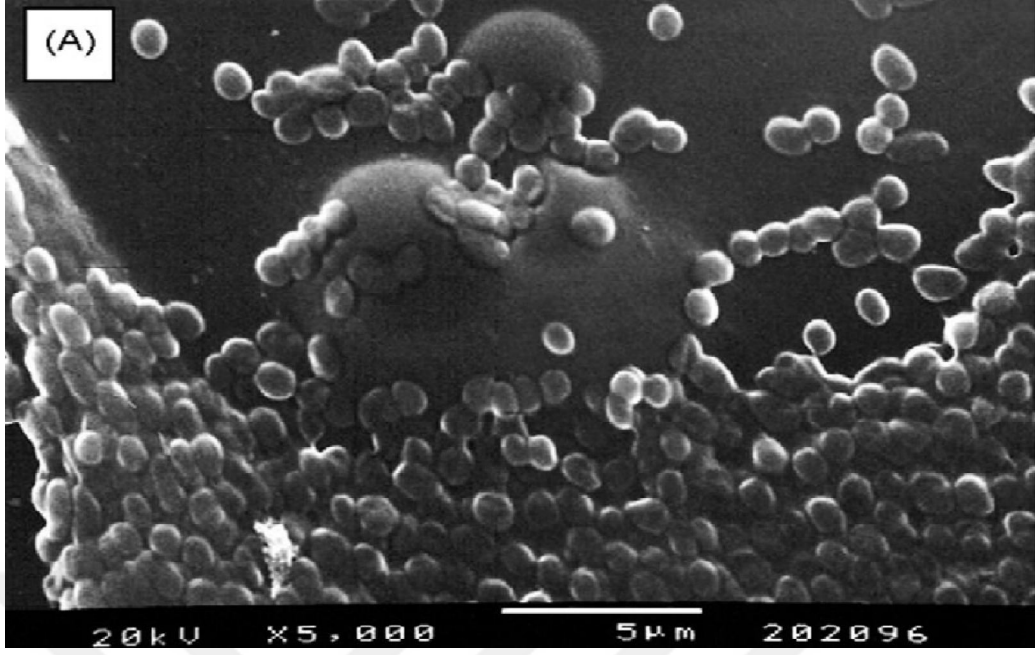
aktivite gösteren bakteri türleri *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella* ve *Staphylococcus*; küf türleri *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* ve *Penicillium*' dur. Lipolitik aktivite gösteren maya türleri ise; *Candida*, *Rhodotorula* ve *Hansenula* cinsleri içinde yer almaktadır (URL-4, 2000).

Bakteriyel lipazlar arasında özellikle *Pseudomonas* cinsine ait lipazlar, biyoteknolojik açıdan özel bir ilgiye sahip olup, endüstriyel uygulamalarda ve organik sentezinde önemli bir rol oynamaktadır (Arpigny ve Jaeger, 1999).

2.5.7. *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas cinsi bakteriler, *Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alırlar. Bu bakterilerin çoğu doğada toprak ve sularda yoğun olarak bulunmakla birlikte bazı türleri insan, hayvan ve bitki patojenidir. Türlerinin tamamı katalaz pozitif, gram negatif, aerobik, polar flagellasıyla hareket edebilen çubuk şekilli bakterilerdir ve hatta; glukozu oksidasyon yoluyla parçalayabilen bakterilerdir. Kendi gelişmeleri için gerekli olan gelişme faktörlerini ve vitaminleri sentezleme yeteneğine de sahiptirler. Isı ve radyasyonla kolaylıkla inhibe olup oksijensiz koşullarda ve 42 °C sıcaklığın üzerinde çoğalamazlar (Pelczar ve Reid, 1958; Tortora vd., 1992; Ayhan, 2000). *Pseudomonas*' lar lipolitik ve proteolitik aktivite-leri sonucunda gıdalarda istenmeyen tat, renk ve koku oluşturlar (Solberg vd., 1972; Jeppesen, 1995). *Pseudomonas* suşlarının çoğu kültür ortamında pigment üretirler. Pigment oluşumu kültür koşullarına bağlıdır. Mutasyonla bu özellik kaybolur ya da aynı anda birçok pigment oluşumu da görülebilir. Bu pigmentler oksijensiz ortamda oluşmazlar, oda sıcaklığında daha iyi oluşum gösterirler (Davis vd., 1968; Aydın, 2001). Floresan pigmentler, floresan özellik taşıyan *Pseudomonas*' ların (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. cichori*, *P. flavescens*) karakteristiğidir (Wilson ve Miles, 1964; Aydın, 2001).

Pseudomonas fluorescens non-patojenik saprofit olup gram negatif bir bakteridir. Çok yönlü bir metabolizmaya sahiptir, su, toprak ve bitki yüzeyinde bulunabilir. Obligat aerobiktir ancak bazı suşları hücresel solunumda elektron akseptörü olarak oksijen yerine nitrat kullanabilirler. Kolonileri yuvarlak, nemli ve parlak yüzeylidir. Sarımsı yeşil pigment oluşturlar. *Pseudomonas fluorescens* hücreleri 41 °C' de üreyemez fakat +4 °C' de üreyebilirler, optimum büyüme sıcaklıkları ise 25-30 °C'dir. Fizyolojik ve genetik özelliği sayesinde biyoteknolojide kullanım alanları giderek artmaktadır (Wasi vd., 2008).



Şekil 2.6. *Pseudomonas fluorescens* hücrelerine ait taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsü (Odacı vd., 2008).

P. fluorescens, üstel büyüme fazında rodları 0.7-0.8 µm ile 2.3-2.8 µm arasında değişen, yaşlı kültürlerde daha kısa ve ince olabilen gram-negatif bir bakteridir. Tek veya çift halinde çoğalabilir. Polar multitrik flagellasyon ile hareket eder, bezende hareketsizdir. Kültürleri, özellikle demir olmayan ortamlarda dağılabilir, floresan pigmentler üretir. Bazı suşları dağılmayan mavi pigmentler üretmektedir.

Organik büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz. Farklı suşları 80' den fazla farklı karbon kaynağı kullanabilir. Denitrifikasyon yeteneğine sahip ve nitratlı ortamda anaerobik şartlarda büyüeyebilen suşları dışında zorunlu aerobiktir. Toprak ve sudan, ayrıca çeşitli karbon kaynakları ile zenginleştirilmiş aerobik ortamda inkübe edildikten sonra izole edilebilirler. Ayrıca *P. fluorescens* genel olarak gıdaların bozulmasına (yumurta, balık, süt ve et) neden olur (Buchanan ve Gibbons, 1974). Biyotip I, II, III ve IV olmak üzere dört farklı biyotipi vardır. Genel olarak Biyotip I lipolitik, Biyotip II lipolitik değildir, diğer biyotipler için ise lipolitik özellik değişkendir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Mikroorganizma ve Üretimi

Deneyisel çalışmalarda American Type Culture Collection (A.T.C.C)' den temin edilen *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-2641) bakterisi kullanılmıştır. Bakteri kültürü liyofilize halde getirilmiş olup, önce içinde nütrient agar ortamı bulunan petri kutuları ve tüplerde, 30 °C' deki etüvde üretilerek aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen mikroorganizmalar daha sonra bu ortamlardan zengin sıvı besin ortamlarına aktarılmıştır. Mikroorganizmanın ekileceği zengin besi ortamının bileşimi Tablo 3.1.' de gösterilmektedir. İstenilen sayıdaki erlenlerin her birine Tablo 3.1.' de yer alan zengin sıvı besiyeri koyulmuş, erlenlerin ağzı pamuk tıkaç ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyerleri 1.1 atm ve 121 °C' de otoklavlanarak steril edilmiştir. Üretime hazırlanan bu besiyerleri steril koşullarda oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Uygun koşullarda soğutulan besiyerlerinin her birine steril koşullarda (ekim işleminin gerçekleştirildiği çevre, ekimden belli bir süre önce UV lambası kullanılarak sterilize edilmiştir. Ekimler bek alevi karşısında, sterilizasyonun bozulmacağı şekilde yapılmıştır) 1/10 oranında *P. fluorescens*' in ekimi yapılmıştır. Ekim işleminin sonra erlenler 30 °C sıcaklık, pH 7' de, 24 saat süre ile 150 rpm hızındaki çalkalayıcılara yerleştirilerek üremenin sağlanması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. *P. fluorescens* ' in üretiminde kullanılan zengin sıvı besiyerinin bileşimi

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Glukoz	5
Maya özütü	1
Bakteriyolojik pepton	1
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
(NH ₄) ₂ .SO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.005

3.2. Enzim Üretim Ortamı

Bu çalışmada *P. fluorescens* ile pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz üretimi kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Enzim üretim çalışmalarında kullanılan besiyerinin bileşimi Tablo 3.2' de verilmiştir. Kesikli düzende derin kültürde yürütülen fermentasyon çalışmaları; 150 mL çalışma hacmindeki 500 mL 'lik erlenlerde, katı hal fermentasyon deneyleri ise 100 mL çalışma hacmindeki 250 mL 'lik erlenlerde yürütülmüştür. Erlenler sabit karıştırma ve çalkalama hızına sahip çalkalayıcılara yerleştirilmiş ve belli bir süre fermentasyona tabi tutulmuştur. Tüm deneylerde zengin besiyerinde üretilen mikroorganizmalar, 1/10 oranında enzim üretim ortamına ilave edilmiş, fermentasyon çalışmaları 30 °C sıcaklık ve 150 rpm karıştırma hızında yapılmış ve enzim üretimine çeşitli parametrelerin etkisi incelenmiştir.

Tablo 3.2. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan besin ortamı (Ouattara vd., 2008).

Bileşen	Miktar (%)
Elma pektini	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.14
KH ₂ PO ₄	0.2
K ₂ HPO ₄	0.6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.01

Enzim üretimi için kullanılan besin ortamını içeren erlenler ve ayrıca ekim işleminde kullandığımız tüpler, pipetler de otoklavda steril lenmiştir. Sterillenerek üretime hazırlanan bu besiyerlerine; birgün öncesinden 24 saat süre ile zengin besiyerinde üretilen *P. fluorescens*' in ekimi steril koşullarda yapılmıştır.

Deneylerde katı substrat olarak kullanılan buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, portakal kabuğu, elma posası, muz kabuğu ve ayçekirdeği tablası çeşitli yerel pazarlardan ve fabrikalardan tedarik edilmiştir. Bunlar; saf su ile yıkanarak 60 °C' deki etüvde 24 saat süre kurutulmuştur. Kurutma işleminden sonra öğütülmüş ve farklı boyutlardaki eleklerde elenmişlerdir.

Katı ve sıvı besin ortamında aktif halde üretilmiş mikroorganizma içeren tüp ve erlenler, 4 °C' de buzdolabında saklanmıştır. Buzdolabında saklanan mikroorganizma 15 günde bir yeni besin ortamlarına nakledilerek mikroorganizmanın aktifliğini koruması sağlanmıştır.

3.3. Analiz Yöntemleri

P. fluorescens ile yapılan enzim üretim çalışmalarında belli aralıklarla fermantasyon ortamından alınan numuneler 5000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek mikroorganizmadan ayrılmıştır. Elde edilen sıvı kısım enzim kaynağı olarak kullanılarak, enzim aktivitesi ve diğer parametreler belirlenmiştir. Tüpte kalan mikroorganizma kütlesi ile mikroorganizma gelişimi takip edilmiştir.

3.3.1. Mikroorganizma Derişimi Tayini

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan mikroorganizma çözeltilerinin 400 nm dalga boyunda absorbanslarının okunmasıyla yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek için; mikroorganizma etüvde kurutulduktan sonra kuru ağırlığa karşı yaş ağırlık grafiğe geçirilerek, yaş-kuru ağırlık kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve bu kalibrasyon doğruları kullanılarak kuru mikroorganizma ağırlığı g/L olarak belirlenmiştir (EK: 1).

3.3.2. Enzim Aktivite Tayini

Yapılan tez çalışmasında pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktivite tayinleri yapılmıştır.

3.3.2.1. Pektin Liyaz Aktivitesi

Pektinaz grubu enzimlerden pektin liyaz aktivitesi; Ramachandran (2005) tarafından önerilen metodun düzenlenmesiyle belirlenmiştir. Bir birim aktivite, ölçüm şartları altında birim zamanda birim hacimde 0.01 absorbans değişimine neden olan enzim miktarıdır. Bu yöntemde kullanılan reaktifler aşağıda yer almaktadır:

- Tris HCl Tampon, 0.05, pH 8.5
- Pektin, %1.0 (w/v) Tris HCl Tamponda hazırlanmış
- CaCl_2 , 0.01 M distile suda hazırlanmış

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %9.0 (w/v) distile suda hazırlanmış
- NaOH , 0.5 M distile suda hazırlanmış
- Tiyobarbiturik Asit, 0.04 M distile suda hazırlanmış
- HCl , 0.1 M distile suda hazırlanmış

Bu yöntemin uygulama aşamaları aşağıda verilmektedir:

1. İstenilen sayıdaki tüplerin her birine; 5.0 mL pektin çözeltisi, 1 mL 0.01 M CaCl_2 çözeltisi, 1.0 mL enzim çözeltisi eklenerek toplam hacim 10.0 mL olacak şekilde üzerlerine saf su eklenir.
2. Tüpler karıştırıldıktan sonra 75 °C' de 2 saatliğine etüvde inkübe ettirilir. Bu sırada şahit çözelti de hazırlanır. Şahit çözelti hazırlamak için tüpün içine sırasıyla; 5.0 mL pektin çözeltisi, 1 mL 0.01 M CaCl_2 çözeltisi, 1 mL Tris HCl tamponu eklenerek toplam hacim 10. 0 mL olacak şekilde üzerine saf su eklenir.
3. Süre sonunda etüvden alınan tüpler soğutulur. Daha sonra şahit çözelti de dahil olmak üzere tüplerin her birine 0.6 mL % 9 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 0.6 mL 0.5 M NaOH çözeltileri ilave edilir.
4. Bu şekilde hazırlanan tüpler karıştırılır ve 5 dakikalığına santrifüjlenirler.
5. Santrifüjleme işleminden sonra her bir tüpten 5.0 mL örnek alınıp başka deney tüplerine aktarılır.
6. Bu deney tüplerinin her birine sırasıyla; 3 mL 0.04 M Tiyobarbiturik Asit, 1.5 mL 0.1 M HCl asit eklenerek toplam hacim 10.0 mL olacak şekilde üzerlerine saf su eklenir.
7. Tüplerin ağzı kapatılarak içi su dolu bir beher içinde 30 dakikalığına kaynamaya bırakılır.
8. Kaynatma işleminden sonra tüpler soğumaya bırakılır ve 550 nm' de absorbansı okunur.

3.3.2.2. Ekzo Pektinaz Aktivitesi

Ekzo pektinaz tayini, pektinin parçalanması sonucu oluşan indirgenmiş şekerlerin ölçümüyle yapılır (Miller, 1959). Bir birim ekzo pektinaz aktivitesi, birim zamanda (dakika) 1 μmol galakturonik asit salıveren enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemin

uygulama aşamaları ve kullanılan DNS çözeltisinin nasıl hazırlandığı aşağıda yer almaktadır:

1. % 1 pektin çözeltisi hazırlanır. Pektin çözeltisinin pH' ı 8.0' e ayarlanır.
2. DNS Çözeltisi; % 1 DNS, % 0.2 Fenol, % 0.05 Sodyum Sülfid, % 1 Sodyum Hidroksit, % 30 Sodyum Potasyum Tartarat karıştırılarak saf su ile 100 mL 'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
3. Her bir tüpe 0.25 mL pektin çözeltisi ve 0.25 mL enzim örneği konulur. Şahit numune-ye ise 0.25 mL pektin çözeltisi ve 0.25 mL pH 8.0 tamponundan konulur.
4. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 40 °C' ye ayarlanan termoreaktöre yerleştirilir ve 15 dakika boyunca inkübe edilir.
5. Reaktörden çıkartılan tüpler soğumaya bırakılır ve her birine 0.5 mL DNS çözeltisinden eklenir. Ve tüpler tekrar karıştırılır.
6. Bu şekilde hazırlanan tüpler 5 dakika boyunca kaynayan su banyosunda bekletilmiştir.
7. Kaynama işleminden sonra tüpler soğuk suda hemen soğutulmuştur.
8. Soğutulan tüplere her birine 9 mL saf su eklenerek 530 nm dalga boyunda şahit çözeltiye karşı okunmuştur.
9. Galakturonik asit miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır.

EK: 2' de verilen kalibrasyon eğrisi; yukarıda belirtilen aşamalara göre konsantrasyonu bilinen miktarlarda galakturonik asit içeren standartlar kullanılarak hazırlanmıştır.

3.3.2.3. Endo Pektinaz Aktivitesi

Endo pektinaz aktivitesi viskozimetrik olarak ölçülmüştür (Tuttobello ve Mill, 1961; Mill ve Tuttobello, 1961). Bu yöntemin uygulama aşamaları aşağıda yer almaktadır:

1. Tüplerin her birine 1 mL enzim örneği ve Tris-HCl tamponu ile pH' ı 8.0' e ayarlanmış olan % 0.5 pektin çözeltisinden 19 mL alınarak tüpler karıştırılır. Ayrıca; bu yöntemde Şahit çözeltiye gerek yoktur.
2. Tüpler 40 °C' de 15 dakika inkübe edilir.
3. İnkübasyondan sonra, viskozitedeki azalma vibroviskometre ile takip edilir.

Bir birim endo pektinaz aktivitesi; yukarıda açıklanan şartlar altında dakikada çözeltinin viskozitesini % 50 azaltan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

3.3.2.4. Protein Tayini

Üretim ortamındaki toplam protein miktarını belirleyebilmek için, Lowry ve diğerleri (1951) tarafından verilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Protein tayininde kullanılan reaktifler aşağıda yer almaktadır:

Reaktif 1: % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Reaktif 2: % 2 Na-K-Tartarat

Reaktif A: 0.1 N NaOH içinde % 2' lik Na_2CO_3 (2 gr Na_2CO_3 + 0.4 gr NaOH/100 mL)

Reaktif B: 1 mL **Reaktif 1** + 1 mL **Reaktif 2** alınarak 100 mL' ye **Reaktif A** ile tamamlanır.

Reaktif C: Folin Ciocalteu Fenol Reaktifi distile su ile 1/1 oranında seyreltilir.

Bu yöntemin uygulama aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Tüplerin her birine 0.5 mL seyreltilmiş enzim örneğinden konulur. Şahit çözeltiye ise 0.5 mL saf su konulur.
2. Daha sonra tüplerin her birine 2.5 mL Reaktif B eklenir ve tüpler karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.
3. Oda sıcaklığında beklemiş olan tüplerin her birine 0.25 mL Reaktif C eklenir ve tüpler karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir.
4. Daha sonra 660 nm dalga boyunda şahit çözeltiye karşı okuması yapılır.
5. Protein miktarları oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

EK: 3' te gösterilen derişim-absorbans kalibrasyon eğrisi; bovine serum albuminin (BSA) derişimi bilinen örneklerinden yararlanılarak hazırlanmıştır.

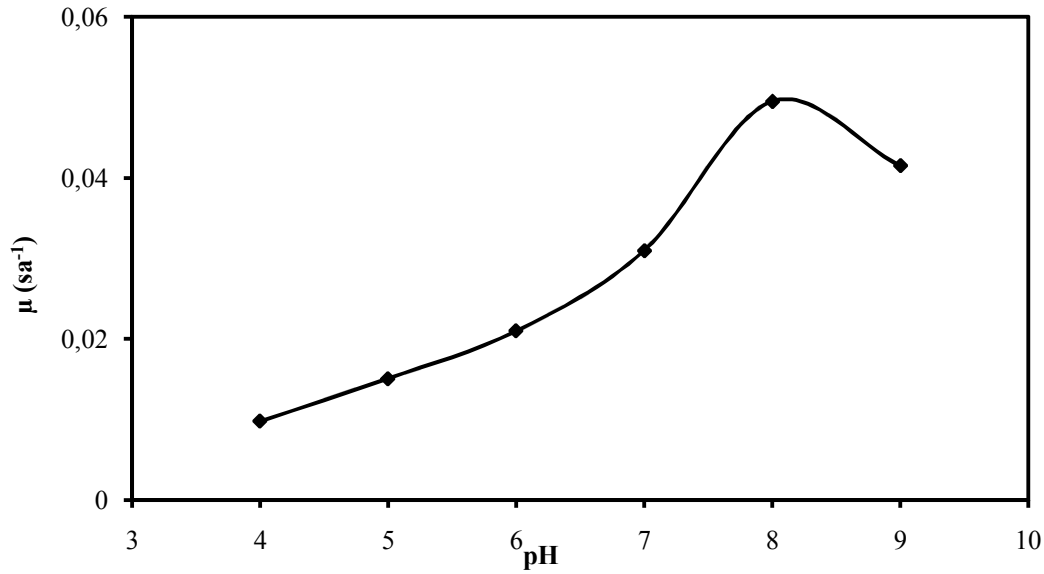
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada; *P. fluorescens* ile pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz üretimi kesikli sistemde derin kültür ve katı hal fermantasyonları ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında derin kültür fermantasyonu deneyleri yapılmış ve ortam pH' ı, başlangıç pektin konsantrasyonu, farklı azot kaynakları ve metal tuzları gibi parametrelerin mikroorganizma özgül üreme ve enzim üretimine etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında, pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH ve sıcaklık belirlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise katı hal fermantasyonu deneyleri yapılmıştır. Çeşitli tarımsal ve tarıma dayalı endüstriyel atıklar kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiş ve en yüksek aktivitelerin elde edildiği katı substratlar belirlenmiştir.

4.1. Derin Kültür Fermantasyon Çalışmaları

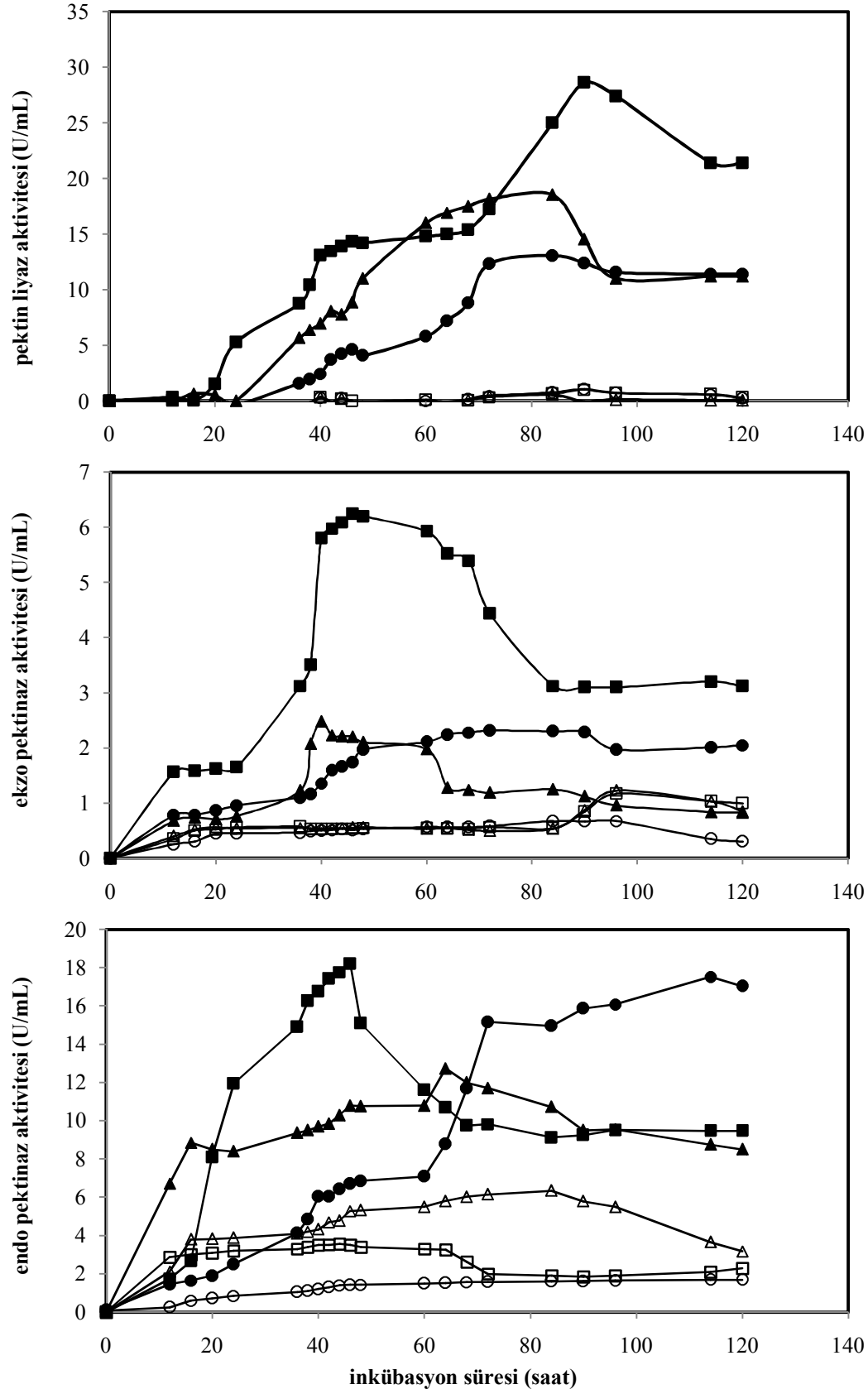
4.1.1. Başlangıç pH' ının Etkisi

Ortam pH' ı mikroorganizmanın üremesi ve substrat tüketimi sırasında oluşan enzimatik tepkimeleri etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Derin kültür fermantasyonunda, başlangıç pH' ı 4-9 aralığında değiştirilmiş ve ortam pH' ının mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim üretimine etkisini incelenmiştir. Şekil 4.1.' de görüldüğü gibi mikroorganizma özgül üreme hızları pH' ın artmasıyla artmış ve en yüksek değer pH 8 değerinde 0.0495 (sa⁻¹) olarak elde edilmiş, daha yüksek pH' larda ise düşüş belirlenmiştir.



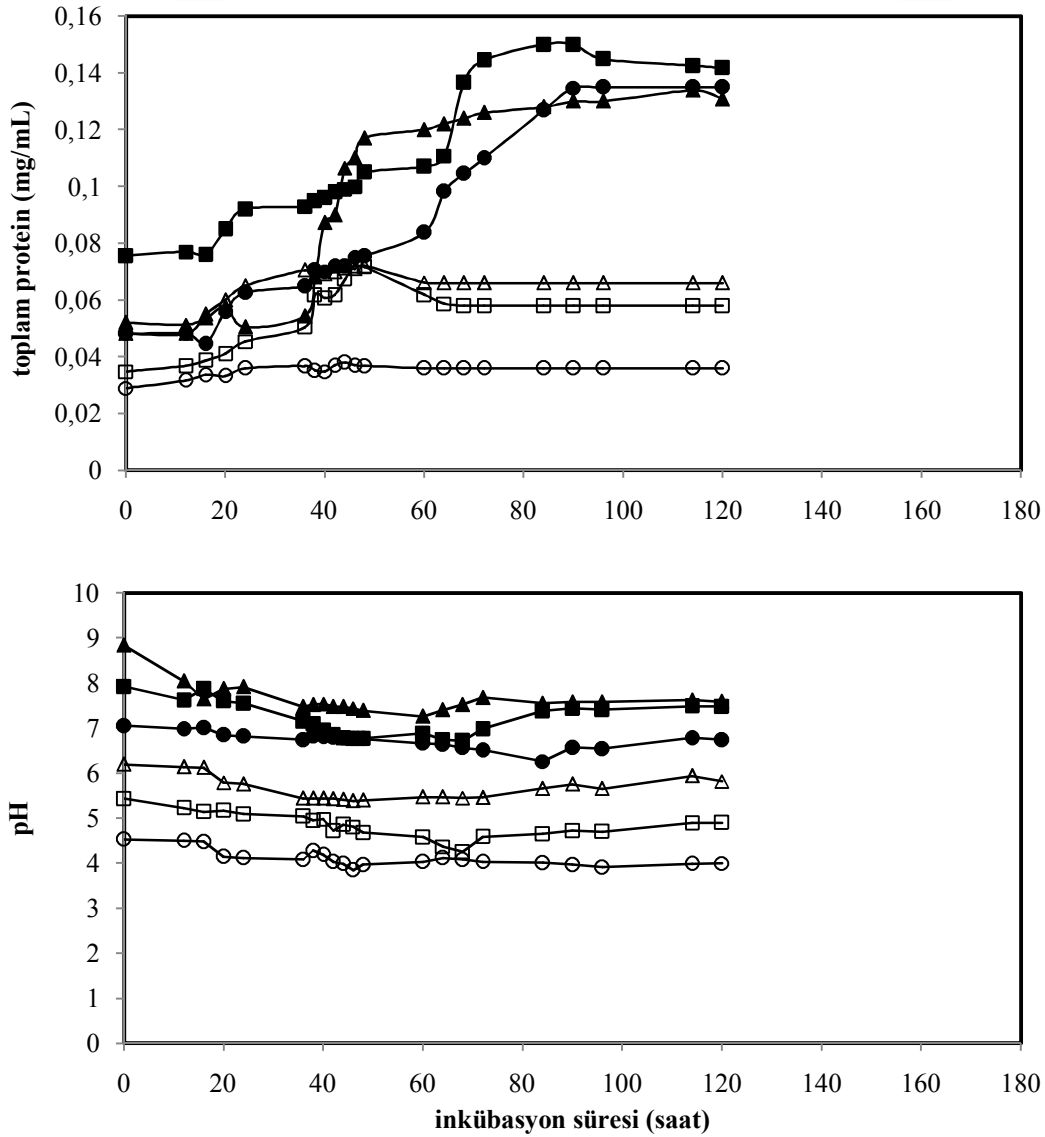
Şekil 4.1. Farklı pH değerlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları [T : 30 °C, KH : 150 rpm, % 1 (w/v) pektin kons., % 10 aşı oranı]

Şekil 4.2.' de ise çalışılan pH değerlerinde elde edilen enzim aktiviteleri verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, pH' ın yükselmesi ile enzim aktivite değerleri artmış, pH 8 de en yüksek pektin liyaz aktivitesi 90. Saatte 28.33 U/mL, ekzo pektinaz aktivitesi 46. Saatte 6.25 U/mL, endo pektinaz aktivitesi 46. saatte 18.20 U/mL olarak kaydedilmiştir. Ortam pH' ının daha fazla artırılmasıyla enzim aktivite değerleri düşmüş ve pH 8, daha ilerideki çalışmalarda kültür ortamının pH değeri olarak seçilmiştir. Bakteriyel pektinaz grubu enzimlerin üretiminde, mikrobiyal üreme ve enzim üretimi için optimum pH, 7.0-10.0 aralığında verilmektedir (Ahlawat vd., 2009). Enzimin salgılandığı ortam pH' ı, enzimin birincil ve ikincil yapısını oluşturan aminoasitlerin iyonizasyon durumunu etkiler. Fermantasyon ortamı pH' ı ayrıca enzimin kararlılığı ile de doğrudan bağlantılıdır. Örneğin, *P. expansum*' un ürettiği pektin liyaz enziminin optimum pH' ını bulmak için yapılan çalışmalar sonucunda, enzimin optimum pH' ının 7.0 olmasına karşın enzimin pH 6.5-8.0 arasında kararlılığını muhafaza ettiği görülmüştür (Piccoli-Valle vd., 2001).



Şekil 4.2. Farklı pH değerlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi [T : 30 °C, KH : 150 rpm, % 1 (w/v) pektin kons., ○: pH 4, □: pH 5, △: pH 6, ●: pH 7, ■: pH 8, ▲: pH 9]

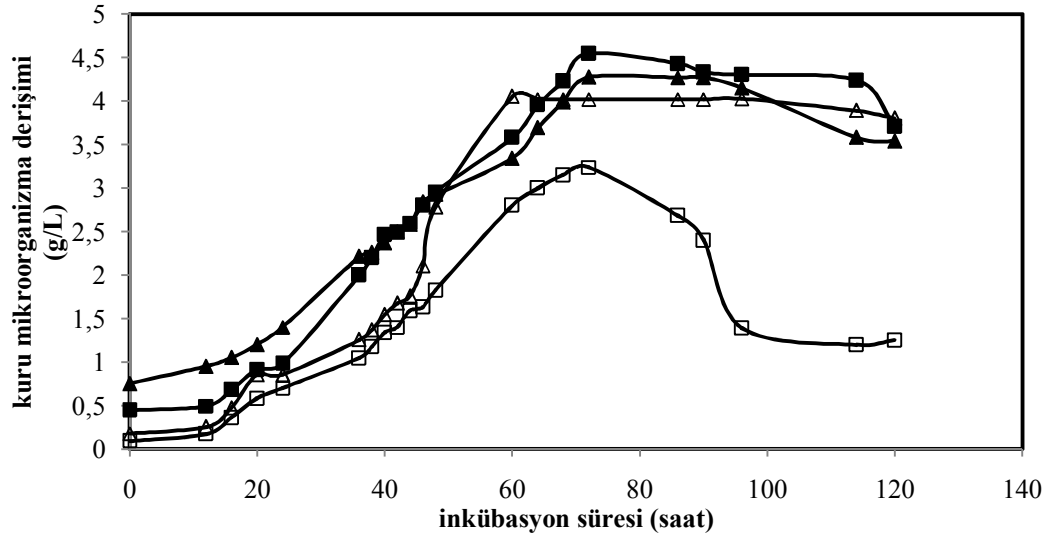
Şekil 4.3.' te çeşitli pH' larda inkübasyon süresi ile ölçülmüş olan toplam protein derişimleri verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmış ve en yüksek protein konsantrasyonu pH 8' de 0.15 mg/mL olarak kaydedilmiştir. Şekil 4.3.' te ayrıca farklı başlangıç pH değerlerinde fermantasyon ortamının pH' ının zamanla değişimi de sunulmuştur. Görüldüğü gibi ortam pH' ı, zamanla çok fazla değişmemekle birlikte ufak farklılıklar göstermiş, pH 8 ve 9 değerinde zamanla belli bir değere kadar azalmış ve sonra hafif artışa geçmiştir. Pektinaz üretimi sırasında kültür pH' ındaki bu benzer değişim çeşitli araştırmacılar tarafından da gözlemlenmiştir (Galiotou-Panayotou vd., 1997).



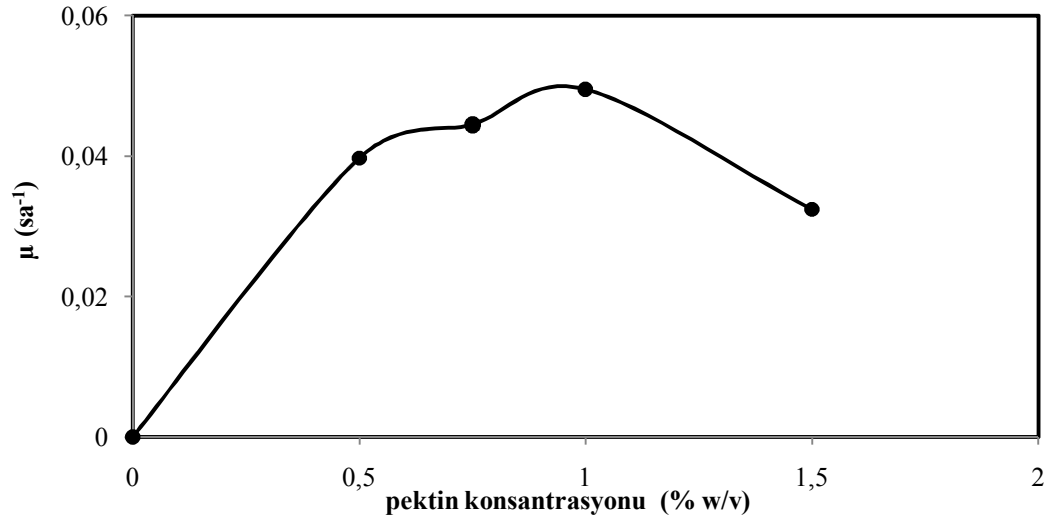
Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinde toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi [T : 30 °C, KH : 150 rpm, % 1 (w/v) pektin kons., ○: pH 4, □: pH 5, △: pH 6, ●: pH 7, ■: pH 8 ▲: pH 9]

4.1.2. Başlangıç Pektin Derişiminin Etkisi

Başlangıç substrat derişimi mikroorganizma üreme ve enzim üretimini etkilemekte böylece fermantasyon işlemlerinde en önemli parametrelerden biri haline gelmektedir. Literatürde pektinin mikrobiyal pektik enzimlerin üretiminde bir indükleyici olarak görev aldığı yer almaktadır (Dhillon vd., 2004). Bu çalışmada pektin derişiminin kuru mikroorganizma derişimi, mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla pektin derişimi % 0.5-1.5 (w/v) aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.4.' te sabit sıcaklık, karıştırma hızı ve değişik pektin derişimlerinde elde edilen mikroorganizma üreme eğrileri yer almaktadır. Şekilde görüldüğü gibi tüm pektin derişimlerinde yaklaşık 12 saatlik gecikme (lag) fazından sonra mikroorganizmalar üremeye başlamakta ve daha sonra üstel üreme bölgesi gözlenmektedir. Maksimum kuru mikroorganizma derişimi, pektin derişiminin % 0.5 (w/v)' ten % 1.0 (w/v)' e artırılmasıyla, ortamdaki substrat derişiminin artması nedeniyle, 3.24 g/L' den 4.55 g/L' ye artmış, pektin derişiminin daha fazla (% 1.5 (w/v)) artırılmasıyla substrat inhibisyonu nedeniyle 4.27 g/L' ye düşmüştür. Şekil 4.5.' te ise farklı pektin derişimlerinde hesaplanan mikroorganizma özgül üreme hızı değerleri sunulmuştur. Maksimum mikroorganizma özgül üreme hızı % 1.0 (w/v) pektin derişiminde 0.0495 (sa⁻¹) olarak elde edilmiş, daha yüksek ve daha düşük pektin derişimlerinde mikroorganizma özgül üreme hızlarında düşüş gözlenmiştir. Mikroorganizma özgül üreme hızının % 1.0 (w/v) pektin derişiminden sonra düşmesi yine substrat inhibisyonuyla açıklanabilir. Düşük substrat derişimlerinde üreme hızı substrat derişimiyle artar ve bir maksimuma ulaşır. Substrat derişiminin daha da artmasıyla üreme hızı azalmaya başlar. Bu olay, substrat inhibisyonu olarak adlandırılır (Shuler ve Kargı, 2002; Türker, 2005).

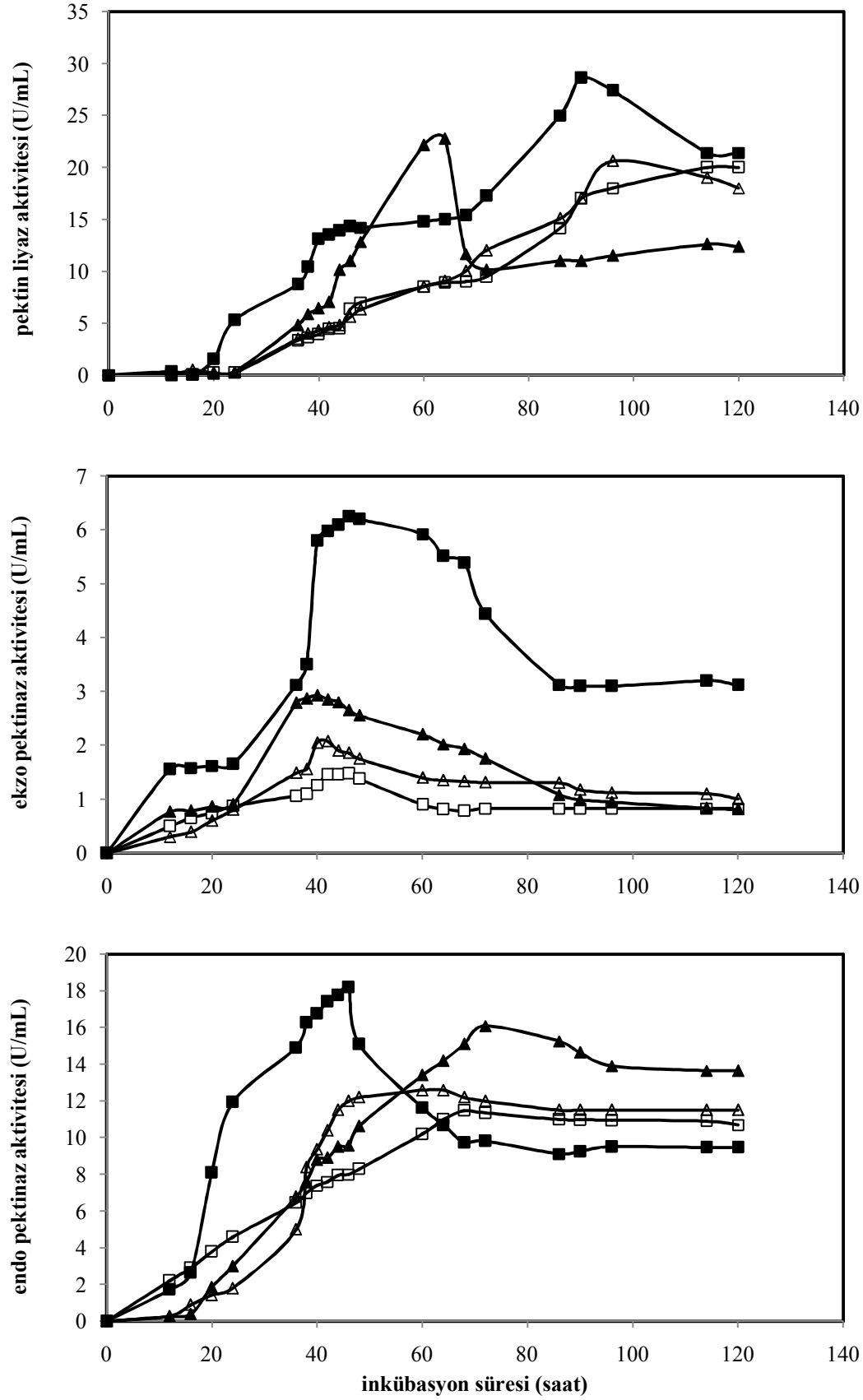


Şekil 4.4. Farklı pektin derişimlerinde kuru mikroorganizma derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm, □: % 0.50, △: % 0.75, ■: % 1, ▲: % 1.50 (w/v)]



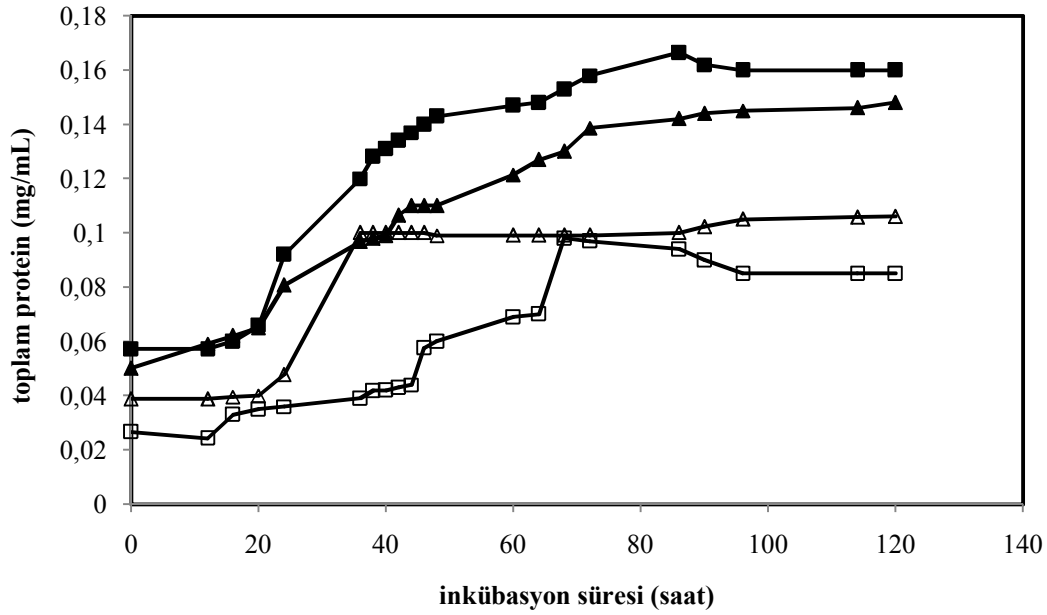
Şekil 4.5. Farklı pektin derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları (pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm)

Şekil 4.6.' da ise farklı pektin derişimlerinde elde edilen pektin liyaz, endo ve ekzo pektinaz aktivite değerleri görölmektedir. Kuru mikroorganizma derişimi ve mikroorganizma özgül üreme hızı değerlerinde olduğu gibi pektin derişiminin % 0.5 (w/v)' ten % 1.0 (w/v)' e artırılmasıyla enzim aktivite değerleri de artmış ve en yüksek pektin liyaz aktivitesi % 1 (w/v) pektin derişiminde 90. saatte 28.63 U/mL, ekzo pektinaz aktivitesi 46. saatte 6.25 U/mL ve endo pektinaz aktivitesi 46. saatte 18.20 U/mL olarak belirlenmiştir. Pektin derişiminin daha fazla artırılmasıyla substrat inhibisyonu sonucu; kuru mikroorganizma derişimi ve özgül üreme hızı değerleriyle birlikte pektin liyaz, endo ve ekzo pektinaz aktivite değerlerinde de düşme gözlenmiştir.



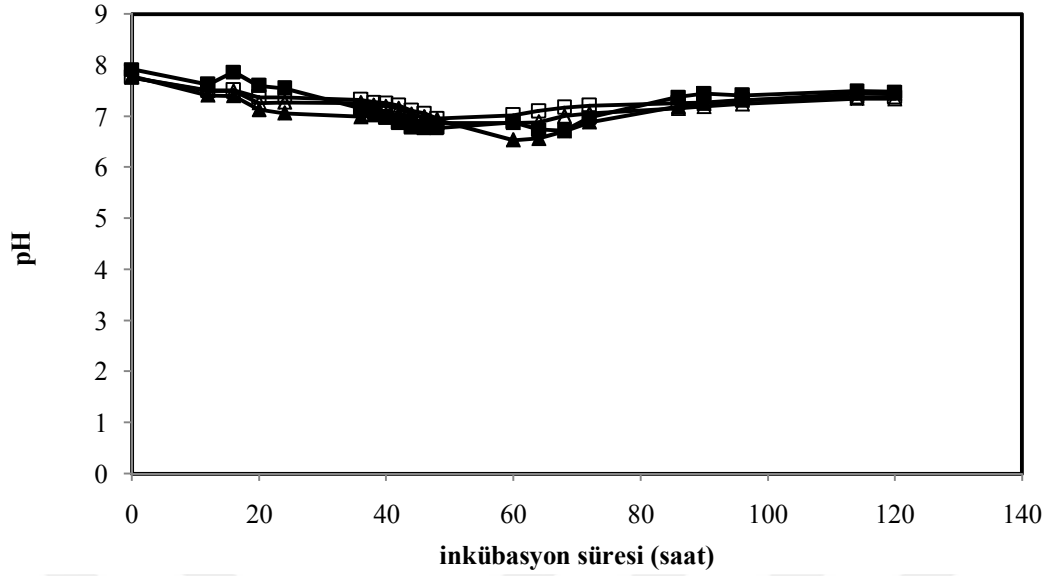
Şekil 4.6. Farklı pektin derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm, $\square$: % 0.50, $\triangle$: % 0.75, $\blacksquare$: % 1, $\blacktriangle$: % 1.50 (w/v)]

Şekil 4.7.' de toplam protein derişiminin zamanla değişimi verilmiştir. Toplam protein miktarı da benzer şekilde pektin derişiminin % 0.5 (w/v)' ten % 1.0 (w/v)' e artırılmasıyla artmış, daha fazla artırılmasıyla da dūřmūřtur. Maksimum protein derişimi % 1.0 (w/v) pektin derişiminde 86. saatte 0.17 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Farklı pektin derişimlerinde toplam protein derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C KH : 150 rpm, □: % 0.50, △: % 0.75, ■: % 1, ▲: % 1.50 (w/v)]

Şekil 4.8.' de ise ortam pH' ın zamanla değişimi verilmiştir. Şekil incelendiğinde ortam pH' larının önce bir miktar dūřtūęu sonra yūkselerek başlangıç değerlerine ulaştığı gōrūlmektedir. Fermantasyon sırasında kūltür sıvısının pH' ındaki azalma, pektinin dees-terfikasyonu sonucu pektik asitlerin birikiminden kaynaklanabilir. pH' daki bu azalma en-zim salgılanmasını teşvik edebilir (Stutzenberger, 1987). Fermantasyon proseslerindeki pH artışı ise, protein metabolizması sonucu amonyak açığa çıkışı ve enerji kaynağı olarak aminoasit kullanımı ile bağlantılıdır. Dięer muhtemel alkali-oluşturan metabolik reak-siyon, organik asit anyonlarının oksidasyonudur. Fermantasyonda, protein ve aminoasitle-rin esas karbon ve enerji kaynağı olmadığı dūřūnūlrse, bu pH artışının asit kullanımından kaynaklandığı açıktır (Silva vd., 2005).



Şekil 4.8. Farklı pektin derişimlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değışimi [pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm, □: % 0.50, △: % 0.75, ■: % 1, ▲: % 1.50 (w/v)]

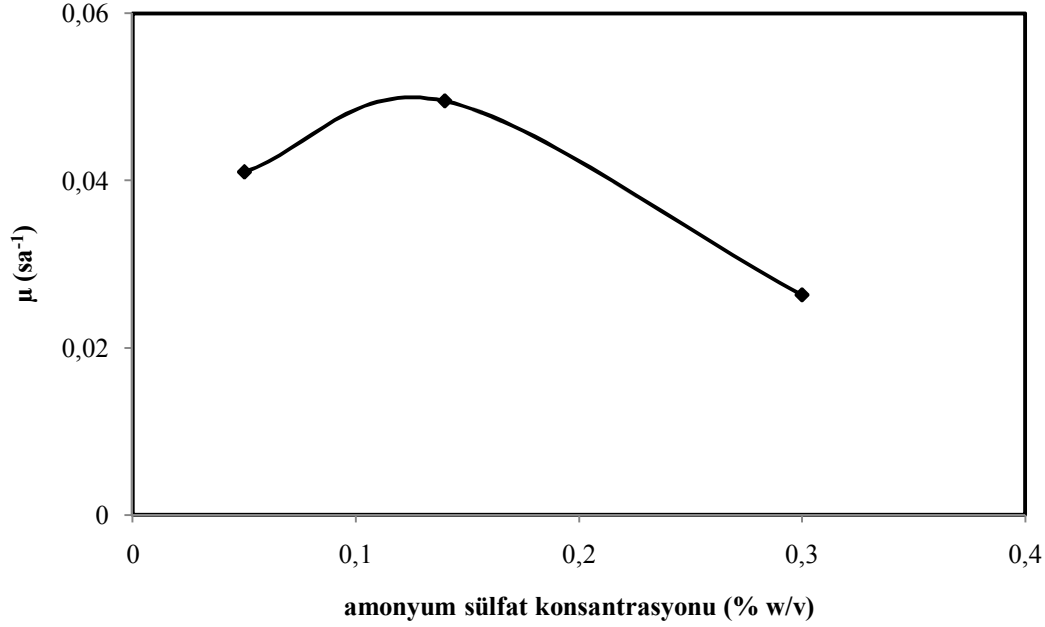
4.1.3. Azot Kaynaklarının Etkisi

Fermantasyon ortamında bulunan azot kaynakları ve konsantrasyonları, mikrobiyal büyüme ve enzim üretiminde önemli bir role sahiptir (Nabi vd., 2003). Enzim üretiminde farklı azot kaynaklarının etkisini araştırmak ve en uygun azot kaynağını belirlemek amacıyla yapılan deneylerde Tablo 3.2.' de verilen besi ortamı kullanılmıştır. Bu amaçla besin ortamında diğer ortam bileşenleri sabit tutulmuş, azot kaynağı değiştirilmiştir. Azot kaynağı olarak; amonyum sülfat, maya özütü ve pepton, sıvı besiyerine % 0.05, % 0.14 ve % 0.3 (w/v) oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. Zamana karşı alınan örneklerde mikroorganizma özgül üreme hızları, enzim aktiviteleri ve toplam protein derişimleri tayin edilmiştir.

4.1.3.1. Amonyum Sülfat Derişiminin Etkisi

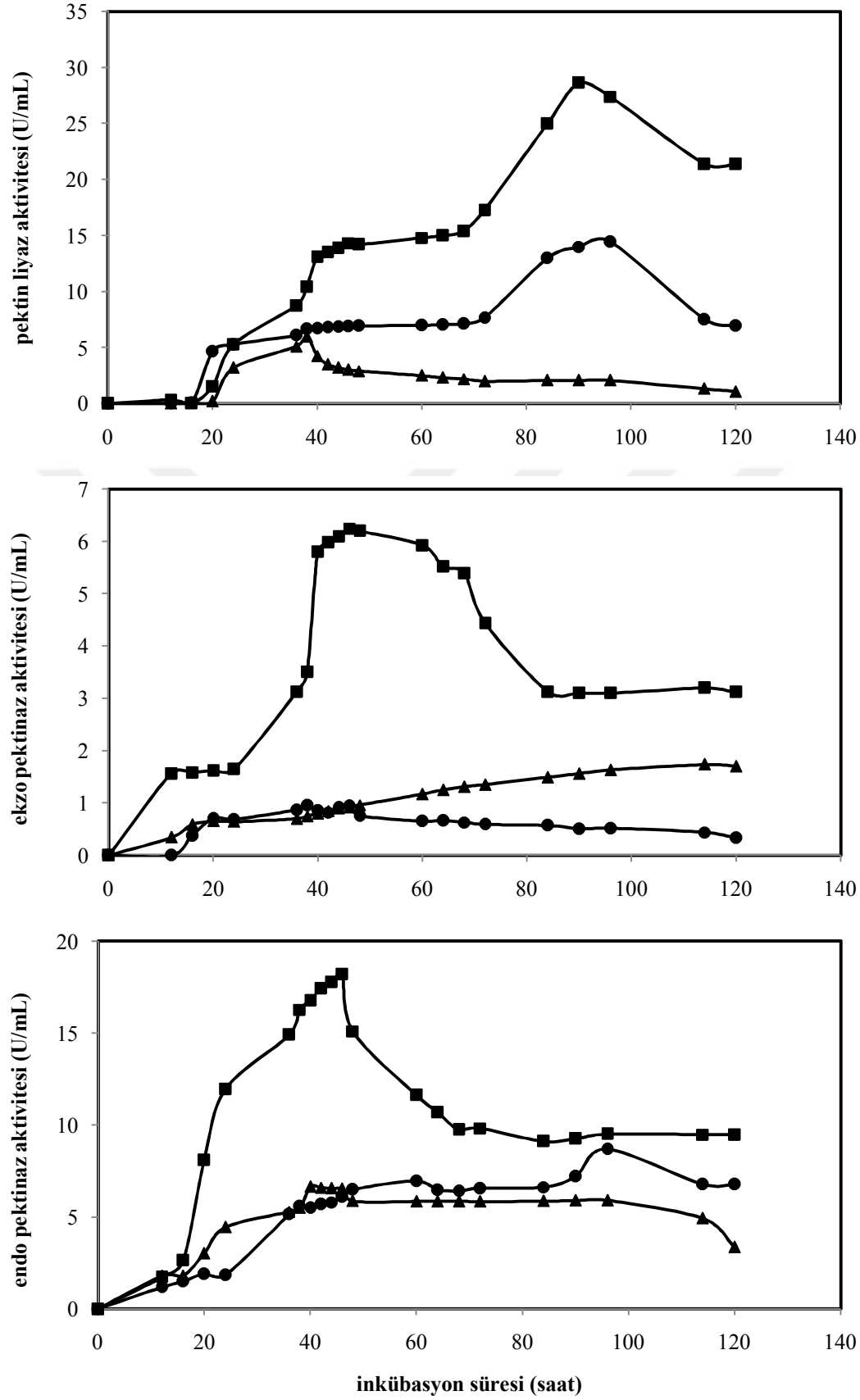
Enzim üretimini artıracak en uygun azot kaynağını belirlemek amacıyla fermantasyon ortamına inorganik bir azot kaynağı olan amonyum sülfat % 0.05, % 0.14 ve % 0.3 (w/v) oranlarında eklenmiştir. Elde edilmiş olan mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 4.9.' da sunulmuştur. Amonyum sülfat derişiminin % 0.05 (w/v)' den % 0.14 (w/v)' ye artırılmasıyla mikroorganizma özgül üreme hızı 0.041 (sa⁻¹)' den 0.0495 (sa⁻¹)' e yükselmiş,

amonyum sülfat derişimi daha fazla artırıldığında (% 0.3 (w/v)) ise substurat inhibisyonu gözlenmiş ve mikroorganizma özgül üreme hızı 0.0263 (sa⁻¹)' e düşmüştür.



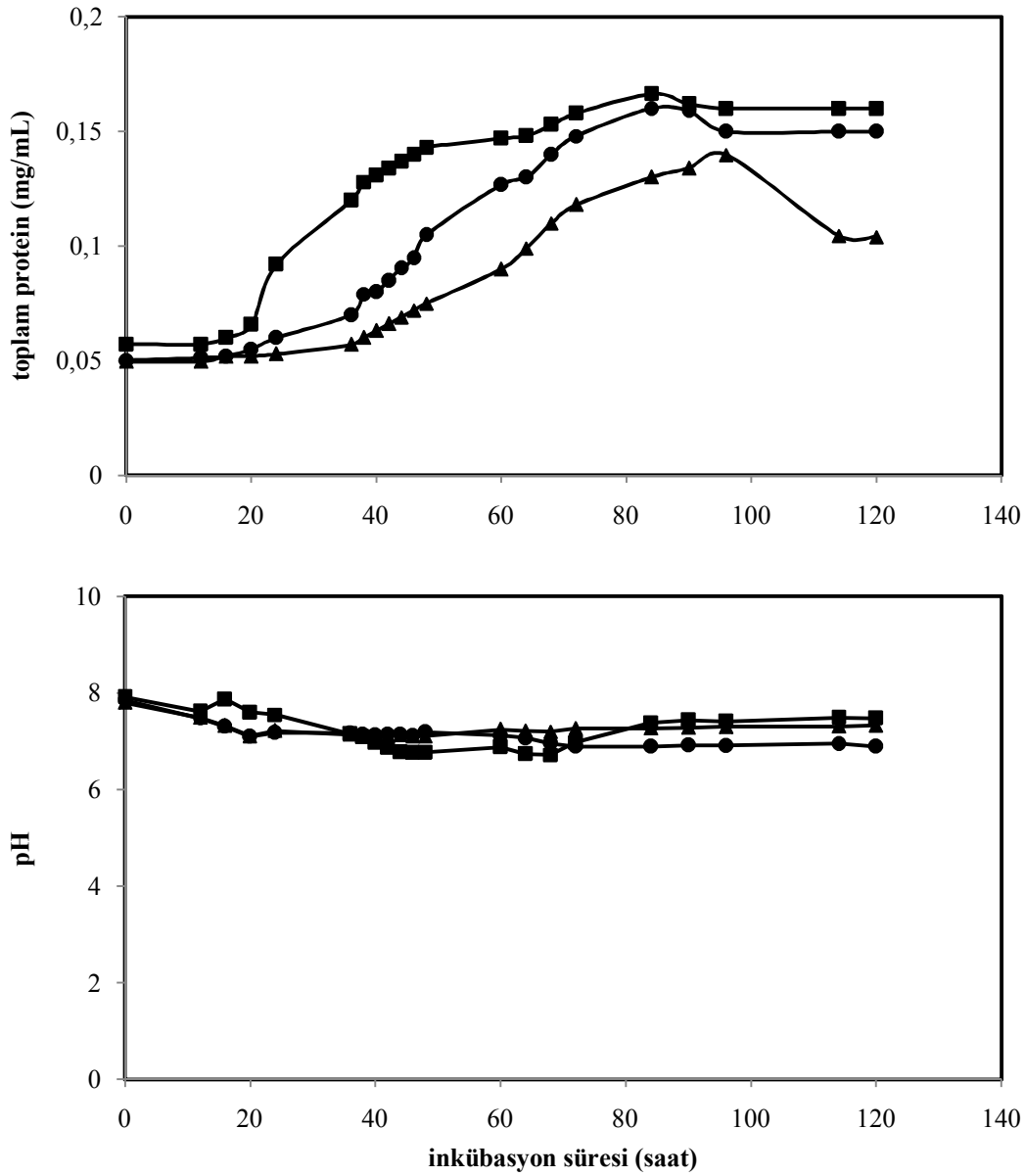
Şekil 4.9. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm]

Şekil 4.10.' da ise azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanıldığında elde edilen enzim aktivite değerleri görülmektedir. Enzim aktiviteleri, mikroorganizma özgül üreme hızlarına paralellik göstermiş ve amonyum sülfat derişiminin % 0.05 (w/v)' den % 0.14 (w/v)' ye artırılmasıyla artmıştır. Amonyum sülfat derişiminin daha fazla artırılması (% 0.3 (w/v)) mikroorganizma üreme ve dolayısıyla enzim üretimi üzerinde inhibisyon etkisi yapmış ve enzim aktiviteleri düşmüştür. % 0.14 (w/v) amonyum sülfat derişiminde belirlenen en yüksek pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla, 90. saatte 28.63 U/mL, 46. saatte 6.25 U/mL ve 46. saatte 18.20 U/mL' dir.



Şekil 4.10. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde, enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, ▲ : % 0.05, ■ : % 0.14, ● : % 0.3 (w/v) amonyum sülfat]

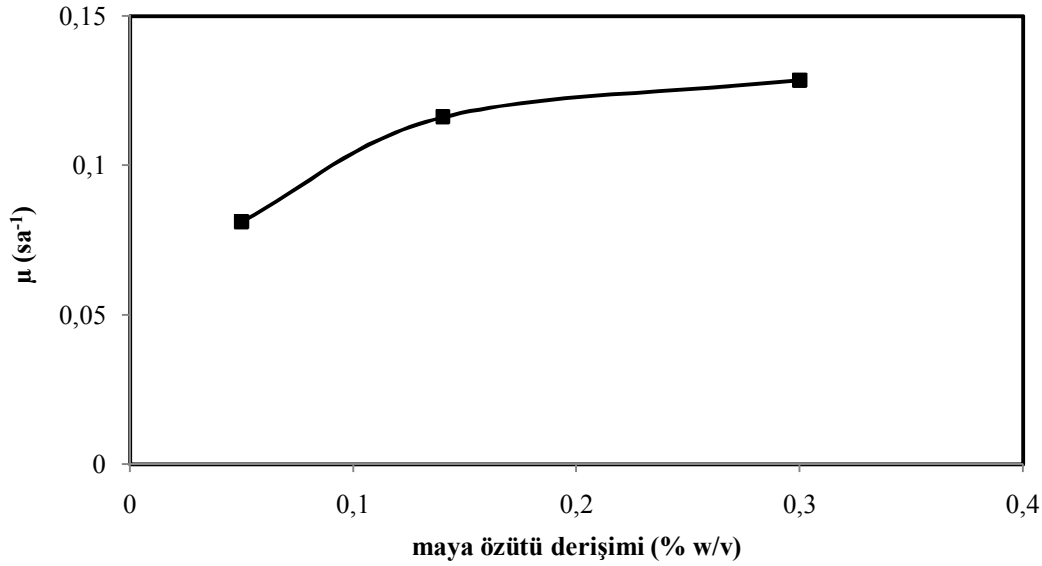
Şekil 4.11.' de % 0.05, 0.14 ve % 0.3 (w/v) oranında amonyum sülfat içeren ortamlarda fermentasyon süresince toplam protein konsantrasyonunun ve ortam pH' ının değişimi verilmiştir. Enzim aktivitesi ile paralel olarak zamanla toplam protein miktarı da artmıştır. En yüksek protein konsantrasyonu, maksimum özgül üreme hızı ve enzim aktivitelerinin elde edildiği % 0.14 (w/v) amonyum sülfat derişiminde ve 84. saatte 0.17 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.11.' de ayrıca fermentasyon ortamı pH' ında zamanla ufak salımlar meydana gelmekle birlikte fazla değişimin olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.11. Farklı amonyum sülfat derişimlerinde toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, ▲ : % 0.05, ■ : % 0.14, ● : % 0.3 (w/v) amonyum sülfat]

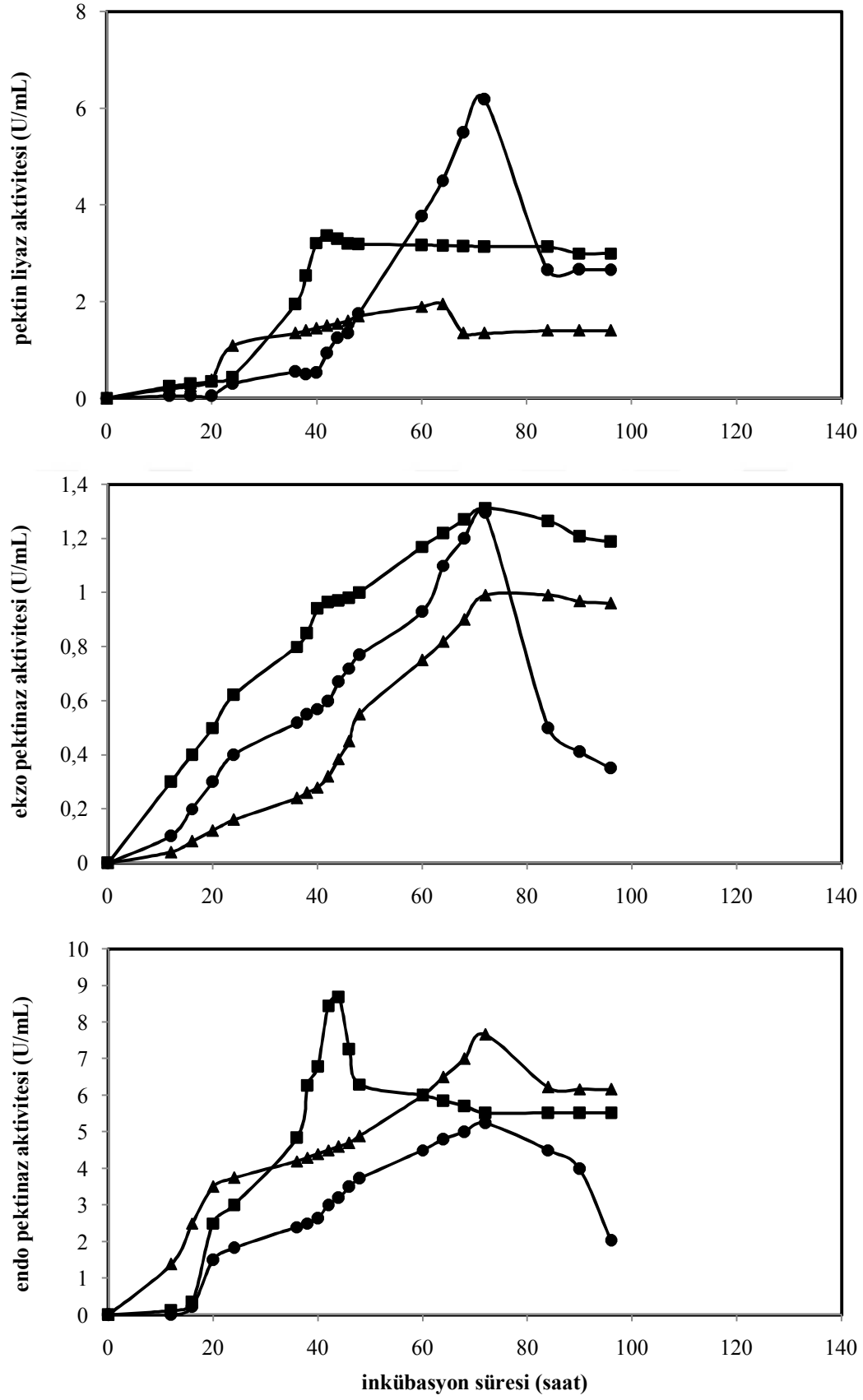
4.1.3.2. Maya Özütü Derişiminin Etkisi

Enzim üretimine maya özütü konsantrasyonunun etkisinin incelendiği deneylerde, fermentasyon ortamına azot kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda maya özütü eklenmiş ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafiklerde verilmiştir. Şekil 4.12.' de görüldüğü gibi düşük maya özütü derişimi değerleri mikroorganizmanın gelişmesi için yeterli olmadığından düşük özgül üreme hızları elde edilmiş ve maya özütü derişimi arttıkça mikroorganizma özgül üreme hızı değerleri artmıştır. En yüksek özgül üreme hızı 0.1285 sa^{-1} olarak % 0.3 (w/v) maya özütü derişiminde elde edilmiştir.



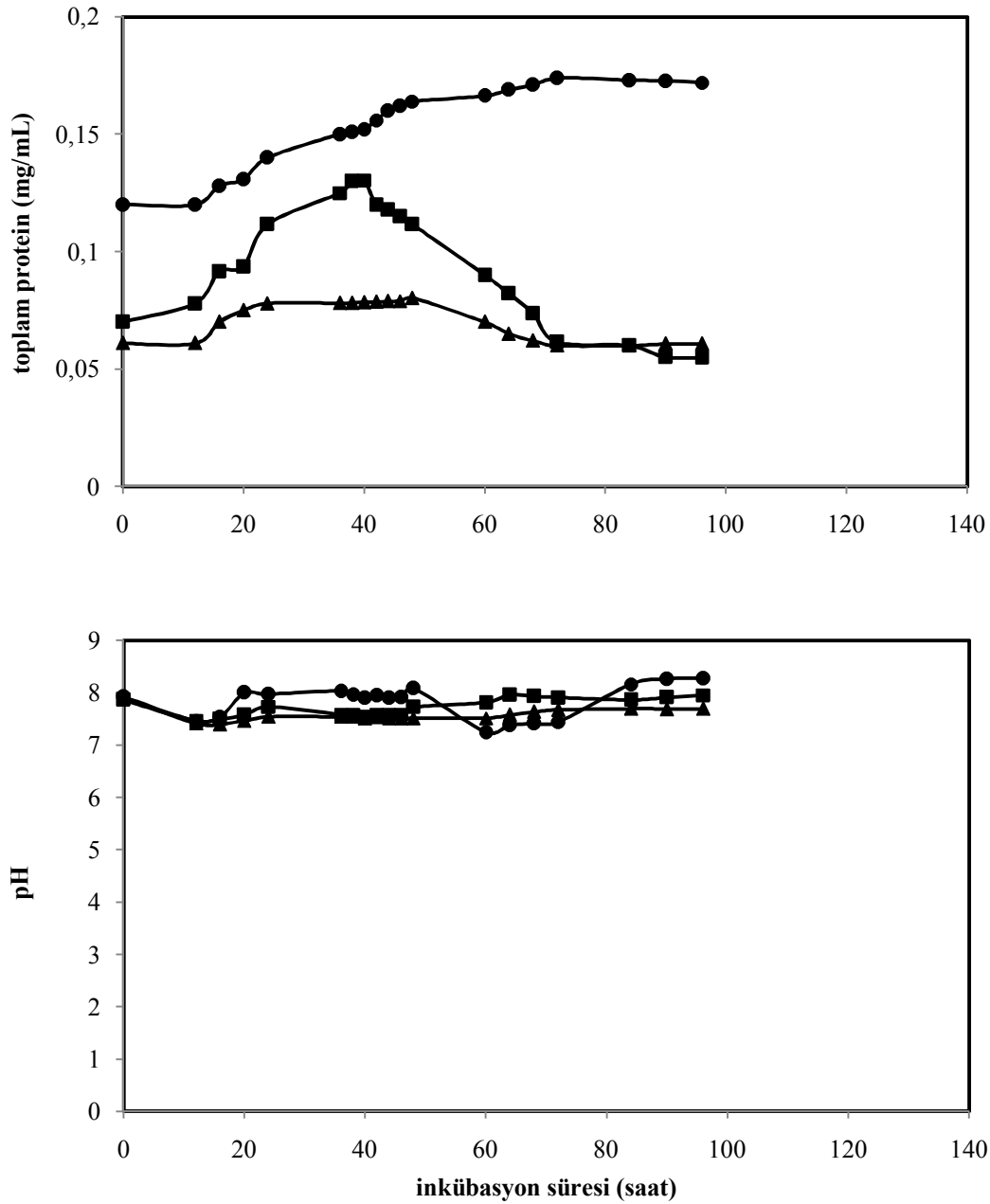
Şekil 4.12. Farklı maya özütü derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm]

Şekil 4.13.' te farklı oranlarda maya özütü içeren fermentasyon ortamlarında tespit edilen pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktivitesi değerleri verilmiştir. En yüksek pektin liyaz aktivitesi % 0.3 (w/v) oranında maya özütü içeren ortamda 72. saatte 6.18 U/mL, ekzo pektinaz aktivitesi % 0.14 ve 0.3 (w/v) oranlarında maya özütü içeren ortamlarda 72. saatte 1.3 U/mL, endo pektinaz aktivitesi ise % 0.14 oranında maya özütü içeren ortam 44. saatte 8.69 U/mL' olarak elde edilmiştir. Azot kaynağı olarak kullanılan amonyum sülfat ve maya özütü ile elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, maya özütü ile elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları ve enzim aktivite değerlerinin, amonyum sülfat içeren fermentasyon ortamında elde edilen değerlerden daha düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.13. Farklı maya özütü derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değışimi [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, ▲: % 0.05, ■: % 0.14, ●: % 0.3 (w/v) maya özütü]

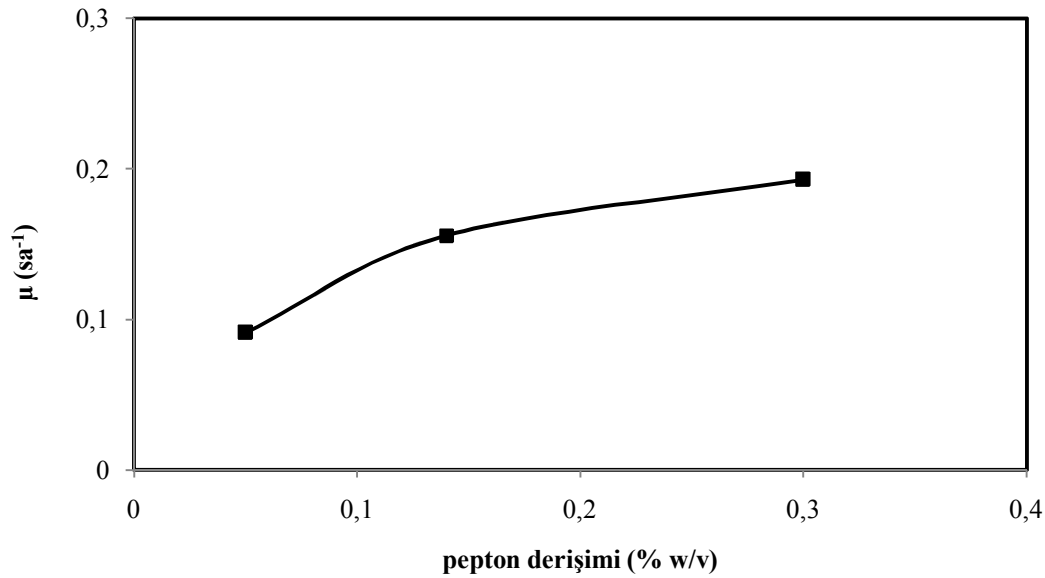
Farklı maya özütü konsantrasyonlarında farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen toplam protein derişimleri Şekil 4.14.' te verilmiştir. Maya özütü derişiminin % 0.05 (w/v)' den % 0.3 (w/v)' e artırılmasıyla toplam protein miktarı da 0.08 mg/mL' den 0.17 mg/mL' ye yükselmiştir. Şekil 4.14.' te ayrıca zamanla fermantasyon ortamının pH değışimi görölmektedir. Ortam pH' ında zamanla ufak salımlar meydana gelmekle birlikte fazla değışim gözlenmemiştir.



Şekil 4.14. Farklı maya özütü derişimlerinde toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değışimi [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, ▲: % 0.05, ■: % 0.14, ●: % 0.3 (w/v) maya özütü]

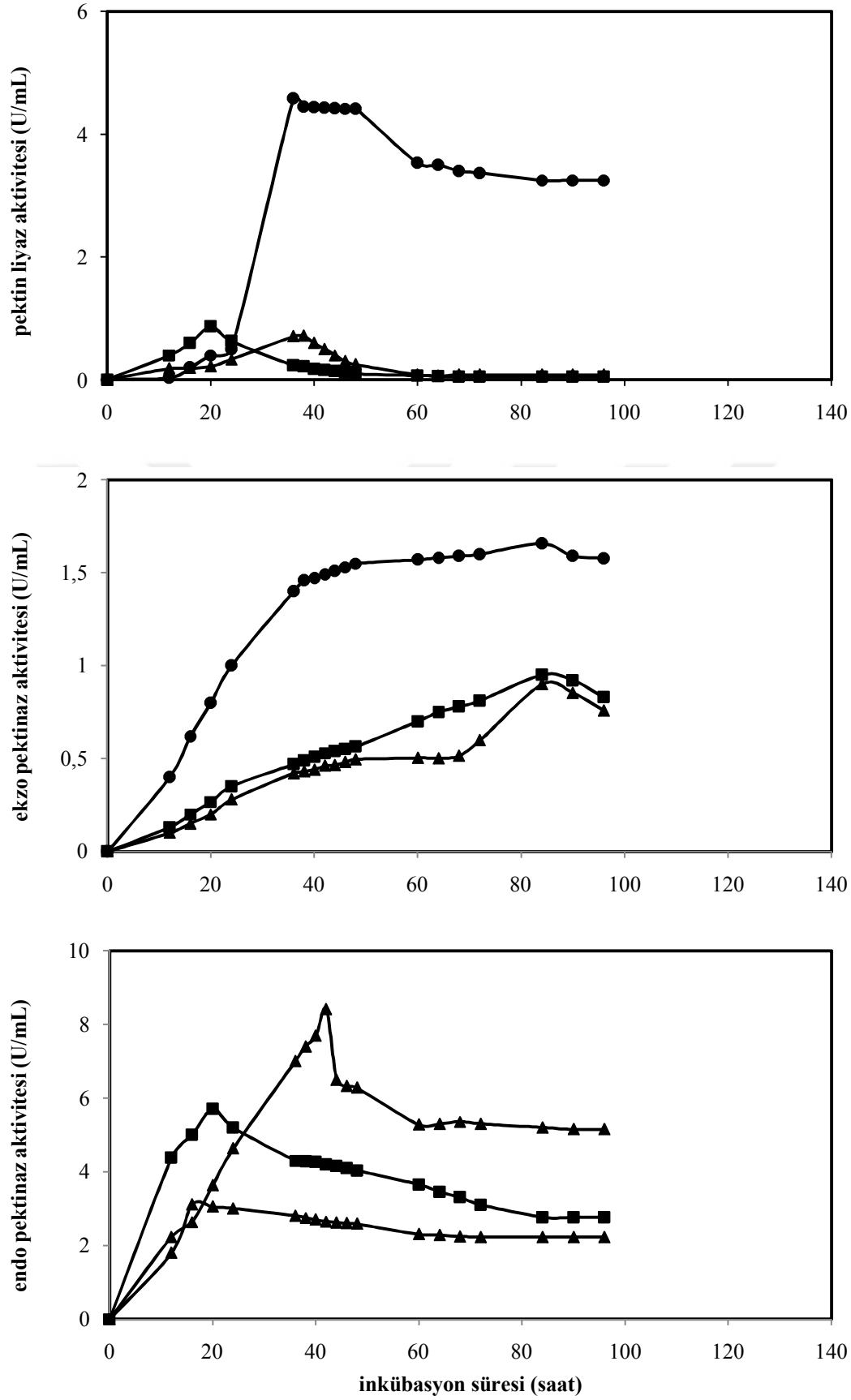
4.1.3.3. Pepton Derişiminin Etkisi

Çalışmanın bu aşamasında azot kaynağı olarak organik bir azot kaynağı olan pepton kullanılmıştır. Pepton derişiminin mikroorganizma üreme ve enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla üç farklı derişimde pepton içeren fermentasyon ortamlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Sabit sıcaklık ve karıştırma hızında elde edilmiş olan mikroorganizma özgül üreme hızları Şekil 4.15.' te verilmiştir.



Şekil 4.15. Farklı pepton derişimlerinde elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm]

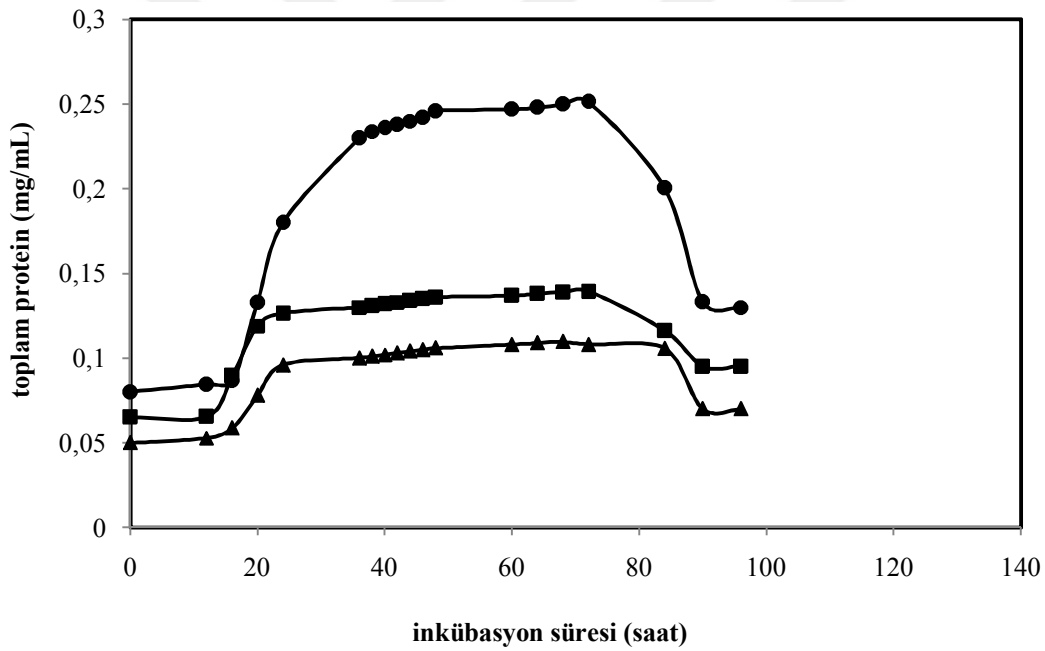
Şekilden de görüldüğü gibi pepton konsantrasyonu arttıkça mikroorganizma özgül üreme hızında artış gözlenmiş ve maksimum özgül üreme hızı % 0.3 (w/v) derişiminde elde edilmiştir. % 0.05, 0.14 ve 0.3 (w/v) pepton derişiminde elde edilen özgül üreme hızları sırasıyla 0.0912, 0.557 ve 0.1928 (sa⁻¹)' dir. Elde edilen sonuçlar azot kaynağı olarak amonyum sülfat ve maya özütü kullanıldığı deney sonuçları ile toplu olarak değerlendirildiğinde azot kaynağı olarak peptonun kullanıldığı fermentasyon ortamında elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızlarının maya özütü ve amonyum sülfat ortamlarında elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bilindiği gibi pepton hem azot kaynağı, hem de karbon kaynağı olarak mikroorganizmalarca tüketilmekte, ayrıca içeriğinde yer alan bazı vitaminler ve aminoasitler gelişme faktörü olarak işlev görmektedir (Halkman, 2005).



Şekil 4.16. Farklı pepton derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değışimi [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, ▲ : % 0.05, ■ : % 0.14, ● : % 0.3 (w/v) pepton]

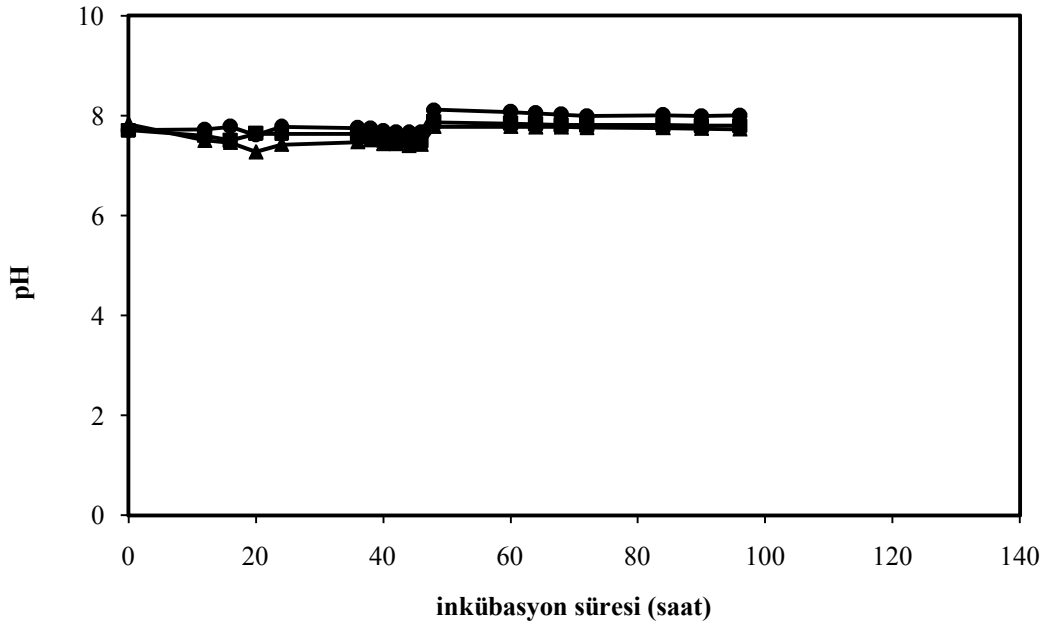
Şekil 4.16.' da görüldüğü üzere azot kaynağı olarak peptonun kullanıldığı fermantasyon ortamlarında elde edilen enzim aktiviteleri verilmiştir. Pepton derişiminin % 0.05 (w/v)' den % 0.3 (w/v)' e artırılmasıyla enzim aktivite değerleri de artmış çalışılan pepton derişim aralığında pepton inhibisyonu gözlenmemiştir. % 0.3 (w/v) pepton derişiminde elde edilen en yüksek pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 36. saatte 4.58 U/mL, 84. saatte 1.66 U/mL ve 42. saatte 8.41 U/mL olarak tespit edilmiştir.

Seçilen pepton derişimlerinde fermantasyon süresi ile ölçülmüş olan toplam protein derişimleri Şekil 4.17.' de gösterilmiştir. Protein derişimleri, mikroorganizma özgül üreme hızı ve enzim aktivite değerlerinin değişimine paralellik göstermiş ve pepton derişiminin artmasıyla artmış, en yüksek değer % 0.3 (w/v) pepton derişiminde 72. saatte 0.252 mg/mL olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.17. Farklı pepton derişimlerinde toplam protein derişiminin inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, ▲: % 0.05, ■: % 0.14, ●: % 0.3 (w/v) pepton]

Şekil 4.18.' de fermantasyon süresince ortam pH' ının değişimi verilmiştir. Fermantasyon ortamı pH' ında çok fazla değişimin olmadığı görülmektedir.



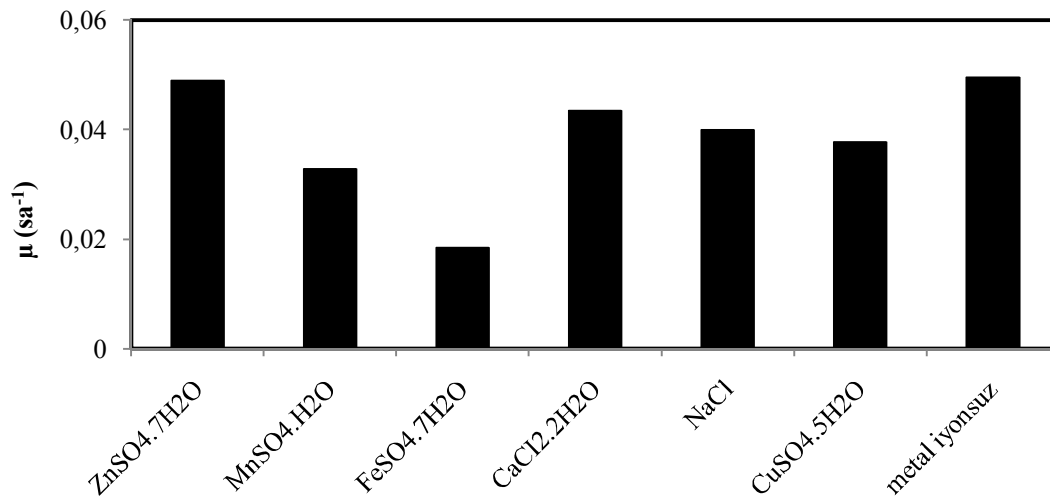
Şekil 4.18. Farklı pepton derişimlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değışimi [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, ▲: % 0.05, ■: % 0.14, ●: % 0.3 (w/v) pepton]

Azot kaynaklarının etkisi toplu olarak değeriendirildiğinde, amonyum sülfatın pektinaz enzimlerinin üretiminde daha kullanışlı olduğı görülmüş ve daha sonra yapılacak deneylerde azot kaynağı olarak amonyum sülfatın (% 0.14 (w/v)) kullanımına karar verilmiştir. İnorganik azot kaynağı olan amonyum sülfatın enzim üretimini arttırması azotlu bileşiklerin sentezinde NH_4^+ iyonunun daha kolay kullanılması ile açıklanabilir (Özeş, 1988). Literatürde de, Fawole ve Odunfa (2003), *Aspergillus niger* ile pektik enzim üretimini etkileyen faktörleri inceledikleri çalışmalarında amonyum sülfatı en iyi azot kaynağı olarak seçmişlerdir. Ward ve Fogarty (1974), *Bacillus subtilis* ve *Flavobacterium pectinovorum* ile poligalakturonat liyaz üretiminde en yüksek aktivite değeriini *Bacillus subtilis* için glutamin ve amonyum sülfat içeren ortamda ve *Flavobacterium pectinovorum* için amonyum sülfat içeren ortamda elde etmişlerdir. Buna karşın, Swain ve Ray (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus subtilis* CM5 ile ekzo poligalakturonaz üretimi % 1 (w/v) pepton içeren kültür ortamında gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. Metal Tuzların Etkisi

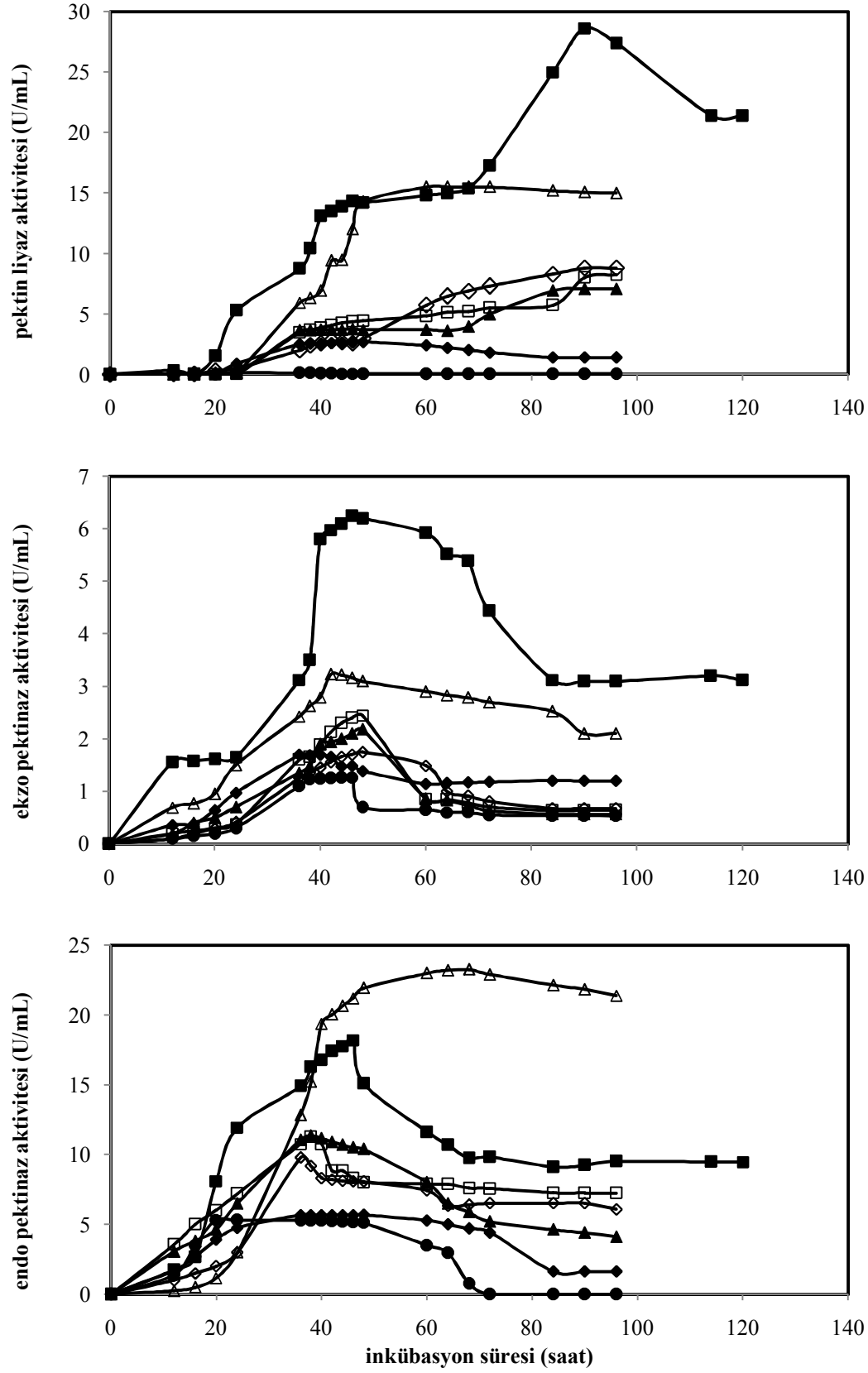
Metal iyonları mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olup, enzim sentezini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir. Ayrıca, enzim kararlılığının ve preteolitik etkilere karşı

korunması için ortamda mutlaka etkili metal iyonlarının bulunması gerekmektedir (Tanyıldızı, 2005). Pektinaz enzimi üretimi ve hücre dışı performansı, çözeltide mevcut iyonlarla doğrudan bağlantılıdır. Bakterilerle pektinaz üretiminde kalsiyum iyonlarının etkisi çeşitli çalışmacılar tarafından araştırılmıştır. Yüksek metal iyonu konsantrasyonlarında dış ortama protein salgılanması engellendiğinden enzim üretimi düşük oranda gerçekleşir (Ahlawat vd., 2009). Genelde, bakteriyel 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 vd., 1997; Kobayashi vd., 1999). Çalışmanın bu aşamasında, çeşitli metal tuzlarının mikroorganizma üreme ve enzim üretimine etkisini incelemek amacıyla % 1 (w/v) pektin ve % 0.14 (w/v) oranında amonyum sülfat içeren besi ortamına % 0.02 (w/v) derişiminde $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ teker teker eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar hiç metal tuzu katılmamış ortamdaki sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.19.' da görüldüğü gibi en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı hiç metal tuzu eklenmediği durumda elde edilmiş (0.0495 sa^{-1}), metal tuzları ilave edildiğinde bir miktar inhibisyon etkisi göstermiş ve daha düşük özgül üreme hızları belirlenmiştir. % 0.02 (w/v) derişimlerinde $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ teker teker eklendiğinde, mikroorganizma özgül üreme hızları sırasıyla 0.0489, 0.0328, 0.0184, 0.0435, 0.0399, 0.0377 sa^{-1} olarak tespit edilmiştir.



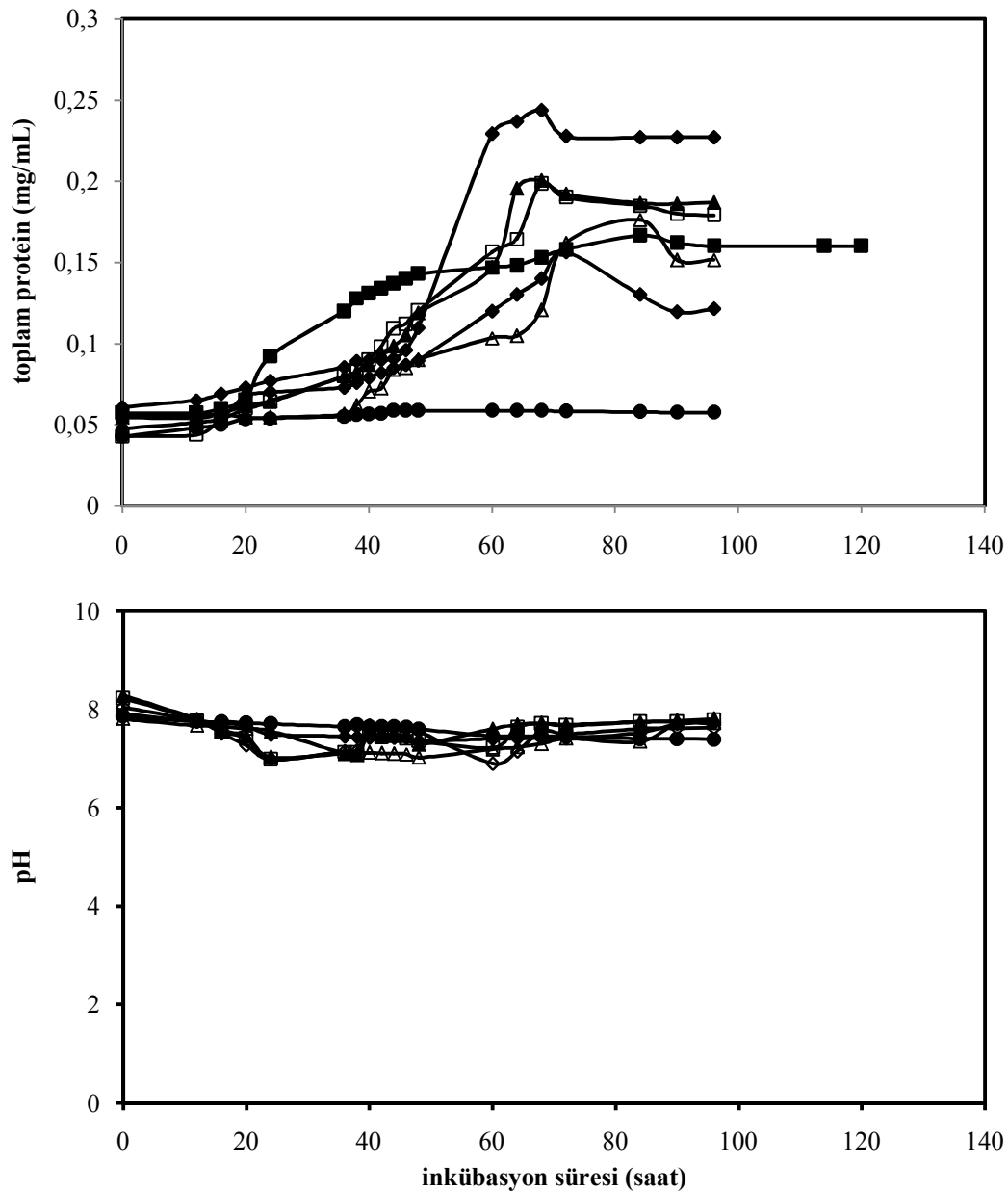
Şekil 4.19. Farklı metal tuzlarında [% 0.02 (w/v)] elde edilen mikroorganizma özgül üreme hızları [pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., % 0.14 (w/v) amonyum sülfat, KH : 150 rpm]

Metal iyonunun enzim üretimine etkisinin incelendiği deneylerde elde edilen bulgular Şekil 4.20.' de verilmiştir. En yüksek pektin liyaz aktivitesi hiç metal tuzu eklenmediği durumda 90. saatte 28.63 U/mL olarak kaydedilmiş, metal tuzları teker teker ilave edildiği durumlarda ise metal iyonlarının inhisiyonu sonucu daha düşük aktivite değerleri saptanmıştır. % 0.02 (w/v) derişiminde $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ teker teker eklendiğindeki tesbit edilen en yüksek pektin liyaz aktivite değerleri sırasıyla; 60. saatte 15.5 U/mL, 48. saatte 2.68 U/mL, 90. saatte 8.8 U/mL, 90. saatte 7.07 U/mL, 96. saatte 8.25 U/mL, 36. saatte 0.12 U/mL' dir. Elde edilen sonuçlar ekzo pektinaz aktivitesi açısından değerlendirildiğinde benzer şekilde en yüksek aktivite hiç metal tuzu eklenmediği durumda 46. saatte 6.25 U/mL olarak tespit edilmiş, metal tuzları teker teker ilave edildiğinde ise inhisiyonu sonucu daha düşük aktivite değerleri kaydedilmiştir. % 0.02 (w/v) derişiminde $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ teker teker eklendiğinde belirlenen en yüksek ekzo pektinaz aktivite değerleri sırasıyla; 44. saatte 3.22 U/mL, 40. saatte 1.7 U/mL, 48. saatte 1.75 U/mL, 48. saatte 2.18 U/mL, 48. Saatte 2.49 U/mL, 46. saatte 1.27 U/mL' dir. Besi ortamına % 0.02 (w/v) derişiminde ilave edilen $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, endo pektinaz aktivitesini hiç ilave edilmediği durumdakine (46. saatte 18.2 U/mL) göre artırmış (68. saatte 23.26 U/mL) diğer tuzlar ise düşürmüştür. Besi ortamına $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ teker teker eklendiğinde belirlenen en yüksek endo pektinaz aktivite değerleri sırasıyla; 48. saatte 5.69 U/mL, 36. saatte 9.79 U/mL, 38. saatte 11.36 U/mL, 38. saatte 11.26 U/mL, 20. saatte 5.33 U/mL' dir.



Şekil 4.20. Farklı metal tuzlarında [% 0.02 (w/v)] enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi (pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., % 0.14 amonyum sülfat, KH : 150 rpm, □: NaCl, △: ZnSO₄·7H₂O, ○: FeSO₄·7H₂O, ▲: CaCl₂·2H₂O, ◆: MnSO₄·H₂O, ●: CuSO₄·5H₂O, ■: Metal tuzu içermeyen ortam)

Toplam protein derişiminin zamanla değişimi şekil 4.21.' de sunulmuş ve en yüksek ve en düşük protein derişimi % 0.02 (w/v) derişiminde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklendiğinde sırasıyla 68. Saatte 0.24 mg/L ve 0.059 mg/L' olarak belirlenmiştir. şekil 4.21.' de ayrıca metal tuzları ilave edildiğinde fermantasyon ortamının pH' ının zamanla değişimi grlmektedir. Zamanla pH da ufak değişiklikler meydana gelse de fazla değişimin olmadığı tespit edilmiştir.



şekil 4.21. Farklı metal tuzlarında [% 0.02 (w/v)] toplam protein derişiminin ve ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi (pH : 8, T : 30 °C, % 1 (w/v) pektin kons., KH : 150 rpm, □: NaCl, △: ZnSO₄·7H₂O, ○: FeSO₄·7H₂O, ▲: CaCl₂·2H₂O, ◆: MnSO₄·H₂O, ●: CuSO₄·5H₂O, ■: Metal tuzu içermeyen ortam)

4.1.5. Enzim Aktivitesi Üzerine pH ve Sıcaklığın Etkisi

Enzimler; protein yapısında biyolojik katalizörler olduğundan organizmanın iç ortamı, pH' ı ve sıcaklığı proteinler için doğal bir ortam sağlar. Ortamdaki herhangi bir değişim proteinin kısmen ya da tamamen bozunmasına sebep olabilir. Enzimler açısından bir proteinin bozunması, katalitik aktivitenin azalmasına neden olur (Shubakov ve Elkina, 2002). Bu doğrultuda, bir enzimin aktivitesini koruyacak optimum pH ve sıcaklık şartlarını bulmak gereklidir.

Enzimin maksimum aktivite göstereceği pH ve sıcaklığı bulmak amacıyla daha önceki deneysel çalışmalarda belirlenen enzimin yüksek aktivite gösterdiği ortamda (% 1 (w/v) pektin, % 0.14 (w/v) amonyum sülfat) ve en yüksek aktivite gösterdiği 90. saatte numune alınmıştır. Numune santrifüjlendikten sonra sıvı kısım, enzim kaynağı olarak kullanılmış, standart ölçüm şartları altında, enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Enzimlerin pH 6-11 arasında bir birim arayla aktiviteleri belirlenerek aktif oldukları pH aralıkları ve optimum pH' ları bulunmuştur. pH 6.0-7.0 aralığında fosfat, pH 8.0-9.0 aralığında Tris-HCl, pH 10.0-11.0 aralığında glisin-NaOH tamponları aktivite tayininde kullanılan substrat çözeltisini hazırlamak için kullanılmıştır. Pektin liyaz için 0.05 M, ekzo ve endo pektinaz aktivitesi için 0.1 M' lik tamponlar hazırlanmıştır.

Pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği pH değerleri sırasıyla 8.0 (Tris-HCl tamponu), 10.0 (glisin-NaOH tamponu) ve 9 (Tris-HCl tamponu) olarak bulunmuştur. Bulunan bu pH' lardaki aktivite değerleri % 100 olarak alınarak, diğer pH değerlerindeki aktiviteler bunlara göre oranlanmış ve relatif enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. pH' a karşı % aktivite değişimleri Tablo 4.1.' de verilmiştir. *P. fluorescens* (NRRL B-2641) suşuna ait pektinaz grubu enzimlerin pH 8.0, 9.0 ve 10.0' da aktivite göstermeleri nedeniyle bu enzim grubu alkali özelliktedir. Bakteriyel pektinolitik enzimlerin optimal pH' ı 5.0 ve 7.0 arasında, fungal ve bitki kaynaklı olanların ise optimum pH' ı 4.0 ve 5.5 arasındadır (Kobayashi vd., 2001). Literatürde alkali pektinazların izolasyonu üzerine çalışmalar mevcuttur. *Bacillus sp.* DT7' den elde edilen pektinaz pH 7.5-8.5 alkali şartlarda oldukça kararlıdır (Kashyap vd., 2000). Parisot ve diğerleri (2002) *Thermotoga maritima* ' dan ekzopoligalakturonat liyaz üretmişler ve enzimin optimum pH' ını 9.5 olarak belirlemişlerdir. Daha alkali aralıkta (10.5-11.0) pH optimumuna sahip pektinazlar *Bacillus sp.* ile üretilmiştir. Alkali şartlar altında aktif pektinazlar ticari açıdan da-

ha önemlidirler. Çünkü alkalofilik pektinolitik mikroorganizmalar, pektinli materyalleri daha kolay gidermekte ve aktif çamur işleminde daha kolay parçalanmalarını sağlamakta, dolayısıyla, pektik maddelerin pektik atık sulardan uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Kapoor vd., 2000).

Çalışmanın bu bölümünde, pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz enzimlerinin aktiviteleri üzerine sıcaklığın etkisi araştırılmış ve sıcaklık 30-70 °C aralığında 10' ar birim artırılarak aktivite analizleri yapılmıştır. *P. fluorescens* ile üretilen pektinaz grubu enzimlerden; pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri sırasıyla, 50, 40 ve 40 °C olarak bulunmuştur. Bulunan bu sıcaklıklardaki aktivite % 100 olarak alınarak diğer sıcaklık değerlerindeki aktiviteler buna göre oranlanmış ve relatif enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Sıcaklığa karşı % aktivite değişimleri Tablo 4.1.' de verilmiştir.

Tablo 4.1. pH ve sıcaklığa karşı % aktivite değişimleri

		Relatif aktivite (%)		
		Pektin liyaz	Ekzo pektinaz	Endo pektinaz
pH	6	26.2	41.1	44.9
	7	29.2	44.7	67.3
	8	100.0	66.4	88.4
	9	85.3	83.6	100.0
	10	0	100.0	96.9
	11	-	96.9	76.9
Sıcaklık (°C)	30	58.7	94.1	55.4
	40	73.2	100.0	100.0
	50	100.0	95.5	23.6
	60	83.7	88.4	0
	70	60.4	88.0	0

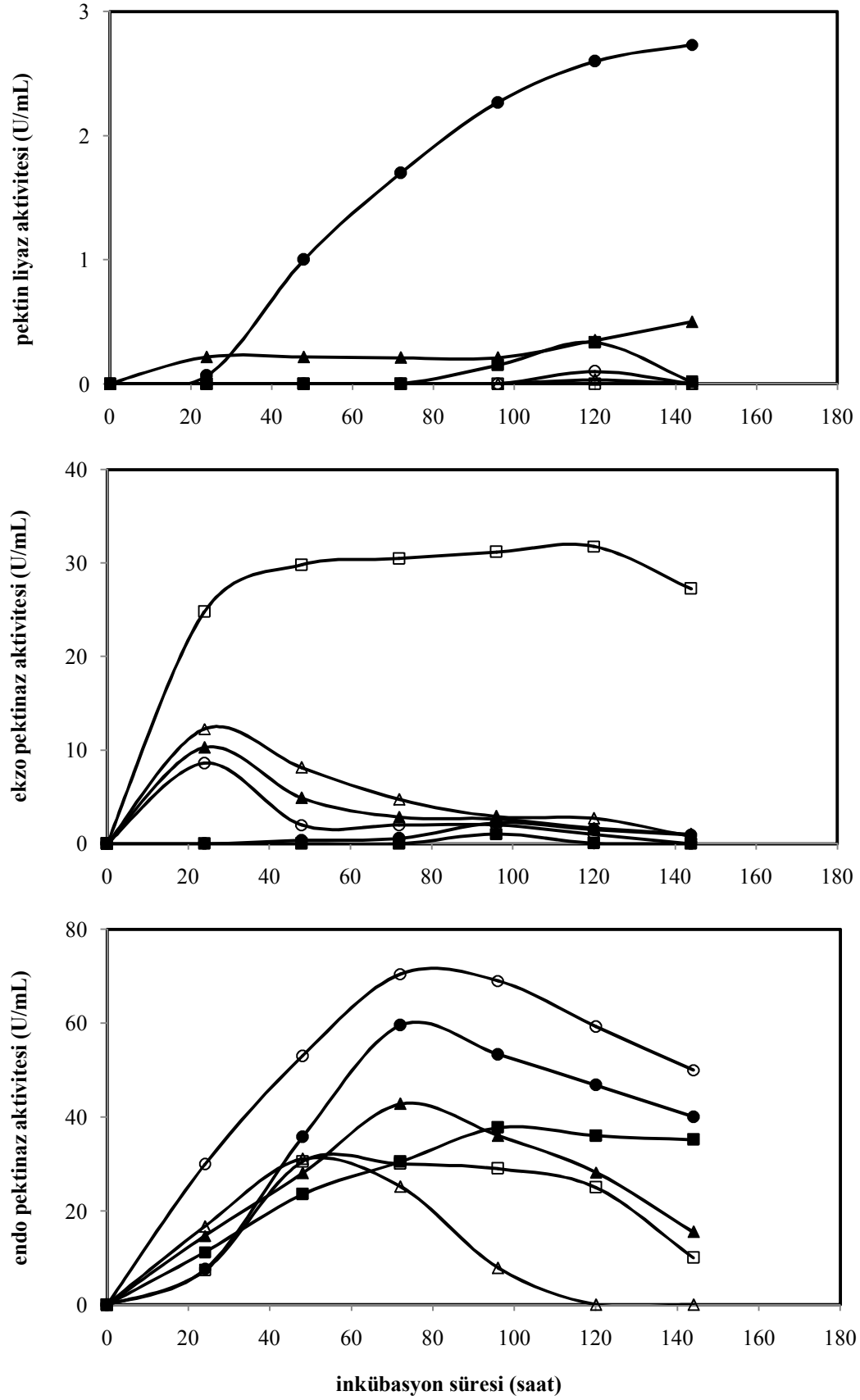
4.2. Katı Hal Fermantasyonu Deneyleri

Çalışmanın bu aşamasında katı hal fermantasyonu deneyleri gerçekleştirilmiş ve substrat olarak; buğday kepeği (BK), şeker pancarı küspesi (ŞPK), ayçekirdeği tablası (AÇT), portakal kabuğu (PK), muz kabuğu (MK) ve elma posası (EP) kullanılmıştır. 20-100 mesh boyutundaki katı substrat % 5 (w/v) konsantrasyonunda kullanılmıştır. Saf su yerine musluk suyu ilave dirmiştir. Bu hem ortam maliyetini azaltmış hem de mikroorganizmaların kullanacağı mineralleri içermesi açısından faydalı olmuştur. Bütün deneylerde sıvı

kültürde olduğu gibi ortam parametreleri; pH : 8, sıcaklık : 30 °C ve karıştırma hızı :150 rpm olarak alınmış ve enzim üretimi takip edilmiştir.

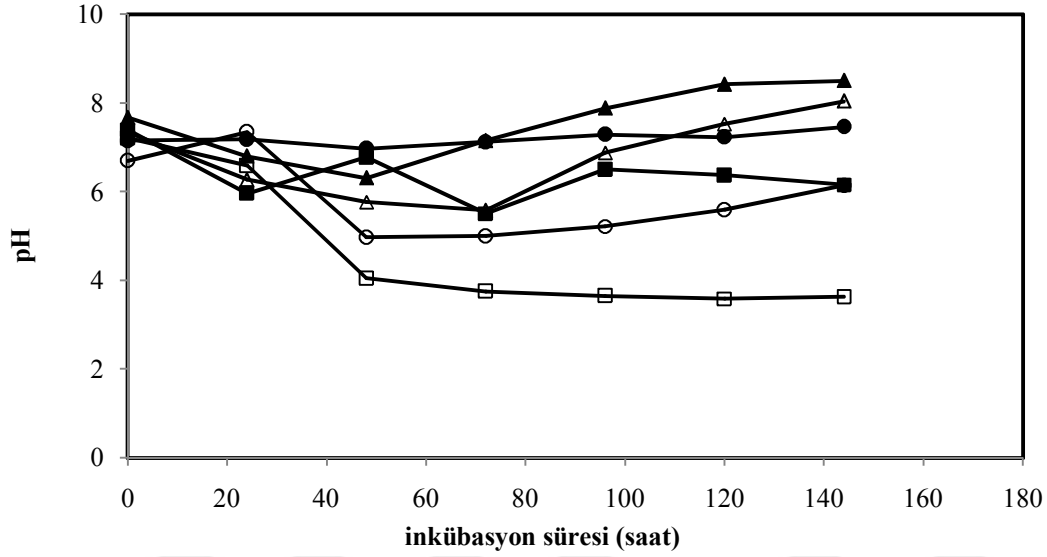
4.2.1. Ortam Seçimi

Substrat olarak buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ayçekirdeği tablası, portakal kabuğu, muz kabuğu ve elma posasının kullanıldığı ortamlarda fermentasyon süresince elde edilen enzim aktiviteleri Şekil 4.22.' de verilmiştir. En yüksek pektin liyaz aktivitesi şeker pancarı küspesinde 144. saatte 2.73 U/mL olarak elde edilmiştir. Buğday kepeği ve ayçekirdeği tablasında elde edilen aktivite değerleri sırasıyla 120. saatte 0.33 U/mL, 144. saatte 0.5 U/mL' dir. Elma posasında hiç pektin liyaz aktivitesi gözlenmezken, portakal kabuğu ve muz kabuğunda sadece 120. saatte sırasıyla 0.1 U/mL ve 0.03 U/mL olarak aktivite değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ekzo pektinaz aktivitesi açısından değerlendirildiğinde en yüksek aktivitenin elma posası ortamında 120. saatte 31.79 U/mL olarak elde edildiği görülmektedir. Buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ayçekirdeği tablası, portakal kabuğu ve muz kabuğunun kullanıldığı ortamlarda tespit edilen aktivite değerleri sırasıyla; 96. saatte 1.04 U/mL, 96. saatte 0.22 U/mL, 24. saatte 10.28 U/mL, 24. saatte 8.61 U/mL ve 24. saatte 12.26 U/mL' dir. En yüksek endo pektinaz aktivite değeri ise portakal kabuğunda (48. saatte 30.48 U/mL) elde edilirken en düşük aktivite ise elma posası (72. saatte 70.44 U/mL) içeren ortamlarda elde edilmiştir. Literatürde *Bacillus pumilus* ile yapılan katı hal fermentasyonu çalışmasında substrat olarak buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ayçekirdeği tablası, portakal kabuğu, muz kabuğu, elma posası ve üzüm posası kullanılmış ve en yüksek pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri, şeker pancarı küspesinin kullanıldığı ortamda 4. günde sırasıyla, 60 U/mL 3.43 U/mL ve 34.78 U/mL olarak elde edilmiştir (Tepe, 2012).



Şekil 4.22. Farklı ortam bileşenlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi [(% 5 (w/v) katı substrat, tanecik boyutu : 20-100 mesh, pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm, Aşı oranı : % 10 w/v, ●: ŞPK, ■: BK, ▲: AÇT, ○: PK, □: EP, △: MK]

Şekil 4.23.' te ise fermentasyon ortamı pH' ının zamanla değişimi sunulmuştur. Şekilde görüldüğü gibi şeker pancarı küspesi kullanıldığında ortam pH' ında fazla değişim gözlenmezken diğer ortam bileşenlerinde önemli salınımlar meydana gelmiştir. Özellikle elma posasının kullanıldığı ortamda pH çok düşmüş ve bu da düşük aktivite değerlerinin elde edilmesine sebep olmuştur.

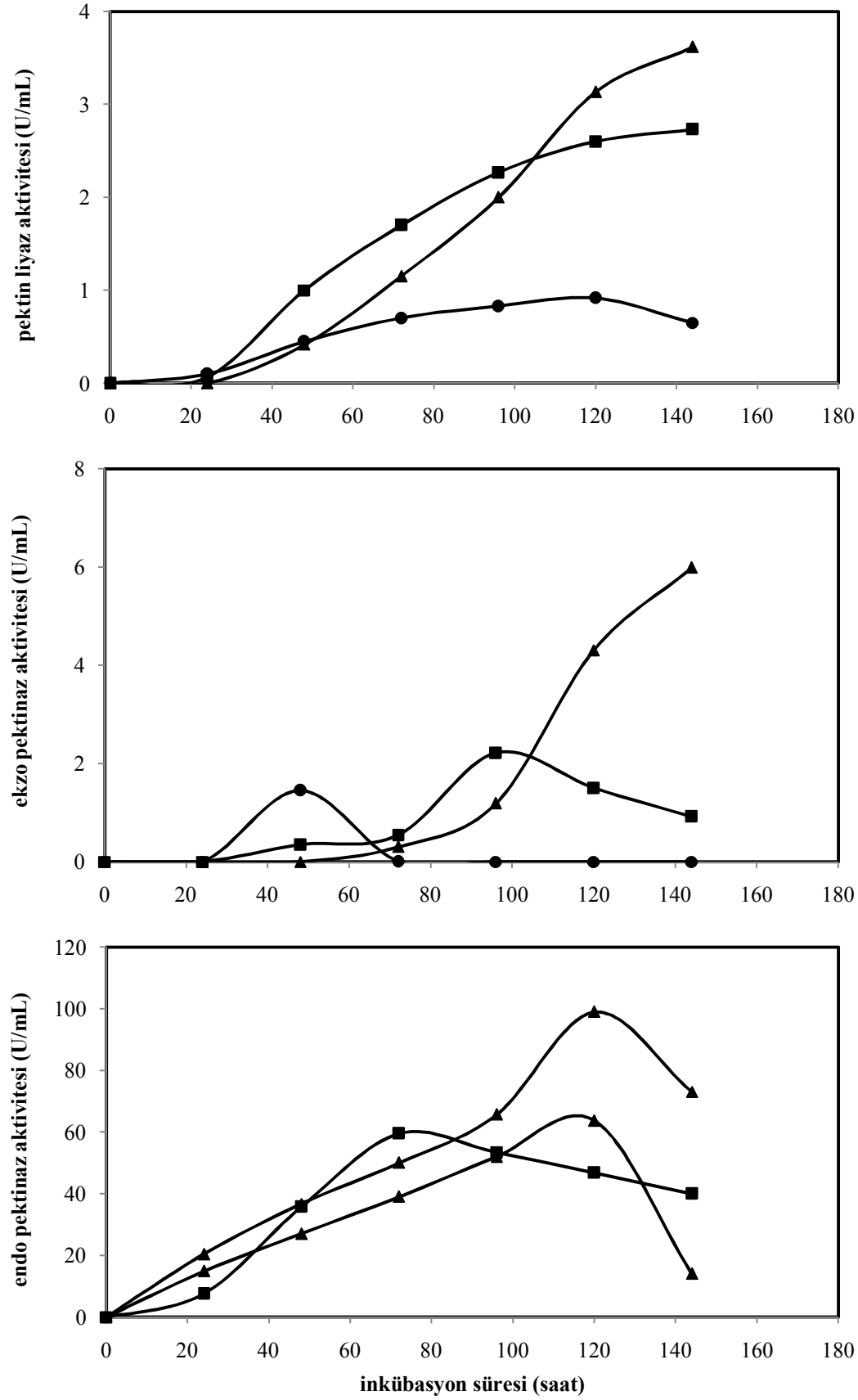


Şekil 4.23. Farklı ortam bileşenlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi [(% 5 (w/v) katı substrat, tanecik boyutu : 20-100 mesh, pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm, Aşı oranı : % 10w/v, ●: ŞPK, ■: BK, ▲: AÇT, ○: PK, ◊: EP, △: MK]

Katı hal ve derin kültür fermentasyonlarında elde edilen veriler pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri açısından birlikte değerlendirildiğinde şeker pancarı ve portakal kabuğu ortamlarında derin kültür fermentasyonundan daha yüksek ekzo ve endo pektinaz aktivite değerleri elde edildiği ve tarımsal atık ve artıkların pektinaz grubu enzimlerin eldesi için besiyeri hazırlamak amacıyla kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Katı hal fermentasyon ile yapılacak daha ileri çalışmalarda maksimum aktivitelerin elde edildiği katı substratlardan biri olan şeker pancarı küspesi kullanılmıştır.

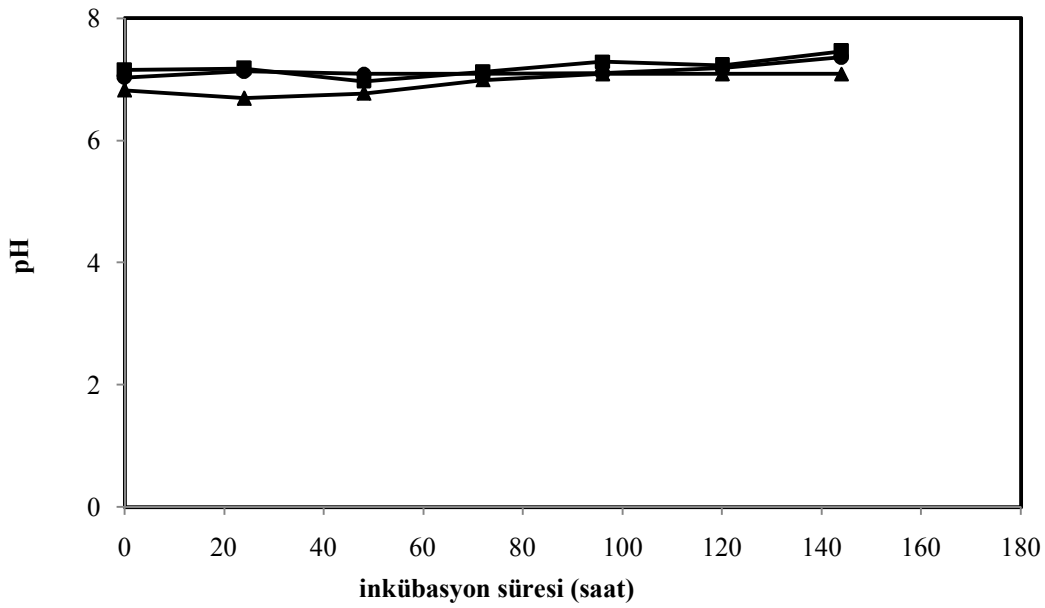
4.2.2. Tanecik Boyutunun Etkisi

Çalışmada katı substurat olarak kullanılan şeker pancarı küspesinin tanecik boyutunun etkisini incelemek amacıyla 3 farklı tanecik boyutunda (20, 100 ve 150 mesh) deneyler yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.24.' te verilmiştir.



Şekil 4.24. Farklı şeker pancarı küspesi boyutlarında enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi [(% 5 (w/v) ŞPK, pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm, Aşı oranı : % 10 w/v, ▲: 20 mesh, ■: 100 mesh, ●:150 mesh]

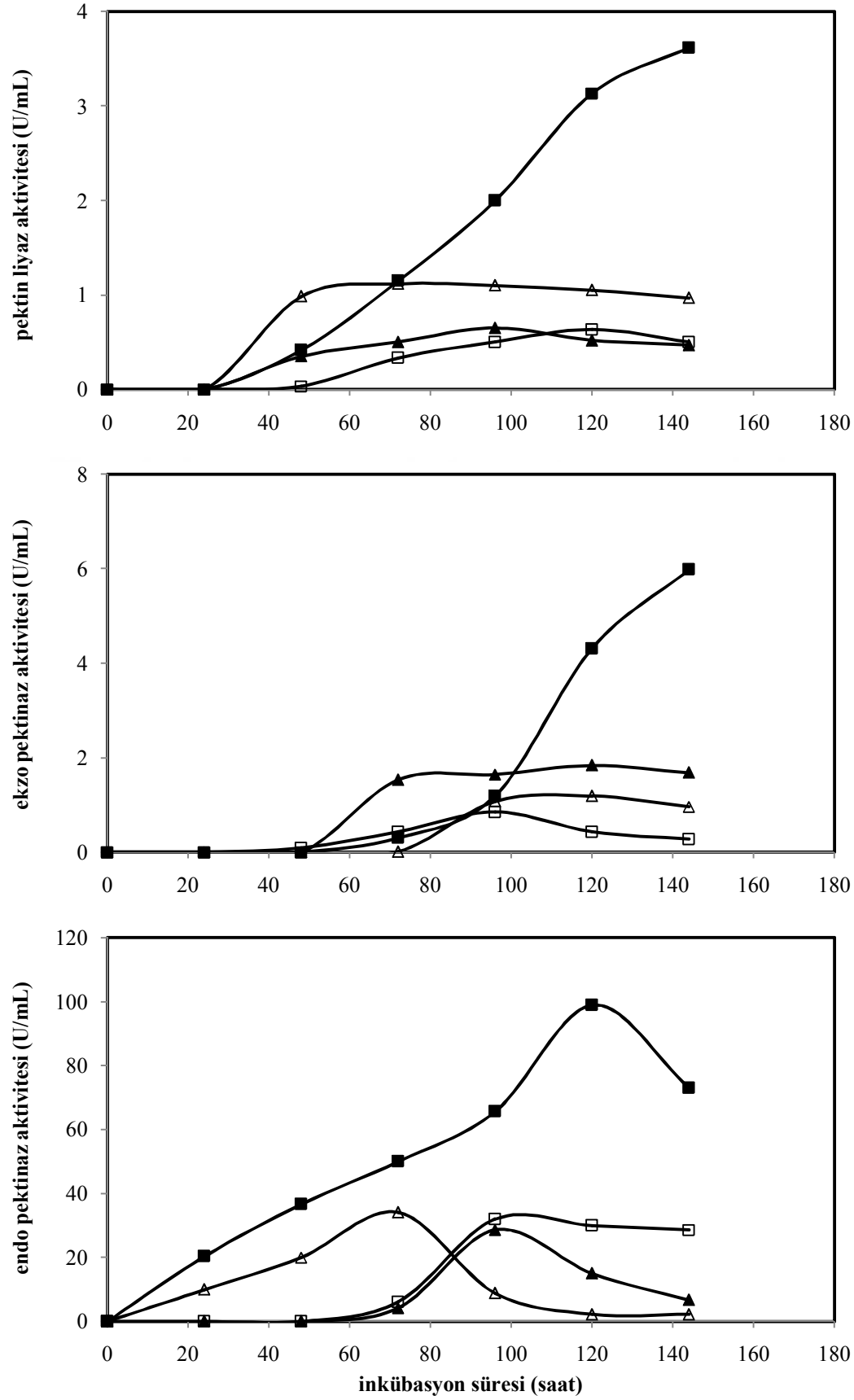
Şekilde de görüldüğü üzere; maksimum pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri 20 mesh tanecik boyutunda sırasıyla 144. saatte 3.62 U/mL, 144. saatte 5.98 U/mL ve 120. saatte 98.93 U/mL olarak elde edilmiştir. Tanecik boyutunun küçülmesiyle enzim aktivite değerleri düşmüş, bu nedenle daha sonraki çalışmalar 20 mesh tanecik boyutunda gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25.' te ise fermentasyon ortamı pH ' ının zamanla değişimi görülmektedir. Ortam pH' ında fermentasyon süresince fazla değişme gözlenmemiştir.



Şekil 4.25. Farklı şeker pancarı küspesi boyutlarında ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi [(% 5 (w/v) ŞPK, pH : 8, T : 30 °C, KH : 150 rpm, Aşı oranı : % 10 w/v, ▲: 20 mesh, ■: 100 mesh, ●: 150 mesh]

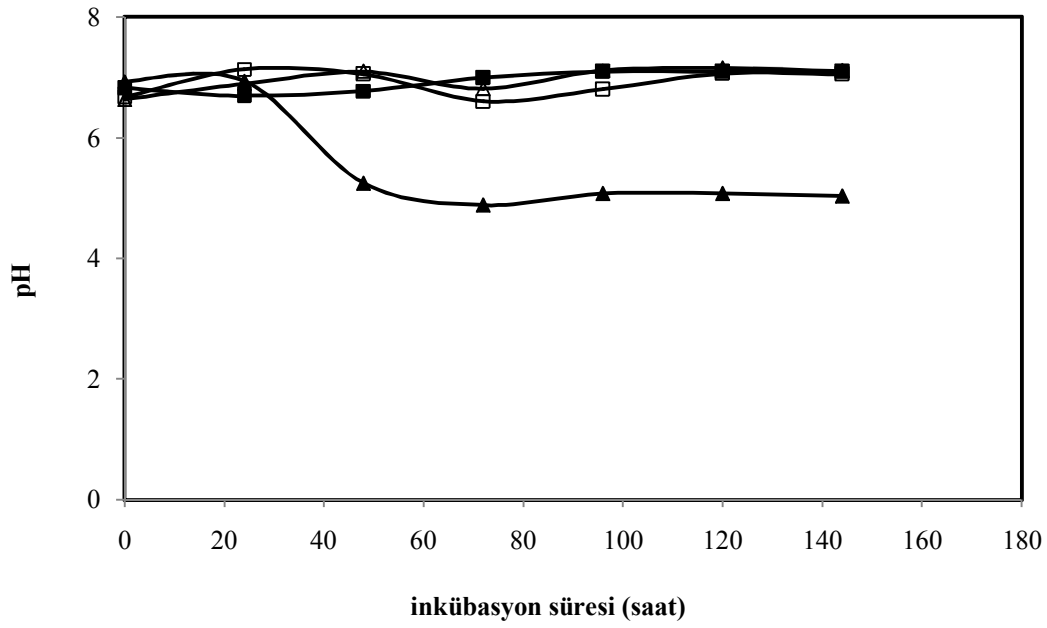
4.2.3. Şeker Pancarı Küspesi Derişiminin Etkisi

Çalışmanın bu bölümünde katı substrat olarak seçilen şeker pancarı küspesinin derişimi değiştirilmiş ve 20 mesh boyutunda % 1, % 2.5, % 5 ve % 7.5 (w/v) derişimlerinde şeker pancarı küspesi içeren ortamlarda deneyler yapılmıştır. Şekil 4.26.' da görüldüğü gibi şeker pancarı küspesinin derişiminin % 1' den % 5 (w/v)' e kadar artmasıyla pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri artmış, şeker pancarı küspesinin derişimi daha fazla artırıldığında ise substrat inhibisyonu gözlenmiş ve aktivite değerleri düşmüştür. % 5 (w/v) derişiminde elde edilen pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktiviteleri sırasıyla 144. saatte 3.62 U/mL, 144. Saatte 5.98 U/mL, 120. saatte 98.92 U/mL' dir.



Şekil 4.26. Farklı şeker pancarı küşesi derişimlerinde enzim aktivitelerinin inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C, Tanecik boyutu : 20 mesh, KH : 150 rpm, Aşı oranı : % 10 w/v, □: % 1, △: % 2.5, ■: % 5, ▲: % 7.5 w/v]

Şekil 4.27.' de ise ise fermentasyon ortamı pH ' ının zamanla değişimi sunulmuştur. Şekilden de görüldüğü gibi % 1, % 2.5 ve % 5 (w/v) oranlarında şeker pancarı küspesi kullanıldığında ortam pH' ında fazla değişme gözlenmezken, % 7.5 (w/v) oranında şeker pancarı küspesi kullanıldığında ortam pH' ında önemli düşüş meydana gelmiştir. % 7.5 (w/v) oranında şeker pancarı küspesi kullanıldığında enzim aktivite değerlerinin düşmesinin sebeplerinden biri de ortam pH' ındaki bu düşüş olabilir.



Şekil 4.27. Farklı şeker pancarı küspesi derişimlerinde ortam pH' ının inkübasyon süresi ile değişimi [pH : 8, T : 30 °C, Tanecik boyutu : 20 mesh, KH : 150 rpm, Aşı oranı : % 10 w/v, □: % 1, △: % 2.5, ■: % 5, ▲: % 7.5 (w/v)]

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasında, *P. fluorescens* ile pektin liyaz, endo pektinaz ve ekzo pektinaz enzimleri üretimi gerçekleştirilmiş ve fermantasyon bileşenlerinin mikroorganizma özgül üreme hızına ve enzim üretimine etkileri incelenmiştir. Çalışmada öncelikle, enzim üretimini etkileyen en önemli parametrelerden biri olan ortamın başlangıç pH'ının etkisi araştırılmış, en yüksek enzim aktiviteleri ile en yüksek mikroorganizma özgül üreme hızının pH 8' de elde edildiği görülmüştür. Böylece bu deneysel çalışma ile seçilen pH 8 değeri sonraki deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere uygun değer olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın sonraki aşamasında başlangıç substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Başlangıç substrat derişimi; fermantasyon deneylerinde mikroorganizma üreme ve enzim üretimini etkilemekte olan en önemli parametrelerden biridir. Deneysel çalışmalarda substrat kaynağı olarak kullanılan pektinin; farklı derişimlerinin enzim aktivitesi ve mikroorganizma özgül üreme hızına etkisi incelenmiş ve bu amaçla pektin derişimi % 0.5-1.5 (w/v) aralığında değiştirilmiştir. Pektin derişimi artmasıyla hem mikroorganizma özgül üreme hızının hem de enzim üretiminin arttığı görülmüş ve optimum pektin derişimi % 1 (w/v) olarak saptanmıştır. Pektin derişiminin daha fazla artırılmasıyla substrat inhibisyonu sonucu mikroorganizma kuru mikroorganizma derişimi ve özgül üreme hızı değerleriyle birlikte enzim aktivite değerlerinde de düşme gözlenmiştir.

Fermantasyon ortamında bulunan azot kaynakları mikrobiyal büyüme ve enzim üretiminde önemli bir role sahiptir. Bu çalışmada azot kaynağı olarak; amonyum sülfat, maya özütü ve pepton seçilmiş ve sıvı besiyerine % 0.05, 0.14 ve 0.3 (w/v) oranında olacak şekilde ilave edilmiştir. Farklı azot kaynaklarının etkisi toplu olarak değerlendirildiğinde, amonyum sülfatın pektinaz grubu enzimlerin üretiminde daha kullanışlı olduğu görülmüş ve bundan sonra yapılacak deneysel çalışmalarda azot kaynağı olarak amonyum sülfatın (% 0.14 (w/v)) kullanımına karar verilmiştir.

Derin kültür fermantasyonu çalışmalarında son olarak; farklı metal tuzlarının enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Metal iyonları mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olup, enzim sentezini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $NaCl$ ve $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ metal tuzları olarak seçilmiş ve her bir deneyde bir metal tuzu olacak şekilde 0.02 (w/v) derişiminde ilave edilmiştir. Elde edilen sonuçlar hiç metal tuzu katılmamış ortamdaki sonuçlar ile karşılaştırılmış

tır. En yüksek mikroorganizma özgül üreme hızı hiç metal tuzu eklenmediği durumda elde edilmiş olup metal tuzları ilave edildiğinde bir miktar inhibisyon etkisi göstermiştir. En yüksek pektin liyaz ve ekzo pektinaz aktivitesi hiç metal tuzu eklenmediği durumda; en yüksek endo pektinaz aktivitesi ise $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilavesi durumunda tespit edilmiştir.

Enzimin maksimum aktivite göstereceği pH ve sıcaklığı bulmak amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda ise; pektin liyaz, ekzo pektinaz ve endo pektinaz aktiviteleri için optimum pH sırasıyla 8, 10, 9; optimum sıcaklık ise sırasıyla 50, 40, 40 °C olarak bulunmuştur. Çeşitli araştırmacılar da yapmış oldukları farklı çalışmalarda alkali özellik gösteren pektinaz enzimi üretmişlerdir.

Katı hal fermantasyonu deneylerinde ilk olarak uygun katı substratın seçimi yapılmış, bu amaçla substrat olarak; buğday kepeği, şeker pancarı küspesi, ayçekirdeği tablası, portakal kabuğu, muz kabuğu ve elma posası denenmiştir. 20-100 mesh boyutundaki katı substratlar % 5 (w/v) konsantrasyonunda ilave edilmiştir. Ortam maliyetini azaltmak ve ayrıca mikroorganizmaların kullanacağı mineralleri içermesi açısından saf su yerine musluk suyu kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda maksimum aktivitelerin elde edildiği katı substratlardan biri olan şeker pancarı küspesi seçilmiş, bundan sonraki deneysel çalışmalarda şeker pancarı küspesinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Bir sonraki deneysel çalışmada katı substrat olarak kullanılan şeker pancarı küspesinin tanecik boyutunun etkisini incelemek amacıyla 3 farklı tanecik boyutunda (20, 100 ve 150 mesh) deneysel çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada; en yüksek pektin liyaz, ekzo ve endo pektinaz aktivitelerinin 20 mesh tanecik boyutunda olduğu görülmüş ve böylece daha sonraki deneysel çalışmaların 20 mesh tanecik boyutunda gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

Katı hal fermantasyonu çalışmalarının son aşamasında şeker pancarı küspesinin derişiminin etkisi incelenmiş ve optimum şeker pancarı küspesi derişiminin % 5 (w/v) olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ışığında daha ileride yapılacak çalışmalarda, enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılabilir, mikroorganizmanın genetik yapısı düzenlenerek, enzim üretimini arttırma çalışmaları yapılabilir, sürekli sistemde çalışılarak enzim üretimi gerçekleştirilebilir ve tutuklanmış mikroorganizma ile enzim üretimi incelenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Acar, J., Gökmen, V.,** 2004. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi, Cilt 1-Meyve ve Sebze Suları Üretimi, 674 s.
- Aguilar C.N., Gutierrez-Sanchez G., Rado-Barragan P.L.A., Rodriguez-Herrara R., Martinez-Hernandez J.L., Contreras-Esquivel J.C.,** 2008. Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes American Journal of Biochemistry and Biotechnology 4 (4) : 354-366.
- Ahlawat S., Dhiman S.S., Battan B., Mandhan R.P., Sharma J.,** 2009. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric, Process Biochemistry 44, 521–526.
- Akoğlu, A.,** 2006. Çiğ sütte *pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, A. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, L.J. and Serra, J.L.,** 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review, Process Biochemistry, 33(1), 21-28.
- Alonso, J., Canet, W., Hawell, N. ve Alique, R.,** 2003. "Purification and characterization of carrot (*Daucus carota L*) pectinesterase", J Sci Food Agric, 83:1600-1606.
- Anonymous,** 2004b. Delta Food Technology & Ingredients, Delta Gıda San. Tic. Ltd. Şti.
- Arpigny JL ve Jaeger KE.,** 1999. Bacterial Lipolytic Enzymes: Classification and Properties. Biochem J. 1999, 343: 177-83.
- Arunachalam C., Asha S.,** 2010. Pectinolytic Enzyme - A Review of New Studies, Advanced Biotech Journal- Online, May., 01-05.
- Ashford M., Jell J. T., Attwood D., Sharma H., Woodhead P.,** 1993. An evaluation of pectin as a carrier for drug targeting to the colon. J. Controlled Release., 26:213-220.
- Aydın, F.,** 2001. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Değişik Yöntemlerle Çeşitli Antimikrobiyellere Duyarlılıklarının Araştırılması, A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.
- Aydın Z., Akbuga J.,** 1996. Preparation and evaluation of pectin beads. Int. J. Pharm.,137:133-136.
- Ayhan, K.,** 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını Sim Matbaacılık Ltd., 522s, Ankara.

- Baumann, L., Baumann, P. Mandel, M. and Allen, R.D.** 1972. Taxonomy of Aerobik Marine Eubacteria, *J. Bacteriol.*, 110(1): 402-429.
- Baytop T.**, 1989. Farmakognozi, İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1. Cilt, s. 57-58.
- Be Miller, J.N.**, 1986. An introduction of pectins; Structure and properties, Chemistry and Functions of Pectins, Fishman, M.L. and Jem, J.J. ACS Symposium Series 310, American Chemical Society, Washington, DC.
- Blandino A., Iqbalsyah T., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C.**, 2002. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol*, 58:164-169.
- Bruins, M.R., Kapil, S. and Oehme, F.W.**, 2003. Characterization of a Small Plasmid (pMBCP) from Bovine *P. pickettii* that Confers Cadmium Resistance. *Ecotox. Environ. Safe.*, 54: 241-248.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.**, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eight edition, 1268 p., U.S.A.
- Celestino, S.M.C., Freitas, S.M., Medrano, F.J., Sousa, M.V., Filho, E.X.F.**, 2006. Purification and Characterization of a Novel Pectinase from *Acrophialophora nainiana* with Emphasis on Its Physicochemical Properties. *Journal of Biotechnology*, 123:33-42.
- Chisti Y.**, 2010. Industrial Biotechnology Sustainable Growth and Economic Success, Edited by Wim Soeteart and Erick J. Vandamme, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 149-173, 552 p, Weinheim, Germany.
- Cosgrove, D. J.**, 1997. "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants", *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13:171-201.
- Couto, S.R., Sanroman, M.A.**, 2005. Application of solid state fermentation to lignolytic enzyme production, *Biochemical Engineering Journal*, 22, 211-219.
- Couto S.R. and Sanroman M.A.**, 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*. 76 (3), 291-302.
- Davis, D.B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. S. and Wood, W.B.**, 1968. Microbiology, Hober Medical Division, 774p, New York.
- Dhillon S.S., Gill R.K., Gill S.S., Singh M.**, 2004. Studies on the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*, *International Journal of Environmental Studies*, Volume 61, Issue 2 April 2004, pages 199 – 210.
- Diaz- Godinez G., Sorino-Santos J., Augur C., Viniegra-Gonzalez G.**, 2001. Exopectinase produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 271-275.

- Dixit, V. S., Kumar, A. R., Pant, A. ve Khan, M. I., 2004.** "Low molecular mass pectate lyase from *Fusarium moniliforme*: similar modes of chemical and thermal denaturation", *Biochem Biophys Res Commun*, 315:477-84.
- Ekşi, A., 1988.** Meyve Suyu Durultma Tekniği, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no:9, 127s.
- Erdem, B., 1999.** "Pseudomonaslar." Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö: *Temel ve klinik mikrobiyoloji.*, Güneş kitabevi, 551-558, Ankara.
- Erşan, M., 2011.** *Rhizopus delemar* ile Lipaz ve Asit Fosfataz Enzimlerinin Üretimi ve Ağır Metal Biyobirikiminin Eş Zamanlı Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Fuller, A.T. ve Mellowes, G., 1971.** Pseudomonic Acid: An Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature.*, 234: 416-417.
- Galiotou-Panayotou M., Kapantai M., Kalantzi O., 1997.** Growth conditions of *Aspergillus sp.* ATHUM-3482 for polygalacturonase production, *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 425-429.
- Gilligan P, H., 1995.** "Pseudomonas and Burkholderia", Murray, P,R., Baron, E,J., Pfaller, M,A., Tenover, F,C., Tenover, F,C., Tenover, R,H., (eds). *Manual of Clinical Microbiology.*, 6 th ed. Washington DC: ASM Press: 509-519.
- Goodenough, P., 1992.** "Protein Engineering II", Proceedings of the Second AFRC Protein Engineering Conference, Cambridge University, September, Berkshire, UK. 70-71. Harpen, G., (1981). "Industrial Enzymes from Microbial Sources Recent Advances", *Chemical Technology Review*, 180:282-284.
- Göğüş, F. and Fadiloğlu, S., 2006.** Enzymes, 219-267, Food Chemistry, Göğüş, F. and Fadiloğlu, S. (Eds.), Nobel Yayın Dağıtım, 344 p, Ankara.
- Gözükara, M.E., 2001.** Biyokimya, 4. Baskı, Cilt 2, Nobel Tıp Kitapevleri, Malatya.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004.** Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64: 763-781.
- Gürsoy A., Dortunç B., Piskin A., Peppas N. A., 1989.** Kontrollü İlaç Serbestleştirici Sistemler. s. 249-252, M. Ü. Eczacılık Fakültesi Yayınları, İstanbul.
- Halkman A.K., 2005.** Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları, Başak Matbaacılık Ltd. Şti, 358 sayfa, Ankara.
- Hasan F., Shah, A.A., Hameed, A., 2006.** Industrial applications of microbial lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235–251.
- Hassen, A., Saidi, N., Cherif, M. ve Boudabous, A., 1998b.** Effects of Heavy Metals on

Pseudomonas aeruginosa and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology*., 65: 73-82.

- Hirose, N., Kishida, M., Kawasaki, H. ve Sakai, T.,** 1999. "Purification and Characterisation of an Endo-polygalacturonase from a Mutant of *Saccharomyces Cerevisia*", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(6):1100-3.
- 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 and Biotechnology*, 59 (4-5), 409-418.
- Jeppesen, C.,** 1995. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp From Food and Environment, *International Journal of Food Microbiology*, 26:25-41.
- Kalaycıoğlu, L., Serpek, P., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A. M.,** 2000. *Biyokimya*, 2.Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, 654 s., Ankara.
- Kampen, W.H.,** 1997. Nutritional requirements in fermentation processes, *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook Principles, Proces Design and Equipment*, 2nd Edition, Edited by Henry C. Vogel and Celeste L. Todaro, New Jersey.
- Kanner, D., Gerber, N.N. ve Bartha, R.,** 1978. Pattern of Phenazine Pigment Production by a Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 134(2): 690-692.
- Kapoor M., Beg Q.K., Bhushan B., Dadhich K.S., 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, 467-473.
- Kapoor M., Kuhad R.C.,** 2002. Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation., *Lett Appl Microbiol* 34: 317-322.
- Kashyap D.R., Chandra S., Kaul A., Tewari R.,** 2000. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 277-282.
- Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., and Tewari, R.,** 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77 (3), 215-227.
- Kashyap D.R., Soni S.K., Tewari R.,** 2003. Enhanced Production of pectinase by *Bacillus* sp. D T 7 using solid state fermentation, *Bioresource Technology* 88, 251-254.
- Kawano, C.Y., Chellegatti, M.A., Said, S., Fonseca, M.J.,** 1999. "Comparative Study of Intracellular and Extracellular Pectinases Produced by *Penicillium frequentans*", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29:133-140.

- Keskin, D. ve Ekmekçi, S.,** 2003. *Pseudomonas* türlerinin gıdalardan izolasyon ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri. *Mikrobiyoloji Dergisi.*, 1(8): 29-33, Aydın.
- Keskin D.,** 2007. *Pseudomonas* Türlerinin Gıdalardaki Önemi. Çukurova Ü. Tıp Fak. ARŞİV Kaynak Tarama Dergisi, Sayı 3 Cilt16: Sayfa 185, Aydın.
- Kıran, Ö.(1), Çömlekçioğlu, U.(1), Dostbil, N.(2),** 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kahramanmaraş (KSU, Journal of Science And Engineering 9(1), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Van(2).
- Kilara, A.,** 1982. Enzymes and their uses in the processed apple industry: A review. *Process Biochemistry*, 17 (4), 35-41.
- 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-alkalina Pectate Lyase from an Alkaliphilic Strain of Bacillus, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63 (1), 65-72.
- Kobayashi T., Higaki N., Suzumatsu A., Sawada K., Hagihara H., Kawai S., Ito S.,** 2001. Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolysaccharuronase from a strain of Bacillus, *Enzyme and Microbial Technology* 29,70-75.
- Koka, R. and Weimer, B.C.,** 2000. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98, *Journal of Applied Microbiology*, 89: 280-288.
- Koneman, W.E., Allen, D.S., Janda, M.W., Schreckenberger, P.C. Winn,C.W.,** 1997. "Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology"., vol. 5, Lippincott Press, Philadelphia, 263-274.
- Krishna C.,** 2005. Solid-State Fermentation Systems --An Overview, *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 1-30.
- Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S.,** 2007. "Environmental and Microbial Relationships" 4(4):325-340.
- Kulkarni, N.S., Deshpande, M.S.,** 2007. *General Enzymology*. Global Media, Mumbai, p 266.
- Lower E. S.,** 1992. Pectin and derived acids manufacture properties uses. *SÖFWJournal.*, 118(14):845-846.
- Lower E. S.,** 1993. Pectin and derived acids manufacture properties uses. *SÖFWJournal.*, 119(1):42-44.
- Lowry, O., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.,** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

- Martins E.S., Silva D., Da Silva R., Gomes E.,** 2002. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*, *Process Biochemistry* 37: 949-954.
- Mccarthy R., Kotarski S. F., Salyers A. A.,** 1985. Location and characterization of enzymes involved in the breakdown of polygalacturonic acid by bacteroides thetaiotaomicron. *J. Bacteriology.*, 161:493-499.
- Meyer, J.M. ve Hohnadel, D.,** 1990. Pyoverdinin-Facilitated Iron Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: Immunological Characterization of the Ferripyoverdin Receptor. *Mol. Microbiol.*, 4: 1401-1405.
- Mill P.J., Tuttobello R.,** 1961. The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger* 2. Endopolygalacturonase, *Biochem. J.* 79, 57-64.
- Micheli, F.,** 2001. "Pectin methylesterase: cell wall enzymes with important roles in plant physiology", *Trends Plant Sci.*, 6:414-419.
- Miller G.L.,** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Miller, M. and Litsky W.,** 1976. *Industrial Microbiology*, McGraw-Hill Book Company, 465 p.
- Nabi N.G., Asgher M., Shah A.H. , Sheikh M.A., Asad M.J.,** 2003. Production of Pectinase by *Trichoderma harzianum* in Solid State Fermentation of Citrus Peel, *Pak. J. Agri. Sci.*, Vol. 40(3-4), 193-201.
- Odaci, D., Timur, S. and Telefoncu, A.,** 2008. Bacterial sensors based on chitosan matrices, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134:89-94.
- Okafor N.,** 2007. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, Science Publishers, Clemson, South Carolina, Enfield, NH, USA, 551 p.
- Ooijskaas, L., P., Weber, F., J., Buitelaar, R., M., Tramper, J., Rinzema, A.,** 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems, *Tibtech*, 18, 356-360.
- Ouattara H.G., Koffi B. L., Karou G. T., Sangare A., Niamke S.L., Diopoh J.K.,** 2008. Implication of *Bacillus sp.* in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation, *World J Microbiol Biotechnol* 24, 1753–1760.
- Özeş O.N.,** 1988. *Aspergillus niger*' in poligalakturonaz sentezine etki eden fizyolojik parametrelerin saptanması ve enzimin bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi, *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Palleroni N, J.,** 1984. "Family 1. Pseudomonadeceae; Genus: Pseudomonas", Krieg N R., Holt J G: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology.*, Williams and Wilkins, Baltimore- U.S.A " (1): 141-199.

- Palleroni N, J.**, 2005. "Family 1.*Pseudomonadeceae*; Genus: *Pseudomonas*", Brenner D,J., Krieg N R.,Staley J,T: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology.*, ", George M., Garrity, Sc. D., East Lansing-U.S.A ", (2): 323- 379.
- Pamuk, F.**, 2000. Biyokimya, Birinci Baskı, Gazi Kitapevi, 353 s., Ankara.
- Pandey A.**, 2003. Solid-state fermentatıon, Biochemical Engineering Journal 13, 81-84.
- Patil S.R., Dayanand A.**, 2006. Exploration of Regional Agrowastes for the Production of Pectinase by *A. Niger*, Food Technol. Biotechnol. 44 (2), 289-292.
- Pekin, B.**, 1980. Biyokimya Mühendisliği, Birinci Kitap İkinci Kısım, Ege Ün.v., İzmir.
- Pelczar, J. M and Reid, D. R.**, 1958. Microbiology. Kogakusha Company Ltd., 125 s., Tokyo.
- Petersen, S.**, 2001. Enzymes to upgrade plant nutrients. Feed Mix, 9, 12-15.
- Piccoli-Valle, R.H., Passos F. M.L., Passos F.J.V., Silva, D.O.**, 2001. Production of Pectin Lyase by *Penicillium griseoroseum* in Bioreactors in the Absence of Inducer, Brazilian Journal of Microbiology 32, 135-140.
- Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K. ve Enkins, J.**, 1998. "Chrystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp." Carotovora, Journal of Biological Chemistry, 27(38):24660-24664.
- Pollack, M.**, 1995. "*Pseudomonas aeruginosa*", Mandell G., Douglas, G., Benett, J., (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases., P1980, 4 th ed. Churchill Livingston Inc. New York.
- Pressey, R. ve Avants, J. K.**, 1973. "Two forms of polygalacturonase in tomatoes", Biochim Biophys Acta, 309:363-369.
- Pressey, R. ve Puri, T.**, 1984. "Characterization of tomato polygalacturonase converter", Euro J Biochem,144:217-221.
- Pylar, E.J.**, 1952. Enzymes, 71-89, Baking Science and Technology, Volume I, The Baker Digest in Collaboration with the Staff of the Siebel Institute of Technology (Eds.), Siebel Publishing Company, Chicago, ILL, 382 p.
- Raimbault, M.**, 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation, EJB Electronic Journal of Biotechnology, 1, 3, 174-188.
- Rajmohan, S., Dodd, C.E.R. and Waites, W.M.**, 2002. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage, Journal of Applied Microbiology, 93: 205-213.
- Ramachandran S.**, 2005. Isolation, purification and Characterization of Pectinase from *Penicillium citrinum*, Doctoral Thesis, School of Biosciences Mahatma Gandhi

University Kottayam, Kerala India.

Rao, D.G., 2010. Introduction to biochemical engineering, Second edition, Tata McGraw Hill Education, New Delhi.

Reed, G., 1981. Industrial Microbiology, Fourth Edition, 883 p., U.S.A.

Rehm, J., Reed, G., Kennedy, J.F., 1987. Biotechnology, 7a, 5-100, Vch, New York.

Romboutz, F.M. ve Pilnik, W., 1980. "Pectic Enzymes, Economic Microbiology, A. H. Rose (Eds.), Academic Press, London, 33:227-382.

Rubinstein A., Radai R., Ezra M., Pathak S., Rokem J. S., 1993. In vitro evaluation of calcium pectinate: A potential colon specific drug delivery carrier. Pharm. Res., 10(2):158-263.

Sabu A., Nampoothiri K.M., Pandey A., 2005. L-Glutaminase as a Therapeutic enzyme of microbial origin, Methods in Biotechnology, Vol. 17: Microbial enzymes and biotransformations, Edited by Jose-Luis Barredo, Humana Press, 7-90, 319 p., Totowa, New Jersey, USA.

Sağiroğlu, A.K., 1999. Bilim ve Teknik, No:383, 74-80.

Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J. and Vandamme, E.J., 1993. Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties, and applications. Advances in Applied Microbiology, 39, 213-294.

Scott, D., 1978. "Enzymes, industrial" ,173-224, Encyclopedia of chemical technology, M. Grayson, D. Ekarth ve K. Othmer (Derl.), Wiley, New York.

Sharma R., Chisti, Y., Banerjee, 2001. U.C., Production, purification, characterization, and applications of lipases, Biotechnology Advances, 19, 8, 627-662.

Shevchik V.E., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., 1997. Pectate Lyase Pell of *Erwinia chrysanthemi* 3937 Belongs to a New Family, Journal of Bacteriology, Dec., p. 7321-7330.

Shubakov A.A., Elkina E.A., 2002. Thematic Division, Chemistry and Technology of Plant Substances, Biotechnology of pectinolytic enzymes as instruments for structural research of plant polysaccharides. Part I. Production of Polygalacturonases by Filamentous Fungi *Aspergillus niger* Acn F-1119 and *Penicillium Dierckxii* Acn F-152, Chemistry and Computational Simulation Butlerov Communications Vol.2. No.7, 65-68.

Shukla N., Shukla, P.K., 2009. "Magnetization of a Warm Plasma by the Nonstationary Ponderomotive Force of an Electromagnetic Wave", Phys. Rev. E 80, 027401 80:34-70 Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., (2000). "Serine Alkaline Protease From a Newly Isolated *Bacillus sp.* SSR1. Process Biochemistry . 36 : 781-785.

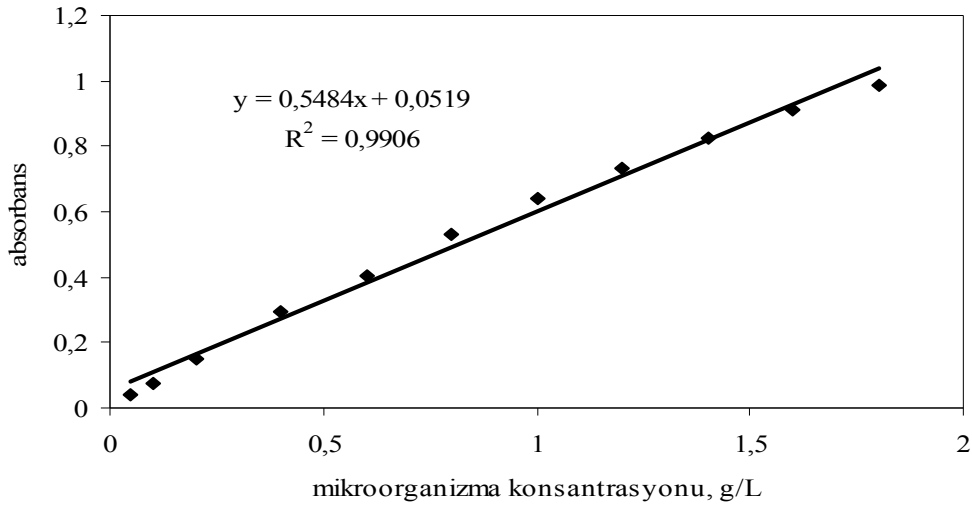
- Shuler, M.L., Kargi, F.,** 2002. Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2nd Ed., Prentice Hall Inc., USA.
- Silva D., Tokuioshi K., Martins S.E., Silva R., Gomes E.,** 2005. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3, Process Biochemistry 40, 2885–2889.
- Silver, S.,** 1992. Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. Plasmid., 27: 1-3.
- Soares, M.M.C.N., Silva, R., Gomes, E.,** 1999. Screening of Bacterial Strains for Pectinolytic Activity: Characterization of the Polygalacturonase Produced by *Bacillus sp.* Revista de Microbiologia, 30:299-303.
- Solberg, M., O'leary, V.S. and Riha, W.E.,** 1972. New Medium for the Isolation and Enumeration of Pseudomonads, Applied Microbiology, 24: 544–550.
- Strianse S. J.: Gum-base hair dressing. Ed.,** 1957. Sagarin E., Cosmetics Science and technology. s. 565-566, Interscience Publisher, Inc., New York.
- Stutzenberger F.J.,** 1987. Inducible Thermoalkalophilic Polygalacturonate Lyase from *Thermomonospora Fusca*, Journal Of Bacteriology, June, P. 2774-2780.
- Tanabe, H., Kobayashi, Y. and Akamatsu, I.,** 1986. Pretreatment of pectic wastewater from orange canning by soft-rot *Erwinia carotovora*. Journal of Fermentation Technology, 64 (3), 265–268.
- Tanyıldızı M.S.,** 2005. Çeşitli bakteri türleriyle farklı ortam ve çalışma şartlarında α -amilaz üretiminin incelenmesi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Elazığ.
- Tatar, F.,** 1997. *Aspergillus niger* Kullanarak Alfa-Amilaz Enzimi Üretimi Üzerinde Araştırmalar, Yüksek Lisans Semineri, Uludağ Ün., Bursa.
- Telefoncu, A.,** 1986. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, 22 Eylül-3 Ekim 1986. Çesme, İzmir-Türkiye, 326p.
- Telefoncu, A.,** 1997. Enzimoloji.Yüksek Lisans Yazokulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye.446 s.
- Temiz, A.,** 1998. Enzimler, 259-337, Gıda Kimyası, Saldamlı, İ. (Der.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 527 s.
- Tepe, Ö.,** 2012. "*Bacillus Pumilus* ile Pektinaz Üretiminin İncelenmesi", Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Topal, S.,** 1985. "Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri", Gıda, 10(1), 25-37.

- Topal, S., Pembeci, C., Borcaklı, M., Batum, M., Çeltik, Ö.,** 2000. Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Endüstriyel Öneme Sahip Bazı Enzimatik Aktivitelerinin İncelenmesi-I: Amilaz, Proteaz, Lipaz. *Türk J Biol*, 24: 79-93.
- Tortora, J.G., Funke, R.B. and Case, L.C.,** 1992. Microbiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., California, 523p.
- Tuttobello R., Mill P.J.,** 1961. The Pectic Enzymes of *Aspergillus niger* 1. The Production Of Active Mixtures of Pectic Enzymes, *Biochem. J.* Vol.79, 51-57.
- Türker M.,** 2005. Biyoreaksiyon Mühendisliği Biyolojik Proseslerin Kinetiği ve Modellenmesi, Su vakfı yayınları, Kocaeli.
- Tüzün, C.,** 1997. Biyokimya, Üçüncü Baskı, Palme Yayınları, 487 s., Ankara.
- Ünlütürk A ve Turantaş F.,** 1998. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir.
- Vachee, A., Mossel, D.A.A. and Leclerc, H.,** 1997. Antimicrobial Activity Among *Pseudomonas* and Related Strains of Mineral Water Origin. *J. Appl. Microbiol.*, 83: 652-658.
- Vries R.P., Visser, J.,** 2001. "Applied and Environmental Microbiology", 65:5500-5503.
- Wasi, S., Jeelani, G. and Ahmad, M.,** 2008. Biochemical characterization of a multiple heavy metal, pesticides and phenol resistant *Pseudomonas fluorescens* strain, *Chemosphere*, 71:1348- 1355.
- Wilson, S.G. and Miles, A.A.,** 1964. Principles of Bacteriology and Immunity. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 636-643 p.
- Wiseman, A.,** 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry s. 274-373.
- Whitaker, J. R.,** 1990. "Microbial pectinolytic enzymes", 133-176, Microbial enzymes and biotechnology, W.M. Fogarty ve C.T. Kelly (Derl.), Elsevier Science Ltd, London.
- URL-1,** www.dcu.ie/~oshead/BE401/lectures/pres4381fa94a4194.pdf, Weir E., McSpadden C., Production of Industrial Enzymes in Fermentation, 10.10.2011.
- URL- 2,** The Merck Index, Twelfth Edition, Merck and Co., Inc., USA, 1996.
- URL- 3,** www.mikrobiyoloji.org, 2009.
- URL- 4,** Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Sim Matbacılık Ltd. Şti., Ankara, 2000.

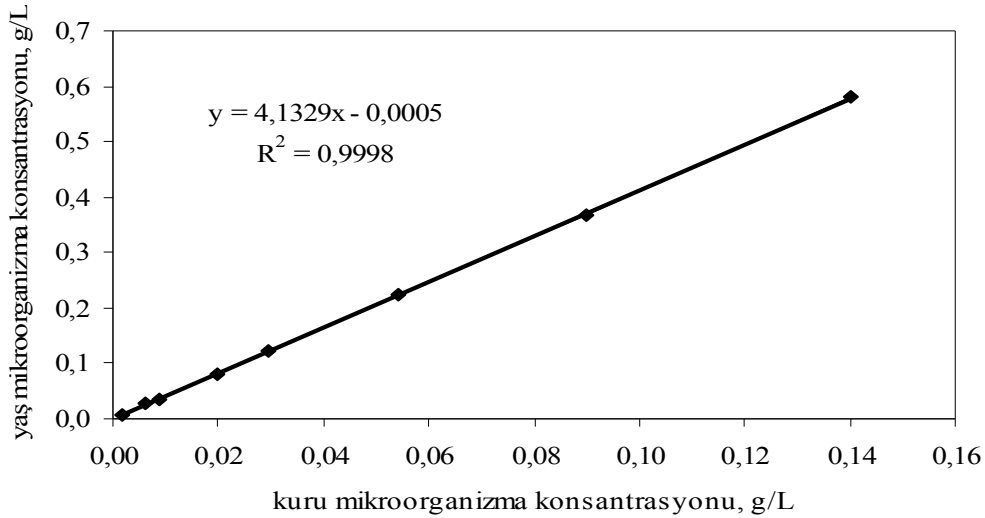
7. EKLER

Ek : 1 Mikroorganizma Konsantrasyonu Kalibrasyon Doğrusu

Mikroorganizma konsantrasyonu spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bunun için öncelikle 0.05 - 1.8 g/L arasındaki derişimlerde hazırlanan mikroorganizma çözeltilerinin uygun dalga boyu olarak seçilen 400 nm’ de absorbanslarının okunmasıyla yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur (Ek Şekil 1.1.). Verilerin değeriendirilmesinde kuru mikroorganizma ağırlığı kullanıldığından, yaş ve kuru ağırlık arasındaki ilişkiyi belirlemek için mikroorganizma sıvı ortamda üretilip santrifüjlenerek ayrılması sağlanmış, ayrılan mikroorganizmalar değışik ağırlıklarda tartılarak, 60 °C’ de etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuş ve tekrar tartılarak kuru ağırlıkları saptanmıştır. Kuru ağırlığa karşı yaş mikroorganizma ağırlığı grafiğe geçirilerek *P. fluorescens* için kuru mikroorganizma kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir (Ek Şekil 1.2.).



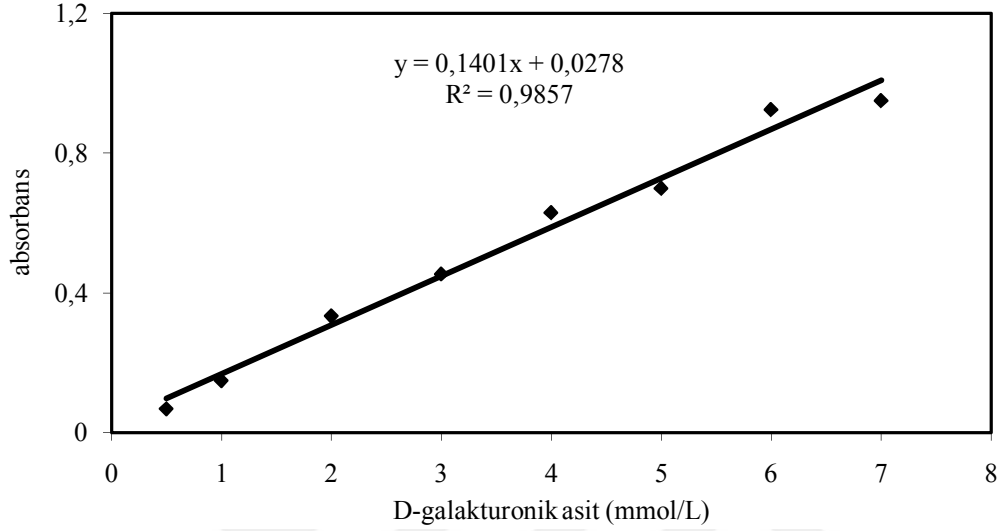
Ek Şekil 1.1. Yaş mikroorganizma kalibrasyon doğrusu



Ek Şekil 1.2. Yaş-kuru ağırlık kalibrasyon doğrusu

Ek : 2 Galakturonik Asit İçin Kalibrasyon Doğrusu

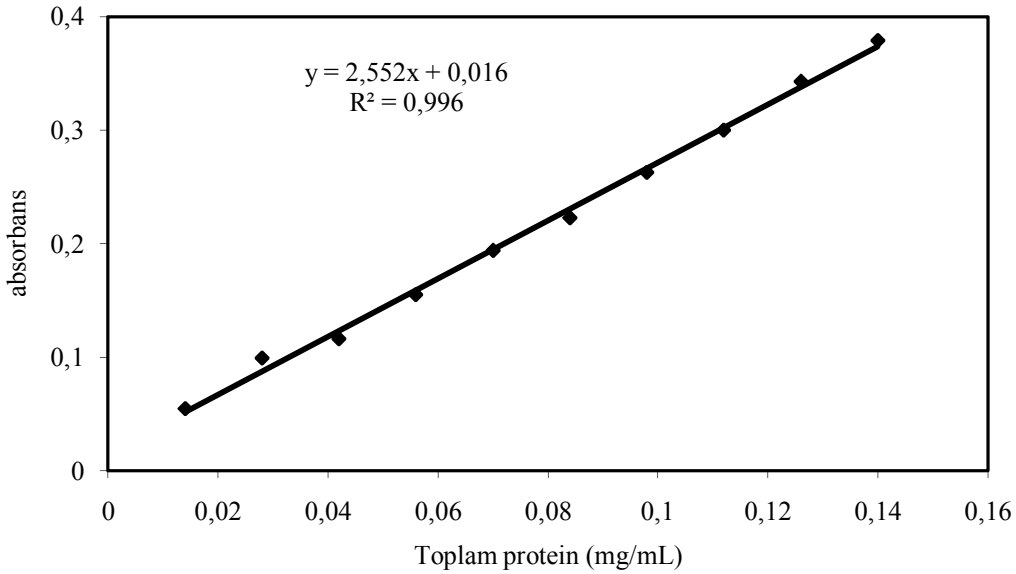
50 mmol/L' lik galakturonik asit çözeltisinden belli konsantrasyonlarda hazırlanan galakturonik asit çözeltilerinin uygun dalga boyu olarak seçilen 530 nm' de absorbanslarının okunmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiği Ek Şekil 2.1.' de verilmiştir.



Ek Şekil 2.1. Galakturonik asit kalibrasyon grafiği

Ek : 3 Toplam Protein Konsantrasyonu Kalibrasyon Doğrusu

Bovine serum albuminin (BSA) distile suda hazırlanan 1 mg/mL' lik standart stok çözeltisinden belli konsantrasyonlarda hazırlanan protein çözeltilerinin uygun dalga boyu olarak seçilen 660 nm' de absorbanslarının okunmasıyla elde edilen kalibrasyon grafiği Ek Şekil 3.1.' de verilmiştir.



Ek Şekil 3.1. Toplam protein kalibrasyon grafiği

ÖZGEÇMİŞ

14.02.1986 yılında Batman' da doğdu. İlk, ortaokul ve lise eğitimini Siirt' te tamamlamış olup 2004 yılında Siirt Lisesi' sinden (yabancı dil ağırlıklı) mezun olmuştur. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümünde üniversite eğitim hayatına başlamış olup 2009 yılında mezun olmuştur. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başlamış olup halen devam etmektedir. 2011 yılında Zonguldak' ta, Türkiye Taşkömürü Kurumu Genel Müdürlüğü Karadon Taşkömürü İşletme Müessesesi Müdürlüğünde Çevre Mühendisi olarak görevine başlamış olup halen devam etmektedir. Evli olup Zonguldak' ta hayatına devam etmektedir.

