

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***TRICHODERMA REESEI* KÜLTÜRLERİNDE
PEKTİNAZ ENZİMİNİN OPTİMİZASYONU**

Kimyager Barlas ESKİZENGİN

**FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İnci ARISAN (YTÜ)

İSTANBUL, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	iv
KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ	2
2.1 Pektin	2
2.1.1 Pektinin Yapısı	3
2.1.2 Pektinlerin Biyolojik Olarak Parçalanması	5
2.2 Mantarlar	6
2.2.1 Mantarların Üremesinde Etkili Olan Faktörler.....	7
2.2.2 Mantarların metabolizması	3
2.3 <i>Trichoderma reesei</i>	8
2.3.1 <i>Trichoderma</i> 'nın Keşfi ve İzolasyonu	8
2.3.2 <i>Trichoderma reesei</i> 'nin Endüstriyel Mutantları ve Rekombinant Suşları.....	9
2.4 Pektinazlar	10
2.4.1 Enzimler	10
2.4.2 Enzimlerin Yapısı	12
2.4.3 Enzimlerin Eldesi	13
2.4.4 Enzim Katalizi	13
2.4.4.1 Enzimlerin Substrat Spesifikliği.....	16
2.4.5 Enzimlerin Etki Spesifikliği	16
2.4.6 Enzimatik Reaksiyonların Mekanizması	17
2.4.7 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	17
2.4.8 Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları	18
2.4.8.1 Proteaz	19
2.4.8.2 Amilaz	19
2.4.8.3 Selülaz	20
2.4.8.4 Ksilanaz	21
2.4.8.5 Lipaz	21
2.4.8.6 Pektinaz	22
2.5 Pektinazların Kullanım Alanları	25
3. METARYAL VE YÖNTEM.....	27

3.1	Kullanılan Aletler	27
3.2	Kullanılan Kimyasallar.....	27
3.3	Çalışmada Kullanılan Mantar Suşu	28
3.4	Mikroorganizma Üretim Ortamı (Katı Besiyeri).....	28
3.5	Spor Çözültisinin Hazırlanması	28
3.6	Enzim Üretim Ortamı (Sıvı Besiyeri).....	29
3.7	Enzim Aktivitesinin tayini.....	30
3.8	D-Galakturonik Asid Standart Eğri grafiğinin Çizilmesi	30
3.9	Protein Tayini	31
3.10	BSA Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi	31
3.11	Kültür Ortamında Pektinaz aktivitesini Etkileyen Fizyolojik Koşulların Belirlenmesi	32
3.11.1	Pektinaz Üretimi İçin Uygun Konsantrasyonun Saptanması	32
3.11.2	Pektinaz Üretimi için uygun pH 'ın saptanması	33
3.11.3	Pektinaz Üretimi için Uygun Sıcaklığın Saptanması.....	33
3.12	Enzim Aktivitesinin Tayini	33
3.12.1	Total Ünitenin Hesaplanması	33
3.12.2	Spesifik Aktivitenin Hesaplanması	34
4.	SONUÇLAR.....	35
4.1	Pektinaz Üretimi için Uygun Konsantrasyonun Belirlenmesi.....	35
4.2	Pektinaz Üretimi için Uygun pH Değeri	36
4.3	Pektinaz Üretimi için Uygun Sıcaklık Değeri	37
5.	TARTIŞMA.....	38
	KAYNAKLAR.....	40
	ÖZGEÇMİŞ.....	43

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
g	Gram
v/v	Hacimce
C	Konsantrasyon
l	Litre
μ	Mikro
Km	Michaelis Sabiti
M	Molar
mg	Miligram

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Bovine Serum Albumin
CoA	Koenzim A
DNS	Dinitrosalisilik Asid
PDA	Patatez Dekstroz Agar
PE	Pektin Esteraz
PG	Poligalakturonaz
PGL	Poligalakturonaz Liyaz
PL	Pektin Liyaz
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
t	Zaman
U	Enzim Ünitesi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Galakturonik asit rezidülerinin α (1-4) bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan pektin4
Şekil 2.2	Trichoderma reesei türünün mikroskop altında görünümü10
Şekil 2.3	Enzim katalizini gösteren örnek şema14
Şekil 2.4	Aktivasyon enerjisini gösteren şema.....15
Şekil 3.1	Farklı gliserin konsantrasyonlarına sahip, ekim yapılmış kültürasyon ortamlarını inkübatör içerisinde gösteren resim29
Şekil 4.1	Gliserin konsantrasyonunun spesifik aktivite değişimi.....35
Şekil 4.2	Farklı pH lardaki enzim üretim ortamlarında tespit edilen spesifik aktivite değerleri.....36
Şekil 4.3	Pektinaz enzim aktivitesinin sıcaklığa göre total ünite değişimi37

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan kimyasallar.....27
Çizelge 3.2	D-galakturonik asid standart eğri grafiği.....31
Çizelge 3.3	BSA standart eğri grafiği.....32
Çizelge 4.1	Farklı gliserin konsantrasyonlarındaki üretim ortamlarında tespit edilen total ünite ve spesifik aktivite değerleri.....35
Çizelge 4.2	Farklı pH lardaki enzim üretim ortamında tespit edilen total ünite değerleri 36
Çizelge 4.3	Farklı sıcaklıklardaki enzim üretim ortamlarında tespit edilen total ünite değerleri37

ÖNSÖZ

Yüksek lisans bitirme tezi hazırlama çalışmalarında başından sonuna kadar bana yardımcı olan, sonsuz bilgi ve tecrübesiyle yol gösterip her konuda destek veren çok değerli hocam Prof.Dr.İnci Arısan'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Sn.Araştırma Görevlisi Nurdagül ORHAN ve Sn.Arş.Gör. Nilay ALTAŞ KIYMAZ' a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Mantarlar, bitkiler aleminin klorofilden yoksun tek veya çok hücreli canlılarıdır. Bir hücreli mantarlar (sporlar ve mayalar) mikroplara benzerler, ancak çevrelerinde selüloz zardan oluşan kalınca bir zarın bulunması ile onlardan ayrılırlar.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Endüstriyel alanda en çok kullanıma sahip olan enzimler proteaz, amilaz, selülaz, ksilanaz, lipaz ve pektinazdır.

Pektinaz, endüstriyel pektik enzim preparatları için kullanılan genel bir isimdir. *Aspergillus niger* tarafından pektinaz yapımı, meyve ve sebze suyu teknolojilerinde çok fazla uygulanmaktadır. Meyve ve sebze teknolojilerinde kullanılmaktadır.

Çalışmada genetik olarak mutasyona uğratılmış *Trichoderma reesei* mantarı tarafından pektin ve gliserin substratı kullanılarak enzim üretim şartlarının düzenlenmesi sonucunda daha önceden ön çalışması yapılmış lisans tezinde gözlemlenen pektinaz üretimindeki artış, bu artıştan yararlanılarak bulunan optimum konsantrasyon ve optimum zaman sayesinde optimum pH ve optimum sıcaklığın tayin edilmesi gerçekleştirilecektir.

Anahtar Kelimeler : Mantarlar , pektinaz, optimizasyon, *Trichoderma reesei*

ABSTRACT

The world of plants, fungi, single or multi-celled life forms that lack of chlorophyll. One-celled fungi (spores and yeasts) are like germs, but a thick membrane around them by the presence of cellulose membrane are separated from them.

Enzymes used in almost every field of industry are usually obtained from microorganisms. Because microbial enzymes from vegetable or animal origin according to the catalytic activity of enzymes are very high, form an unwanted by-product, they are more stable and cheaper, they can be obtained are the advantages of large amounts. Industrial area with the most available protease enzymes, amylase, cellulase, ksilanaz, lipase and pectinase.

Pectinase, a general name used for industrial pectic enzyme preparations. Pectinase production by *Aspergillus niger*, a lot of fruit and vegetable juice technology is applied. Fruits and vegetables are used in technology.

In the study by genetically mutated fungus *Trichoderma reesei* using the enzyme substrate for pectin and glycerine production conditions as a result of regulation previously observed in pre-thesis work has been an increase in the production of pectinase, benefiting from this increase in the optimal concentration and the optimum time to take place thanks to the determination of optimum pH and optimum temperature.

Keywords : Fungus , pectinase , optimization, *Trichoderma ressei*

1. GİRİŞ

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 ulaştığımız 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.

Bir enzimden herhangi bir alanda yararlanabilme imkanı büyük ölçüde ekonomik parametrelerle ilgilidir. Enzimler canlı materyallerden elde edilmelidir. İzolasyon ve saflaştırma işlemleri çok emek gerektiren pahalı proseslerden oluşmaktadır. Bu nedenlerden dolayı enzimler genellikle pahalı materyallerdir.

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.

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

Pektik maddeler pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir grup maddeye verilen genel addır. 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. *Aspergillus niger* veya mutasyona uğratılmış mantarlar tarafından pektinaz yapımı, meyve ve sebze suyu teknolojilerinde çok fazla uygulanmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; genetik olarak mutasyona uğratılmış *Trichoderma reesei* mantarı tarafından pektin ve gliserin substratı kullanılarak enzim üretim şartlarının düzenlenmesi sonucunda daha önceden ön çalışması yapılmış lisans tezinde gözlemlenen pektinaz üretimindeki artış, bu artıştan yararlanılarak bulunan optimum konsantrasyon ve optimum zaman sayesinde optimum pH ve optimum sıcaklığın tayin edilmesi gerçekleştirilecektir.

2. GENEL BİLGİ

2.1 PEKTİN

Hücre duvarı bitkinin yaşam döngüsü boyunca büyüme, hücreler arası iletişim, patojenlerin saldırısına karşı koruma, mekanik direnç ve çevre ile iletişim gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları yerine getirir. (Cosgrove, 1997 ve 1999). Bitki hücre duvarında iki tip hücre duvarı gözlenir. Birincil ve ikincil hücre duvarıdır. Birincil hücre duvarı yapısında selülozu, hemiselülozu, pektik polisakkaridleri ve birçok proteini barındırır ve polisakkarid bileşimi çeşitlilik gösterebilir. Bu polisakkaridler tip I ya da tip II olarak tanımlanır. Birincil hücre duvarında en sık gözlenen polisakkarid bileşimi tip I dir. Tip II türü polisakkarid bileşimi ise otsu bitkiler için tipiktir. Tip I yapısındaki birincil hücre duvarlarının %35 ini oluşturan pektindir. Tip I grubuna bütün çift çenekli bitkilerde, otsu olmayan tek çenekli bitkilerde ve çıplak tohumlu bitkilerde rastlanır. Tip II hücre duvarı ise pektin tarafından fakirdir, ancak arabinoksilanlar açısından zengindir.

İkincil hücre duvarı daha iyi polimerize olmuş selüloz birimlerinden oluşmakta ve sahip olduğu bu özelliklerden dolayı ağaç endüstrisi için gerekli olan kaliteyi sunmaktadır. Doğada en sık rastlanılan organik bileşenler hücre duvarı polisakkaritleridir. Bu polisakkaritler hücre duvarının %90'ını oluştururlar.%10 lık kısmını yapı proteinleri ve enzimler oluşturur.

Selüloz hücre duvarı polisakkaritlerinin ana bileşenidir ve ana hücre duvarının sağlamlığından sorumludur. Hemiselülozlar daha heterojen olup selülozdan sonra doğada en sık bulunan yenilenebilir polisakkaritlerdir.(Ramon vd.,1993)

2.1.1 Pektinin Yapısı

Pektinler heteropolisakkaridlerin diğer bir grubunu oluşturur ve birbirlerine α -1,4-glikozid bağlarıyla bağlanmış D-galaktronik asid kalıntılarını içeren iskelete sahiptirler. Bu yapı galakturonik asid iskeletinin özel "kıllı" bölgelerinde , α -1,2-bağları ile yapıya bağlanmış L-ramnoz kalıntıları tarafından kesintiye uğratılır. L-arabinoz ve D-galaktoz kalıntılarından oluşan uzun yan zincirler bu ramnoz kalıntılarına bağlanabilir. Belirli kaynaklardan temin edilen pektinlerin (örneğin şeker pancarı ve elma) içerdiği arabinoz kalıntılarının beşinci pozisyondaki oksijenine ya da galaktozun ikinci pozisyondaki oksijenine bağlanan ana kalıntı ferulik asididir. Pektinler iki farklı tanımlanmış bölge içeren kompleks heteropolisakkaridlerdir.Pektin α -1,4 glikozid bağları ile bağlanmış D-galakturnik asid

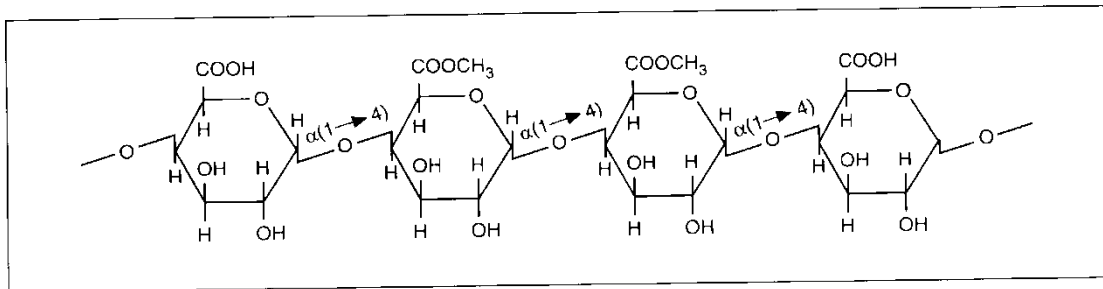
kalıntıları içerir. Ana iskeleti oluşturan D-galakturonik asit kalıntılarının ikinci yada üçüncü pozisyonundaki oksijenine bir asetil grubu yada altıncı pozisyonundaki oksijenine bir metil grubu bağlanabilir. Hemiselüloz ve pektin, polisakkaridlerinin yanı sıra aromatik bir polimer olan lignin de selüloz liflerine bağlanarak hücre duvarını güçlendiren yapıya katkıda bulunur.

Pektik maddeler, bitki duvarlarında ve orta lamelde oluşan yapısal polisakkaritlerdir. Bu maddeler büyük oranda anhidrogalakturnik asit birimlerinden oluşan karmaşık, kolloidal karbonhidrat türevlerinden meydana gelen yüksek su tutma kapasitesine sahiptirler. Bu durumda pektik maddeleri oluşturan birim, poligalakturnik asit olup, düz bir zincir yapmak üzere birbirleriyle α -1,4 bağı yapmışlardır. Pektik maddeler pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir grup maddeye verilen genel isimdir.

Pektin, meyve sebze gibi daha yüksek bitkilerde bulunan bir polisakkarittir. D-galakturnik asit üniteleri ve metoksil gruplarını oluşturmak için α -1,4 bağlanmasıyla oluşan uzun zincirli bir dizidir (Şekil 1). Metil grubu içermeyen bileşikler ise pektik asit ve poligalakturnik asittir (Harpen, G., 1981).

Toprak, pektik mikroorganizmaların ana deposudur. Bu mikroorganizmaların üç büyük grubu, fungus, *Actinomycetes* ve diğer bakterilerdir. *Pseudomonas*, *Bacillus* ve *Clostridiumlar* gibi bakteriler tarafından üretilmektedirler. Diğer grup bakteriler ise *Micromonospora*, *Azotobacter* ve *Rhizobiumlar*dır (Romboutz ve Pilnik, 1980). Metanolün en büyük doğal kaynağı pektindir. Metanolü kullanan mikroorganizmaların pektin esterazı ürettiği bilinmektedir. D-galakturnat, pektat ve pektin içeren üreme ortamlarında mikroorganizma tarafından üretilen enzimin üretim hızı değişmektedir (Bonnin, vd., 2002).

Pektin, insanlar ve hayvanların intestinal boşluğundaki sindirici enzimler tarafından parçalanamamakta fakat kolondaki bakteriler tarafından kısmen yıkılmaktadır. (Romboutz ve Pilnik, 1980).



Şekil 2.1 Galakturonik asit rezidülerinin α (1-4) bağlarıyla bağlanmasıyla oluşan pektin (Aksöz, E. ve Aksöz N., 1985)

Kimyasal açıdan çok karmaşık yapıya sahip bitki hücre duvarı bazı organizmalar tarafından kolonize edilmesi bu yapının parçalanmasına neden olur ve oldukça kalıcı olan toprak humusu ile son bulur. Bu genel parçalanma sürecinde yer alan mantarlar çeşitli ve karmaşık topluluklardır. Organizmalar genelde genetik ve enzimatik kapasitelerine bağlı olarak sadece belirli polimerleri parçalayabilirler. Hücre duvarının enzimatik olarak parçalanması normalde sinerjetik bir süreçtir. Her mantarın kendine özgü enzimleri çoklu bir enzim sisteminin parçası olarak görev yapar ve böylece belirli bir polimerin etkin biçimde parçalanmasını sağlar. Mantarlar bu enzimlerin sentezlenmesi ve hücre dışına salınması için oldukça sofistike bir gen kontrol mekanizmasının yanı sıra oldukça yüksek kapasiteli bir salgılama mekanizması geliştirmişlerdir. Tüm bu özellikler sayesinde mantarlar habitatlarında yer alan diğer organizmalarla başarı ile baş edebilirler. (Malttei, B. vd., 2001)

Substratlar genel olarak büyük, suda çözünmeyen ve bazen de kristal yapıli polimerler olduklarından, bunların parçalanması hücre dışında gerçekleşmektedir. ki tür hücre dışı enzimatik sistem tanımlanmıştır. İlki Hidrolitik sistem, enzimler polisakkaridleri genel olarak hidroliz yoluyla parçalar. İkincisi olan oksidatif ligninolitik sistemde ise, ligninin depolarizasyonundan sorumludur.

Genel olarak üç ana enzim sınıfı tanımlanmıştır. Bu enzim sistemleri kısaca ;

- I) Polimerik zincirlerin uçlarından monomerleri ve dimerleri koparan eksoenzimlerdir.
- II) Şeker zincirlerini ortalarından ikiye bölen endoenzimlerdir.
- III) Diğer enzimlerin etkisiyle oluşan oligosakkaridleri monomerlerine parçalamak üzere özelleşmiş enzimler. Bu enzimler genelde eksoenzim aktivitesine sahiptir.

Bu yapıların parçalanması sonucu ortaya çıkan mono- ve disakkaritler çeşitli permeazlar tarafından hücreye alınmaya hazırdır ve çok çeşitli katabolik yollar sayesinde tamamıyla parçalanır.

2.1.2 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.(Cervone, vd.,1990; Kubicek, C.P., Druzhinina,I.S., 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 R.P., Visser, J., 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 hidrolotik olarak parçalanmasını kataliz eder. Ekzopoligalakturonazlar (galakturon 1,4- α -galakturonidaz) (PGX) indirgen olmayan uçtan başlayarak polimeri parçalarlar.

2.2 Mantarlar

Mantarlar; karyot hücre tipine sahip hücre sayısı fazla ve hücrelerinde gerçek anlamda zar ile çevrili çekirdek ve birçok organeli olan canlılardır.(kf mantarları, mayalar, şapkalı mantarlar bu gruba dhildirler). Ayrıca tamamına yakını heterotrof (besin tüketicisi) olup, parazit ve saprofit yapıya sahip olanları vardır .

Mantarlar, bitkiler aleminin klorofilden yoksun tek veya çok hücreli canlılarıdır.Bir hücreli mantarlar (sporlar ve mayalar) mikropalara benzerler, ancak çevrelerinde selüloz zardan oluşan kalınca bir zarın bulunması ile onlardan ayrılırlar. Mantarların bitkisel yapıları tal denilen liflerden oluşmuştur. remeleri bazılarında eşeyli sporlarla, bazılarında ise eşeysiz sporlarla olur. Lifleri bölmelere ayrılmamış olan basit yapılı mantarlardan (miksomietler, fkomietler, zigomietler) başka lifleri bölmelere ayrılmış, üreme organları iyi gelişmiş yüksek yapılı mantarlar (basidiomietler, askomietler, adelomietler ve aktinomietler) da vardır. Mantarların kendilerine özgü bir beslenme tarzları bulunmaktadır. Enerji kaynağı için organik bileşiklere ve biyosentez için de karbonlu kaynaklara gereksinim duyarlar.

Basit organik moleküller (monosakkaridler, amino asitler, organik asitler, vs.) hücre membranlarından kolayca içeri girebilirler. Buna karşın, makromoleküller ise (disakkaridler, polisakkaridler, polipeptid ve proteinler, vs.) dışarıda enzimatik olarak ayrıştırıldıktan ve membrandan geçebilecek bir düzeye indikten sonra içeri girebilirler. Bazı mantarlar da (Myxomycestes) gıdalarını fagositozis veya endositozis ile alabilirler. Mantarlar karbon ve enerji kaynaklarını bir çok substratlardan temin edebilirler. Doğada serbest olarak yaşayan mantarların bir çoğu enerji için bitkisel orijinli kaynaklardan

yararlanırlar. Mantarların büyük bir ekseriyeti de glikoz, sakkaroz, nişasta, maltozu ayrıştırabilir ve bunlardan yararlanabilir. Bunların hücre membranlarından geçişinde permeaz enzimlerinin rolü fazladır.

2.2.1 Mantarların Üremesinde Etkili Olan Faktörler

Rutubet, mantarların üremelerinde çok önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır. Yüksek orandaki rutubet, genellikle, üreme üzerine olumlu etkide bulunur. Rutubet azaldıkça, mantarların çoğalmaları da sınırlanmaya başlar. Mantarların rutubete olan gereksinimleri, türler arasında değişiklik gösterir. Bazı mantar türleri relatif rutubeti %10-15 arasında bulunan ortamlarda veya suyu çok azalmış olan kuru danelerde üreme yeteneğine sahiptirler. Patojenik mantarların, özellikle, dermatofitlerin insan veya hayvan vücutlarında yerleşebilmesi ve hatta hastalık oluşturabilmesi için rutubet yine önemli bir faktördür. Mantarların üreme ısı limitleri oldukça geniştir ve türler arasında farklar gösterir. Bu sınırlar, 0° ile 60°C arasında değişebilmektedir. Hifalar maksimal ısı limitinin dışında kolayca ölmelerine karşılık, sporları yüksek ısıya ve değişik çevre koşullarına çok fazla dayanıklılık gösterirler. Buzdolabı ısısında üreyebilen ve gıdaların bozulmasına neden olan mantarlara her zaman rastlamak mümkündür. Çok fazla soğuk, mantarların muhafazasında kullanılmaktadır. Sıfırın altında -195°C' de mantarlar uzun süre canlı kalabilirler.

Mantarlar, genellikle, aerobik karakter taşırlar ve oksijenin bulunduğu ortamlarda gelişirler ve ürerler. Bu nedenle, havada bulunduğu miktar (veya oran) kadar oksijen, üreme için gereklidir. Patojenik mantarlardan, *Actinomyces* bazı türleri hariç olmak üzere, diğerleri aerobik koşullarda ürerler. Oksijenin azlığı veya mikroaerofilik koşullar üremeyi ve gelişmeyi sınırlar. Mantarların üremeleri için ışık, gereksinme duyulan önemli bir faktör değildir. Işık olmadan da kolayca gelişebilirler. Patojenik mantarlar da direkt ışık olmadan üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Direkt güneş ışınları, üremeyi ve gelişmeyi sınırlar.

2.2.2 Mantarların Metabolizması

Mantarların metabolik aktiviteleri alg ve yüksek bitkilerden biraz farklılık gösterir. Fotosentez yetenekleri olmadığından, enerjice zengin karbon kaynaklarına ihtiyaçları vardır. Heterotrofik bir beslenme özelliği gösteren mantarların metabolizmaları oldukça fazladır. Bunu gerçekleştirmek için fazla enerjiye ve dolayısıyla da enerji üretimine gereksinimleri vardır. Mantarlarda da, diğer ökaryotik ve prokaryotiklerde olduğu gibi, adenozin trifosfat (ATP) merkezi bir role sahiptir.

Metabolik aktivite sonunda mantar hücreleri içinde birçok depo maddeleri birikebilir. Bunlar arasında lipidler ve karbonhidratlar vardır. Mantarlarda sekonder metabolizma olarak tanımlanan ve ancak, normal metabolizmanın sınırlandığı durumlarda aktif hale gelen diğer bir metabolizma olayı da bulunmaktadır. Şimdiye dek 1000 den fazla sekonder metabolit bildirilmiştir. Bu metabolitlerin kimyasal yapıları farklı olup türlere özgü bir karakter taşımaktadırlar. Bazı metabolitlerin ticari değerleri çok fazladır (antibiyotikler, hormonlar, vs.) bazıları da insan ve hayvan için oldukça toksiktirler (mikotoksinler gibi). Üremeleri kısıtlanan ve durma dönemine giren mantarlar tarafından sentezlenen bu sekonder metabolitler, bir mantar için hayati önemde olmayıp normal üreme döneminde sentezlenen primer metabolitlerden oldukça farklıdır.

2.3 TRICHODERMA REESEI

2.3.1 *Trichoderma*'nın keşfi ve izolasyonu

Trichoderma neredeyse 200 yıl önce mantar soyları taksonuna dahil edildi. *Trichoderma* 150 yıl boyunca zaman zaman mikotaksonomiyle ilgilenen bilim adamlarının dikkatini çektiyse de diğer bilim dallarının ilgi alanına girmedi. Bu durum Amerikan ordusunun ikinci dünya savaşı sırasında tropik bölgelerde özellikle de güney pasifikte kullandıkları malzemelerin çürümeye başlamasını rapor etmesi üzerine dramatik olarak değişti ve bu olgunun sebebini bulmak üzere uzun süreli bir araştırma programı başlatıldı. Bu çalışmalar sırasında izole edilen *Trichoderma vride* QM6a bu bölgedeki en selülotik mantarlardan biri olarak tanımlandı. Bütün *Trichoderma* soyları “ *Trichoderma .vride* “ olarak tanımlanıyordu. Ancak QM6a soyunun eşsiz biyolojik doğasının keşfedilmesi ve soyun izole edilmesini sağlayan Elwyn Reese onuruna “*T. reesei*” olarak adlandırıldı. Natick Enstitüsü’nün’ de gerçekleştirdiği olağanüstü çalışmalar bu mantarı ve onun çeşitli mutant soylarını biyosentez alanındaki birçok çalışmanın konusu haline getirdiği gibi bu mantarı selülozun ve diğer polisakkaridlerin yapısının belirlenmesinde ve bu karbonhidratların katabolizmasında rol alan mekanizmaların aydınlatılmasında rol alan bir çok çalışmada konusu haline getirdi. Avrupa’daki ve Asya’daki bir çok laboratuvar 1960 ların sonunda *Trichoderma*’nın selülotik sistemini incelemeye başladı.

Biyolojik kontrol ajanı olarak bilinen *Trichoderma* saprofitik bir fungustur. *Trichoderma* türleri hemen hemen tüm topraklarda ve çeşitli habitatlarda bulunan küf mantarlarıdır. Topraklardan izole edilerek kültürü oluşturulabilir. Yüksek bitkilerin köklerine tutunarak

hızla çoğalırlar ve diğer mantarlara karşı saldırgan ve parazittirler; başka bir deyişle besinlerini diğer mantarlardan elde ederler.

Trichoderma kültürleri tipik olarak 25-30 °C’ de hızlı gelişim gösterirken, 35°C’ de gelişim göstermezler. Koloni miselleri ilk aşamada mısır-dekstroz (CMD) besiyeri üzerinde şeffaf, daha zengin içerikli patates-dekstroz (PDA) besiyeri üzerinde ise beyaz renklidir. Özellikle PDA besiyeri üzerinde yetiştirilen kültürlerin konidleri içindeki sarı pigment agar içine salınabilir. Karakteristik bir şeker ya da hindistan cevizi kokusu oluşturur. Mikroskopik karakterlerine göre dokuz farklı *Trichoderma* soyu tanımlanmıştır, Taksonomik sınıflandırmaya göre ise mantarlar alemi, Ascomycota kolu, Euascomycetes sınıfı, Hypocreales sırası , Hypocreaceace ailesinin üyesidir.

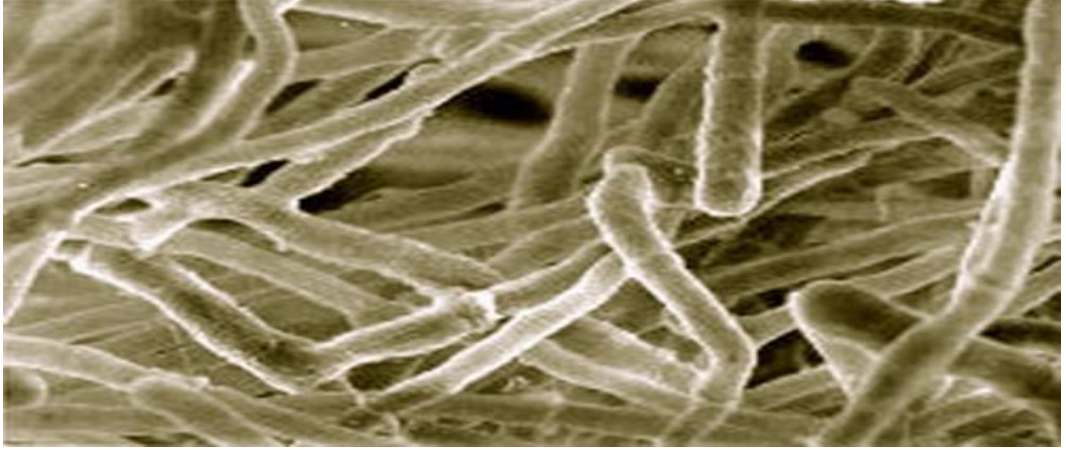
2.3.2 *Trichoderma Reesei* ‘nin Endüstriyel Mutantları ve Rekombinant Suşları

1980’li yıllarda *Trichoderma Reesei* endüstride kullanılmaya başlanmıştır. Selülotik enzimlerin, bunlara *T.reesei* nin ürettiği selülozlar da dahildir, endüstrideki kullanımı büyük ölçüde artmıştır. Bu artıştaki en büyük pay tekstil endüstrisine aittir. Bugün selülozlar ve hemiselülozlar dünya enzim piyasasının %20 sini oluşturmaktadır ve bu enzimlerin kayda değer kısmı *Trichoderma*’ ya aittir.

Endüstride kullanılan ilk *Trichoderma* soyları selüloz üretimi arttırılmış mutantlardır. Bu mutagenetik çalışma selülozik artıkların glukozu parçalanmasının sağlanması ve elde edilen glukozun etanol fermentasyonunda kullanılması amacıyla yapılmıştır. *T.reesei* selülozları ve hemiselülozları yem, gıda, tekstil ve kağıt endüstrilerinde kullanılmaktadır. Bu uygulamaların amacı selülozik ipliklerin yapısını değiştirmektir.

T.reesei iyileştirilmiş kültür koşullarında kültür ortamına 40 g/l ya kadar varan miktarlarda protein salgılar. *T.reesei* tarafından sentezlenen ana protein ailesi selülozlardır ve selülozlar içinde en fazla sentezlenen enzim, tek bir gen tarafından kodlanan, sellobiyohidrolaz I (CBHI)’ dir. Üretilen protein miktarını arttırmak için etkin gen ekspresyon sistemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. *T.reesei* de iyi indüklenebilen cbhl promotorunun kullanılması üretilen protein miktarını arttırmıştır. İstenilen özelliği uzun süre koruyabilen rekombinant soylar elde edebilmek için transformasyonu gerçekleştirirken kullanılan DNA’nın mantarın genomuna ilave edilmesi gerekir.

T.reesei’ nin mutant soyu Natick Laboratuvarında Mandels tarafından izole edilmiştir. Çeşitli mutasyonlara uğratılması sonucunda yüksek enzim üretme kapasitesine sahip çeşitli soy serileri elde edilmiştir. (Akel, S., 2009)



Şekil 2.2 Trichoderma reesei türünün mikroskop altında görünümü
(DOE Joint Research Institute) [1]

2.4 PEKTİNAZLAR

2.4.1 Enzimler

Enzimler, canlı hücrelerde üretilen özel proteinlerdir. Canlılar içinde her zaman kimyasal reaksiyonlar gerçekleşir. Bunlar bazen metabolik reaksiyonlar olarak adlandırılır. Hemen hemen her metabolik reaksiyon enzim olarak adlandırılan katalizörler tarafından kontrol edilir. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgülüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Solunumun, büyümenin, kasılmasının, sinirdeki iletimin, fotosentezin, azot bağlanmasının, deaminasyonun, sindirim işlemlerinin temelini oluştururlar .

Doğal durumda suda çözünen enzimler, canlı organizmada oluşan bütün reaksiyonların çok ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlayan ve bu reaksiyonları koordine eden protein yapısındaki spesifik biyokatalizörlerdir. Bir biyolojik sisteme ait genetik bilgi, protein zincirinde yer alacak aminoasitlerin diziliş sırasını belirleyen formdadır. Bu genetik bilgi tarafından kodlanan proteinlerin çoğu biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilme yeteneğine sahiptirler. Bununla beraber yeterli koşulların sağlanması durumunda etkilerini gösterebiliyor olmaları, enzimlerden doğal ortamlarının dışındaki pek çok alanda yararlanabilme imkanını ortaya çıkarmaktadır.

İnsanlar gerçekte binlerce yıl öncesinden bu yana enzimlerden yararlanmaktadır. Örneğin alkol fermantasyonu, bira ve ekmek yapımı gibi işlemler ilk biyoteknolojik prosesler olarak tanımlanabilirler. Buna karşılık enzimler hakkında bilimsel denebilecek araştırma ve bulgular ancak geçtiğimiz yüzyılda gözlenmeye başlanmıştır. 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 enzimoloji konusundaki ilk çalışmalar olarak gösterilebilir. Payen ve Persoz' un 1833 yılında nişastayı şekere dönüştüren termolabil bir maddeyi alkol çöktürmesiyle elde etmeleri enzimoloji alanındaki en önemli kilometre taşlarından biri olmuştur. Bugün amilaz olarak bilinen bu enzim o günlerde diastaz olarak adlandırılmıştı ve günümüzde enzimlere ilişkin pek çok geleneksel ve tüm sistematik adlandırmalardaki -ase eki kaynağını bu çalışmadan almıştır. Enzim terimini ilk kullanan ise 1878 yılında Kühne olmuştur. Enzimlerin spesifikliği ve anahtar-kilit modeli gibi kavramlar ise 19. yüzyılın sonlarında Fischer tarafından ortaya konmuştur.

Enzimlerin ilgili reaksiyonları ılımlı koşullarda çok hızlı ve spesifik bir biçimde katalizliyor olmaları, onların ayrıntılı enzimolojik araştırmaların paralelinde, çeşitli pratik uygulamalarda da kullanımlarını gündeme getirmiştir. Bir enzimden herhangi bir alanda yararlanılabilme imkanı büyük ölçüde ekonomik parametrelerle ilgilidir. Bilindiği gibi enzimler canlı materyallerden elde edilmek zorundadırlar. Ayrıca izolasyon ve saflaştırma işlemleri 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. Buna karşılık bir 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. .

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Bu güne kadar 2000'den fazla enzim tanımlanmış olup, bunlar arasında yaklaşık 100 tanesi ticari kullanıma uygun bulunmasına rağmen günümüzde sadece 18 tanesi endüstriyel amaçla kullanılmaktadır .

Enzim teknolojisi; ekonomik, etkili ve biyoteknolojik tekniklere olan büyük ihtiyaç nedeniyle ilerleme kaydetmiştir. Biyoteknoloji sayesinde, yeni tür enzimlerin büyük ölçeklerde ve ekonomik olarak üretilmesi mümkün olmuştur. Buna göre bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilirliği; maliyet bakımından ucuz olmasını, çok

farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olmasını ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmamasını gerektirmektedir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır.

Bakterilerin selüloz sistemleri son zamanlarda ciddi bir şekilde araştırılmaktadır. Mantarların selüloz sistemleri ile bakteri selüloz sistemlerinin karşılaştırılması için bir eğilim vardır. Bakterilerin selülitik enzimleri exo β 1,4- glukanlar ve endo β 1,4- glukanlar şeklinde karakterize edilmiştir.

2.4.2 Enzimlerin Yapısı

Enzimler bilindiği gibi kimyasal bakımdan protein yapısında moleküllerdir. Ancak çoğu durumda söz konusu proteine protein olmayan daha küçük yapıları organik veya anorganik moleküllerin bağlanmasıyla oluşmuş proteid yapısı gözlenir. Bu son durumda enzimin protein kısmı "Apoenzim" protein olmayan parçası ise "Prostetik Grup" veya "Koenzim" olarak tanımlanmaktadır. Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasının birinci adımı protein zincirindeki aminoasit diziliş sırasının başka bir deyişle "primer yapı"sının aydınlatılmasıdır. Günümüzde enzimlerin primer yapısının aydınlatılmasına yönelik çok duyarlı ve otomatize edilmiş sistemler geliştirilmiştir.

Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasında ikinci adımı sekonder yapının belirlenmesi oluşturur. Sekonder yapı, bir protein zincirindeki amino asitlerin R grupları dikkate alınmaksızın zincirin uzaydaki konformasyonunu ifade eder. Sekonder yapının oluşumu büyük ölçüde protein zincirinin primer yapısı tarafından belirlenir. Bununla beraber primer yapının oluşumunda peptid bağlarındaki mezomeri ve C=O grubu oksijeni ile HN-grubu hidrojeni arasında meydana gelen hidrojen köprü bağları önemli bir yer tutar. Bir proteinin dolayısıyla bir enzimin sekonder yapısı α -heliks ve β -katlanmış yaprak yapısı olmak üzere iki ana gruptan ve bunların dört farklı düzenleniş şekline oluşabilmektedir. Enzimlerin yapısının aydınlatılmasında üçüncü adım, üç boyutlu yapının oluşumunda son derece etkili olan "tersiyer yapı"nın belirlenebilmesidir. Bir enzimin tersiyer yapısı, o enzimin protein zincirinde yer alan aminoasitlerin R gruplarının da dikkate alınarak uzaydaki konumunun belirlenmesidir. Bu konumu protein zincirindeki hidrojen köprü bağları, disülfid köprüleri, iyonik ilişkiler ve hidrofobik etkileşimler belirlemektedir.

Birden fazla alt birimden oluşmuş enzimlerde yapı aydınlatılmasında "kuarterner yapı" belirlenmesi dördüncü adımı oluşturur. Bilindiği gibi pek çok enzim alt birim olarak

ifade edilen birden çok polipeptid zincirinden meydana gelir. Bu polipeptid zincirleri arasındaki ilişki ve toplam molekülün uzaydaki konformasyonu onun kuartern yapıyı oluşturur.

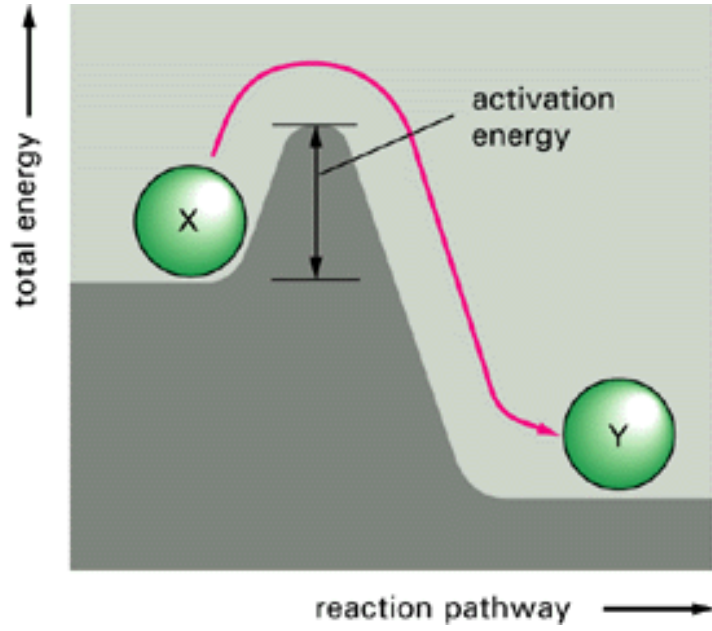
2.4.3 Enzimlerin Eldesi

Enzimler, ticari olarak mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilirler. Üretimi için patates nişastası, soya fasulyesi, tuz, mısırözü 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., Shukla, P.K., 2009).

2.4.4 Enzim Katalizi

Moleküller arası kimyasal reaksiyonda, moleküller, yeterli enerji düzeyine sahipse reaksiyon kendiliğinden meydana gelmektedir. Bir reaksiyonun hızı, uyarılmış durumdaki moleküllerin konsantrasyonları ile orantılıdır. Kimyasal reaksiyonun hızını arttırmak için iki yol vardır: Birincisi, sıcaklığı arttırarak moleküllerin termik hareketlerini, kinetik enerjilerini arttırmak ve uyarılmış durumdaki molekül sayısını arttırmaktır. İkincisi ise sisteme katalizör ilave etmektir. Katalizörler kimyasal reaksiyonun aktifleşme enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırırlar. Katalizörlü sistemde serbest enerji değişimi katalizörsüze kıyasla daha düşüktür.

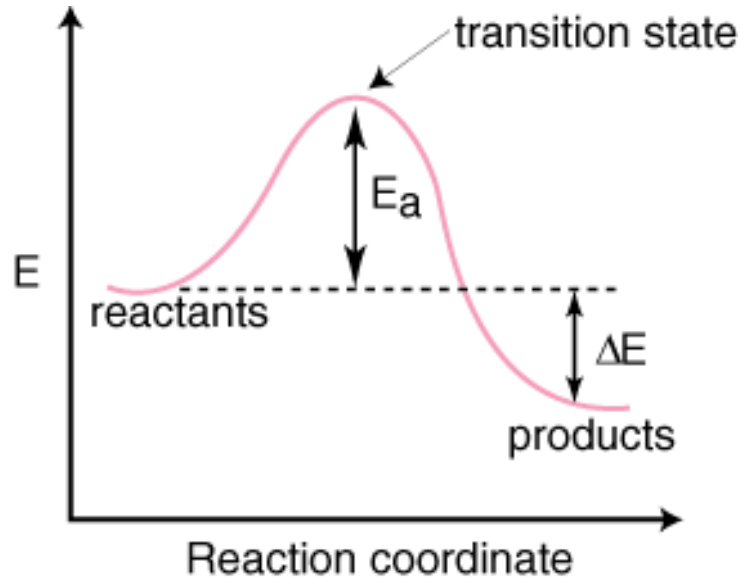
Canlı sistemler için reaksiyonların enzimatik katalizi esastır; biyolojik olarak uygun şartlar altında katalizlenmeyen reaksiyonlar, yavaş olmak eğilimindedirler. Biyomoleküllerin çoğu, hücre içinde bulunan nötral pH, ılımlı sıcaklık ve sulu çevrede oldukça stabildirler. Yiyeceklerin sindirilmesi, sinir sinyallerinin gönderilmesi veya kasların kasılması için gerekli reaksiyonlar, kataliz olmadan yararlı bir hızda meydana gelmez. Bir enzim, belli bir reaksiyon için enerjetik olarak daha uygun spesifik bir ortam sağlayarak bu problemleri atlatır.



Şekil 2.3 Enzim katalizini gösteren örnek şema. [2]

Enzimle katalizlenen bir reaksiyonun ayırt edici özelliği, enzim üzerinde **aktif merkez** denen bir cep sınırları içinde meydana gelmesidir. Aktif merkez, enzim molekülü üzerinde, substrat bağlama özelliğine sahip özel bölgedir. Aktif merkez tarafından tutulan ve enzimin etki ettiği molekül, substrat diye adlandırılır. Basit bir enzimatik reaksiyon şu şekilde yazılabilir.

Bir kimyasal reaksiyonda belirli bazı maddelerden (substratlar, S) belirli başka bazı maddeler (ürünler, P) oluşur. Geçiş düzeyi kuramına göre, her kimyasal tepkimede, substrat ve ürünler arasında kararsız bir ara ürün oluşumu öngörülür; geçiş durumundaki kararsız bileşik, kararlı temel bileşiklere göre daha çok serbest enerji içerir ve daima daha kararlı bir bileşiğe dönüşmek üzere parçalanır. Bir kimyasal reaksiyonda geçiş durumuna ulaşmak için gerekli enerji, **aktivasyon enerjisi** olarak bilinir. Aktivasyon enerjisi, $S \leftrightarrow P$ gibi her hangi bir reaksiyonu koordinat diyagramı ile göstermek suretiyle daha kolay anlatılabilir:



Şekil 2.4 Aktivasyon enerjisini gösteren şema [3]

Termodinamik bilgilerimize göre, substratların ve ürünlerin belirli serbest enerjileri vardır. Substratlar ve ürünler arasında bir enerjetik bariyer de vardır. Moleküllerin reaksiyona uğramaları için bu bariyeri aşmaları, dolayısıyla daha yüksek bir enerji düzeyine yükselmeleri gerekir. Bu bariyer, reaksiyonlaşan grupların ayarlanması, geçici anstabil yüklerin oluşması, bağ yeniden düzenlenmeleri ve reaksiyonun gerektirdiği diğer değişikliklerin olması için bir enerji (**aktivasyon enerjisi**) gerektiğini gösterir. Enerjinin en yüksek olduğu ve geçiş durumu diye adlandırılan bir noktada oluşan ara ürünün S'ye ve P'ye doğru gidiş olasılığı birbirine eşittir. **Aktivasyon enerjisi** (substratlar ve ürünler arasındaki enerjetik bariyer), geçiş durumu ve temel durumun (S veya P) enerji düzeyleri arasındaki farka ($\Delta G_{S \rightarrow P}$ veya $\Delta G_{P \rightarrow S}$) eşittir. Aktivasyon enerjisi bir reaksiyonun hızını yansıtır. Yüksek bir aktivasyon enerjisi yavaş bir reaksiyona karşılık gelir; düşük bir aktivasyon enerjisi ise hızlı bir reaksiyona karşılıktır. Ancak aktivasyon enerjisini serbest enerji değişikliği veya standart serbest enerji değişikliği ile karıştırmamak gerekir. Kimyasal reaksiyonların hızları, enerji bariyerini aşmak için yeterli enerjili moleküllerin sayısını artıran sıcaklık yükseltilmesi (ısıtma) suretiyle artırılabilir. Alternatif olarak bir katalizör eklenerek aktivasyon enerjisi (substratlar ve ürünler arasındaki enerjetik bariyer) düşürülebilir.

Enzimler, olağanüstü katalizörlerdir. Glukoz molekülünün laboratuvar koşullarında CO_2 ve H_2O 'ya dönüşümü termodinamik yönden olanaklıdır; ancak bunun için yüksek basınç ve sıcaklık gerekir. Hücre içinde ise aynı tepkime enzimlerin etkisiyle çok kolaylıkla gerçekleşmektedir. Enzimler de katalizörlerin reaksiyon dengelerini etkilememe kuralına

uyarlar. $S \rightarrow P$ reaksiyonunu katalize eden her hangi bir enzim, aynı zamanda $P \rightarrow S$ reaksiyonunu da katalize eder; enzimin rolü, S ve P'nin karşılıklı dönüşümlerini hızlandırmaktır. Enzimler vasıtasıyla meydana getirilen hız artışı $10^7 - 10^{14}$ derecesindedir. Bir enzim, bir dakikada milyonlarca substrat molekülünün ürüne dönüşümünü sağlar ki bir enzim molekülü başına bir saniyede ürüne çevrilen substrat molekülü sayısına **dönüşüm sayısı** denir. Bir enzim, reaksiyon sürecinde tükenmez ve denge noktasını etkilemez. Bununla beraber, uygun enzim varsa reaksiyon hızı artacağından reaksiyon dengeye çok daha hızlı ulaşır.

Enzim etkisini açıklamak için substrat ve enzimin fonksiyonel grupları arasındaki kimyasal reaksiyonlar iyice incelenmiştir. Enzimleri enzim olmayan birçok katalizörden ayıran, spesifik enzim-substrat kompleksi (ES) oluşmasıdır. Enzim üzerindeki spesifik amino asit yan zincirleri, metal iyonları, koenzimler gibi fonksiyonel gruplar, substrat ile geçici olarak etkileşebilirler ve reaksiyon için substratı aktive ederler. Enzim üzerindeki, substrat ile etkileşen küçük gruplar, birçok durumda düşük enerjili reaksiyon yolu sağlayarak aktivasyon enerjisini azaltırlar ve bu nedenle reaksiyonu hızlandırırlar. Daha düşük aktivasyon enerjisi için gerekli enerji, genellikle enzim ve substrat arasındaki zayıf, nonkovalent etkileşimden türer. ES kompleksinde enzim ile substrat arasındaki etkileşime, protein yapısını stabilize eden hidrojen bağları, iyonik bağlar ve hidrofobik Van der Waals etkileşimleri gibi güçler aracı olur. ES kompleksinde her zayıf etkileşimin oluşması, etkileşim için bir stabilite derecesi sağlayan küçük miktarda serbest enerji salınması ile birliktedir. Enzim-substrat etkileşiminden türeyen bu enerji, **bağlanma enerjisi** olarak adlandırılır; reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürmek için enzimler vasıtasıyla kullanılan serbest enerjinin başlıca kaynağıdır.

2.4.4.1 Enzimlerin Substrat Spesifikliği

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 spesifikliğinin protein kısmı tarafından gerçekleştirildiği kabul edilmektedir. (Goodenough, P., 1992)

2.4.5 Enzimlerin Etki Spesifikliği

Bir kimyasal reaksiyonda teorikte birden fazla yan ürün oluşabilmektedir. Ancak enzimler reaksiyona girdiklerinde sadece bir ürün oluştururlar. Bu olaya enzimin etki spesifikliği denir.

2.4.6 Enzimatik Reaksiyonların Mekanizması

Enzim molekülü reaksiyonu katalizleyebilmek için substrat ile bir kompleks oluşturmaktadır. Enzimin aktif merkezleri molekülün nüfuz eden bölgeleri ile karşı karşıya gelmektedir. Bu, enzimi substrata karşı çeker ve her iki molekülün oryante olmasına izin verir. Böylece bir enzim – substrat kompleksi oluşumu anahtar – kilit mekanizması ile başlamış olur.

Biyoreaksiyon, oluşan enzim – substrat kompleksindeki aktivasyon enerjisini düşürüp, reaksiyon hızının artmasıyla devam eder. Son olarak, kompleks, reaksiyon ürünlerinin açığa çıkmasıyla parçalanır. Orijinal enzim tekrar kullanıma elverişlidir. Proses, enzim kimyasal bir madde veya çok uç bir pH ya da sıcaklık ile aktivitesini kaybedene kadar devam eder.

2.4.7 Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. 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 1µmol substratı değiştiren enzim etkinliğini ifade eder ki bu da 1 saniyede 16,67 nmol substratın ürüne dönüştürülmesine karşılıktır.

Genel olarak enzim aktivitesi denince, enzim katalizli reaksiyonun hızı ve aktivitesi anlaşılmaktadır. Enzimlerin aktivite birimlerinin birbirleriyle karşılaştırılabilmesi için Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) enzim aktivitesi için birimi “Uluslararası Birim (U)” olarak tanımlamıştır.

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

Spesifik aktivite : 1 mg enzim tarafından dakikada dönüşüme uğratılan substratın µmol 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 (1kat=6.109U). Bu nedenle pratikte, mikrokatal (µkat) veya nanokatal (nkat) birimleri kullanılır. (Telefoncu, 1986)

2.4.8 Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları

Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir ve çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmiştir.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Ekstremofilik mikroorganizmalar; yüksek ve düşük sıcaklıklarda, pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak üzere adapte olmuşlardır. Bu koşullarda yaşayan bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına dayanıklı oldukları için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmışlardır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Endüstriyel alanda en çok kullanıma sahip olan enzimler proteaz, amilaz, selülaz, ksilanaz ve lipaz dır. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir.

Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır .

2.4.8.1 Proteaz

Proteazlar, doğada bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynamaktadırlar ve böylece besin döngüsünü sağlamakta ve ayrıca bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır. Proteazlar enzimlerin oldukça kompleks bir grubunu oluştururlar ve oldukça farklı fizikokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Proteaz sentezinin hücrel kontrolünden sorumlu mekanizma henüz tam olarak bilinmemekle beraber alkali proteazların üretimi amino asit veya amonyum gibi hızlı bir şekilde metabolize edilebilen azot kaynakları ile baskılanmaktadır. Diğer ortam bileşenleri küçük şekerler ve mineraller enzim sentezini etkilemektedir. Potansiyel proteaz kullanımı ve maksimum enzim üretimi ile endüstriyel işlemlerin maliyetini düşürmek amaçlanmaktadır (Mabrouk vd., 1998). Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadır. Proteazlar, çamaşır deterjanları, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde kullanılmaktadır. Alkali proteazlar, bakteri, küf, maya gibi çeşitli kaynaklardan elde edilse de (Singh J. vd., 2000) alkalifilik *Bacillus* biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmadır, çünkü çok geniş çeşitli ortamlardan izolasyonu nispeten kolaydır. Proteazların diğer ilginç bir kullanım alanı ise deniz *Crustacea* atıklarının deproteinizasyonudur. Kimyasal işlemlerin üstesinden gelmek için mikroorganizmaların veya proteolitik enzimlerin kullanılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

2.4.8.2 Amilaz

Bir karbohidraz olan α -amilaz enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir, α -amilaz enzimi, nişasta molekülündeki α -1,4 bağlarını parçalayarak glikoz, maltoz, maltotrioz ve α -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlar. Nişasta, çok sayıda glikoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen α -amilaz, β -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler. Uygulama alanları oldukça genişlemiş ve çeşitlenmiştir. Bu enzimler tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, ekmek, glikoz ve fruktoz şurupları ve tutkal üretiminde, alkol fermentasyonunda kullanılmaktadırlar (Bailey ve Ollis, 1987). Bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılan, *Bacillus* ve *Aspergillus* tarafından üretilen, ayrıca arpa ve buğday maltında da bulunabilen enzimler, amilaz ve endo β -glukanazlardır. (Demain ve Solomon, 1981). Tekstil endüstrisinde dokuma sırasında ipliklerin sağlam ve düzgün olması ve kopmaması için iplikler nişasta içeren bir çözelti ile muamele edilmektedirler.

Bu işleme haşıllama adı verilir. Kumaş dokunduktan sonra, kumaştaki fazla nişastanın uzaklaştırılması gerekir. Bu işleme de haşıl alma adı verilmektedir. Haşıl alma ajanı olarak da yaygın olarak α -amilaz enzimi kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, nişastanın α -amilaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucu açığa çıkan ürünler, yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu ürünlerden dekstrin, nişastanın glikoza kadar hidrolize olmasından önce oluşan kısa moleküllü ilk üründür. Dekstrinler çözünürlüğü yüksek ve dayanıklı bir ürün olup, yoğun şurup kıvamında bir maddedir ve bu maddeler gıdalarda viskozite arttırıcı, yani, koyulaştırıcı dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır.

2.4.8.3 Selüloz

Selüloz, bitki biyokütlesinin yaklaşık % 40'ını oluşturmaktadır. Yaklaşık 15000 glikoz biriminin β -1,4- glikozidik bağlar ile linear bir şekilde bağlanması ile oluşur. Selülozun suya karşı yüksek çekiciliği olmasına rağmen, suda hiç çözünmez. Selüloz glikoza, en az üç farklı enzimin sinerjistik çalışması ile hidrolize olabilir. Bu enzimler; endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β glukosidaz'dır. Selülozu hidrolize eden enzimler geniş çapta mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Böyle enzimler çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ticari olarak en çok kullanılan selüloz *Trichoderma sp.* tarafından üretilmektedir. Ayrıca selülozlar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes* ve *Bacillus* suşlarından elde edilmektedir (Tomme, P. vd., 1995). Selülitik enzimler, sıvı kazancını arttırmak ve iyi bir renk elde etmek için alkol üretiminde kullanılmaktadır. Deterjanlarda selüloz varlığı renklerin canlanmasına, yumuşamasına ve partikül halindeki toprağın uzaklaşmasına neden olmaktadır. Ayrıca selüloz kot pantolonların biyolojik olarak taşlanması için kullanılmaktadır. Selülozun enzimatik hidrolizi için genellikle yapılan çalışmalar selüloz salgılayan mikroorganizmaların ortama doğrudan ilave edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir ancak elde edilen verimin düşük olduğu görülmüştür. Bununla beraber, selüloz selüloz ile doğrudan muamele etmek daha iyi bir çözümdür. Bu işlem öncelikle selülozün üretilmesi, kısmen saflaştırılması ve hidroliz çalışmaları için kullanılması şeklinde gerçekleştirilebilir. Pek çok mikroorganizmanın selüloz ürettiği bulunmuştur.

Trichoderma reesei gibi selülitik mikroorganizmalar kristal selülozu parçalayan ve sinerjistik olarak aksiyon gösteren enzim serisi üretebilir. Çoğu durumlarda prokaryotik β -1,4-glukanazlar, selülozun sadece çözünebilir formlarına (Karboksimetilselüloz ve hidroksimetilselüloz) ait glikosidik bağların hidrolizini katalizlemektedir. Hücre dışı mikrobiyel β -glukanaz, bira endüstrisinde, zirai atıkların biyokonversiyonunda ve fungal bitki patojenlerinin biyolojik olarak kontrolünde uygulama alanına sahiptir.

2.4.8.4 Ksilanaz

Bitki hücre duvarları mikroorganizmaların canlı bitki dokusuna geçişini engellemek için bir bariyer meydana getirmektedir. Doğal olarak bulunan lignoselülozik bitki biyokütlesinin içeriğinin % 20-30'unu heterojen polisakkaritler olan ve selülozla ilişkili bir şekilde bulunan hemiselülozik materyaller oluşturur. Biyokütle, dünyanın yakıt ihtiyacını karşılayan ve yeterince kısa bir döngüye sahip olan alternatif doğal kaynaklardır. Ksilan, yüksek bitkilerin hücre duvarının hemiselülozik kısmının temel bileşenidir ve yüksek potansiyelde kullanışlı son ürünlere parçalanabilen ikinci en bol kaynaktır (Yang, J. vd., 1995). Pek çok bakteri ve mantar ksilanı sindirmek için ksilanaza ihtiyaç duyar. Bu nedenle patojenler ve saprofitler hücre duvarı parçalayan enzimler üretmektedirler .

Özellikle Batı Avrupa ülkeleri ve Kuzey Amerika'da ksilanazlar, ağaç kabuklarının çıkartılmasında, geri dönüştürülmüş liflerin boyasının çıkarılmasında ve kağıt hamurunun çözülmesinin hazırlığı için selülozun saflaştırılmasında önemli derecede kullanılmaktadır (Yang, J. vd., 1995). Kağıt hamuru ağartma da kullanılan biyolojik metodlarda, ksilanaz, ksilanın %20'sini seçici olarak uzaklaştırmakta ve klor içeren ağartma kimyasallarını %25 azaltmaktadır. Pek çok bakteri ve mantarın ksilanaz üretimi için çalışılmış olmasına rağmen bunlardan sadece birkaçı alkalifiliktir. İlk ksilanaz ile ağartma çalışmaları mantar ve mayaların bilinen enzimlerinin kullanımına odaklanmıştır. Ancak bunların aktivite gösterdikleri optimum pH asidiktir. Ağartma işlemi ise güçlü alkali koşullar altında gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle alkali koşullar altında enzimatik ağartma işleminde fonksiyon gösterebilmesi, enzim için oldukça önemli bir karakteristiktir. Termostabil alkali ksilanazların kullanımı enzimle kağıt hamuru ağartma için pH ve sıcaklık ayarlamalarını oldukça indirgeyerek önemli derecede teknik ve ekonomik avantaj sağlamıştır .

Ksilan, zirai ve gıda endüstrilerinin atıklarında yüksek miktarlarda bulunurlar. Bu nedenle, ksilanaz atık sudaki ksilan'ı ksiloz'a dönüştürülmesi için kullanılır. Enzimatik hidrolizin etkili işlemlerinin geliştirilmesi hemiselülozik atıkların muamelesinde yeni umutlar ortaya çıkarmıştır .

2.4.8.5 Lipaz

Lipazlar, yağlar ve yağ asidi esterlerini hidroliz ederler. Enzim, emülsiyonun yağ-su geçiş fazında katalizi gerçekleştirir ve enzim reaksiyonunun hızı, oluşan yüzey alanına bağlıdır. Lipazlar yağ asitlerinin zincir uzunluğu, doyma derecesi, yağ asidinin pozisyonu ve substrat'ın fiziksel durumuna uygun spesifiklik gösterirler. 4-10 C atomlu

yağ asitleri daha uzun C zincirli yağ asitlerinden daha hızlı bir şekilde hidroliz olarak yağın yapısından ayrılır ve serbest hale geçerler. Lipolitik enzimlerin aktivitesi süt endüstrisinde önemlidir. Yüksek lipolizis çeşitli peynirlerin üretiminde zorunlu olmaktadır. Peynir yapımında kullanılan renninin kütlesinde, proteolitik enzimler gibi lipazlarda mevcuttur. Lipazlar tereyağına aroma kazandırmada, çikolata endüstrisinde, kremalarda, karamellerde kullanım alanına sahiptir. Margarinler, şorteningler, fırın ürünleri edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır ve bitkisel ürünler gibi ürünlerde lipazla modifiye edilmiş tereyağı ürünleri aroma geliştirici olarak kullanılmaktadır.

Kıyafetlerimizi kirleten maddelerin başında proteinler, yağlar ve nişasta gelir. Bu lekeleri yüksek sıcaklıkta kimyasal deterjanlar yoluyla gidermek mümkünse de, enzimlerin kullanılması düşük sıcaklıkta ve daha az mekanik enerji ile istenen temizliği sağlar. Ayrıca çimen, kan, süt ve ter lekelerini çıkarmakta biyolojik olmayan deterjanlara göre çok daha etkilidir. Deterjanlarda kullanılan enzimlerden proteazlar yumurta, kan gibi lekelerdeki proteinleri parçalar; lipaz yağ lekelerini, amilaz ise nişasta bazlı lekeleri çıkartmakta etkilidir. Çamaşırların yıpranmasıyla oluşan selülöz fibriller ise, selülaz enzimi ile parçalanarak çamaşırların daha yumuşak olması ve renklerini koruması sağlanır. (Kıymaz, A.N., 2007).

2.4.8.6 Pektinaz

Pektinin, pektik asidin veya oligo-D-galakturonatın tercih edilen substrat olmasına, pektinazların trans-eleminasyon ya da hidroliz yoluyla iş görmelerine ve parçalamanın rastgele ya da sırayla yapılmasına göre pektik enzimler 3 sınıfa ayrılmışlardır.

Pektin Esterazlar (PE)

Pektinmetil hidrolaz olarak da bilinen pektin esterazlar, pektik asidi oluşturan pektinin metoksil grubunun deesterifikasyonunu hidrolizler.

Glikozidik bağları hidrolizleyenler

▪ Polimetilgalakturonazlar (PMG)

α -1,4-glikozidik bağların hidrolitik parçalanmasını katalizler. Endo-PMG, tercihen yüksek miktarda esterleşmiş pektinin α -1,4-glikozidik bağlarını rastgele parçalar. Ekso-PMG ise pektinin α -1,4-glikozidik bağlarını pektin zincirinin indirgen olmayan ucundan sırayla parçalarlar.

- Poligalakturonazlar (**PG**)

Pektik asitteki α -1,4-glikozidik bağların hidrolizini katalizler. Endo-PG, pektik asidteki α -1,4-glikozidik bağları rastgele parçalar. Ekso-PG ise sıra ile parçalar.

Glikozidik Bağları Bölenler

Trans-eliminasyon ile α -1,4-glikozidik bağları bölerler ve bunun sonucunda, oluşan galaktronik asidin indirgen olmayan ucunda C4 ve C5 karbonlarının arasında doymamış bağ içeren galaktronidin ortaya çıkmasına sebep olurlar.

- Polimetilgalakturonat Liyazlar (**PMGL**)

Trans-eliminatif bölme yolu ile pektinin parçalanmasını katalizler. Endo-PMGL bağların rastgele bölünmesini katalizler, ekso-PMGL ise trans-eliminatif bölünmeyle parçalanmayı sağlar.

- Poligalakturonat Liyazlar (**PGL**)

Trans-eliminasyon yolu ile pektik asitteki α -1,4-glikozidik bağların bölünmesini katalizler. Endo-PGL glikozidik bağın rastgele, ekso-PGL ise sıra ile bölünmesini sağlar. Pektik enzimler, genelde polisakkaritleri parçalayan zincir kırıcı enzimler olarak bilinmektedirler. Bitki hücrelerinin orta lamelinin ve primer hücre duvarının yapısını oluşturan pektik asit ve pektini parçalayan bu enzimler bakteri, mantar, böcek, nematod ve protozoada bulunmaktadır. Mikroorganizmal pektin yıkımı bitki patojenitesinde, simbiyotik yaşamda, bitkisel artıkların bozunumunda, bitkisel besinlerin sindiriminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca meyve sularının berraklaştırılması ve pektinin uzaklaştırılması gibi pek çok endüstriyel amaçlar içinde kullanılmaktadırlar. (Vitali, J. vd.,1998).

Pektik maddelere etki eden ve kısaca pektik enzimler denilen grupta çok sayıda enzim yer almaktadır. Pektik enzimleri, pektin molekülünün galakturonan omurgasına olan etkilerine göre pektinesterazlar (ester bağını hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (Zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayırarak incelemek olasıdır. Pektinazlar çok sayıda bitki patojeni ya da saprofitik fungus, bakteri ve bazı mayalarca oluşturulurlar. Son yıllarda çok sayıda pektinaz özellikle funguslardan olmak üzere tam olarak saflaştırılmıştır. Pektinazlarında mikroorganizmalara bağlı olarak değişik moleküler formlarda olabilecekleri saptanmış ve çeşitli izoenzimleri bulunmuştur. Bu enzimlerin çoğu 30,000-35,000Da moleküler ağırlıklı olup bir çoğunda glukoprotein orijini gözlenmiştir. (Parenicova, L., 2000)

Pektinazlar, poligalakturonat için spesifiktir. Enzim aktivitesi için substratın kalsiyum tuzu gereklidir. Serbest tetragalakturonat anyonu, kompetitif bir inhibitördür (Romboutz ve Pilnik, 1980). Pektik maddelere etki eden ve kısaca pektik enzimler denilen grupta çok sayıda enzim yer almaktadır. Pektik enzimleri, pektin molekülünün galakturonan omurgasına olan etkilerine göre pektinesterazlar (ester bağına hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (Zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayırarak incelemek olasıdır.

Endo-poligalakturonazlar çok sayıda bitki patojeni ya da saprofitik fungus, bakteri ve bazı mayalarca oluşturulurlar. Son yıllarda çok sayıda endopoligalakturonan özellikle funguslardan olmak üzere tam olarak saflaştırılmıştır. Endopoligalakturonazlarında mikroorganizmalara bağlı olarak değişik moleküler formlarda olabilecekleri saptanmış ve çeşitli izoenzimleri bulunmuştur. Bu enzimlerin çoğu 30,000-35,000 Da moleküler ağırlıklı olup bir çoğunda glukoprotein orijini gözlenmiştir . (Van Santen vd., 1999)

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, R. 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, C.Y. vd., 1999).

2.5 Pektinazların Kullanım Alanları

Pektinaz, endüstriyel pektik enzim preparatları için kullanılan genel bir isimdir. *Aspergillus niger* tarafından pektinaz yapımı, meyve ve sebze suyu teknolojilerinde çok fazla uygulanmaktadır. Meyve ve sebze teknolojilerinde kullanılmaktadır. Ticari pektinazlar, meyve ürünlerinin tadını etkilemektedir. Enzim üretimi, indükleyici olmadan daha fazla miktarda enzim üreten ve katabolik baskılamaya dirençli mutantların seçimi yoluyla gerçekleştirilebilir. Pektinazlar 60 yıldan daha fazla süredir gıda ve meyve suyu üretiminde kullanılmaktadır. Ticari pektinaz üretiminde kullanılan asıl mikroorganizma *A.niger* dir. Yüksek poligalakturonaz aktivitesine sahip pektik enzimlerin kullanımı ile meyve suyundaki bulanıklığın kararlı hale gelmesi başarılmıştır.

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 fermantasyonudur.

Bira ve Şarap Biyoteknolojisinde , pektin üzümün hücre duvarında bulunan en önemli yapı bileşenidir. Olgunlaşma esnasında pektinaz tarafından parçalanır, ancak üzüme ait pektinaz bu faaliyeti çok yavaş sürdürür ve bu nedenle verimi arttırmak amaçlı dış kaynaklı pektinaz enzimleri kullanılır. Üzümün pektin seviyesi şıranın vizkozitesini belirler. Dış kaynaklı pektinaz enzimleri, üzümün poligalakturonaz (PL) enzimlerini faaliyete geçirir ve vizkozitenin azalmasıyla birlikte, sıkma işlemi sırasında daha fazla üzüm suyu elde edilmesine yardımcı olurlar. Ekstraksiyon ve berraklaştırma işlemlerine yardımcı olmasının yanı sıra pektinaz enzimleri, atık pektinlerin yıkımında görev alarak da süzme işleminin kalitesini arttırmaktadır. (Herron, S.R. vd., 2000).

Gıda Biyoteknolojisinde ,

- Parçalayıcı enzimler (pektinazlar, selülozlar, hemiselülozlar karışımı) :

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

- Poligalakturonazlar :

Çilek, kiraz gibi meyvelerde ve çekirdekli meyvelerde doku kırılmasıyla viskoziteyi hızla düşürür, meyve ezilebilirliğini ve renk yoğunluğunu geliştirir.

- Yüksek pro-pektinaz, düşük selüloz ile birlikte poligalakturonaz :

Yüksek viskoziteli meyve püresi üretmi.

- Düşük pektin esteraz ve hemiselüloz ile birlikte poligalakturonaz ve pektin transeliminaz :

Düşük viskoziteli, homojen sebze suyu üretimi.

- Hemiselüloz ile birlikte poligalakturonaz ve pektin transeliminaz :

Meyve suyunun arıtılması.

- Pektinaz ve β -glukozidaz :

Meyve ve sebzelerin duyumsal özelliklerinin arttırılması.

- Pektin liyaz aktiviteleri ve poligalakturonaz olmadan pektin :

Meyvenin işlenmesini sağlar, yüksek kalitede ketçap üretimi.

- Ramnogalakturonaz :

Meyve suyunun stabilitesini sağlar, homjen elma suyu üretimi.

- Selüloz ve pektinaz :

Antioksidanların meyve ve sebzelerin posasından ayrılmasını sağlar. Koroner kalp yetmezliği ve damar sertliğinin kontrolü, meyvenin bayatlanmasının önlenmesi.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Aletler

- Sterilizasyon işlemi için Fissler marka düdüklü tencere (10L)
- Enzim indüksiyonu sağlamak için Sartorius çalkalamalı inkibator
- Enzim aktivite ve protein tayini için Philips PU 8740 UV/VIS Spektrofotometre
- Tampon ve çözelti pH kontrolü için CyberScan pH 500 pH metre
- Santrifüj için Sigma 3K 30 santrifüj
- Enzim aktivite tayininde kullanılan GFL 1086 çalkalamalı su banyosu
- Kullanılan tampon, çözelti ve kültürlerin saklanması için Bosch marka buzdolabı

3.2 Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasal maddeler çizelge 3.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasal	Firma No
Pepton	Sigma / P-6588
MgSO ₄ .7H ₂ O	Riedel-de Haen /13142
KH ₂ PO ₄	Merck / 1.04871
(NH ₄) ₂ SO ₄	Lachema / 30786
Agar-Agar	Merck / 1.01613
MnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma / M-6528
BSA	Fluka / 27815

Coomassie Blue	Merck / 1.00201
ZnSO ₄ .H ₂ O	Sigma / Z-4750
3-5 dinitrosalisilic acid (DNS)	Sigma / 0550
NaOH (Merck 1.06498)	Merck / 1.06498

3.3 Çalışmada Kullanılan Mantar Suşu

Çalışmada kullanılan mikroorganizma *Trichoderma reesei*, Temmuz 2009 tarihinde Viyana Teknik Üniversitesi, Biyokimyasal Teknoloji ve Mikrobiyoloji Enstitüsü tarafından temin edilmiştir.

3.4 Mikroorganizma Üretim Ortamı (Katı Besiyeri)

% 3,9 g patates-dekstrozu agar (PDA), %3 malt ekstresi ve %2 agar agar kullanılarak, PDA ve MEA katı besiyerleri hazırlanmıştır. 20 dakika 121 °C buharlı basınçta sterilize edildi. Daha sonra steril petri kaplarının 2/3'sini kaplayacak şekilde petrilere döküldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

Katı besiyerlerine saf kültürden ekim yapıldı. Bunun için saf kültürden alınan küçük miktarlar petrideki katı besi ortamının ortasına bırakıldı. 30 °C'de 5 gün inkübe edildi. Bu sürenin sonunda besi yeri yüzeyi tamamen kaplandı. Bu yol ile hazırlanan mikroorganizma +4 °C' de 3 ay boyunca saklanabilir.

3.5 Spor Çözeltisinin Hazırlanması

Katı besiyerinde üreyen mikroorganizmaları çözelti içine almak ve aşılama işleminde kullanmak için, sporlar ekim iğnesi yardımı ile yüzeyden kazınarak 5 ml steril su ilave edilerek çözeltiye alındı.

3.6 Enzim Üretim Ortamı (Sıvı Besiyeri)

Enzim üretim ortamının bileşimi :

%10 Gliserin (v/v)	80 ml
Pepton	0,4 g/L
Maya Ekstresi	0,4 g/L
KH ₂ PO ₄	0,24 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,4 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g/L
CaCl ₂ .H ₂ O	0,1 g/L

şeklindedir. Çalışmanın konusu olan enzim üretimine etki eden optimum konsantrasyon, optimum pH ve optimum sıcaklığın bulunması için sırasıyla, uygun konsantrasyondan sonra pH'ı 3,5-6 arasında olan ve her üretim ortamından toplam 4 adet erlen (100' er ml) ile çalışıldı. Bulunan optimum pH yardımı ile daha sonra 25°C, 30°C, 35°C ve 40 °C de optimum sıcaklık denemesi yapıldı.

Hazırlanan spor çözeltisinden 0,5 ml enzim üretim ortamına enjekte edilerek uygun konsantrasyon, pH ve sıcaklık denemeleri için 3 gün 120 rpm çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi.



Şekil 3.1 Farklı gliserin konsantrasyonlarına sahip, ekim yapılmış kültür ortamlarını inkübatör içerisinde gösteren resim (YTÜ Biyokimya Lab, Davutpaşa)

3.7 Enzim Aktivitesinin tayini

Pektinaz enziminin aktivitesi , Jing Debinga vd., tarafından önerilen (2004) metoda göre substrat olarak pektin kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edildi.

Çözeltiler ;

- 50mM Sodyum asetat tamponu pH 4,8 : 0,85 g sodyum asetat ve 0,36 ml glacial asetik asit çözeltisi çözülerek balon jode 100 ml ye tamamlandı.
- % 1 lik Pektin çözeltisi : 0,1 g pektin 10 ml pH'ı 4,8 olan 50 mM sodyum asetat çözeltisinde çözüldü.
- DNS çözeltisi (3,5 dinitrosalisilik asit) : 10 g 3,5-dinitrosalisilik asit ; 10 g sodyum hidroksit, 2 g fenol ve 200 g sodyum potasyum tartarat 1 litre destile suda çözüldü.
- Enzim Çözeltisi (örnek çözelti) : Enzim üretim ortamına enjekte edilen 0,5 ml spor çözeltisi ile 3 gün inkübasyon sürecinde elde edilir.

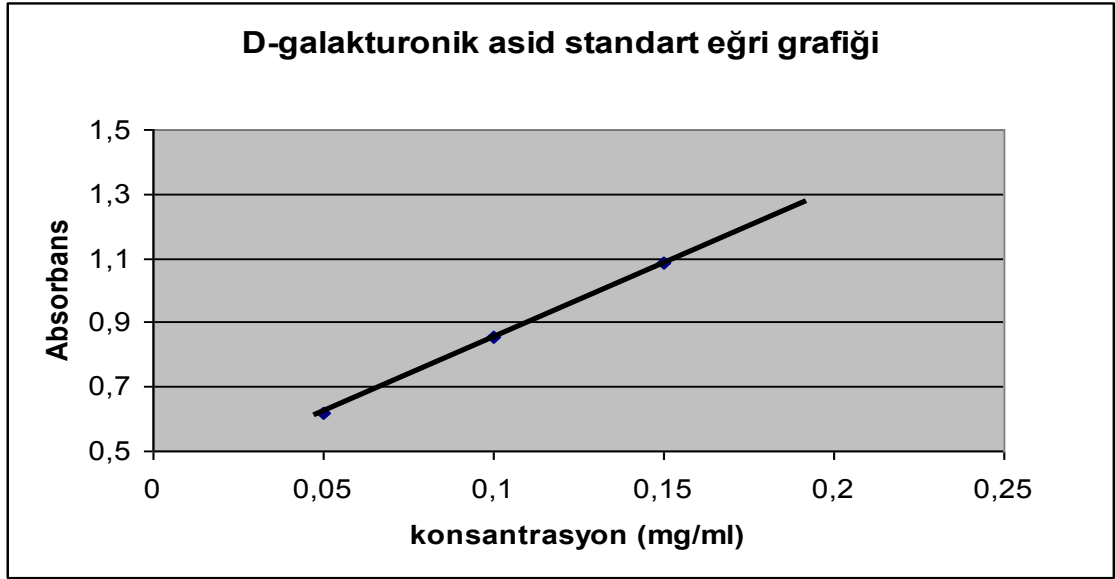
Bu yöntemde 2 ml %1 lik pektin çözeltisi (sodyum asetat tamponu içinde çözülmüş) 0,5 ml enzim çözeltisi ile karıştırılarak 40 °Cde 30 dakika sıcak su banyosunda bekletildi. Daha sonra oda sıcaklığına ısı düşürüldü. 2,5 ml DNS eklendi ve 5 dakika kaynar sıcak suda bekletildi. 10 ml distile su eklendi. Absorbans değerleri, 540 nm'de 1ml kuvars küvet içinde spektrofotometrede sodyum asetat körüne karşı okundu. Bu absorpsiyon değerinin d-galakturonik asid regresyon denkleminde uygulanmasıyla enzim tarafından bir dakikada açığa çıkarılan d-galakturonik asid miktarı $\mu\text{mol} / \text{dakika}$ olarak belirlendi. (Debinga, J. vd., 2007).

Bir ünite enzim aktivitesi ; standart koşullar altında bir dakikada pektinden 1 μmol D-galakturonik asid oluşmasını sağlayan enzim miktarıdır.

3.8 D-galakturonik asid Standart Eğri grafiğinin Çizilmesi

Sodyum asetat tamponu içerisinde %1 lik D-galakturonik asid çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,05-0,2 mg/ml konsantrasyonlarında seyreltik D-galakturonik asid standartları hazırlandı. Seyreltik çözeltilerin kullanılması ile her 24 saatte bir alınan örneklerde DNS metodu ile 540 nm de aktivite ölçümü yapıldı. Elde edilen veriler en küçük kareler yöntemine göre düzenlendi. Absorbans ve D-galakturonik asid konsantrasyonları arasında standart eğri çizildi. Regresyon denklemi ; $y = 4,688x + 0,3847$ olarak bulundu.

Çizelge 3.2 D-galakturonik asid standart eğri grafiği



3.9 Protein Tayini

Protein tayini Bradford (1976) yöntemine göre yapıldı. Sığır serum albumini (BSA) standart olarak kullanıldı.

Çözeltiler

Renk reaktifi: 100 mg Coomassie Blue G-250, 50 mL % 96 (v/v) etonolde çözüldükten sonra 100 mL %85 (v/v) 0-fosforik asid eklendi. Destile su ile balon jojede 1 L ye tamamlandı.

Bu yöntemde, 0,8 mL protein miktarı tayin edilecek örnek üzerine 0,2 mL renk reaktifi eklendi. Ve köre karşı 5 dakika-1 saat aralığında 595 nm de spektrofotometrik olarak okundu.

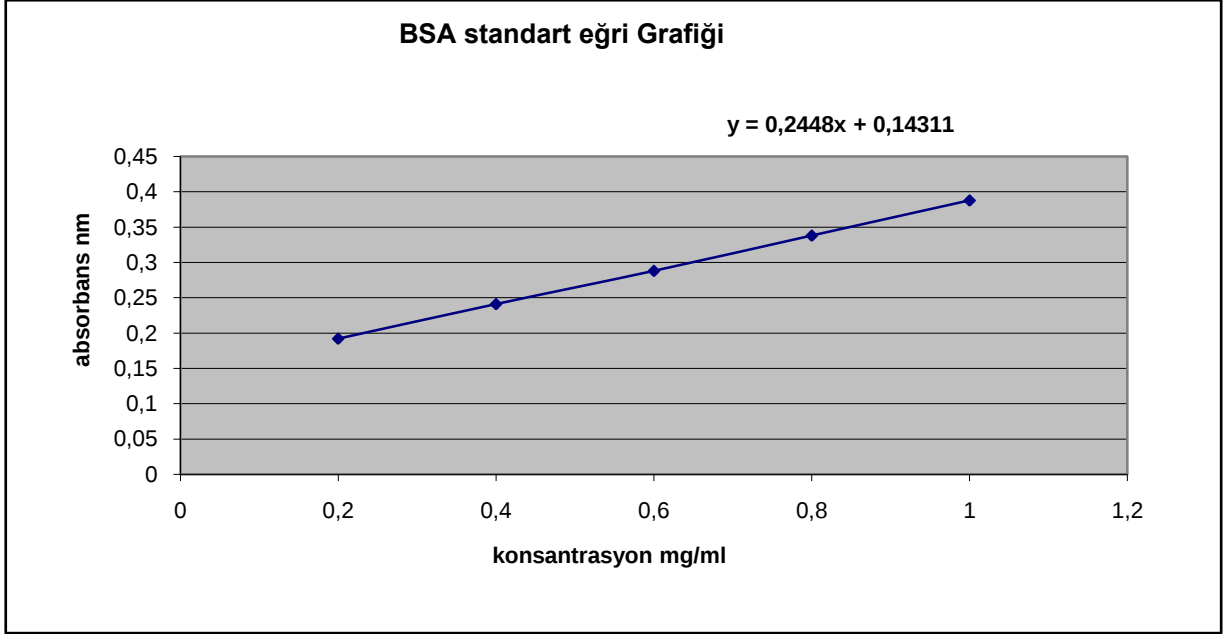
Kör 0,8mL distile su ve 0,2 mL renk reaktifinin karıştırılması ile hazırlandı. Elde edilen absorbans değerlerinin BSA ile çizilen standart grafiğe uygulanması ile, protein miktarı mg/mL olarak hesaplandı.

3.10 BSA Standart Eğri Grafiğinin Çizilmesi

mg/mL konsantrasyonda stok BSA çözeltisi hazırlanarak bu stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak 0,2 - 1 mg/mL konsantrasyon aralığındaki çalışma çözeltileri hazırlandı. Elde edilen standart çözeltilere Bradford deneyi uygulandı. Deney beş kez

tekrarlandı. Ölçülen absorbans değerlerine en küçük kareler metodu uygulanarak grafik çizildi. Şekil 10' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 BSA standart eğri grafiği



3.11 Kültür Ortamında Pektinaz aktivitesini Etkileyen Fizyolojik koşulların belirlenmesi

3.11.1 Pektinaz Üretimi İçin Uygun Konsantrasyonun Saptanması

Enzim indüksiyon ortamında pektinaz üretimine konsantrasyonun etkisini saptamak amacıyla üç farklı gliserin konsantrasyonuna sahip besiyerleri hazırlandı. Bu besiyeri gliserin konsantrasyonları şöyle ayarlandı, %5, %10 ve %15 (v/v) oranında gliserin her biri 80 ml olacak şekilde üç ayrı erlenlere konur ve 0,4 g Pepton, 0,4 g maya ekstresi, 0,24g KH_2PO_4 , 0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 4 ml iz element eklenerek çözeltiler oluşturulup, erlenlere paylaştırıldı.

50x İz elementi çözeltisi

250 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

80 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

70 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 mg/l $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

1. Sıvı Besiyeri: %5 (v/v) gliserin içermektedir.
2. Sıvı Besiyeri: %10 (v/v) gliserin içermektedir.
3. Sıvı Besiyeri: %15 (v/v) gliserin içermektedir

Sıvı besiyerleri 20 dakika 121 °C’de buharlı basınçta sterilize edildi. Spor çözeltisinden 0,5 ml her bir erlene enjekte edildi. Üç gün 30 °C 120 rpm çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Bekleme süresinden sonra DNS yöntemi ile absorbans ölçüldü.

3.11.2 Pektinaz Üretimi için uygun pH ‘ın saptanması

Enzim indüksiyon ortamında pektinaz üretiminde pH’ın etkisini saptamak amacıyla 4 adet erlene paylaştırıldı. Üretim ortamları 0,1N HCL ve 0,1N NaOH kullanılarak 3,5-4-4,5-5-5,5-6 gibi farklı pH lara ayarlandı. 20 dakika 121 °Cde buharlı basınçta sterilize edildi. Spor çözeltisinden 0,5 ml her bir erlene enjekte edildi. Üç gün 30 °C120 rpm çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Bekleme süresinden sonra DNS yöntemi ile absorbans ölçüldü, protein miktarları hesaplanarak total aktivite ve spesifik aktivite değerleri bulundu.

3.11.3 Pektinaz Üretimi için Uygun Sıcaklığın Saptanması

Enzim indüksiyon ortamında pektinaz üretimine sıcaklığın etkisini saptamak amacıyla 400 mL enzim üretim ortamı paralelleri ile birlikte 4 adet erlene paylaştırıldı. Üretim ortamları pH’ ı 4,5 e ayarlanmış olarak 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40 °C de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde üç gün bekletilmiştir.

3.12 Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

3.12.1 Total Ünitenin Hesaplanması

Standart D-galakturonik asid eğrisi kullanılarak bulunan indirgen şeker miktarı aşağıdaki denklemde yerine yazılarak hesaplandı. (U/mL)

$$\text{Total Ünite} = \text{mg/ml indirgen şeker} \times 100 / t \times M_G$$

mg/mL : Örneklerin absorbanslarına karşılık gelen D-galakturonik asid miktarı

t : İnkübasyon zamanı (dk)

M_G : Serbest bırakılan D-galakturonik asid in molekül ağırlığı

3.12.2 Spesifik Aktivitenin Hesaplanması

Total ünite değerleri mL deki mg protein miktarlarına bölünerek spesifik aktivite hesaplandı. U / mg.

4. SONUÇLAR

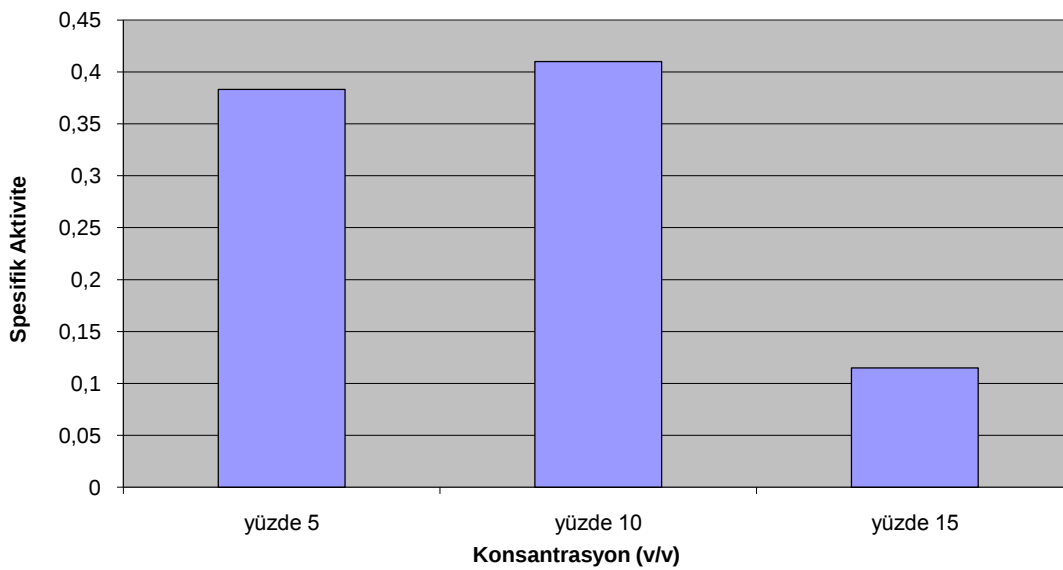
Mikroorganizma önce PDA katı ortamına, sonra enzim üretim ortamına transfer edildi. Substrat eklenip pektinaz aktivitesini etkileyen pH ve sıcaklık koşulları belirlendi. D-galakturonik asid standart eğrisi kullanılarak indirgen şeker miktarları bulundu. mL’ deki protein miktarları total protein standart eğrisi kullanılarak hesaplandı.

4.1 Pektinaz Üretimi için Uygun Konsantrasyonun Belirlenmesi

Üç gün 30 °C 120 rpm çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Bekleme süresinden sonra DNS yöntemi ile absorbans ölçüldü . Total ünite ve spesifik aktivite hesaplandı. Ortam pH sı 4,5 ve konsantrasyonu %10 olan üretim ortamında en yüksek enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı gliserin konsantrasyonlarındaki üretim ortamlarında tespit edilen total ünite ve spesifik aktivite değerleri

Konsantrasyon	Total Ünite U/ml	Spesifik Aktivite (U/mg)
% 5 Gliserin	0,230	0.383
% 10 Gliserin	0,437	0.410
% 15 Gliserin	0,417	0.115



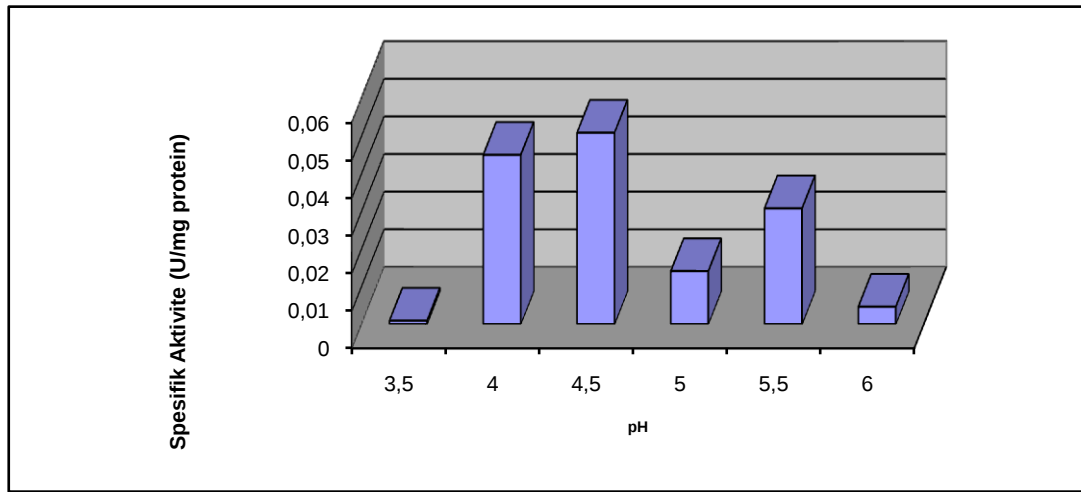
Şekil 4.1 Gliserin konsantrasyonunun spesifik aktivite değişimi

4.2 Pektinaz Üretimi için Uygun pH Değeri

Enzim üretim ortamının başlangıç pH'ları 3,5 – 4 – 4,5 – 5 – 5,5 – 6 olarak ayarlandı. *Trichoderma Reesei* sporları enjektte edildi ve 30 °Cde çalkalamalı koşulda inkübe edildi. 3 günlük süre sonunda yapılan total ünite ve protein ölçümler ile spesifik aktivite hesaplandı. Ortam pH'sı 4,5 olan enzim üretim ortamında en yüksek pektinaz aktivitesi elde edildiği gözlenirken pH 3,5 ve pH 6 da en az enzim aktivite tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı pH lardaki enzim üretim ortamlarında tespit edilen total ünite değerleri

pH	Total Ünite U/ml	Spesifik Aktivite (U/mg)
3,5	0,01	0.0158
4	0,270	0,879
4,5	1,055	0.99
5	0,087	0,071
5,5	0,324	0,601
6	0,0387	0,088



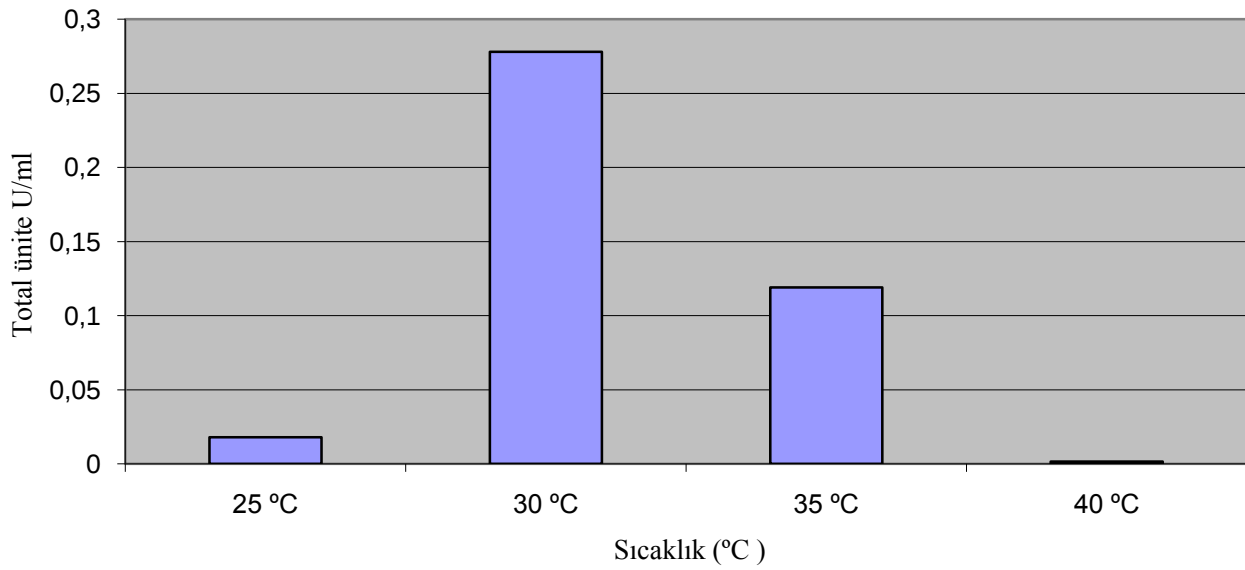
Şekil 4.2 Farklı pH lardaki enzim üretim ortamlarında tespit edilen spesifik aktivite değerleri

4.3 Pektinaz Üretimi için Uygun Sıcaklık Değeri

İnkübasyon sıcaklığının *Trichoderma .reesei* tarafından salgılanan pektinaz aktivitesinin etkisini saptamak amacıyla hazırlanan enzim üretim ortamına spor çözeltileri eklendi. 25 °C, 30 °C, 35 °C ve 40 °C de (pH 4,5 ' da) çalkalamalı inkübatörde 3 gün bekletildi. İnkübasyonun 3. gününde alınan örneklerde yapılan incelemede 30°C sıcaklıkta ölçülen total ünite ve protein ölçümleri sonunda pektinaz aktivitesinin en yüksek değere ulaştığı tespit edildi.

Çizelge 4.3 Farklı sıcaklıklardaki enzim üretim ortamlarında tespit edilen Total ünite değerleri

pH 4,5	Total Ünite U/ml	Spesifik Aktivite (U/mg)
25 °C	0,0179	0.043
30 °C	0,278	0,678
35 °C	0,119	0,386
40 °C	0,00152	0.012



Şekil 4.3 Pektinaz enzim aktivitesinin sıcaklığa göre total ünite değişimi

5. TARTIŞMA

Mikroorganizmaların hücre dışına salgıladıkları glukanaazlar, kitinaazlar, lipazlar, pektinaazlar ve proteazlar patojenik mantarların hücre duvarından salgılanan enzimlerdir. Pektin, tüm kara bitkilerinde bulunan doğal bir polisakkarittir. Molekül ağırlığı 30 000 – 100 000 arasında değişir. Pektinin temel yapıtaşı α -galakturonik asittir. Galakturonik asitin oluşturduğu linear poligalakturonik asit ana zincirde α -1,2 glikozidik bağla bağlanmış ramnoz molekülleri yer almaktadır. Ramnoz moleküllerine, uzun yan zincirler veya monomerler olarak nötral şekerler bağlanmıştır. Şu halde pektin molekülleri, linear zincir (düz bölge) ve yan zincirlerinin bulunduğu kısımlar (tüylü bölge) olmak üzere özel bir yapıdadır. Pektin denildiği zaman, gerçekte özellikleri benzer pektik madde grubu anlaşılmaktadır. Birçok meyve ve sebzede bulunan, hücre duvarının yapısında yer alan, hücreleri birbirine bağlayan pektik bileşikler, pektinik asit, pektik asit, pektat, protopektin pektin gibi bileşikler kapsamaktadır. Pektik maddeler, galakturonik asit veya galakturonik asidin metal esterleri olup birbirlerine 1-4 bağı ile zincir yaparak bağlanmışlardır.

Pektin, bitkisel dokularda yaygın olarak bulunmasına rağmen, her bitkiden pektin üretimi ekonomik olmamaktadır. Bunun yanı sıra bitkisel dokularda yeterli pektin bulunsa bile, pektinin nitelikleri kullanım açısından uygun olmayabilir. Gıda endüstrisinde kullanılmak üzere üretilen pektinin başlıca hammaddeleri; turunçgil kabukları ve elma posası gibi meyve suyu üretiminde oluşan atıklardır.

Pektinaazlar pektik maddeleri parçalayan bir grup enzimdir. Pektin bitki hücre duvarında bulunan, bitki dokularının bütünlüğünü sağlayan yapısal bir polisakkarittir. Pektik enzimler endüstriyel olarak meyve sularının berraklaştırılması ve konsantre edilmesi, şarapların berraklaştırılması ve keten için selüloz liflerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır. *Trichoderma reesei* de pektin metabolizmasından sorumlu hücre dışı pektinaz sorumludur. En yüksek enzim aktivitesi %10 luk gliserin konsantrasyonunda pH 4,5 olan besi ortamında 30 °C sıcaklıkta, çalkalamalı inkübatörde 3 gün süre sonunda elde edildi. Optimum koşullarda enzim aktivitesi 0,278 U/mL, spesifik aktivite 0,678 U/mg protein olarak bulundu. Yıllar boyunca filamentöz mantarlardan üretilen enzimler gıda üretim proseslerinde kullanılmıştır. Büyük ölçekli fermantasyonun endüstride yaygın bir şekilde kullanılması , proses mühendisliğinde ki ilerlemeler ve genetik olarak modifiye edilmiş suşların gelişimi bugün endüstri üretiminde filamentöz mantarların kullanılmasına neden olmuştur. Genellikle doğada bulunan suşlar ihtiyacımız olandan daha çok daha düşük miktarlarda protein ürettiğinden ticari olarak kullanılmamaktadır. Bu yüzden istenilen hedef proteini alabilmek için doğadaki suşlara genetik transformasyon yapılmaktadır.

Viyana Teknik Üniversitesi'nden temin edilen bu suş, rekombinant gen teknolojisi ile pektinaz enzimi üretme geni eklenmiş olmasıyla bilinmektedir. Bu çalışmada söz konusu suş kullanılarak pektinaz elde edilmiştir. Bu özelliğe sahip bir suş ile çalışmanın araştırmacılar açısından en büyük avantajı; kültür ortamında, uzaklaştırılması zor olan pektine gereksinim duyulmaması ve böylece saflaştırma işleminde kolaylık ve ekonomik kazanç sağlamasıdır.

Yapılan çalışmaların sonucunda, genelde endüstride *Aspergillus niger* tarafından üretilen pektinazın *Trichoderma Reesei* mantarından düşük pH ve düşük ısılarda endüstriyel alanlarda güvenle kullanılabilir olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- Akel, S., (2009). “*Trichoderma Reesei*ye Ait Bazı Enzimlerin Üretimini, Yenilenebilir Karbon Kaynağı Olarak Kullanılan D-ksiloz ve L-arabinoz Tarafından Baskılanması.”, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.
- Aksöz, E. ve Aksöz, N., (1985). “Pektik Enzimler”, (Derleme), *Biyokimya Dergisi*, 1:38-51.
- Bailey, J.E. ve Ollis, D.F., (1987). “Biochemical Engineering Fundamentals”, International Student Edition, Chapter 1-7, 39-50.
- Bonnin, E., Le Goff, A., Korner, R., Vigouroux, J., Roepstorff, P. ve Thibault, J. F., (2002). “Hydrolysis of Pectins with Different Degrees and Patterns of Methylation by the Endopolygalacturonase of *Fusarium Moliniforme*”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1596, 1: 83-94.
- Cosgrove, D.J., (1999). “Enzymes and Other Agents that Enhance Cell Wall Extensibility,” *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 263:243-256
- Debinga, J., Peijuna, L., Stagnittib, F., Xianzheb, X., Lic, L., (2005) “Pectinase Production by Solid Fermentation from *Aspergillus Niger* by a New Prescription Experiment a Institute of Applied Ecology”, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 11016, People’s Republic of China Received 5 May 2004; Received in Revised Form 17 January 2005; accepted 18 January 2005 Available Online 16 March 2005.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., (1981). “In Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering”, *Scientific American*, Freeman &Comp., San Francisco pp. 3-14..
- Vries R.P., Visser, J., (2001). “Applied and Environmental Microbiology”, 65:5500-5503.
- 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.
- Herron, S. R., Benen, J. A. E., Scavetta, R. D., Visser, J. ve Jurnak, F., (2000). “Structure and Function of Pectic Enzymes: Virulence Factors of Plant Pathogens”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 16:8762-8769.
- 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.
- 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.
- Kıymaz, A.N., (2007). “*Hypocrea Jecorina QM9414* Kültürlerinde Beta Galaktozidazın Karakterizasyonu ve Kısmi Saflaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.

- Kubicek, C.P., Druzhinina, I.S., (2007). "Environmental and Microbial Relationships" 4(4):325-340,
- Mabrouk, S.S., Hashem. A.M., EL-Shayeb, A., Ismail, M.S., Abdel-Fattah, A.F., (1998). "Optimization of Alkaline Protease Productivity by *Bacillus licheniformis*", Bioresource Technology 69:155-159.
- Malttei, B., Belnada, M. S., Federici, L., Roepstoff, P. ve Cervone, F., (2001). "Secondary Structure and Ost-translational Modifications Leusin-rich Repeat Protein PGIP from *Phaseolus Vulgaris*", Biochemistry, 40(2):569-76.
- Parenicova, L., Kester, H.C., Benen, J.A., ve Visser, J., (2000). Characterization of a Noval Endopolygalacturonase from *Aspergillus Niger* with Unique Kinetic Properties, *FEBS Letter*, 467(2):333-336.
- 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.
- Romboutz, F.M. ve Pilnik, W., (1980). "Pectic Enzymes, Economic Microbiology, A. H. Rose (Eds.), Academic Press, London, 33:227-382.
- Ramon, D., Veen, P., Visser, J., (1993). "Arabian Degrading Enzymes From *Aspergillus Nidulas* Introduction and Purifaction". Fems Microbiology Letters, 113:1522 Journal of Moleculer Biology, 311(4):863-878.
- 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.
- Tomme, P., Warren, R.A., Gilkes, N.R., (1995). "Cellulose Hydrolysis by Bacteria And Fungi", Adv Microb Physio. 137:1-81.
- Van Santen, Y., Benen, J.A., Schroter, K.H. ve Kalk, K.H., (1999). "1,68-A Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus Niger* and Identification of Active Site Residue", Journal of Biological Chemistry, 274(43):30474-30480.
- Vitali, J., Schick, B., Harry, C.M., Visser, J. ve Jurnak, F., (1998). "The Three-Dimensional Structure of *Aspergillus Niger* Pectin Lyase B at 1.7-A Resolution Plant Physiology, 116:69-80.
- Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S., (1999). "Production and Purification of Protease From a *Bacillus Subtilis* That Can Deproteinize Crustacean Wastes", Enzyme And Microbial Technology. 26:406-413.

İnternet Kaynakları

[1] www.yildiz.edu.tr

[2] www.mustafaaltinisik.org.uk/09-tbl102-0809Enzimler.ppt

[3] www.sparknotes.com/chemistry/kinetics/mechanisms

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi	07.04.1982	
Doğum Yeri	Kırklareli	
Lise	1996-2000	İzmir Karşıyaka Yabancı Dil Ağırlıklı Lise
Lisans	2001-2007	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya
Yüksek Lisans	2007- Devam ediyor	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı Biyokimya Programı

Çalıştığı Kurumlar

2004-2005	Şişecam Sanayi AŞ
2005-2006	Mercedes Benz Türk AŞ
2007-2008	Intel Türkiye
2009-2010	Oki Printing Solutions
2010- Devam ediyor	Medicheck radyofarmasötik ilaç AŞ