



T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zübeyde BAŞARAN

YEM KATKISI KSİLANAZ ENZİMİ
ÜRETEN BAKTERİ İZOLASYONU
VE ENZİMİN KİSMİ KARAKTERİZASYONU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OSMANIYE – 2017

**T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YEM KATKISI KSİLANAZ ENZİMİ ÜRETEEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE ENZİMİN KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

Zübeyde BAŞARAN

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE
MAYIS-2017**

TEZ ONAYI

YEM KATKISI KSİLANAZ ENZİMİ ÜRETEEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Zübeyde BAŞARAN tarafından Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy çokluğu ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

.....

Üye: Prof. Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

.....

Üye: Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Biyoloji Anabilim Dalı, ÇÜ

.....

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve /.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Halil Zeki GÖK
Enstitü Müdürü, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

.....

Bu Çalışma OKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: OKÜBAP-2016-PT3-007

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Zübeyde BAŞARAN



ÖZET

YEM KATKISI KSİLANAZ ENZİMİ ÜRETEEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMİN KISMİ KARAKTERİZASYONU

Zübeyde BAŞARAN
Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Mayıs 2017, 46 Sayfa

Bu çalışmada Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi kampüs alanı içerisinde alınan toprak örneklerinden ksilanolitik *Bacillus* sp. XbO bakterisi izole edilmiştir. XbO ksilanazı optimum aktivitesini 60 °C ve 6.0-7.0 pH aralığında göstermiştir. Ksilanaz enzimi 30 dk ön inkübasyon sonrasında 60 °C'de %92 kalan aktivite gösterirken, 90 °C'de %62 kalan aktivite göstermiştir. 40-80 °C arasındaki ortalama kalan aktivite ise %92 olarak gerçekleşmiştir. Yine enzim 7.0-10.0 pH değerlerinde 30 dk ön inkübasyon sonucunda ortalama %96, 7.0-11.0 pH aralığında ise ortalama %92.4 kalan aktivite göstermiştir. En yüksek ksilanaz üretimi izolatanın inkübasyonundan itibaren 24. saatte gerçekleşmiştir. SDS-PAGE ve zımogram analizleri ile enzimin moleküler ağırlığı ~81 kDa olarak belirlenmiştir. MnCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, EDTA ve FeCl₃ enzim aktivitesini stimüle ederken, HgCl₂ ve CuCl₂ inhibe etmişlerdir. Ham ve saflaştırılmış enzime ait spesifik aktivite değerleri sırasıyla 27.6 ve 113.8 U/mg protein olarak belirlenmiştir. BLAST analizi sonucunda *Bacillus* sp. XbO bakterisinin rDNA sekansı ile *Bacillus pumilus* ve *Bacillus safensis* bakterilerinin rDNA sekansları arasında %98 oranında benzerlik bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Bacillus*, ksilanaz, izolasyon, karakterizasyon, BLAST analizi, enzim katkısı

ABSTRACT

ISOLATION OF FEED ADDITIVE XYLANASE PRODUCING BACTERIA AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE ENZYME

Zübeyde BAŞARAN
M.Sc., Department of Biology
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

May 2017, 46 Pages

In the study, the xylanolytic bacterium *Bacillus* sp. XbO was isolated from the soil samples collected from campus area of Osmaniye Korkut Ata University. XbO xylanase showed its optimum activity at 60 °C and 6.0-7.0 pH values. Xylanase enzyme were showed 92 and 62% residual activity after pre-incubation at 60 and 90 °C for 30 min, respectively. The relative residual activity between 40-80 °C was occurred as 92%. On the other hand, the enzyme was showed 96 and 92.4% residual activities after pre-incubation between 7.0-10.0 and 7.0-11.0 pH values for 30 min, respectively. Maximum xylanase production of isolate was observed after 24 hours later from inoculation. The molecular weight of the enzyme was determined as ~81 kDa by SDS-PAGE and zymogram analysis. The enzyme activity was stimulated by MnCl₂, CoCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, EDTA and FeCl₃, whereas inhibited by HgCl₂ and CuCl₂. The specific activities of crude and purified enzymes were 27.6 and 113.8 U/mg proteins, respectively. According to BLAST analysis, *Bacillus* sp. XbO rDNA sequence was similar to *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* rDNA sequences at the rate of 98%.

Key words: *Bacillus*, xylanase, isolation, characterization, BLAST analysis, enzyme supplement



Çok kıymetli aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez konumun belirlenerek tez çalışmamın yürütölmesini üstlenen, çalışmalarım süresince değerli bilgi ve tecrübeleriyle katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bütün çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen ve en büyük fedakarlığı gösteren sevgili eşim Mehmet BAŞARAN'a, çocuklarım Beyza, Ali ve Zeynep BAŞARAN'a içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca bölümdeki çalışmalarım süresince beni destekleyen diğer bölüm hocalarıma ve arkadaşlarım Hürü YÜCEL ve Meryem KARADAĞLI'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikrobiyal Enzimler.....	1
1.2. <i>Bacillus</i> Cinsi.....	2
1.3. Ksilan ve Yapısı.....	3
1.4. Ksilanazlar	5
1.5. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları	7
1.6. Tezin Amacı.....	8
1.7. Tezin Kapsamı	8
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
3. MATERYAL ve METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bakteri ve Besiyerleri	13
3.1.2. Aletler.....	14
3.2. Metot.....	15
3.2.1. <i>Bacillus</i> sp. XbO Bakterisinin İzolasyonu.....	15
3.2.2. Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi	16
3.2.3. Filogenetik Analizler	17
3.2.4. Ksilanaza Ait Bazı Enzimatik Özelliklerin Belirlenmesi	17
3.2.4.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi	17
3.2.4.2. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	18
3.2.4.3. Enzimin Termal (Sıcaklık) Stabilitesinin Belirlenmesi	19
3.2.4.4. Enzimin pH Stabilitesinin Belirlenmesi	20
3.2.4.5. Enzimin Zamana Göre Optimum Aktiviteleri	20

3.2.4.6. Bazı Kimyasal Maddelerin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	20
3.2.5. Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi	21
3.2.5.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması	21
3.2.5.2. Protein Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	21
3.2.5.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizleri	22
3.2.6. Enzimin Spesifik Aktivitesinin Belirlenmesi	23
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	25
4.1. BULGULAR	25
4.1.1. Bakterinin İzolasyonu ve Ksilanaz Aktivitelerinin Belirlenmesi	25
4.1.2. Filogenetik ve BLAST Analizleri	26
4.1.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi	28
4.1.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	29
4.1.5. Enzimin Termal Stabilitesi	30
4.1.6. Enzimin pH Stabilitesi	31
4.1.7. Zamana Göre Enzim Aktivitesi	32
4.1.8. Bazı Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri	33
4.1.9. Enzimin Moleküler Ağırlığı	35
4.1.10. Enzimin Spesifik Aktivitesi	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
5.1. Sonuç	37
5.2. Öneriler	37
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Elde edildikleri kaynaklara göre mikrobiyal enzimler.....	2
Çizelge 1.2. Ksilanaz üreten mikroorganizma grupları	7
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> sp. XbO bakterisine ait rDNA sekansı.....	26



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ksilanın diyagramatik yapısı	4
Şekil 1.2. Ksilanaz enziminin ksilan yapıları üzerine etkisi	6
Şekil 3.1. LB-Agar besiyerlerinin petri kaplarında hazırlanması	13
Şekil 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü OKÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı	14
Şekil 3.3. Toprak numunelerinin 85 °C'ye ayarlanmış su banyosunda pastörizasyonu	15
Şekil 3.4. LB-Ksilan-Agar besiyerinde gelişen izolatlarda Kongo kırmızısı boyaması sonucu ksilanaz aktivite tayini	16
Şekil 3.5. Enzim analizleri için hazırlanmış karışımları içeren deney tüplerinin su banyosunda inkübasyonu	18
Şekil 4.1. LB-Ksilan-Agar besiyerinde izolatların ksilanaz aktiviteleri	25
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. XBO bakterisine ait dendrogram analizi	27
Şekil 4.3. Ksilanaz enzimine ait pH optimum grafiği	29
Şekil 4.4. Ksilanaz enzimine ait sıcaklık optimum grafiği	30
Şekil 4.5. Ksilanaz enzimine ait sıcaklık stabilite grafiği	31
Şekil 4.6. Ksilanaz enzimine ait pH stabilite grafiği	32
Şekil 4.7. Zamana göre enzim aktivite grafiği	33
Şekil 4.8. Bazı kimyasal maddelerin ksilanaz aktivitesine etkileri	34
Şekil 4.9. <i>Bacillus</i> sp. XBO ksilanazının SDS-PAGE ve zimogram analizi ile moleküler ağırlık analizi	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
kDa	Kilodalton
LB	Luria bertani
M	Molar
mg/ml	Miligram/mililitre
mM	Milimolar
mw	Moleküler ağırlık (kDa)
OD	Optical density
rDNA	Ribozomal DNA
DNS	Dinitrosalisilik asit
rpm	Dakikada devir sayısı
SDS	Sodium dodecyl sulfat
spp.	Tür
Tris	2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	Ünite/miligram
U/ml	Ünite/mililitre
UV	Ultra violet
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim

1. GİRİŞ

Enzimler, kimyasal reaksiyonu katalizleyen özel proteinlerdir. Enzimler sadece canlı hücrelerde üretilmekle birlikte doğal ortamlarının dışında da faaliyet gösterebilmektedirler (Temiz vd., 1999). Endüstriyel anlamda üretimi ve kullanımı giderek artan enzimler, günümüzde hayvansal ve bitkisel kaynaklardan ve genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikroorganizmaların daha hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrol edilebilmesi ve her zaman üretimlerinin kolayca yapılabilmesi ticari enzimlerin üretiminde tercih edilme nedenlerindedir (Temiz vd., 1999).

1.1. Mikrobiyal Enzimler

Genellikle mikroorganizmalardan elde edilen enzimler endüstrinin hemen her alanında kullanılmaktadır. Mikroorganizma kaynaklı enzimler bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlere göre fazla miktarda elde edilebilmeleri, katalitik aktivitelerinin yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları tercih edilme nedenlerinin başında yer almaktadır (Wiseman, 1987). Endüstriyel enzimlerin üretiminde mikroorganizma kullanımı artmıştır. Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan çoğu enzim mikroorganizma kaynaklı olduğu için, endüstride kullanılan mikroorganizmalar sadece enzim üretme kabiliyetlerine göre değil, toksik ve patojen olmamalarına göre de seçilmişlerdir (Demain ve Solomon, 1981).

Günümüze kadar 2000'in üzerinde enzim tanımlanmış olup bunların da yaklaşık 100 tanesi ticari kullanım için uygun bulunmuştur (Zeman ve McCrea, 1985).

Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 rennin, %3 tripsin, %3 lipaz, %10 kadar analitik ve farmasötik enzimler ve %10 ise karbonhidrat parçalayan diğer enzimlerdir (Rao vd., 1998). Mikrobiyal kökenli enzimlerin genel olarak %29'u gıda, %15'i hayvan yemi, %56'sı ise genel teknik alanlarda kullanılmaktadır (Kirk vd., 2002; Schallmey vd., 2004). Ticari öneme sahip

bazı enzimler elde edildikleri kaynaklara göre aşağıdaki çizelgede sınıflandırılmıştır (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Elde edildikleri kaynaklara göre mikrobiyal enzimler (Topal, 1985)

	Organizma	Enzim
Küf	<i>Aspergillus oryzae</i>	Amilaz, Proteaz
	<i>Aspergillus niger</i>	Amiloglukosidaz, Katalaz, Amilaz, Selülaz, Pektinaz
	<i>Rhizopus</i> spp.	Amilaz, Amiloglukosidaz, Lipaz
	<i>Penicillium</i> spp.	Pektinaz, Lipaz
	<i>Mucor</i> spp.	Proteaz, Lipaz
	<i>Trichoderma viride</i>	Selülaz
Bakteri	<i>Bacillus subtilis</i>	Proteaz, Selülaz, Amilaz
	<i>Bacillus mesentericus</i>	Proteaz
	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Katalaz
	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	Streptokinaz, Streptodomaz
Maya	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	İnvertaz
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	Laktaz

1.2. *Bacillus* Cinsi

Bacillus cinsi bakteriler çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, birçok olumsuz ortam koşullarına karşı dirençli, endospor oluşturabilen, gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bakterilerdir (Ayhan, 2000).

Bacillus'lar genel olarak güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri hücre dışına salgılamaları ve diğer birçok nedenden dolayı endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukanaaz, glukoz izomeraz ve endonükleaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Uhlig, 1998).

1.3. Ksilan ve Yapısı

Bitki hücre duvarının yapısında kovalent ve/veya kovalent olmayan bağlarla birbirlerini etkilemekte olan selüloz, lignin ve hemiselüloz bulunur (Köksal, 1998, Collins vd., 2005).

Bazı özellikleri ile selülozdan ayrılan hemiselülozlar, odunun diğer elemanlarından ayrıştırıldıktan sonra kaynayan suda ve seyreltik alkali çözeltide çözünebilirler. Hemiselülozların kimyasal yapısı hakkında bugün çok az şey bilinmesine rağmen hemiselülozların selülozdan daha heterojen olduğu hakkında verilere ulaşılmıştır. (Yoon vd., 2005).

Hemiselüloz yapısında ksilan, mannan, galaktan ve arabinan bulunduran bir heteropolimerdir. Hemiselülozların birçoğunda temel monomer olarak D-mannoz, D-galaktoz, D-ksiloz ve L-arabinoz bulunmaktadır (Bestawde, 1992).

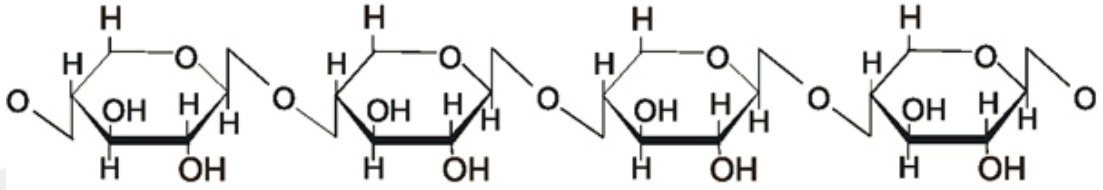
Ksilan ise yüksek bitkilerin hücre duvarında bulunan hemiselülozik yapının temel bileşenlerinden biri olup, kullanılma olasılığı baz alındığında doğada en fazla bulunan ikinci kaynaktır (Christov vd., 1996; Gessesse ve Gashe 1997). β -1,4-bağlarıyla bağlanmış D-xylopyranose yapılarından oluşan bir düz zincir ve arabinozil, glukonozil ve asetil taşıyan yan bağlardan oluşmuştur (Heck vd., 2002).

Ksilanlar eser miktarda L-arabinozdan ve monomer yapı olarak başlıca D-ksilozdan oluşan heteropolimerlerdir (Bastawde, 1992). Selüloz ile non-kovalent etkileşimde ve lignin ile kovalent bağlı ksilan tabakası, selüloz bütünlüğünün korunmasında ve liflerinin selülaz aşındırmasına karşı korunmasında önemli olabilir (Beg vd., 2001).

Kullanılmayan selülozik materyalin içerdiği hemiselüloz yaklaşık %40 oranında pentoz şekerinden oluşmuştur. Hemiselüloz odunsu bitkilerde hücre çeper bileşeni olarak, tohumlarda ise depo polimeri olarak bulunmaktadır (Magge ve Kosaric, 1995).

Günümüzde antibiyotikler, alkoller, hayvan yemleri, kimyasal ürünler ve biyoyakıt üretiminde kullanılmakta olan hemiselüloz monomerleri çeşitli bitkisel materyallerden elde edilmektedir (Heck vd., 2002).

Ksilan ana iskeletinde β -1,4-glikozidik bağlarla bağlanmış ksiloz barındıran kompleks bir polisakkarittir (Şekil 1.1). Ksilan β -ksilopiranoz rezidülerinden oluşmuş bir temel zincirdir (Whistler ve Richards, 1970).



Şekil 1.1. Ksilanın diyagramatik yapısı [1]

Ksilan, karasal bitkilerdeki toplam kuru ağırlığın %30-35'ni oluşturur. Ayrıca ksilan hücre duvarında en çok bulunan hemiselülozik polisakkaritlerdendir (Joseleau vd., 1992).

Ksilan, gimnospermlerin yumuşak odunlarında daha az miktarda bulunur. Bunun yanı sıra angiospermlerin sert odunlarında temel hemiselülozdur ve toplam kuru ağırlığın sırasıyla yaklaşık %7-12'sini ve %15-30'unu oluşturur (Whistler ve Richards, 1970; Wong vd., 1988).

Selülozdan sonra en bol bulunan hemiselüloz bileşikleri ksilanlardır (Collins vd., 2005). Ksilanlar daha çok hücre duvarında ve bitki hücrelerinin orta lamellerinde bulunur.

Birçok ksilan ana iskeleti oluşturan zincir ile buna bağlanmış farklı yapıları içeren yan zincirlerden meydana gelmiştir. Ksilan yapısında ortak olan bileşenler glukurozil, asetil ve arabinozil birimleridir. Sadece ksilozil birimlerinden meydana gelmiş homoksilozlar doğada hasırotu, tütün sapı ve tohum kabuğunda bulunmuştur (Beg vd., 2001).

Ksilitol ve furfural ksilanın hidroliz ürünleri arasında önemli bir yer tutmaktadır. Furfural başlıca tarımsal atıklardan elde edilirken, ksilitol odun atıklarından elde edilmektedir. Gıda endüstrisinde yoğunlaştırıcı ve dondurulmuş gıdalarda katkı maddesi olarak ksilanın diğer hidroliz ürünlerinden ksiloz ve oligosakkaritler kullanım alanı bulmuştur (Wong ve Saddler, 1992).

Ksilanolitik enzim sistemi, ksilanı hidroliz eden enzimlerin tamamına verilen bir isimdir. β -1,4-Endoksilanaz, β -ksilozidaz, α -L-araninofuranozidaz, α -glukuronidaz, asetilksilanesteraz ve fenolik asit (ferulik ve p-kumarik asit) esteraz ksilanolitik enzim sisteminde yer almaktadır. Endo-1,4,- β -ksilanaz (1,4- β -D-xylanxylanohydrolase, EC. 3.2.1.8) endoksilanaz enzimi, ksilan omurgasını rastgele hidrolize ederek polimer yapısının bozulmasını sağlar (Şekil 1.2).

Günümüzde giderek büyük bir önem kazanan ksilanazların, bitki hücre duvarında bulunan hemiselüloz yapısını parçaladığı; ot yiyen hayvanların ve bazı bitki patojenlerinin bitkileri parçalamak için ksilanaz ürettikleri saptanmıştır. Pek çok bakteri ve küf mantarının, ortamda son ürün olarak serbest ksiloz oluşturan hücre dışı ksilanazlar üreterek hemiselüloz-ksilan içeren ortamlarda heterotrofik olarak geliştikleri anlaşılmıştır (Kulkarni vd.,1999).

1.4. Ksilanazlar

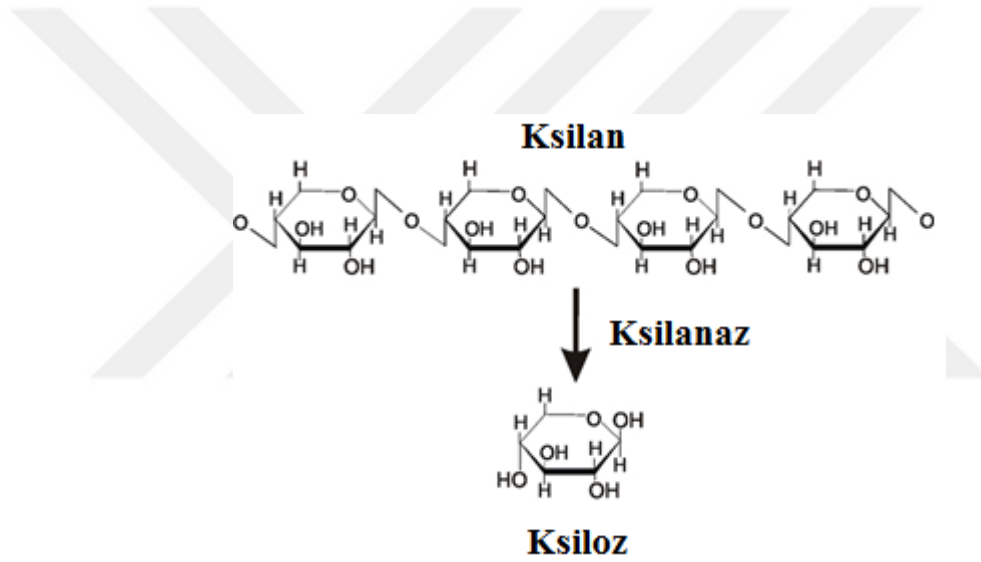
Ksilanı parçalayabilmek için pek çok mantar ve bakteri suşu ksilanaz enzimi üretmektedirler (Gessesse ve Gashe, 1997). Son yıllarda araştırmacılar ksilan ve ksilanaz enzimlerinin endüstriyel uygulamalarına daha fazla ilgi göstermektedirler. Kâğıt hamuru hazırlama ve kâğıt endüstrileri ile gıda ve hayvan yemi üretimi enzimin kullanım alanlarının en fazla olduğu alanlara örnek olarak verilebilir (Kulkarni vd., 1999; Gözükar, 2009).

Yirminci yüzyılın son çeyreğinde enzimlerin endüstriyel uygulama potansiyellerinin artmasıyla birlikte mikroorganizmaların metabolik ürünleri ve mikroorganizmaların kullanımını hızlı bir artış göstermiştir. Ksilanaz enzimlerinin ticari alandaki kullanımı

ise özellikle son 20 yılda kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde yaygınlaşmıştır (Beg vd., 2001).

Mikroorganizma ve bunlara ait enzimlerin ksilanı parçalama mekanizmaları tamamen anlaşılmış olmamasına rağmen mikrobiyal ksilanolitik sistemlerle ilgili bilgiler giderek artmış ve bu yöndeki çalışmalar hız kazanmıştır.

Yapılan çalışmalar daha çok enzim üretiminin indüklenebilirliği, enzimin değişik koşullardaki üretimi, enzim karakterizasyonu, saflaştırma, enzim ekspresyonun artırılması ve klonlama çalışmaları ile çeşitli endüstrilerde kullanımı gibi konularda yoğunlaşmıştır (Beg vd., 2001).



Şekil 1.2. Ksilanaz enziminin ksilan yapıları üzerine etkisi (Enzymeindia, Xylanase, 2007)

Ksilanaz enzimlerinin bakteriler (Gilbert ve Hazlewod, 1993), mantarlar (Sunna ve Antranikian, 1997), aktinomisetler (Ball ve McCarthy, 198) ve maya gibi (Hrmova vd., 1984) mikroorganizmalarca üretildikleri rapor edilmiştir.

Ksilanaz üreten mikroorganizmalar bazı özelliklerine göre Çizelge 1.2'de gruplandırılmıştır (Köksal 1998).

Çizelge 1.2. Ksilanaz üreten mikroorganizma grupları

Mikroorganizma Grubu	Örnek mikroorganizma
Bakteriler	<i>Bacillus</i> sp. <i>Cellulomonas fimi</i> , <i>Micrococcus</i> sp. AR-135, <i>Staphylococcus</i> sp. SG-1, <i>Thermotoga maritima</i> MSB8
Küf mantarları	<i>Aspergillus niger</i> ve <i>Aspergillus nidulans</i> gibi <i>Aspergilli</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i>
Funguslar	<i>Trichoderma</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Thermomyces</i>
Aktinomisetler	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Thermomonospora curvata</i>

Ksilanazların ticari üretiminde en fazla kullanılan suşları *Bacillus subtilis*, *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aureobasidium pullulans* ve *Streptomyces lividans*'dir (Beg vd., 2001).

1.5. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları

Mikroorganizmalardan elde edilen ksilanolitik enzimlerin büyük bir ilgi odağı olmasının sebebi biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı birçok endüstriyel işlemden tercih edilmesidir. Bilhassa gıda ve hayvan yemi endüstrisi başta olmak üzere kâğıt ve kâğıt hamuru gibi alanlarda temel endüstriyel enzim olma yolunda ilerleme kaydetmiştir.

Ksilanazların kullanımı sadece hayvan yemlerinin sindirimini iyileştirilmesi ile sınırlı olmayıp, aynı zamanda ligno-selülozik materyallerin dönüşümü, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, tarımsal atıkların fermentatif ürünlere parçalanması, biranın kıvamının gelişimi, meyve sularının berraklaştırılması alanlarında da önemli bir yere sahiptir. Diğer taraftan ksilanaz enzimleri kahvenin ekstraksiyonunda, bitki yağları ve nişasta üretiminde (Wong ve Saddler, 1992), hamur kıvamı ve hamur ürünlerin kalitesini arttırmak için (Maat vd, 1992), pektinaz ve selülaz ile birlikte meyve sularının berraklaştırılmasında (Biely, 1985) kullanıldığı belirtilmiştir.

1.6. Tezin Amacı

Bu çalışmada, endüstriyel uygulamalarda kullanılacak ksilanaz enzim üreticisi *Bacillus* sp. bakterisinin izolasyonu, tanımlanması, enzimin izolasyonu ve kısmi karakterizasyonu amaçlanmıştır.

1.7. Tezin Kapsamı

Tezin kapsamı aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi kampüs alanından toprak numunelerinin alınması,
2. Alınan toprak numunelerinin pastörize edildikten sonra, içerdiği aerobik bakteri sporlarının çimlendirilmesi,
3. Ksilanaz aktivitesine sahip izolatların belirlenmesi,
4. İleri analiz için seçilen izolata ait ksilanaz enziminin DNS yöntemi ile bazı enzimatik özelliklerinin (optimum pH, optimum sıcaklık, sıcaklık direnci, pH direnci, zamana göre enzim aktivitesi, bazı kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi) belirlenmesi,
5. SDS-PAGE ve zimogram analizleri ile ksilanaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi,
6. Ksilanolitik izolatın rDNA sekansının belirlenmesi ve BLAST analizi ile filogenetik ağacın oluşturulması.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Lowe vd. (1987a), ksilanaz üretiminin en çok ksilan bulunan besi ortamında artış gösterdiğini, buna karşılık selüloz, sellobiyoz, buğday samanı, glukoz ve ksiloz bulunan ortamda gelişmiş anaerobik funguslar tarafından da üretildiğini bildirmişlerdir.

Lowe vd. (1987b) ksilanın parçalanarak; ksiloz, ksilobioz ve ksilo-oligosakkaritlerin oluşması süresine dek ksilanaz ve ksilobiaz enzimlerinin her ikisinin de görev aldığını bildirmişlerdir.

Mountfort ve Asher (1989), çalıştıkları ksilanaz enziminin esasen ekstraselüler ya da kısmen hücre bağlantılı olarak salgılandığını, enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 50 °C ve 5.5–6.0 olduğunu bildirmişlerdir.

Garcia-Campayo ve Wood (1993), bir fungus olan *Neocallimastix frontalis*'ten B-D-ksilosidazı saflaştırmışlardır. Araştırmacılar izole ettikleri enzimin optimum pH'nın 6.4, optimum sıcaklığını 37 °C olduğunu, enzim ksilobioz ve ksilo-oligosakkaritler üzerinde tipik bir ekzo-aktiviteye sahip olduğunu, D-ksiloz varlığında aktivitesinin ciddi miktarda azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimin 83 ve 53 kDa olan 2 polipeptit alt ünitelerden meydana geldiğini, aktivitesinin Cu^{2+} , Ag^{2+} , Zn^{2+} , EDTA ve SDS tarafından yavaşlatıldığını buna karşılık Ca^{2+} , Mg^{2+} varlığında aktivitenin uyarıldığını da bildirmişlerdir.

Blanco vd. (1995), alkali-tolerant *Bacillus* sp. BP23'den ürettikleri ksilanaz enziminin optimum aktivitesini 50 °C ile 5.5 pH değerinde gösterdiğini, moleküler ağırlığının ise 32 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Yang vd. (1995), kâğıt hamurundan izole ettikleri alkalifilik *Bacillus* sp. tarafından üretilen alkali ksilanazın optimum aktivite için pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 8.5 ve 55 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Archana ve Satyanarayana (1997), katı faz fermentasyon tekniği ile termofilik *B. licheniformis* A99 bakterisinden ksilanaz enziminin üretimini gerçekleştirmişlerdir. Araştırcılar enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerlerinin 45 ve 50 °C, pH değerinin ise 6.0-7.0 olduğunu bildirmişlerdir.

Lopez vd. (1998), alkali tolerant *Bacillus*'tan saflaştırdıkları ksilanaz enziminin 45 °C'de 5 saatlik inkübasyon sonunda orijinal aktivitesini %72 oranında koruduğunu, hidroliz sonucunda son ürün olarak ksiloz yerine ana ürün olarak ksilotrioz ve ksilotetroz üretildiğini bildirmişlerdir.

Duarte vd. (1999), 500 adet mikroorganizma izole ettiklerini, bunlardan 22 tanesinin ksilanaz enzimi ürettiğini bildirmişlerdir. Araştırcılar ksilanolitik bakteriler içinden alkali olan ksilanazları belirlemişler, ayrıca enzimlerin üzerine NaCl'ün etkisini de araştırmışlardır.

Dhillon vd. (2000), *Bacillus circulans* AB16 suşundan selüloz aktivitesi zayıf olan termo-tolerant ve alkali-tolerant ksilanaz enzimlerinin üretimini ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırcılar moleküler ağırlıkları farklı olan enzimleri, ksilanaz A ve ksilanaz B olarak adlandırmışlardır. Araştırcılar ksilanaz A ve ksilanaz B'nin moleküler ağırlıklarını sırasıyla 30 ve 22 kDa, optimum sıcaklık değerlerini 75-80 °C ve 65-70 °C, son olarak optimum pH değerlerini her ikisi için de 6.0 olarak bildirmişlerdir.

Sa-Pereira vd. (2002a), termostabil ksilanaz enzimi üreten *B. subtilis* bakterisini sıcak su kaynaklarından izole etmişlerdir. Araştırcılar enzim üretimini pH 6.0'da 50 °C'de 18 saat ve 55 °C'de 11 saatlik fermentasyon işlemleri uygulayarak karşılaştırmışlardır.

Tseng vd. (2002), Alkalifilik *Bacillus firmus* suşundan selüloz aktivitesi olmayan iki farklı ksilanazı izole etmişlerdir. Moleküler ağırlıkları 45 ve 23 kDa olan enzimlerin optimum aktivitelerini pH 5.0-11.0'da ve 37 °C'de gösterdiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırcılar enzim aktivitesi sonucu oluşan son ürünlerin ksiloheksoz, ksiloz ve ksilotrioz olduğunu da belirtmişlerdir.

Saha (2002), *Fusarium proliferatum* suşundan ksilanaz enzimini saflaştırıp özelliklerini belirlemiştir. Araştırmacı enzimin moleküler ağırlığın 22.4 kDa, optimum sıcaklığını 55 °C, optimum pH'sını ise 5.0-5.5 olarak bildirmiştir.

Wejse vd. (2003), halofilik bir bakteri tarafından üretilen iki ekstrem halotolerant ksilanaz enziminin karakterizasyonunu yapmışlardır. Araştırmacılar moleküler ağırlığı 43 ve 62 kDa olan iki alt birimden meydana gelmiş ksilanaz-1'in optimum aktivitesini pH 6.0 ve 60 °C'de, ksilanaz-2'nin ise 65 °C ve 4 M NaCl'de gösterdiğini bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar enzimlerin yarılanma ömürlerini 60 °C'de sırasıyla 97 ve 192 dakikada olarak belirtmişlerdir.

Cardoso ve Filho (2003), *Acrophialophora nainiana*'dan ksilanaz izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar β -ksilanaz enziminin 55 °C'de ve pH 6.5' de optimum aktivite gösterdiğini, moleküler ağırlığının ise 54 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Ryan vd. (2003), *Penicillium capsulatum*'dan düşük molekül ağırlığına sahip endoksilanaz enzimini üretmişlerdir. Enzimin aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık optimumu 3.8 ve 48 °C, yarılanma ömrü ise 50 °C'de 25 saat olarak bildirilmiştir.

Wainø ve Ingvorsen (2003), ekstrem halofilik arkeon *Halorhabdus utahensis*'den β -ksilosidaz ve β -ksilanaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Her iki enzimin de %0-30 NaCl konsantrasyonu aralığında aktivite gösterdiğini ve kısmen de olsa termofilik bir karaktere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar β -ksilanaz enziminin 55 °C ve 70 °C olarak iki optimum aktivite sıcaklığına sahip olduğunu, β -ksilosidazın ise 65 °C optimum aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Lama vd. (2004), termofilik *Bacillus thermantarcticus*'dan termostabil ksilanaz ve β -ksilosidaz enzimlerini izole etmişlerdir. Araştırmacılar ksilanaz için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 5.6 ve 80 °C, β -ksilosidaz için ise optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 6.0 ve 70 °C olduğunu bildirmişlerdir.

Kumar vd. (2004), alkalifilik *Bacillus* sp. NCL'den ürettikleri alkali ksilanazı ticari ksilanazlar ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar değerlendirdikleri 4 ksilanaz arasında alkalifilik *Bacillus* sp.'den izole edilen enzimin, ticari deterjanlar için en uygun enzim olabileceğini bildirmişlerdir.

Gallardo vd.(2004), *Bacillus* sp. BP7'den ksilanazı kodlayan genin izolasyonunu yaparak *E.coli*'de klonlamışlardır. Araştırmacılar genin ekspresyonu sonucunda elde edilen enzimin moleküler ağırlığının 24 kDa olduğunu ve maksimum aktivitesini pH 6.0 ve 60 °C'de gösterdiğini bildirmişlerdir.

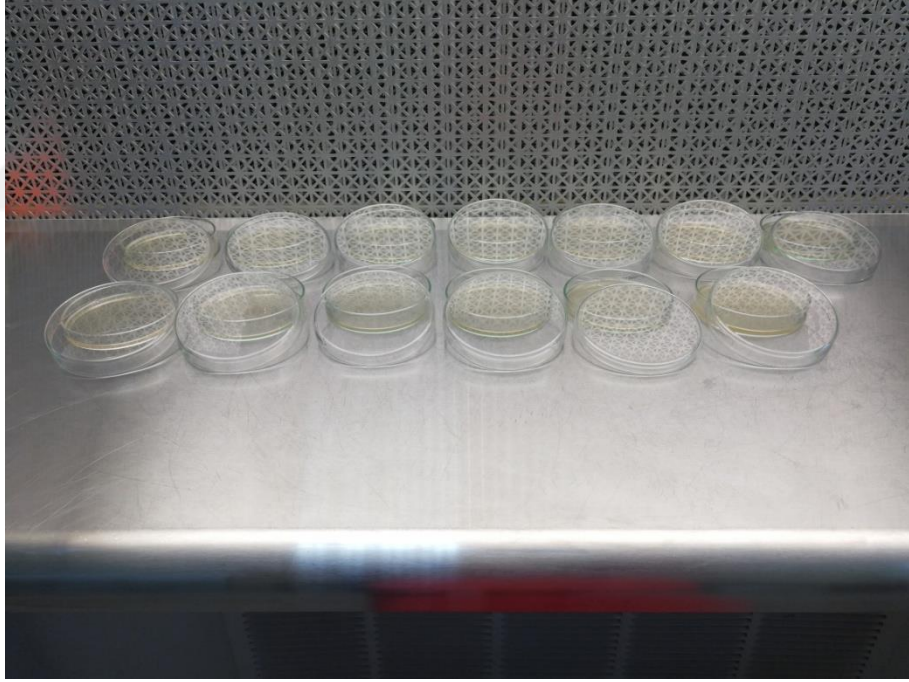
Avcioğlu vd. (2005), topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. suşlarınca üretilen ksilanaz enzimlerinin karakterizasyonunu yapmışlardır. Tarımsal atık ürünler üzerinde *Bacillus* sp. izolatlarını üreterek ksilanaz sentezini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar moleküler ağırlıkları 22, 23 ve 40 kDa olan üç endoksilanazın optimum aktivitesini 70 °C ve pH 6.5'de gösterdiğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri ve Besiyerleri

Çalışmada kullanılan *Bacillus* sp. XbO bakterisi bu çalışma kapsamında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi kampüs sınırları içerisinde alınan toprak numunesinden izole edilmiştir. İzolatın üretimi, LB Broth (%10 w/v tripton, %5 w/v maya özütü, %10 w/v NaCl, pH 7.5) ve LB-Agar (LB Broth'a pH ayarlandıktan sonra %1.5 w/v agar ilave edilmiştir, Şekil 3.1) besiyerleri kullanılarak 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Ksilanaz aktivitesinin belirlenmesinde LB-Agar besiyerine son konsantrasyonu %0.1 w/v olacak şekilde ksilan ilave edilmiştir.



Şekil 3.1. LB-Agar besiyerlerinin petri kaplarında hazırlanması

3.1.2. Aletler

Çalışma Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda yürütülmüştür (Şekil 3.2). Çalışmada kullanılan aletlerden santrifüj (Hettich), inkübatörler (Nüve ve Memmert), su banyosu (Memmert), otoklav (Hirayama), spektrofotometre (Pharmacia), vorteks ve manyetik karıştırıcı (Ika), steril kabin (Nuair), hassas terazi (Denver), pH metre (Hanna), otomatik pipetler (Brand ve Axygen), çalkalayıcı (Ika), protein jel elektroforez takımı ve güç kaynağı (Atto), no-frost buzdolabı (Arçelik) çalışmanın yürütüldüğü Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır.



Şekil 3.2. Çalışmanın yürütüldüğü OKÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı

3.2. Metot

3.2.1. *Bacillus* sp. XbO Bakterisinin İzolasyonu

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi kampüsü sınırları içerisindeki farklı alanlardan toprak örnekleri alınmıştır. Herbir örnekten 1'er g tartılarak alınmış ve 5'er ml steril distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Numuneler 85 °C'de 10 dakika inkübe edilerek (Şekil 3.3) vejetatif bakterilerin ölmesi sağlanmıştır (Lenette vd., 1985). Sıcaklık uygulamasından sonra numunelerden 500'er µl alınarak 25 ml hacimli LB besiyerlerine ilave edilmiş, sonrasında ise sporların çimlenmesi amacıyla 37 °C'de 12 saat süreyle orta çalkalama hızında inkübasyona bırakılmışlardır.

Ertesi gün, üremiş olan bakteri kültürlerinden seri sulandırmalar yapılmış ve 10^{-3} - 10^{-6} arasındaki örneklerden 100'er µl alınarak LB agar besiyerlerine steril cam çubukla yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Plaklar ters çevrilerek 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, plaklardan farklı morfolojik görünüme sahip 37 adet koloni seçilmiş ve numaralandırılmıştır. Bu koloniler, ksilanaz aktiviteleri belirlenmek üzere steril kürdanlarla LB-Ksilan-Agar besiyerine taşınmış ve koloni oluşturmak üzere tekrar ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmışlardır.



Şekil 3.3. Toprak numunelerinin 85 °C'ye ayarlanmış su banyosunda pastörizasyonu

3.2.2. Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Koloni gelişimleri tamamlanmış olan LB-Ksilan-Agar plaklarının üzerine Kongo kırmızısı (%0.1 w/v) boyası dökülmüş ve oda sıcaklığında 15 dk süreyle beklenmiştir. Süre sonunda plaktan boya uzaklaştırılmış, bu sefer üzerine NaCl (1 M) dökülerek 15 dk daha beklenmiştir (Şekil 3.4). Süre sonunda, kırmızıya boyanmış zeminde etrafında sarımtırak zon bulunan bakteriler ksilanaz pozitif bakteriler olarak belirlenmiştir. Ksilanaz pozitif bakterilerden zon çapları dikkate alınarak 24 numaralı koloni (*Bacillus* sp. XbO) ileri çalışmalar için belirlenmiş ve bu bakterinin master ve gliserol (%15 v/v) stokları hazırlanmıştır. Master stoklar +4 °C’de muhafaza edilirken, gliserol stoklar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. LB-Ksilan-Agar besiyerinde gelişen izolatlarda Kongo kırmızısı boyaması sonucu ksilanaz aktivite tayini

3.2.3. Filogenetik Analizler

İzolata ait 16S rDNA sekans analizi hizmet alımı yoluyla RefGen Biyoteknoloji Ltd. Şti'ne (Gölbaşı-Ankara) yaptırılmıştır. BLAST analizi “ncbi.nlm.nih.gov” veritabanı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4. Ksilanaza Ait Bazı Enzimatik Özelliklerin Belirlenmesi

Bacillus sp. XbO bakterisi 100 mL hacimli LB sıvı besiyerinde 24 saat süreyle üretildikten sonra 4950 devir/dk hızında 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücresiz fakat ekstraselüler enzimleri içeren süpernatant kısım temiz bir kaba konduktan sonra buz üzerine alınmış ve kullanım boyunca bu şekilde muhafaza edilmiştir.

3.2.4.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi

Enzimin optimum pH değerinin belirlenmesinde öncelikle 100 mM Na-asetat (pH 5.0-6.0), 100 mM Na-fosfat (pH 6.0-7.0) ve 100 mM tris (pH 7.0-12.0) tamponları hazırlanmıştır. Sonrasında ise her bir pH değeri için ayrı olacak şekilde aşağıda verilen deney düzenekleri kurulmuştur:

Kontrol	: 1 ml tampon (1 tüp)
Enzim kontrol	: 0.5 ml bakteri süpernatantı + 0.5 ml tampon (4 tüp)
Substrat kontrol	: 1.0 ml tampon + 0.01 gr ksilan (4 tüp)
Enzim + Substrat	: 0.5 ml bakteri süpernatantı + 0.5 ml tampon + 0.01 gr ksilan (5 tüp)

Son olarak, hazırlanan deney tüpleri 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edilmişler (Şekil 3.5), süre sonunda her bir tüpe 1.5 ml DNS solüsyonu (10 g dinitro salisilik asit, 2 g fenol, 0.5 g NaSO₃, 200 g sodyum-potasyum tartarat, 500 ml %2'lik NaOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır) eklendikten sonra 5 dk süreyle kaynar suda bekletilmiştir. Tüpler

soğuduktan sonra spektrofotometre ile 540_{nm} daga boyunda köre karşı (kontrol grubu) absorbans değerleri kaydedilmiştir.

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif enzim aktiviteleri belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Enzim analizleri için hazırlanmış karışımları içeren deney tüplerinin su banyosunda inkübasyonu

3.2.4.2. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin belirlenmesi amacı ile 30-100 °C sıcaklık değerleri arasında ki her 10 °C'de ayrı ayrı olacak şekilde, numaralandırılmış deney tüplerinde aşağıda verilen reaksiyonlar kurulmuştur:

Kontrol	: 1 ml Na-fosfat tampon (50 mM, pH 6.5) (1 tüp)
Enzim kontrol	: 0.5 ml bakteri süpernatantı + 0.5 ml Na-fosfat tampon (50 mM pH 6.5) (4 tüp)
Substrat kontrol	: 1 ml Na-fosfat tampon (50 mM, pH 6.5) + 0.01 gr ksilan (4 tüp)
Enzim + Substrat	: 0.5 ml süpernatant + 0.5 ml Na-fosfat tampon (50 mM, pH 6.5) + 0.01 gr ksilan (5 tüp)

Her bir sıcaklık değeri için ayrı hazırlanan deney tüpleri kendi sıcaklık değerlerine ayarlanmış su banyosunda 30 dakika inkübe edildikten sonra 1.5 ml DNS eklenmiş ve 5 dk süreyle kaynar suda bekletilmiştir. Tüpler soğuduktan sonra spektrofotometre ile 540_{nm} daga boyunda köre karşı (kontrol grubu) absorbans değerleri kaydedilmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği sıcaklık değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.4.3. Enzimin Termal (Sıcaklık) Stabilitesinin Belirlenmesi

Enzime ait termal (sıcaklık) stabilite değerlerinin belirlenmesi için öncelikle bakteri süpernatantı yeterli hacimlere sahip 8 ayrı parçaya bölünmüş, sonra herbir parça kendisi için belirlenmiş olan 30-100 °C aralığındaki sıcaklık değerlerinde 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön inkübasyon uygulamasından sonra herbir örnek için aşağıda verilen deney düzeneği hazırlanmıştır.

Kontrol	: 1 ml Na-fosfat tampon (50 mM, pH 6.5) (1 tüp)
Enzim kontrol	: 0.5 ml bakteri süpernatantı + 0.5 ml Na-fosfat tampon (50 mM pH 6.5) (4 tüp)
Substrat kontrol	: 1 ml Na-fosfat tampon (50 mM, pH 6.5) + 0.01 gr ksilan (4 tüp)
Enzim + Substrat	: 0.5 ml süpernatant + 0.5 ml Na-fosfat tampon (50 mM, pH 6.5) + 0.01 gr ksilan (5 tüp)

Hazırlanan reaksiyonlar optimum sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 1.5 ml DNS çözeltisi eklenmiş, 5 dakikalık kaynatmanın ardından soğumaya bırakılmıştır. Son olarak numunelerin 540_{nm} dalga boyunda spektrofotometre ile ölçümleri yapılarak kalan enzim aktiviteleri belirlenmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği ön inkübasyon sıcaklık değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.4.4. Enzimin pH Stabilitesinin Belirlenmesi

Enzime ait pH stabilite değerlerinin belirlenmesinde bakteri süpernatantı yeterli hacimlere sahip 7 ayrı parçaya bölünmüş, sonra her bir parça kendisi için belirlenmiş olan pH değerinde tampon çözeltilerle birlikte 15 dk süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Tampon çözelti olarak pH 7.0-8.0 için 100 mM Na fosfat tamponu, pH 9.0-13.0 için 100 mM Tris tamponu kullanılmıştır.

Hazırlanan reaksiyonlar optimum sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 1.5 ml DNS çözeltisi eklenmiş, 5 dakikalık kaynatmanın ardından soğumaya bırakılmıştır. Son olarak numunelerin 540_{nm} dalga boyunda spektrofotometre ile ölçümleri yapılarak kalan enzim aktiviteleri belirlenmiştir. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği ön inkübasyon pH değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

3.2.4.5. Enzimin Zamana Göre Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

Bacillus sp. XbO izolatı 50 ml hacimli LB sıvı besiyerinde 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bakteri kültüründen her 12 saatte bir (12, 24, 36, 48, 60, 72) steril koşullarda 4 ml çekilerek alınmış ve 4950 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilerek hücresiz süpernatant elde edilmiştir. Herbir süpernatant daha önce belirtildiği şekilde ksilan ile reaksiyona sokularak en yüksek enzim aktivitesine sahip zaman aralığı relatif (%) olarak belirlenmiştir.

3.2.4.6. Bazı Kimyasal Maddelerin Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

24 saat süreyle LB sıvı besiyerinde üremiş olan bakteri kültürü santrifüjle çöktürülmüş ve hücre dışı sıvı kısım elde edilmiştir. Süpernatant kısım 10 parçaya ayrılmış ve 1 tanesi hariç diğerlerine son konsantrasyonları 5'er mM olacak şekilde CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂, CoCl₂, FeCl₃, CuCl₂, MnCl₂, HgCl₂ ve EDTA ayrı ayrı ilave edilmiştir (her bir örneğe sadece bir kimyasal eklenmiştir). Diğer 1 örneğe ise hiçbir

kimyasal madde ilave edilmemiştir (kontrol). Enzim ve kimyasal karışımları optimum sıcaklık değerine ayarlanmış su banyosunda 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön inkübasyon sonrası enzim ve kimyasal madde karışımları kullanılarak ksilan ile optimum sıcaklık koşullarında 30 dk süreyle reaksiyona sokulmuşlardır. Karışımların DNS ilavesi ve kaynatma işleminden sonra spektrofotometrede 540_{nm} dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır. Hiçbir kimyasal madde ilave edilmeyen örnek kontrol olarak kullanılmış ve kimyasal maddelerin enzim üzerine etkisi relatif (%) olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Enzimin Moleküler Ağırlığının Belirlenmesi

Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE Laemmli (1970) ve zimogram analizi Saul vd. (1990)'a göre yapılmıştır. Zimogram analizi için SDS-PAGE'ye 3 ml ksilan solüsyonu (%2 w/v) ilave edilmiştir.

3.2.5.1. Protein Örneklerinin Hazırlanması

Bacillus sp. XbO izolatu 50 ml hacimli LB besiyerine ekilmiş ve 37 °C'de 48 saat süreyle orta çalkalama hızında üretilmiştir. Süre sonunda bakteriler 4950 devir/dk hızında çöktürülerek süpernatant kısım elde edilmiştir. Bakteri süpernatantı 1:1 oranında TCA (%20 w/v) ile karıştırılmış ve oda sıcaklığında ertesi güne kadar bekletilmiştir. Ertesi gün örnekler 4950 devir/dk hızında santrifüj edilerek denatüre proteinler pelet haline getirilmiştir. Sıvı kısım döküldükten sonra protein peleti 30 dk süreyle kurutulmuş ve sonrasında 100 µl hacimde tris solüsyonu (1 M, pH 8.0) ile çözülmüştür. Örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5.2. Protein Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Protein yükleme tamponu ile 2:1 oranında (2 birim protein örneği, 1 birim tampon) karıştırılmış olan protein örnekleri yüklemeye önce 3 dakika kaynatılarak tam bir denatürasyon sağlanmıştır. Polimerize olmuş jeldeki (% 12'lik jel) tarak, oluşan örnek yükleme gözleri yırtılmadan çıkarılmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tanka, örnek yükleme kuyuları da içinde kalacak şekilde elektrod solüsyonu (0.05 M

Glisin, 0.05 M Tris-baz, %0.1 w/v SDS) konmuştur. İlk kuyuya protein markırı olmak üzere örnekler markırın yanından başlayarak diğer kuyulara 50'şer µl olacak şekilde konulmuştur. Tüm örneklerden jele her iki yandan başlayarak (palindrom) biri SDS-PAGE'de karşılaştırmak, diğeri ise zimogram analizinde kullanılmak üzere ikişer adet yüklenmiştir. Örnekte bulunan izleme boyası ayırma jeline geçinceye kadar 60 V ve 25 mA, ayırma jeli süresince ise 80 V ve 40 mA akım uygulanmıştır. İzleme boyası jelin sonuna ulaştığı zaman elektroforez işlemi sonlandırılmıştır.

3.2.5.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizleri

Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve herbir örnekten her iki parçada da kalacak şekilde bir bistüri yardımıyla ortadan ikiye bölünmüştür. Birinci parça jel boyama solüsyonunda (Coomassie mavisi R 250 boyası içeren metanol-asetik asit-su (4:1:5, hacmen)) 1 saat süreyle boyanmış, daha sonra jel bu sefer boya içermeyen aynı solüsyona (destain solüsyonu) alınarak ertesi güne kadar fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Bu süre içerisinde yıkama solüsyonu birkaç kez değiştirilmiştir.

Diğeri jel parçası, denatüre edilmiş olan proteinleri renatüre etmek için, renatürasyon uygulaması yapılmıştır. Bunun için jel önce Solüsyon A (%20 izopropanol +%80 Na-fosfat bafır (50 mM, pH 7.5) içeren bir kaba alınmış ve bu solüsyonda 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra kabtan Solüsyon A uzaklaştırılmış ve yerine Solüsyon B. (Na-fosfat (50 mM, pH 7.5) + 5mM β markaptoetanol + 1mM EDTA) ilave edilmiştir. Jel bu solüsyonda ertesi güne kadar +4 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün Solüsyon B kabtan uzaklaştırılarak yerine Solüsyon C (Na-fosfat bafır (50 mM, pH 7.5) eklenmiş ve jel bu solüsyonda +4 °C'de 1 saat bekletilmiştir. Renatürasyon işleminden sonra jel solüsyondan alınarak streç film ile birkaç kat sarılmış ve 37 °C'de 6 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda jel streç filmden dikkatli bir şekilde ayrılmış ve Kongo kırmızılı solüsyona (%0.2 w/v Congo kırmızısı + %0.02 w/v NaOH) alınarak 1 saat süreyle boyanmıştır. Son olarak jel 1 M NaCl çözeltisine aktarılmış ve 1 saat süre ile fazla boyanın jelden uzaklaşması sağlanmıştır. Sarı zonlar, ksilanaz enziminden sorumlu protein bantlarının bulunduğu bölgeler olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Enzimin Spesifik Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzime ait spesifik aktivite değerleri aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Lowry 1951). Standart olarak stok bovin serum albümin (BSA, 10 mg/ml) değişik konsantrasyonlarda (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg) kullanılmıştır. Protein analizinde kullanılan çözeltiler;

- ▶ Çözelti A: 1.5 g CuSO₄ 5H₂O/100 ml
- ▶ Çözelti B: 3.37 g Na veya K tartarat/100 ml
- ▶ Çözelti C: 2 g NaOH, 10 g Na₂CO₃/500 ml
- ▶ Çözelti D: 1 ml Çözelti A + 1 ml Çözelti B + 100 ml Çözelti C
- ▶ Folin çözeltisi: 1 ml Folin + 1 ml H₂O
- ▶ BSA çözeltisi: 10 mg/ml

1. Bakteri kültürü LB sıvı besiyerinde 24 saat süreyle üretilmiş ve 4950 rpm'de 10 dk süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım (üst faz) temiz bir erlene alınarak buz üzerinde muhafaza edilmiştir.
2. Standart eğrisi için, numaralandırılmış olan birinci grup mikrosantrifüj tüplerine daha önce belirlenen konsantrasyonlarda (0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µL) BSA çözeltisi (standart eğrisini oluşturmak için) eklenmiştir. Aynı şekilde, numaralandırılmış olan diğer grup mikrosantrifüj tüplerine ise 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µl olacak şekilde bakteri süpernatantı eklenmiştir.
3. Her iki grup mikrosantrifüj tüplerine son hacimleri 100 µl'ye tamamlanacak şekilde steril saf su ilave edilmiştir.
4. Herbir mikrosantrifüj tüpüne 1'er ml D çözeltisinden ilave edilmiş ve tüpler seri bir şekilde homojenize edilerek oda sıcaklığında 10 dk beklenmiştir.
5. Mikrosantrifüj tüplerine bu sefer 100'er µl Folin çözeltisi eklenmiş tekrar homojenize edilerek karanlık bir ortamda 30 dk süreyle bekletilmiştir.
6. Süre sonunda, BSA ve bakteri süpernatantı içermeyen başlangıç tüpleri standart (kör) olarak kullanılmış ve örneklerin spektrofotometrede OD₆₆₀ nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır.

7. BSA örneklerinin konsantrasyon değerleri absise (x eksen), bu değerlere ait absorbans değerlerinin ise ordinata (y eksen) yerleştirilmesi ile standart eğri hazırlanmıştır.
8. Konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorbans değerlerinin bu eğriyi kestikleri noktadan x eksenine indirilen bir dik yardımıyla örneklerin konsantrasyon değerleri bulunmuştur.

Protein analizinde her örnek 3 paralel olacak şekilde hazırlanmış ve ortalama değerleri kullanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. Bakterinin İzolasyonu ve Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi kampüs alanı içerisinde alınan toprak örneklerinden *Bacillus* sp. XbO bakterisi izole edilmiştir. Bakteri, LB-Agar-Ksilan besiyerinde Kongo kırmızısı boyaması sonucu ksilanaz aktivitesi göstermiştir (Şekil 4.1). Ksilanaz başta funguslar ve bakteriler olmak üzere doğada birçok organizma tarafından üretilmektedir. *Bacillus cereus* (Roy ve Rowshanul, 2009), *Bacillus* sp. (Hiremath ve Patil, 2011), *B. subtilis* (Guo vd., 2012), *B. licheniformis* (Seo vd., 2013) şu ana kadar çalışılmış ve rapor edilmiş ksilanolitik *Bacillus*'lardan sadece bir kaçıdır.



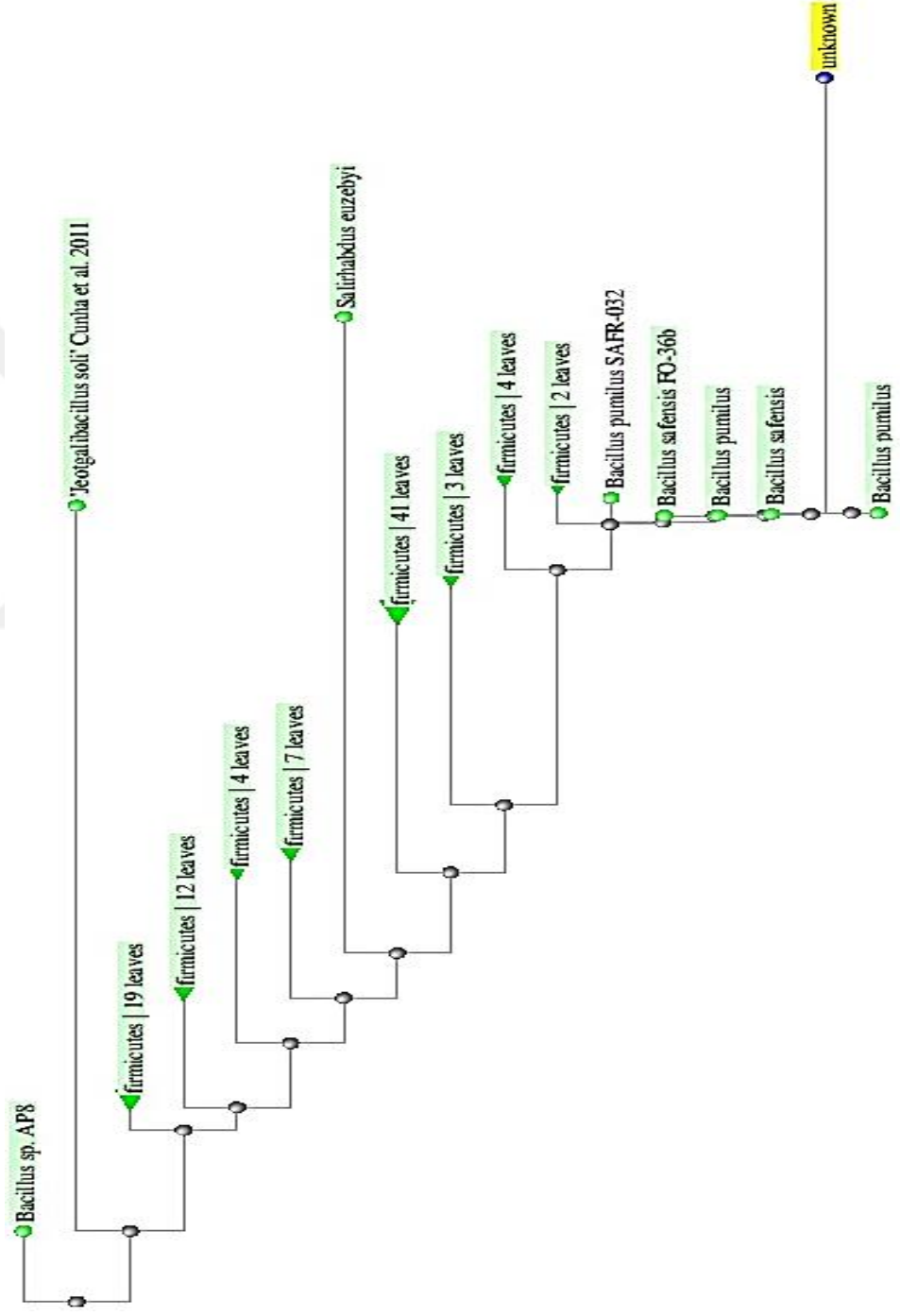
Şekil 4.1. LB-Ksilan-Agar besiyerinde izolatların ksilanaz aktiviteleri

4.1.2. Filogenetik ve BLAST Analizleri

Bacillus sp. XbO bakterisinin 16S rDNA sekansı Çizelge 4.1’de verilmiştir. Filogenetik ve BLAST analizleri *Bacillus* sp. XbO bakterisinin 16S rDNA sekansı ile *Bacillus pumilus* ve *Bacillus safensis* bakterilerinin rDNA sekanslarının %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. XbO bakterisine ait rDNA sekansı

1	TCAACACTTG	TGCGGGCCCC	CGTCAATTCC	TTTGAGTTTC
41	AGTCTTGCGA	CCGTACTCGC	CAGGCGGAGT	GCTTAATGCG
81	TTAGCTGCAG	CACTAAGGGG	CGGAAACAC	CCTAACACTT
121	AGCACTCATA	GTTTACGGCG	TGGAGTGGCA	CGGTATCTAA
161	TCCTGTTCGC	TCTCCACGCT	TTCGCTCCTC	AGCGTCAGTT
201	ACAGAGCAGA	GAGTCGCATT	CGTCCACTGG	TGTTCCCTCCA
241	CATCTCTACG	CAGCATCACC	GCTACACGTG	GAGTTGCACT
281	CTCCTCTTCT	GCACTCAAGT	TTCCCAGTTT	CCAATGACCC
321	TCCCCGGTTG	AGCCGGGGGC	TTTCACATCA	GACTTAAGAA
361	ACCGCCTGCG	AGCCCTTTAC	GCCCCATAAT	TCCGGACAAC
401	GCTTGCCACC	TACGTATTAC	CGCGGCTGCT	GGCACGTAGT
441	TAGCCGTGGC	TTTCTGGTTA	GGTACCGTCA	AGGTGCGAGC
481	AGTTACTCTC	GCACTTGTTT	TTCCCTAACA	ACAGAGCTTT
521	ACGATCCGAA	AACCTTCATC	ACTCACGCGG	CGTTGCTCCG
561	TCAGACTTTC	GTCCATTGCG	GAAGATTCCC	TACTGCTGCC
601	TCCCGTAGGA	GTCTGGGCCG	TGTCTCAGTC	CCAGTGTGGC
641	CGATCACCCCT	CTCAGGTCCG	CTACGCATCG	TCGCCTTGGT
681	GAGCCATTAC	CCCACCAACT	AGCTAATGCG	CCGCGGGTCC
721	ATCTGTAAGT	GACAGCCGAA	ACCGTCTTTC	ATCCTTGAAC
761	CATGCGGTTT	AAGGAACTAT	CCGGTATTAG	CTCCGGTTTC
801	CCGGAGTTAT	CCCAGTCTTA	CAGGCAGGTT	ACCCACGTGT
841	TACTCACCCG	TCCGCCGCTA	ACATCCGGGA	GCAAGCTCCC
881	TTCTGTCCGC	TCGACTTGCA	GTATAGTCTG	CTTACCCTTT
921	TACG			



Şekil 4.2. *Bacillus* sp. XbO bakterisine ait dendrogram analizi

Bakterilerde 5S, 16S ve 23S rDNA gen bölgeleri genomun değişmeyen bölgeleri olup, özellikle 16S bölgesi başta olmak üzere mikroorganizmalar arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadırlar (Woese, 1987; Bottger, 1989; Tortoli, 2003).

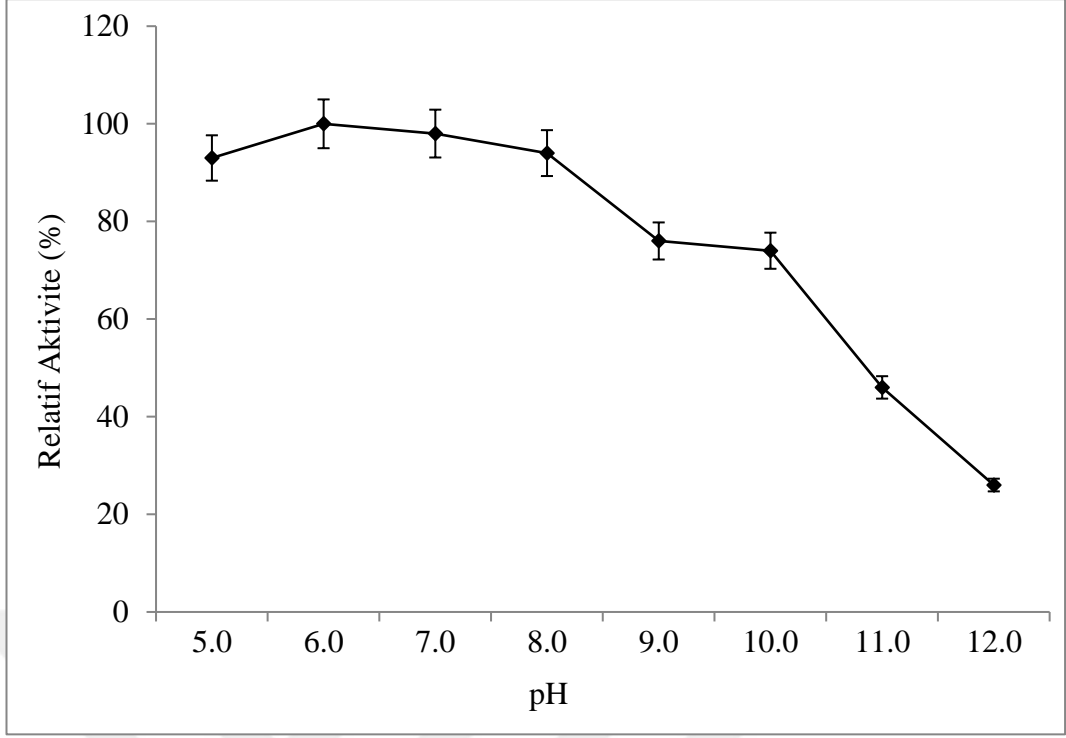
Bakterilerde 16S rDNA genindeki varyasyon tam olarak bilinmemekle birlikte, organizmalar arasındaki bağlantıyı ve evrimsel mesafeyi göstermektedir (Harmsen ve Karch, 2004; Çetinkaya ve Ayhan, 2012). 16S rDNA geninin bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde önemli rol oynamasının bir diğer nedeni, bu genlerde meydana gelen mutasyonların sıklıkla tolere edilebilmeleridir. Bir diğer sebebi ise, tüm bakterilerde ortak olarak bulunması ve böylece tüm bakterileri birbirleriyle karşılaştırabilme imkânı tanınmasıdır (Woese 1987). Bu sebeplerden dolayı, *Bacillus* sp. XbO bakterisinin filogenetik yerinin belirlenmesinde 16S rDNA sekansının kullanılması tercih edilmiştir.

Bacillus sp. XbO bakterisinin 16S rDNA sekansı NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında Blast analizine tabi tutularak diğer yakın mikroorganizmalarla sekans benzerlik düzeyi ortaya çıkarılmış ve buna bağlı olarak da filogenetik dendrogramı oluşturulmuştur (Şekil 4.2).

Blast analizi *Bacillus* sp. XbO bakterisinin 16S rDNA sekansı *B. pumilus* ve *Bacillus safensis* bakterilerinin birçok suşuna ait 16S rDNA sekansları ile %98'lik bir benzerlik göstermiş olup, dendrogramda bu iki bakteri ile birbirlerine yakın pozisyonda yer almışlardır (Şekil 4.2).

4.1.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerinin Belirlenmesi

Bacillus sp. XbO bakterisine ait ksilanaz enziminin optimum pH değeri 6.0 olarak belirlenmekle birlikte, enzim 7.0 pH değerinde de %98 oranında relatif aktivite göstermiştir. Enzimin 5.0-10.0 pH aralığında gösterdiği ortalama oransal aktivite %89 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). Enzim 9.0 ve 10.0 pH değerlerinde sırasıyla %76 ve %74 oranlarında relatif aktivite göstermiştir. Bu veriler enzimin oldukça geniş bir pH aralığında etkin bir aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

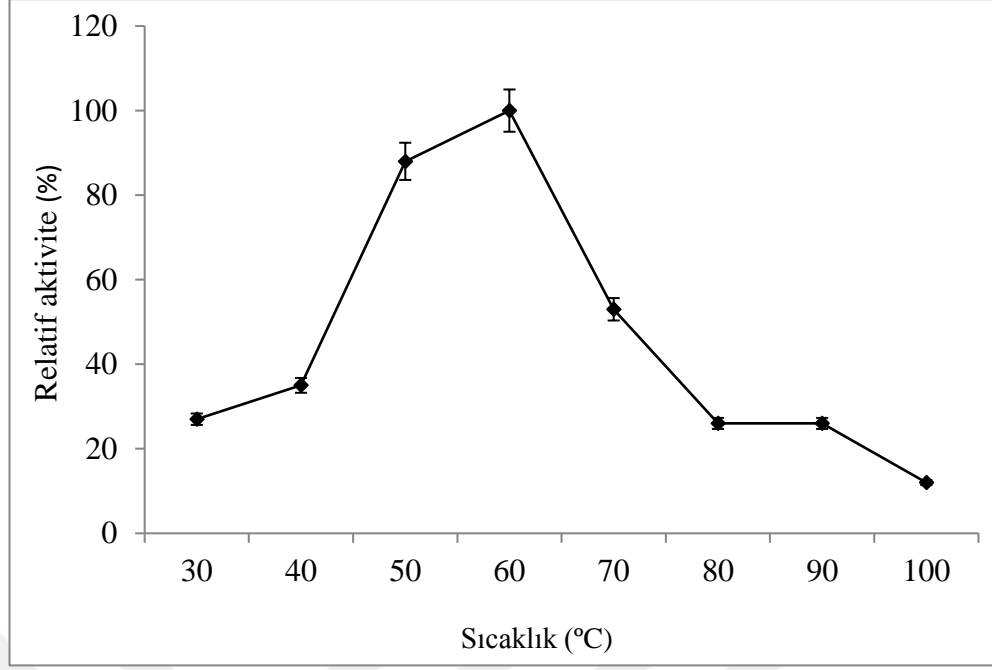


Şekil 4.3. Ksilanaz enzimine ait pH optimum grafiği

pH, enzimi karakterize eden en önemli faktörlerden birisidir. Daha önce farklı pH karakteristiği gösteren ksilanaz enzimleri rapor edilmiştir. Termofilik *Bacillus* sp. tarafından üretilen ksilanaz enziminin optimum pH aralığı 6.5-7.0 olarak rapor edilirken, enzimin pH 7.0'dan sonra aktivitesini hızla kaybettiği bildirilmiştir (Cordeiro vd., 2002). Oysa bir başka termo alkalofilik *Bacillus* tarafından üretilen ksilanaz enziminin *Bacillus* sp. XbO ksilanazı ile benzer şekilde, 6.0-10.0 pH aralığında oldukça yüksek bir aktivite sergilediği bildirilmiştir (Kamble ve Jadhav, 2012). Enzimin geniş bir pH aralığında yüksek aktivite göstermesi, farklı endüstriyel alanlarda ve proseslerde kullanılması açısından bir avantaj teşkil etmektedir.

4.1.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

XbO ksilanazı en yüksek oransal aktivitesini 60 °C'de %100 olarak göstermiştir. Enzim 50 °C'de %88 oransal aktivite gösterirken, 70 °C'de %53 oransal aktivite göstermiştir. Bu sıcaklık değerleri dışında ise enzim aktivitesinde önemli düşüşler gözlenmiştir (Şekil 4.4).

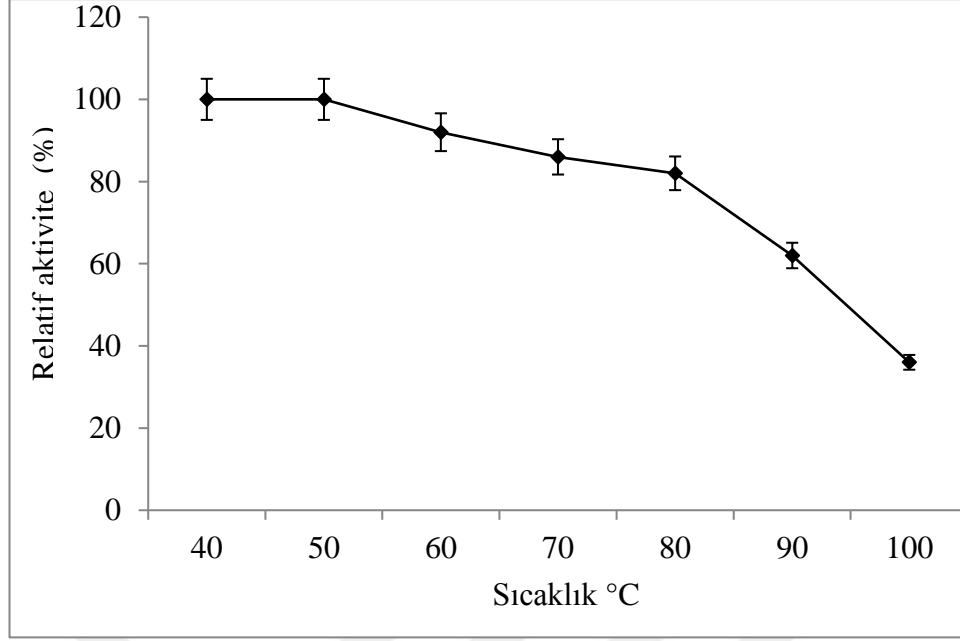


Şekil 4.4. Ksilanaz enzimine ait sıcaklık optimum grafiği

Mikrobiyal enzimlerin yüksek sıcaklık değerlerinde aktivite göstermeleri, enzimlerin ısı işlem uygulanması esnasında kararlı kalacaklarından arzu edilen bir durumdur ve bu sebeple termo-stabil enzimler genellikle mezofil enzimlere göre daima daha cazip olmuşlardır. Mikrobiyal ksilanazlar arasında yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterenler daha önce tanımlanmış ve karakterize edilmişlerdir. Bunlardan 90 °C’de optimum aktivite gösteren termofilik *Bacillus* sp. ksilanazı (Cordeiro vd., 2002), 55-60 °C’lerde optimum aktivite gösteren SY30A, SY190E ve SY185C ksilanazları (Ammonah vd., 2014), 50 °C’de optimum aktivite gösteren *Bacillus* ksilanazı (Kamble ve Jadhav, 2012) ile *Bacillus subtilis* ksilanazı (Bernier vd., 1983), 60 °C’de optimum aktivite gösteren *B. subtilis* ksilanazı (Guo vd., 2012) bunlardan bazılarıdır.

4.1.5. Enzimin Termal Stabilitesi

XbO ksilanazı 40 ve 50 °C’lerde 30 dk ön inkübasyon sonucunda aktivitesini tamamen korumuştur. 60, 70 ve 80 °C’de ön inkübasyon sonrasında ise aktivitesini sırasıyla %92, 86 ve 82 oranlarında korurken, 90 °C’de %62, 100 °C’de %36 düzeyinde korumuştur (Şekil 4.5).

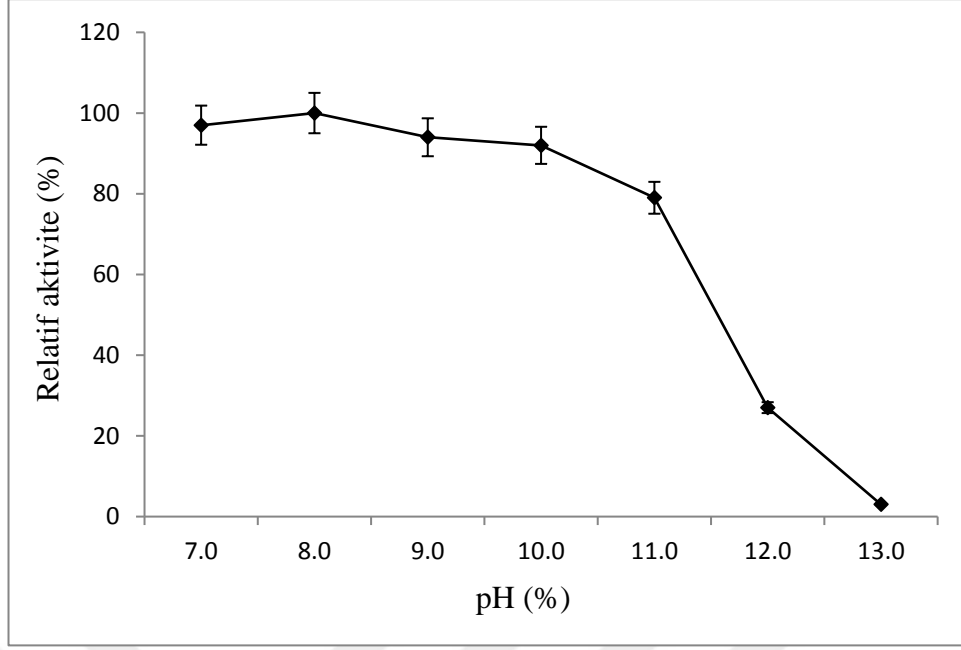


Şekil 4.5. Ksilanaz enzimine ait sıcaklık stabilite grafiği

Endüstriyel uygulamalarda enzim stabilitesi en önemli faktördür. XbO ksilanazı 80 °C'ye kadar stabilitesini önemli ölçüde korurken, daha yüksek sıcaklıklarda aktivitede önemli düşüşler gözlenmiştir. Fakat 100 °C'de 30 dk ön inkübasyon sonucunda bile %36 düzeyinde aktivite göstermesi, XbO ksilanazının endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamalarda bir potansiyel taşıdığını göstermektedir.

4.1.6. Enzimin pH Stabilitesi

XbO ksilanazı 7.0-11.0 pH değerleri arasında önemli bir stabilite göstermiş olup, bu aralıktaki relatif aktivitesi %92.4 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.6).



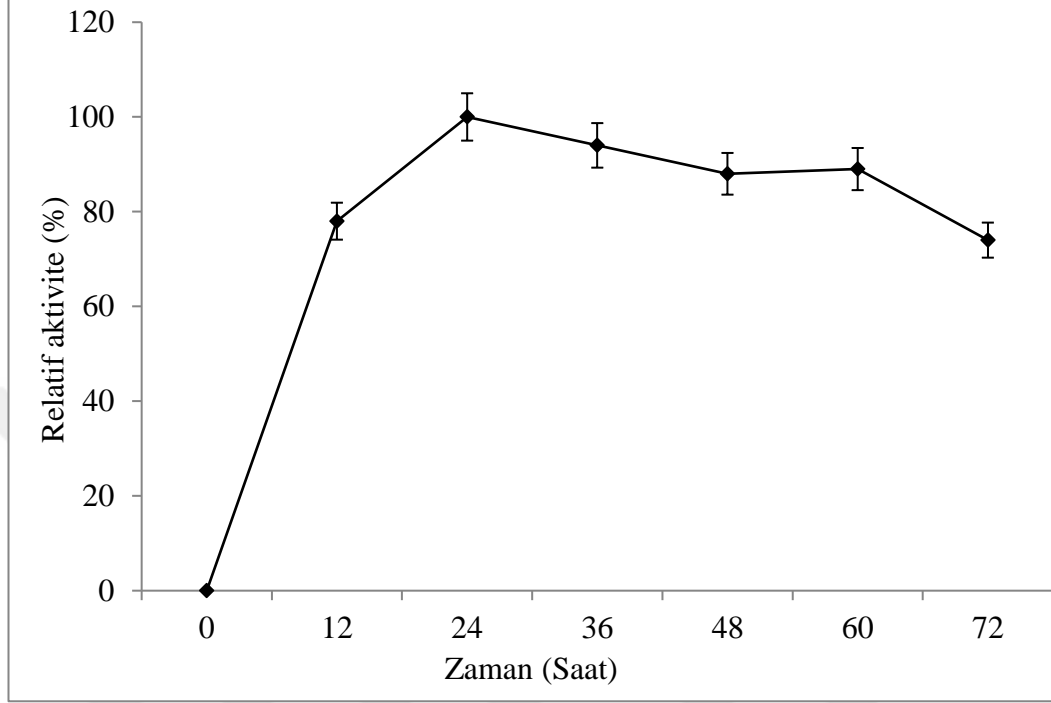
Şekil 4.6. Ksilanaz enzimine ait pH stabilite grafiği

Ekstrem pH değerlerinde enzimin kararlılığı yüklü aminoasit rezidülerinden kaynaklanıyor olabilir. Alkali pH koşullarında kararlı enzimlerde asidik aminoasit rezidülerinde azalma, arjinin aminoasit sayısında ise bir artış meydana geldiği bildirilmiştir (Ammonah vd., 2014). Diğer taraftan asidik ve nötral pH koşullarında kararlı kalan birçok ksilanaz enzimi rapor edilmiştir (Bhakyaraj, 2014). Bu bildiriş, bakteriyel ksilanazların farklı pH değerlerinde stabilite gösterebileceğini açıkça ortaya koymaktadır.

4.1.7. Zamana Göre Enzim Aktivitesi

XbO ksilanazı inokülasyonun başlangıcından itibaren 12. saatte %78 oranında relatif aktivite gösterirken, maksimum enzim üretimi 24. saatte gerçekleşmiştir. 72. saatte enzim üretimi %74 düzeyinde olmuştur (Şekil 4.7). Irfan vd. (2016) *Bacillus subtilis* ve *B. megaterium* ksilanazlarının üreme periyodunun sırasıyla 48. ve 72. saatte gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Porsuk vd. (2013) *Streptomyces* sp. CA24 bakterisine ait ksilanazın karbon kaynağı olarak ksilanın kullanılması durumunda en yüksek enzim üretim seviyesine 48 ve 72. saatlerde ulaştığını bildirmişlerdir. Annamalai vd. (2009) ise nehir ağzından izole ettikleri *B. subtilis* bakterisine ait ksilanazın 7.0-10.0 pH aralığında en yüksek enzim üretim seviyesine 36-48. saatlerde ulaştığını

bildirmişlerdir. Genellikle *Bacillus* 'larda enzim üretim seviyesinin, bakteri inokülasyonundan itibaren 24. ile 48. saatler arasında yoğunlaştığı görülmekte olup, bu çalışmadan elde edilen bulgu bu görüşü desteklemektedir.

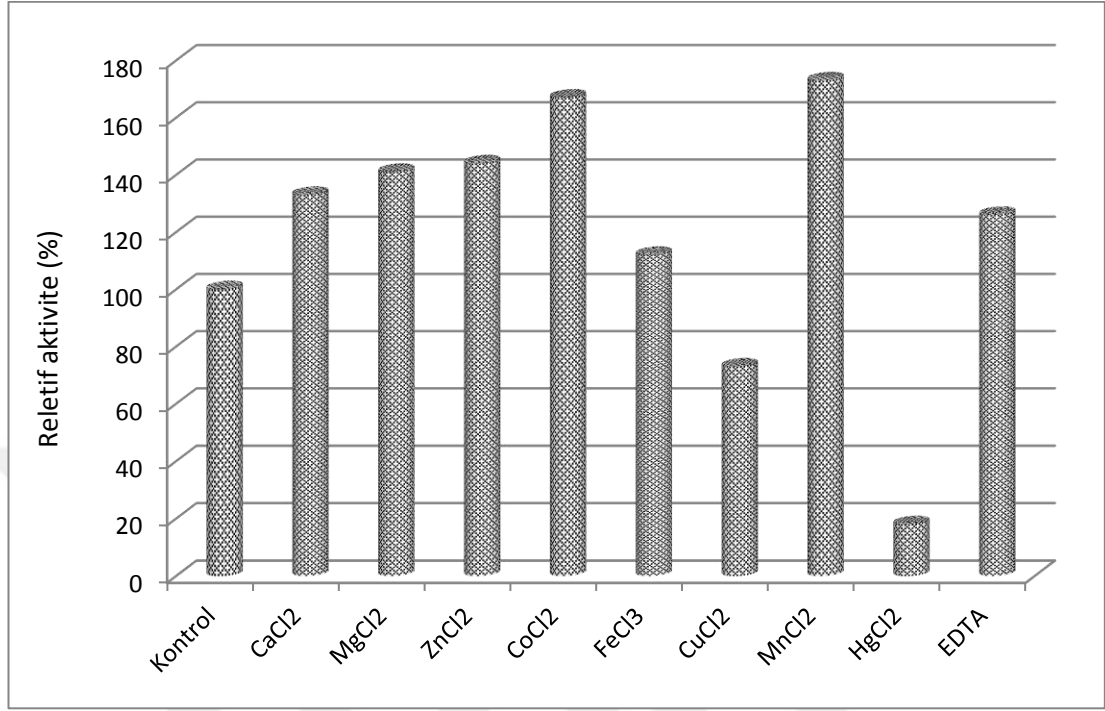


Şekil 4.7. Zamana göre enzim aktivite grafiği

4.1.8. Bazı Kimyasal Maddelerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri

XbO ksilanazı bazı kimyasal maddeler (CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 , MnCl_2 , HgCl_2 , EDTA (her biri 5 mM)) ile 55 °C'de 30 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmışlar ve sonrasında bu kimyasal maddelerin enzim aktivitesi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Enzim aktivitesi üzerinde en büyük inhibisyon HgCl_2 varlığında gerçekleşmiş ve bu kimyasal madde varlığında enzim %82, CuCl_2 varlığında ise sadece %27 oranında aktivite kaybına uğramıştır. Diğer kimyasal maddeler varlığında enzim aktivitesinde yükselme gözlenirken, kontrol grubuna göre %173'lük aktivite ile MnCl_2 enzim üzerinde en yüksek düzeyde aktivatör madde olmuştur. EDTA, CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 ve CoCl_2 varlığında ise enzim aktiviteleri

kontrol grubuna göre sırasıyla %26, 33, 41, 44 ve 67 düzeylerinde artmıştır (Şekil 4.8).



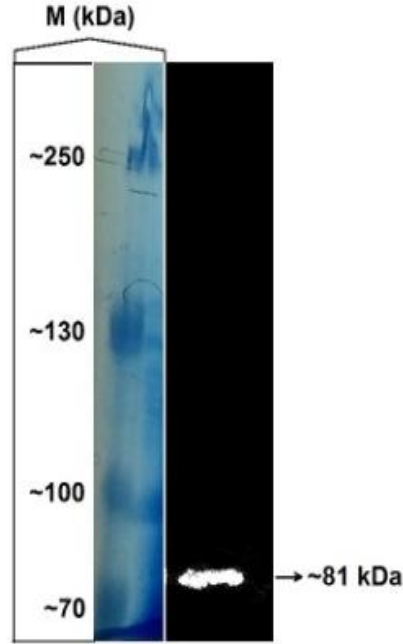
Şekil 4.8. Bazı kimyasal maddelerin ksilanaz aktivitesine etkileri

Bacillus ksilanazları üzerine yapılan önceki çalışmalar incelendiğinde, HgCl₂'nin genel inhibitör madde olduğu görülmektedir. Ksilanaz enziminin Hg⁺² iyonları tarafından inhibisyonu, Hg⁺² iyonlarının sistinin sülfidril grupları ile interaksyonu sonucu meydana gelmiş olabileceği bildirilmiştir (Khandeparkar ve Bhosle, 2006). CaCl₂ (Gessesse, 1998; Annamalai vd., 2009; Gaur vd., 2015), MgCl₂/MgSO₄ (Khasin vd., 1993; Gessesse, 1998; Gaur vd., 2015; Annamalai vd., 2009), ZnSO₄ ve CoCl₂ (Gaur vd., 2015) ve Mn⁺² (Sharma vd., 2013) tarafından stimülasyonu daha önce de rapor edilmiştir. Bununla birlikte ksilanazların Ca²⁺ (Faulet vd., 2006) ve MgCl₂ (Gessesse, 1998) tarafından inhibisyonu da daha önce rapor edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde ksilanaz enzimlerinin EDTA tarafından değişik oranlarda inhibe edildiği görülmektedir (Ratanakhanokchai vd., 1999; Yang vd., 2010; Sanghvi vd., 2014). Bu çalışmada ise XbO ksilanazı aktivitesi EDTA tarafından stimüle edilmiştir. Ksilanaz enzimlerinin aynı metal iyonları varlığında farklı tepkiler verdiği görülmektedir. Bu farklı tepkilerin metal iyonlarının sadece

ksilanazın aktif ksilan bağlanma bölgesini değil, aynı zamanda substratın etkin hidrolizi ile ilgili olan non-katalitik ksilan bağlanma bölgesini de etkilemiş olabileceğinden kaynaklanabileceği önerilmiştir (Ratanakhanokchai vd., 1999).

4.1.9. Enzimin Moleküler Ağırlığı

SDS-PAGE ve zimogram analizinde XbO ksilanazının yaklaşık 81 kDa ağırlığında tek bir bant ürettiği belirlenmiştir (Şekil 4.9). Yapılan literatür taramaları sonucunda ksilanaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları 8 ile 145 kDa arasında varyasyon gösterdiği belirlenmiştir (Sunna ve Antranikian, 1997; Kulkarni vd., 1999). Bununla birlikte *Bacillus subtilis* tarafından üretilen ve 340 kDa moleküler ağırlığına sahip ksilanaz enzimi de bildirilmiştir (Sa-Pereira vd., 2002b).



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. XbO ksilanazının SDS-PAGE ve zimogram analizi ile moleküler ağırlık analizi

4.1.10. Enzimin Spesifik Aktivitesi

Ham ve saflaştırılmış ksilanaz enzimine ait spesifik aktivite değerleri sırasıyla 27.6 ve 113.8 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

Kapilan (2015), *B. subtilis* BS166 ksilanazının ham ve saflaştırılmış spesifik aktivite değerlerini sırasıyla 32.14 ve 212.5 U/mg⁻¹ protein olarak bildirmiştir. Menon vd. (2010), *B. pumilus* GESF1 ksilanazını saflaştırarak spesifik aktivitesini 21.21 kat artırmışlar ve 112.42 U/mg proteine çıkarmışlardır. Heck vd. (2002), *B. subtilis* BL53 suşunun saflaştırılmamış ksilanaz enziminin spesifik aktivitesinin 72 saatlik kültür sonrasında 5.19 UI/mg protein olarak gerçekleştiğini bildirmiştir. Benzer şekilde Blanco vd. (1995) ile Chaudhry vd. (2015) saflaştırdıkları ksilanaz enzimlerinin spesifik aktivitelerini sırasıyla 40.2 ve 12.33 U/mg⁻¹ olarak bildirmişlerdir. XbO ksilanazının spesifik aktivite değerleri Kapilan (2015) ve Menon vd. (2010) tarafından verilen spesifik aktivite değerleri ile benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte yine XbO ksilanazının spesifik aktivite değerleri diğer ksilanazlara ait spesifik aktivite değerlerinden oldukça yüksek bir spesifik aktivite değeri göstermiştir. Bu değerler, XbO ksilanazını endüstriyel kullanım için uygun bir aday haline getirmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Bu çalışma ile Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi kampüsü içerisinde alınan toprak örneklerinden ksilanaz enzimi üreten *Bacillus* sp. XbO bakterisi izole edilmiştir. Enzimin optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 60 °C ve 6.0 olarak belirlenmiştir. Enzim 50 °C'de 30 dk ön inkübasyon sonrasında aktivitesinin tamamını korumuştur. Yine enzim 7.0-10.0 pH değerlerinde 30 dk ön inkübasyon sonucunda yüksek derecede kalan aktivite göstermiştir. En yüksek ksilanaz üretimi izolatın inokülasyonundan itibaren 24. saatte gerçekleşmiştir. SDS-PAGE ve zimogram analizleri ile enzimin moleküler ağırlığı ~81 kDa olarak belirlenmiştir. MnCl₂, enzim aktivitesini en yüksek düzeyde stimüle eden metal iyonu olurken, HgCl₂ en yüksek düzeyde inhibe eden metal iyonu olmuştur. Ham ve saflaştırılmış enzime ait spesifik aktivite değerleri sırasıyla 27.6 ve 113.8 U/mg protein olarak belirlenmiştir. BLAST analizi ile *Bacillus* sp. XbO bakterisinin 16S rDNA sekansının *Bacillus pumilus* ve *Bacillus safensis* bakterilerinin 16S rDNA sekansları ile %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Bu veriler, XbO ksilanazının endüstriyel kullanım için uygun bir enzim olabileceğini göstermektedir.

5.2. Öneriler

XbO enziminin moleküler genetik uygulamaları (klonlama ve *in-vitro* mutagenesis) ile daha saf, bol ve ucuz üretimi gerçekleştirilebilir. Özellikle enzimden sorumlu genin XbO genomundan izole edilerek uygun bir klonlama vektörü ile endüstriyel bir suşta klonlanması ile rekombinant bir endüstriyel suş oluşturulabilir.

KAYNAKLAR

- [1]“Polisakkaritlerin Enzimatik Sindirimi” Erişim adresi:
<https://www.biotek.com/resources/application-notes/enzymatic-digestion-of-polysaccharides-part-ii/>
- Ammonah, H., Harba, M., Akeed, Y., Al-Halabi, M., Bakri, Y., Isolation and identification of local *Bacillus* isolates fro xylanase biosynthesis. Iranian Journal of Microbiology, 6(2): 127-132. 2014.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated form marine environment. Indian Journal of Biotechnology, 8: 291-297. 2009.
- Archana, A., Satyanarayana,T., Xylanase production bythermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. Enzyme. Microbial. Technol., 21: 12-17. 1997.
- Avcioglu, B., Eyupoglu, B., Bakir, U., Production and characterization of xylanase of a *Bacillus* strain isolated from soil. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21: 65-68. 2005.
- Ayhan, K., Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43-44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara. 2000.
- Ball, A.S., McCarthy, A.J., Production and purification of xylanase from actinomycetes. J Appl Bacteriol., 66:439–444. 1989.
- Bastawde, K.B., Xylan structure, microbial xylanases, and theirmode of action. World J Microbiol Biotechnol., 8:353–368. 1992.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. S., Microbial xylanases and their industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol., 56:326–338. 2001.
- Bernier, R., Desrochers, M., Jurasek, L., Paice, M.G., Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 46(2): 511-514. 1983.
- Bhakyaraj, R., Isolation, production and characterization of xylanase from *Bacillus* sp. isolated from soil samples. International Journal of Advanced Multidisciplinary Research, 1(1): 41-51. 2014.
- Biely, P., Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol., 3:286–290. 1985.

- Blanco, A., Vidal, T., Colom, J. F. and Pastor, F. I. J., Purification and Properties of Xylanase A from Alkali-Tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4468-4470. 1995.
- Bottger, E.C., Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 65: 171–176. 1989.
- Cardoso, O.A.V., Filho, E.X.F., Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 223:309-314. 2003.
- Chaudhary, H., Chaudhary, V., Kasana, H., Production and partial purification of xylanase from *Bacillus pumilus*. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 2(10): 396-400. 2015.
- Christov, L.P., Akhtar, M., and Prior, B.A. Impact of Xylanase and Fungal Pretreatment on Alkali Solubility and Brightness of Dissolving Pulp. *Biobleaching of Sulphite Pulp*. 50: 579-582. 1996.
- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1): 3-23. 2005.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., DA Silva, R.F., Production and properties of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(4): 413-418. 2002.
- Çetinkaya, E., Ayhan, K., Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. *Karaelmas Science and Engineering Journal*, 2(1): 53-62. 2012.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. *Scientific American*, Freeman & Comp., San Francisco. 1981.
- Dhillon, A., Gupta, J.K., Kahna, S., Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB16. *Process Biochem.*, 35:849-856. 2000.
- Duarte, M.C.T., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Bim, M.A., Tagliari, C.V., Franco, T.T., Production and purification of alkaline xylanase. *Bioresource Tech.*, 68:49-53. 1999.

- Faulet, B.M., Niamke, S., Gonnety, J.T., Kouame, L.P., Purification and biochemical properties of a new thermostable xylanase from symbiotic fungus, *Termitomyces* sp, African Journal of Biotechnology, 5(3): 273-282. 2006.
- Gallordo, O., Diaz, P., Pastor, F.I.J., Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: Comparison with alkaline pI-low molecular weight xylanase of family 11. Current Microbiology, 48:276-279. 2004.
- Garcia-Campayo, V., Wood, T.M. Purification and characterization of a β -D-xylozidase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. Carbohydrate Res. 242: 229-245. 1993.
- Gaur, R., Tiwari, S., Rai, P., Srivastava, V., Isolation, production, and characterization of thermotolerant xylanase from solvent tolerant *Bacillus vallismortis* RSP-15. International Journal of Polymer Science, Article ID: 986324, 10 pages. 2015.
- Gessesse, A., Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Applied and Environmental Microbiology. p. 3533-3535. 1998.
- Gessesse, A., and Gashe. B.A., Production of Alkaline Xylanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. Journal of Applied Microbiology., 83:402-406. 1997.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Bacterial cellulases and xylanases. J Gen Microbiol., 139:187-194. 1993.
- Gozukara, F., Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Lichenaz (β -1,3 ve 1,4 Glukanaz) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 2009.
- Guo, G., Liu, Z., XU, J., Liu, J., Dai, X., Xie, D., Peng, K., Feng, X., Duan, S., Zheng, K., Cheng, L., FU, Y., Purification and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis* isolated from the degumming line. Journal of Basic Microbiology, 52: 419-428. 2012.
- Harmsen, D., Karch, H. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. American Society for Microbiology, 70: 19-24. 2004.
- Heck, J.X., Hertz, P.F., and Ayub, M.A.Z. Cellulase And Xylanase Production By Isolated Amazon *Bacillus* Strains Using Soybean Industrial Residue Based Solid-State Cultivation. Brazilian Journal of Microbiology 33:213-218. 2002.

- Hiremath, K.S., Patil, C.S., Isolation, production and characterization of alkalothermostable xylanase from newly Isolated *Bacillus* sp. International Journal of Biotechnology Application, 3(1): 48-51. 2011.
- Hrmova, M., Biely, P., Vrsanka, M., Petrakova, E., Induction of cellulose-and-xylan-degrading enzyme complex in yeast *Trichosporon cutaneum*. Arch Microbiol., 161:371–376. 1984.
- Irfan, M., Asghar, U., Nadeem, M., Nelofer, R., Syed, Q., Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. In submerged fermentation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 9(2016): 139-147. 2016.
- Joseleau, J.P., Comtat, J., Ruel, K., Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: Visser J, Beldman G, van Someren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam: 1–15. 1992.
- Kamble, R.D., Jadhav, A.R., Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation. International Journal of Microbiology, Article ID 683193, 8 pages. 2012.
- Kapilan, R., Purification of xylanase from *Bacillus subtilis* BS166. Journal of Science, 5(7): 511-515. 2015.
- Khandeparkar, R., Bhosle, N.B., Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation, Enzyme and Microbial Technology, 39(4): 732-742. 2006.
- Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y., Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, Applied and Environmental Microbiology, 59(6): 1725-1730. 1993.
- Kirk, O., Borchert, T.V. and Fuglsang, C.C. Industrial Enzyme Applications. Current Opinion In Biotechnology, 13: 345-351. 2002.
- Köksal, G. İki fazlı sistemde süspansiyon ve tutuklanmış mikroorganizmalarla ksilanaz üretimi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara. 1998.
- Kulkarni, N., Shendye, A., and RAO, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiology Reviews. 23:441-456. 1999.

- Kumar, B.K., Balakrishnan, H. and Rele, M.V., Comptibility of falkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* NCL (87-6-10) with 166 commercial detergents and proteases. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.*,31: 83-87. 2004.
- Laemmli, U.K., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. 1970.
- Lama, L., Calandrelli, V., Agata, Gambacorta, A., Nicolaus,B., Purificaion and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*.*Research In Microbiology*,155: 283-289. 2004.
- Lenete, E.H., Balows, A., Hausler, J.WJR, Shadomy, J.H., *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. 4 Amerika. 1149p. 1985.
- Lopez, C., Blanco, A. and Pastor, F.I.J., Xylanase production by anew alkali tolerant *Bacillus*. *Biotechnology Letters*,20:243-246.167, 1998.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J. Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect oftemperature on development. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:1210-1215. 1987a.
- Lowe, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J., Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheatstraw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. *Applied and Environmental Microbiology*. 53: 1216-1223. 1987b.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*, 193: 265- 271. 1951.
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Dasilra, M.J.S., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., Vangarcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., Vanderhondel, C.A.M.J.J., Vanrotterdam, C., Xylanases and their application In bakery. In: Visser J, Beldman G, van Someren MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*. Elsevier, Amsterdam:349–360. 1992.
- Magge, R.J.; Kosaric, M., Bioceonversion of hemicellulose. *Adv. Biochem Eng Biotech.*, 32: 61-93. 84, 1995.
- Menon, G., Mody, K., Keshri, J., Jha, B., Isolation, purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain, GESF-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(6): 998-1005. 2010.

- Mounfort, D.O., Asher, R.A., Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 1016-1022. 1989.
- Porsuk, I., Ozakin, S., Bali, B., Ince Yılmaz, E., A cellulase-free, thermoactive, and alkali xylanase production by terrestrial *Streptomyces* sp. CA24. *Turkish Journal of Biology*, 37: 370-375. 2013.
- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M., and Deshpande, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62: 597-635. 1998.
- Ratanakhanockchai, K., Kyu, K.L., Tanticharoen, M., Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-I. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 694-697. 1999.
- Romanowska, I., Polak, J., Janowska, K., Bielecki, S., The application of fungal endoxylanase in bread-making. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68, 317-320. 2003.
- Roy, N., Rowshanul, H.M., Isolation and characterization of xylanase producing strain of *Bacillus cereus* from soil. *Iranian Journal of Microbiology*, 1(2): 49-53. 2009.
- Ryan, S.E., Nolan, K., Thompson, R., Gubitz, G.M., Savage, A.V., Tuohy, M.G., Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*. *Enzyme. Microb. Technol.*, 33: 775-785. 2003.
- Saha, B.C., Production, purification and properties of xylanase from a newly Isolated *Fusarium proliferatum*. *Process Biochem.*, 37: 1279-1284. 2002.
- Sanghvi, G., Jivrajani, M., Patel, N., Jivrajani, H., Bhaskara, G.B., Patel, S., Purification and characterization of haloalkaline, organic solvent stable xylanase from newly isolated halophilic bacterium-OKH. *International Scholarly Research Notices*, Article ID: 198251, 10 pages. 2014.
- Sa-pereira, P., Mesquita, A., Duarte, J.C., Barros, M.R.A., Costaferreira, M., Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain *Bacillus subtilis* and Its properties. *Enzyme. Microb. Technol.*, 30: 924-933. 2002a.

- Sa-pereira, P., Costa-ferreira, M., Atres-barros, M.R., Enzymatic properties of a neutral endo-1,3(4)-b-xylanase Xyl II from *Bacillus subtilis*, *Journal of Biotechnology*, 94: 256-275. 2002b.
- Saul, D.J., Williams, L.C., Grayling, R.A., Chamley, L.W., Love, D.R. and Bergquist, P.L., *ceiB*, a Gene Coding for a Bifunctional 171, 1990.
- Schallmeyer, M., Singh, A. and Ward, O. P. Developments In the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1-17. 2004.
- Seo, J.K., Park, T.S., Kwon, I.H., Piao, M.Y., Lee, C.H., HA, J.K., Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 Isolated from the rumen of a native Korean goat. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(1): 50-58. 2013.
- Sharma, M., Mehta, S., Kumar, A., Purification and characterization of alkaline xylanase secreted from *Paenibacillus macquariensis*. *Advances In Microbiology*, 3: 32-41. 2013.
- Sunna, A., Antranikian, G., Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Review Biotechnol.* 17:39–67. 1997.
- Temiz, A., Kartal, I., B., Saldamlı, I. Comparison of biochemistry analyzer with Teles method In determination of lactose. *Milchwissenschaft.* 54,1,7-9. 1999
- Topal, I., Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Renninin Yeri. *Gıda*, 10 (1), 25-37. 1985.
- Tortoli, E., Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 319–354. 2003.
- Tseng, M-J., Yap, M-N., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., Chen, S-T., Purification and characterization of two cellulase free xylanase from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzyme.Microb.Technol.*,30: 590-595. 2002.
- Uhlig, H. *Industrial enzymes and their applications*. John Wiley & Sons, Inc. 1998.
- Wainø, M. and Ingvorsen, K., Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7:87-93. 174, 2003.

- Wejse, P.L., Ingvorsen, K., Mortensen, K.K. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.*, 32: 721-727, 2003.
- Whistler, R.L., Richards, E.L., Hemicelluloses. In: Pigman W, Horton, D (eds) *The carbohydrates*. Academic Press, New York: 447-469. 1970.
- Wiseman, A., *Handbook of Enzymes Biotechnology*. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes In Industry p. 274-373. 1987.
- Woese, C.R., Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271. 1987.
- Wong, K.K.Y., Saddler, J.N., *Trichoderma* xylanases, their properties and purification. *Crit Rev Biotechnol.*, 12:413-435. 1992.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N., Multiplicity of β -1,4- xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.*, 52:305-317. 1988.
- Yang, V.W., Zhuang, Z., Elegir, G., and Jeffries, T.W., Alkaline active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from kraft pulp. *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 434-441. 1995.
- Yang, Y., Zhang, W., Huang, J., Lin, L., Lian, H., Lu, Y., Wu, J., Wang, S., Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486. *African Journal of Microbiology Research*, 4(21): 2249-2256. 2010.
- Yoon, J.J., Ve Kim, Y.K., Degradation of crystalline cellulose by Brown-Rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *The Journal of Microbiology*, 43 (6), 487-492. 2005.
- Zeman, N.W. and McCrea, J.M., *Alpha-amylase Production Using a Recombinant DNA Organism*, 1985.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Zübeyde BAŞARAN

2. Doğum Tarihi : 01/01/1975

3. Ünvanı : Biyolog

4. Öğrenim Durumu :

<i>Derece</i>	<i>Bölüm/Program</i>	<i>Üniversite</i>	<i>Bitirme Yılı</i>
Önlisans	Laboratuvar	Yüzüncü Yıl Üniversitesi	1995
Lisans	Biyoloji	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2014

5. İş Tecrübesi:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Laboratuvar Teknisyeni	Osmaniye Devlet Hastanesi	1993-

6. Yayınlar:

7. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler:

8. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

9. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

10. Diğer yayınlar:

11. Projeler:

12. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

13. Ödüller: