

LİGNOSELÜLOZ DEĞREDASYONUNU SAĞLAYAN
STREPTOMYCES ENZİMLERİ HAKKINDA BİR ARAŞTIRMA

136256

ALİ KURU

Mersin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

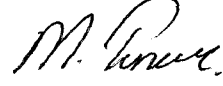
Yrd. Doç. Dr. Münir TUNCER

YÜKSEK LİSANS TEZİ
DOKÜMANLAMA MERKEZİ

136256

MERSİN
Ağustos – 2003


Bu tezin gerek bilimsel içerik gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.



Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Münir TUNCER



Jüri Üyesi
Doç. Dr. Mustafa ÖZYURT



Jüri Üyesi
Yrd. Doç. Dr. Nevzat ŞAHİN

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü yönetim kurulunun 26.09.2003 tarih ve 2003.../16-333 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Mahir TURHAN

Not: Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden izole edilmiş ve izole edildikleri habitatlar doğrultusunda muhtemel lignoselüloz degradesicileri olabilecekleri düşünülen, altı *Streptomyces* suşunun ekstraselüler lignoselüloolitik enzimleri (endoksilanaz, endoglukanaz ve peroksidaz), farklı karbon kaynakları içeren bazal maya ekstraktı besiyeri üzerinde büyümeleri sırasında çalışılmıştır.

Ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerin üretimi için gerekli optimal çevresel koşullar, besiyeri içeriği ve inkübasyon koşulları değiştirilerek belirlenmiştir. İnkübasyon zamanı ile birlikte farklı pH (5-9), sıcaklık (25-50°C) ve karbon kaynaklarının [%0,0'dan 1,2'ye (w/v) değişen konsantrasyonlarda yulaf ksilani ve öğütülmüş buğday samanı] bu enzimlerin üretimine olan etkisi de belirlenmiştir. Bütün suşlarda en yüksek enzim aktiviteleri 72-96 saat inkübasyon sonrasında, 30-35°C'de ve pH 8-9'da gözlemlenirken, farklı karbon kaynakları ve konsantrasyonları her bir enzimin üretiminde farklı etki ortaya koymuştur. Çalışmalar sırasında gözlemlenen en yüksek endoksilanaz aktivitesi *Streptomyces* sp. F4880 (43,345 U/ml) tarafından, en yüksek endoglukanaz aktivitesi ise *Streptomyces* sp. F6318 (5,975 U/ml) tarafından yulaf ksilani üzerinde [sırası ile; 0,8 ve 1,0 (w/v)] büyüme sırasında üretilirken; çalışmalar sırasındaki en yüksek peroksidaz aktivitesi *Streptomyces* sp. F6616 (0,631 U/ml) tarafından buğday samanı üzerinde büyüme sırasında üretilmiştir [1,2 (w/v)].

Anahtar kelimeler: Degredasyon, endoksilanaz, lignoselüloz, peroksidaz, *Streptomyces*.

ABSTRACT

In this study, the production of extracellular lignocellulolytic enzymes (endoxylanase, endoglucanase and peroxidase) from six *Streptomyces* strains, which are isolated from different places in Turkey and according to their isolation habitats thought as possible lignocellulose degraders, were studied during the growth in basal salts-yeast extract medium containing different carbon sources.

Optimal environmental conditions for the production of extracellular lignocellulolytic enzymes were determined by changing the medium contents and incubation conditions. Effects of different pH (5-9), temperature (25-50°C) and carbon sources [oat spelt xylan and chopped wheat straw with differing concentrations from %0,0 to 1,2 (w/v)] on the production of these enzymes were also investigated with the effect of incubation time. In all strains used the highest enzyme activities were observed after 72-96 hours of incubation, at 30-35°C, and pH 8-9, while different carbon sources and concentrations performed different effect on each enzyme. During the studies the highest endoxylanase activity was produced by *Streptomyces* sp. F4880 (43,345 U/ml), and the highest endoglucanase activity was produced by *Streptomyces* sp. F6318 (5,975 U/ml) when growing on oat spelt xylan [0,8 (w/v) and 1,0 (w/v) respectively], while the highest peroxidase activity was produced by *Streptomyces* sp. F6616 (0,631 U/ml) when growing on wheat straw [1,2 (w/v)].

Keywords: Degredation, endoxylanase, lignocellulose, peroxidase, *Streptomyces*.

TEŞEKKÜR

Özellikle teőekkürden daha fazlasını borçlu olduğum iki kişiye, çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren hocam Yrd. Doç. Dr. Münir Tuncer'e ve yine tezimin her aşamasında yanımda olan, belki de adının benimki ile birlikte yer alması gereken, arkadaşım Melahat Işıklı'ya teőekkürlerimi sunarım. Çalışmada kullandığım *Streptomyces* suşlarını temin ederek çalışmanın gerçekleştirilmesine büyük katkıda bulunan hocam Yrd. Doç. Dr. Nevzat Şahin'e, çalışmaların bir bölümünde yardımcı olan ve desteğini hep yanımda hissettiğim arkadaşım Serap Karagöz'e ve bu tez sırasında benden desteklerini esirgemeyen aileme, Nihal'e ve çalışma arkadaşlarıma da teőekkürü borç bilirim.



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>ii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iii</i>
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	<i>iv</i>
ÇİZELGELER DİZİNİ	<i>vii</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>viii</i>
KISALTMALAR	<i>x</i>
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. LİGNOSELÜLOZİK MATERYALLERİN YAPISI ve BİYOKİMYASI	3
2.1.1. Selüloz	4
2.1.2. Hemiselüloz	5
2.1.3. Lignin	7
2.2. ODUN HÜCRE DUVARININ KİMYASAL YAPISI	9
2.3. LİGNOSELÜLOZ YIKIMINDA ROL ALAN ENZİMLER	10
2.3.1. Selülazlar	10
2.3.2. Hemiselülazlar	12
2.3.3. Peroksidazlar	14
2.3.4. Lakkazlar	16
2.4. LİGNOSELÜLOZ YIKIMINDA ROL ALAN ORGANİZMALAR	17
2.4.1. Lignoselüloz Degrede Eden Bakteriler	17
2.4.1.1. Aerobik yıkım	18
2.4.1.2. Anaerobik yıkım	18
2.4.2. Lignoselülozu Degrede Eden Funguslar	19
2.4.3. Lignoselülozu Degrede Eden Aktinomisetler	21
2.4.3.1. Aktinomisetlerin genel özellikleri	23
2.4.3.2. Lignoselülozun aktinomisetler tarafından yıkımı ve modifikasyonu	25
2.5. LİGNOSELÜLOZUN KOMPOST BİR ÇEVREDEKİ DEGREDASYONU	26
2.6. AKTİNOMİSET ENZİMLERİNİN ve DİĞER ÜRÜNLERİNİN ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ	29
2.7. ÇALIŞMANIN AMACI	30

3. MATERYAL ve METOD	32
3.1. MATERYAL	32
3.1.1. Kimyasallar ve Proteinler	32
3.1.2. Kullanılan <i>Streptomyces</i> Suşları	32
3.1.3. Cam Malzemeler	33
3.1.4. İnkübatörler	33
3.1.5. Santrifüjler	33
3.1.6. UV/Visible Spektrofotometre	33
3.2. METOD	34
3.2.1. <i>Streptomyces</i> Suşlarının Kültürü ve Muhafazası	34
3.2.2. Sübstratların Hazırlanması	36
3.2.3. İnokulum Hazırlanışı	37
3.2.4. Süpernatant Sıvılarının Toplanması	37
3.2.5. Ekstraselüler Protein Miktarlarının Tayini	37
3.2.6. Enzim Preperasyonları	38
3.2.7. Enzim Asseyleri	38
3.2.7.1. Endoksilanaz ve endoglukanaz asseyi	38
3.2.7.2. Peroksidaz asseyi	40
3.2.8. Ekstraselüler Lignoselülitik Enzimlerin Üretiminin Optimizasyonu	41
3.2.8.1. Ekstraselüler lignoselülitik enzim aktivitelerinin büyüme kinetiği ile olan ilişkisi	41
3.2.8.2. Kültür sıcaklığının ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin aktivite düzeyleri üzerine etkisi	41
3.2.8.3. Kültür pH'ının ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin aktivite düzeyleri üzerine etkisi	42
3.2.8.4. Farklı karbon kaynaklarının ve konsantrasyonlarının ekstraselüler lignoselülitik enzim aktivitelerinin üretimi üzerine olan etkisi	42
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	43
4.1. BULGULAR	43
4.1.1. Ekstraselüler Lignoselülitik Enzimlerin Üretiminin Büyüme Kinetiğine Bağlı Değişimi	43
4.1.2. Farklı Sıcaklık Koşullarında Ekstraselüler Lignoselülitik Enzimlerin Üretimi	48

4.1.3. Farklı pH Koşullarında Ekstraselüler Lignoselüolitik Enzimlerin Üretimi	53
4.1.4. Farklı Karbon Kaynakları ve Konsantrasyonlarının Lignoselüolitik Ekstraselüler Enzimlerin Üretimi Üzerine Etkisi	58
4.1.4.1. Farklı konsantrasyonlardaki yulaf ksılanının lignoselüolitik ekstraselüler enzimlerin üretimi üzerine etkisi	59
4.1.4.2. Öğütülmüş buğday samanının farklı konsantrasyonlarının lignoselüolitik enzimlerin üretimi üzerine etkisi	64
4.2. TARTIŞMA	71
4.2.1. <i>Streptomyces</i> Suşları Tarafından Üretilen Lignoselüolitik Enzimlerin Büyüme Kinetiğine Bağlı Değişimi	71
4.2.2. İnkübasyon Sıcaklığının <i>Streptomyces</i> Suşları Tarafından Üretilen Ekstraselüler Lignoselüolitik Enzimlerin Üretimi Üzerine Etkisi	73
4.2.3. Farklı pH Değerlerinin Kullanılan <i>Streptomyces</i> Suşlarının Ekstraselüler Lignoselüolitik Enzimlerinin Üretimi Üzerine Etkisi	74
4.2.4. Farklı Karbon ve Enerji Kaynaklarının Kullanılan <i>Streptomyces</i> Suşlarının Ekstraselüler Lignoselüolitik Enzimlerinin Üretimi Üzerine Etkisi	76
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı lignoselüloz kaynaklarının tipik kuru ağırlıkları kompozisyonları	3
Çizelge 2.2. Dört farklı lignoselülozik materyaldeki polisakkaritler.	7
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>Streptomyces</i> suşları ve izole edildikleri ortamlar.	32



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Selülzoun yapısı ve selülzoun tekrarlamalı birimi sellobiyoz	5
Şekil 2.2. Tipik tahıl arabino-4- <i>O</i> -metilglukuronoksilan'ının yapısı.	6
Şekil 2.3. Yumuşak odun lignininin şematik çizimi.	8
Şekil 2.4. Odun fibrillerinde hücre duvarı tabakalarının organizasyonu.	10
Şekil 2.5. Optimal koşullar altında kompostlama süreci.	28
Şekil 3.1. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın değişik konsantrasyonlarının Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğri.	38
Şekil 3.2. D-glukoz ve D-ksiloz'un farklı konsantrasyonlarının Miller metodu ile analizi ile elde edilen indirgenmiş şeker standart eğrileri.	39
Şekil 4.1: Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince <i>Streptomyces</i> suşları tarafından üretilen peroksidaz aktiviteleri ve spesifik aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.	44
Şekil 4.2: Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince <i>Streptomyces</i> suşları tarafından üretilen endoglukanaz aktiviteleri ve spesifik aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.	45
Şekil 4.3: Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince <i>Streptomyces</i> suşları tarafından üretilen endoksilanaz aktiviteleri ve spesifik aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.	46
Şekil 4.4: Farklı sıcaklık koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri rölatif peroksidaz aktiviteleri.	49
Şekil 4.5: Farklı sıcaklık koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri rölatif endoglukanaz aktiviteleri.	50
Şekil 4.6: Farklı sıcaklık koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri rölatif endoksilanaz aktiviteleri.	52
Şekil 4.7: Farklı pH koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri rölatif peroksidaz aktiviteleri.	54
Şekil 4.8: Farklı pH koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri rölatif endoglukanaz aktiviteleri.	55
Şekil 4.9: Farklı pH koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri rölatif endoksilanaz aktiviteleri.	56
Şekil 4.10: Farklı ksilan konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında <i>Streptomyces</i> suşlarının sergiledikleri peroksidaz aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri.	60

- Şekil 4.11:** Farklı ksilan konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoglukanaz aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri. 62
- Şekil 4.12:** Farklı ksilan konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoksilanaz aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri. 63
- Şekil 4.13:** Farklı saman konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri peroksidaz aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri. 66
- Şekil 4.14:** Farklı saman konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoglukanaz aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri. 69
- Şekil 4.15:** Farklı saman konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoksilanaz aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri. 70



KISALTMALAR

2,4-DCP:	2,4-diklorofenol
4-AAP:	4-aminoantipirin
AAO:	Aril alkol oksidaz
APPL:	Asitle çöktürülebilen polimerik lignin (Acid Pacipitable Polymeric Lignin)
BSA:	Bovin serum albumin
CMC:	Karboksümetilselüloz (Carboxymethylcellulose)
Da:	Dalton
DHP:	Dehidrogenasyon polimeri
DNS:	Dinitrosalisilik asit
EC:	
HRP:	Bayır turpu peroksidazı (Horse Radish Peroxidase)
ISP4:	Uluslararası <i>Streptomyces</i> Projesi 4 numaralı besiyeri (International <i>Streptomyces</i> Project No.4), aynı zamanda inorganik tuzlar – nişasta agar (inorganic salts – starch agar) olarak da adlandırılır.
k:	Kilo
kob:	Koloni oluşturan birim
LiP:	Lignin peroksidaz
MnP:	Mangan-bağımlı peroksidaz
Mr:	Rölatif moleküler ağırlık
MS-YEM:	Minimal tuzlar – maya ekstraktı besiyeri (Minimal salts – yeast extract medium)
PD:	Polimerizasyon derecesi
SD:	Sekonder hücre duvar
U:	Ünite
w/v:	Ağırlık ve hacim

1. GİRİŞ

Lignoselülozun yıkım prosesi, toprakta ve kompostlarda çok geniş bir çeşitliliğe sahip olan fauna ve mikro-flora tarafından yürütülmektedir. İnvertebratlar ve toprak solucanları, lignoselülozu ısırarak ve küçük parçalara ayırarak, dolayısı ile de aktinomisetler gibi toprak mikroorganizmalarının enzimatik faaliyetleri için yüzey/hacim oranını yükselterek, lignoselülozun toprağa fiziksel olarak karışmasından sorumludurlar. Bu mikroorganizmalar, lignoselülozu kullanabilmek için iyi adapte olmuşlardır. Hifli büyüme formları, lignoselülozik materyal içerisine nüfuz ederek organizmanın materyal içinde daha kolay yayılmasını mümkün kılar. Lignoselülozik materyal içinde hiflerin yayılması ise, yapıyı açarak gaz diffüzyonuna ve diğer mikroorganizmaların da süstrata saldırabilmelerine olanak sağlar. Bununla birlikte odunun kökeni, odun hücrelerinin tipi, kimyasal kompozisyonu ve hücre duvarı morfolojisinin tamamı, yıkımın hem oranını hem de enzimolojisini etkiler.

Doğada fikse edilmiş karbonun ana deposu olan bitki hücre duvarları üç temel polimerik bileşene sahiptir: selüloz (β -1,4-glukan'ın suda çözünmeyen homopolimer fibrilleri), hemiselüloz (glukanları, mannanları ve ksilanları içeren, selülozik olmayan hetero-polisakkaritler) ve lignin (kompleks bir poli-fenolik yapı).

Lignoselüloz, doğada bol olarak bulunan ve yenilenebilen bir enerji kaynağını teşkil eder. Günümüzde, mikroorganizmaların lignoselülozu kullanarak işe yarar son-ürünler oluşturabilme yeteneklerinden kazanç sağlanmaya çalışılmaktadır. Örneğin, lignoselülozun endüstriyel hidrolizinde kimyasal metotlar yerine mikrobiyal enzimlerin kullanımı, enzim reaksiyonlarının yüksek spesifitesi, reaksiyon koşullarının daha ılımlı olması ve kimyasal modifikasyonlar sonucu süstrat kaybının olmayışı gibi nedenlerle daha avantajlıdır. Bu gibi biyolojik dönüştürme prosesleri, özellikle ormancılık ve tarımsal faaliyetler sonucu üretilen kalıntıların ve atıkların eliminasyonu için çekicidirler. Hemiselülozun ana bileşeni olan ksilanın bolluğu, ksilanolitik enzimlerin bu bileşenlerin biyolojik dönüşümünde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Bunun da ötesinde ksilan yıkıcı enzimlerin kullanım alanları kağıt ve kağıt endüstrisini [1-4] içerisine aldığı kadar,

lignoselüloz kökenli şekerlerin yakıtta dönüştürülmesini [5], fırıncılığı, meyve suları ve biranın bulanıklılığının giderilmesini içerisine alan gıda işlemlerini [6] ve tek hücre proteini üretimini [7] de içerisine alır. Bunlara benzer diğer potansiyel uygulamaların gelişebilmesi ise lignoselülozu enerji kaynağı olarak kullanan organizmaların tanımlanarak, bu organizmaların gelişerek gerekli enzim sistemlerinin indüksiyonu için optimum çevresel koşulların belirlenmesini ve lignoselülozun enzimatik olarak yıkım mekanizmasını ortaya koyan araştırmaların yoğunlaştırılmasına bağlıdır.

Lignoselülozun yapısında yer alan ligninin, selüloolitik ve hemiselüloolitik enzimlerin aktivitelerini sınırladığı ve dolayısı ile lignoselüloz yıkımının etkinliğini indirgediği düşünülmektedir. Bununla birlikte, yıkım mekanizması net olarak bilinmekte olan selülozla kıyaslandığında, hemiselüloz yıkımının enzimolojisi henüz tam olarak anlaşılammıştır. Bunun nedeni ise kısmen hemiselülozların, selüloza oranla kompleks yapıda olması ve buna dayalı olarak da aktinomisetler gibi mikroorganizmalar tarafından bir çok ksilanaz enzimlerinin üretilmesidir. Aynı zamanda, ekstraselüler peroksidazların da fungusların lignoselüloz yıkım mekanizmalarının önemli bir parçası olduğu iyi bir biçimde tespit edilmiştir. Ekstraselüler peroksidazların üretiminin lignoselüloolitik aktinomisetler için de genel ayırt edici bir özellik olmasından dolayı, bu enzimlerin aktinomisetlerde, selüloz ve ksilan yıkıcı enzimler ile birlikte, lignoselülozun yıkımında işe karışıyor olarak görülmeleri araştırılması gereken açık ve de çalışılmaya değer bir konudur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. LİGNOSELÜLOZİK MATERYALLERİN YAPISI ve BİYOKİMYASI

Doğada lignoselüloz, biyomasın çok büyük bir kısmını oluşturmaktadır ve bunun sonucunda global karbon döngüsünün gerçekleşebilmesi için lignoselülozun degradasyonu gereklidir. Her yıl, lignoselülozu dünya üzerinde en bol bulunan bileşik yapacak şekilde, $2-5 \times 10^9$ ton lignoselüloz fotosentezle sentezlenmektedir [8]. Lignoselüloz üç ana bileşenin: selüloz, hemiselüloz ve lignin, bileşiminden oluşmaktadır ve yapısal destek sistemini oluşturduğu vasküler bitkiler içerisinde yaygın dağılım göstermektedir [9]. Bitki hücre duvarları da aynı zamanda büyük ölçüde bu üç ana polimerin değişik oranlarda bir araya gelmesi sonucu oluşmuşlardır, bundan dolayı da doğadaki fikse edilmiş karbon kaynaklarının ana deposu olarak görülmektedirler (bkz. Çizelge 2.1.). Bitkisel materyallerde aynı zamanda terpenleri, resinleri ve fenollerini içeren diğer minör bileşenler de bulunmaktadır. Değişik bileşenlerin oranları, bitki dokusunun tipine ve yaşına olduğu kadar, türlere ve tek bir tür içerisindeki farklı dokulara da bağlılık göstermektedir. Genellikle sert odunlardaki (angiosperm) selüloz ve hemiselüloz konsantrasyonları, yumuşak odunlardakinden (gymnosperm) daha yüksek olmakla birlikte, yumuşak odunlardaki lignin içeriği sert odunlardakinden daha yüksektir [9]. Otlar (*Gramineae*) ve saman, odunsu bitkilere oranla hemiselüloz bakımından zengin (% 25-30 w/w), lignin (%10-30 w/w) ve selüloz (%25-40 w/w) bakımından ise daha fakirdirler [9,10] (bkz. Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Farklı lignoselüloz kaynaklarının tipik kuru ağırlıkları kompozisyonları (w/v). Betts ve ark. [9] ve Coombs [10]'dan yeniden düzenlenmiştir.

	Kül*	Lignin	Selüloz	Hemiselüloz
Yumuşak-Odun	1,7	25-35	45-50	25-35
Sert-Odun	2,0	18-25	45-55	24-40
Otlar	7,8	10-30	25-40	25-50
Atık gazete kağıdı	Eser	16	61	20

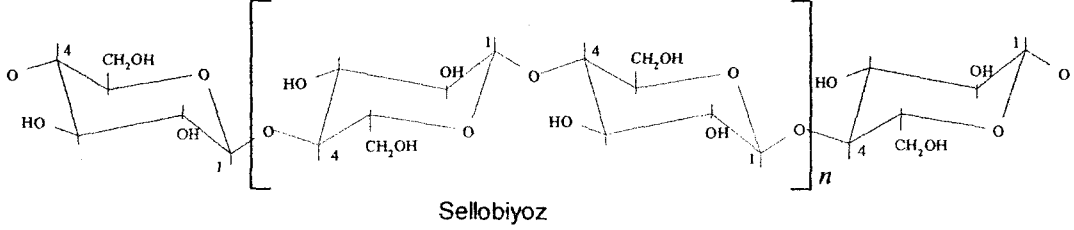
* Değerler kuru hammaddenin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

2.1.1. Selüloz

Selüloz, bitkiler tarafından sentezlenen temel karbonhidrattır. Yılda, 1×10^8 tonu kağıt sanayisinde kullanılmak üzere yaklaşık $1,5 \times 10^8$ ton selüloz, ham fibriler materyal formunda tüketilmektedir [9]. Bundan dolayıdır ki selülozik biyomasın yıkımı, biyosfer içerisindeki karbon döngüsünün önemli bir bölümünü oluşturur. Aynı nedenden dolayı, etanole fermente edilebilecek şeker sübstratlarının üretimi gibi endüstriyel prosesler için selüloolitik enzimlerin kullanımı, biyoteknologların ilgisini çekmektedir. Selüloz, bitki hücre duvarlarının temel bileşenidir ve oranı bitkiye bağlı olarak %35-40 (w/w) arasında değişmektedir [10]. Selüloz aynı zamanda fungusların, bakterilerin [9,11], alglerin [12] ve bazı deniz hayvanlarının yapısında da [13] bulunmaktadır. Selüloz, birbirlerine β -1,4-glukozidik bağlar ile bağlanmış, glukoz alt ünitelerinden oluşan lineer bir polimerdir (Şekil 2.1). Doğal şartlar altında glukoz birimlerinin %98 (w/w)'den daha fazlası, moleküler enerji gereksinimlerini indirgeme biçimi olarak, *cis* konfigürasyonu gösterirler (detaylı bilgi için bkz. [13]). Bunun sonucunda β -1,4-glukozidik bağlar, sellobiyozu selülozun tekrarlamalı birimleri haline getirecek biçimde, şeker birimlerini molekülün vertikal eksenine etrafında 180° döndürürler (bkz. Şekil 2.1). Selülozun bileşke polimeri, glukozun 3. karbonundaki hidroksil grubu ile komşu piranozid halkasının oksijen atomu arasındaki zincir-içi hidrojen bağlarının sıkı bir biçimde tutulması şeklindedir. Aynı zamanda piranoz halkasının 2. ve 6. karbon pozisyonlarındaki hidroksil grupları arasında da hidrojen bağı oluşumu meydana gelebilmektedir. Selüloz molekülleri, 10-15 molekülün bir araya gelmesi ile proto-fibriller (4 nm eninde) şeklinde gruplar oluştururlar. Bunlar mikrofibrilleri (25 nm eninde) oluşturmak için yaklaşık 40 proto-fibrilden oluşan gruplar halinde bir araya gelirler. Mikrofibriller 3. karbondaki hidroksil grubu ve bitişik zincirlerdeki piranoz halkasındaki oksijen atomu ile birbirlerine tutunurlar. Bunlar daha sonra Van der Waals bağları ile güçlenirler [14].

Glukozun depo polimeri olan nişastanın aksine, selülozun rolü sadece yapısaldır. Selülozun gerilmeye karşı yüksek dayanıklılığı, bitki hücrelerinin ozmotik basınca karşı dayanabilmelerini sağlar ve bitkilerin mekanik baskılara karşı

direncinden sorumludur. Selülozun mekanik dayanıklılığı, özellikle tekstil fibrillerinde (pamuk ve keten gibi) açıkça görülmektedir.



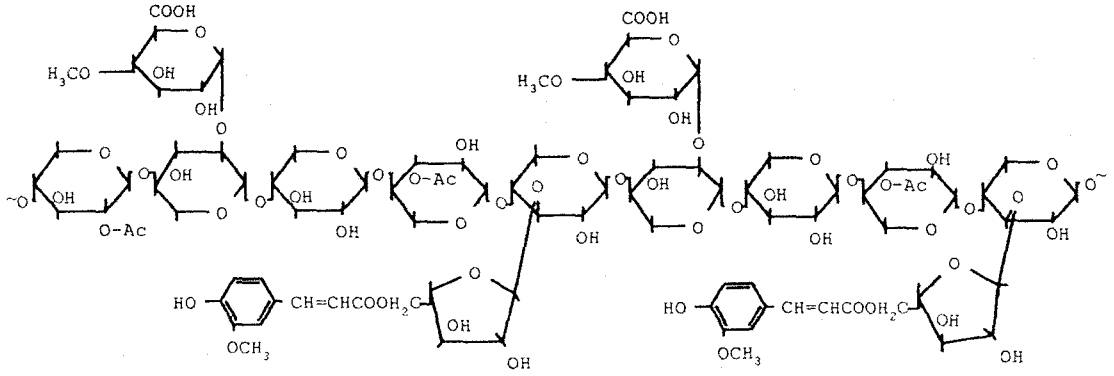
Şekil 2.1. Selülzoun yapısı ve selülzoun tekrarlamalı birimi sellobiyoz. [15]'e göre yeniden çizilmiştir.

Selüloz, kökenine bağlı olarak 5×10^4 ile $2,5 \times 10^6$ Da arasında değişebilen [16], yüksek moleküler ağırlığa sahip doğal bir polimerden oluşur. Selülozun moleküler ağırlığı (M_r) glukopiranozidin M_r 'na bölüldüğünde, polimerizasyon derecesi (PD) elde edilir. Genelde vasküler bitkilerin birincil hücre duvarlarından köken alan selülozun polimerizasyon derecesi 1000-4000 aralığındayken, ikincil hücre duvarından elde edilen selülozun PD'si 8000-10000 arasındadır [16,17].

2.1.2. Hemiselüloz

Başlangıçta hemiselüloz, selülozun öncüsü olarak düşünülmüştür, bu nedenle de hemiselüloz adı verilmiştir. Aslında hemiselüloz ve selüloz, birbirinden yapısal ve kimyasal kompozisyon bakımından ayrılmaktadırlar. Hemiselülozlar bitki hücre duvarları içinde selüloz ve lignin ile birleşmiş olarak bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip hetero-polisakkaritlerdir (bkz. Şekil 2.2). Odunsu bitkilerden köken alan hemiselülozlar, genellikle D-arabinoz, D-galaktoz, D-galaktronikasit, D-glukoz, D-glukuronikasit, D-ksiloz, D-mannoz ve 4-O-metilglukuronikasit gibi birkaç şeker yapısından meydana gelmektedir [18]. Ot ve tahıl kaynaklı hemiselülozların şeker yapılarının çeşitliliği ise odunsu olanlara oranla daha azdır ve yaygın olarak D-ksiloz, D-glukoz, L-arabinoz ve D-galaktoz'dan meydana gelmektedir. Bununla birlikte odun hemiselülozunun aksine *Gramineae* kökenli hemiselülozlarda, dokunun yaşına bağlı olduğu kadar türe ve tek bir tür içerisindeki farklı dokulara bağlı olarak, bağlarda ve dallanma tiplerinde büyük bir çeşitlilik göstermektedirler. Sert-odunun,

yumuşak-odunun, buğday samanının ve şeker kamışı küspesinin şeker kompozisyonu için analitik bir veriden ve çeşitli polisakkaritlerin kompozisyonlarına ait bilgilerden yararlanılarak, bu dört farklı lignoselülozik materyalin kimyasal bileşimleri Çizelge 2.2’de özetlenmektedir.



Şekil 2.2. Tipik tahıl arabino-4-O-metilglukuronoksilan’ının yapısı. [19]’a göre yeniden çizilmiştir.

Baskın hemiselüloz olan ksilan, biyosferde sentezlenen biyo-polimerlerin selülozdan sonra, en bol bulunanlarından birisidir. Ksilanın miktarı, kayın odununda kuru ağırlığın %35’ini oluştururken, bazı gymnospermlerde bu oran %7’ye kadar düşmekte [20], dolayısı ile farklı bitkilerde farklı oranlarda bulunmaktadır. Ksilanlar, karasal bitkilerde β -1,4-bağlı D-ksilozil iskeletinden meydana geldikleri halde, deniz alglerinde β -1,3-bağlı D-ksilozil iskeletlerinden meydana gelen farklı kimyasal yapıya sahip ksilanlar da bulunmaktadır [21]. *Rhodymenia palmata* gibi bazı deniz yosunlarında ise β -1,3 ve β -1,4 bağlarının bir karışımını içeren ksilanların varlığı da bilinmektedir [22,23]. Karasal bitkilerden köken alan ksilanlar, yapılarında büyük değişiklikler gösteren ve birbirleri ile ilişkili olan geniş bir hemiselülozlar grubunu oluşturan hetero-polisakkaritlerdir. “Hetero-” ön eki, polimerin yapısında D-ksiloz haricinde diğer şekerlerin de bulunduğu işaret etmektedir. Ksilanların kimyasal yapıları ile botanik kökenleri arasında olduğu gibi, sitolojik yerleşimleri arasında da bir ilişki bulunmaktadır. Dolayısı ile ksilan içeren materyaller içerisinde, birbirlerine yakın yapıya sahip fakat, bir kaç özellikleri ile ayrılan bir kaç farklı ksilan polimerine sahip, kesin bir komplekslilik derecesi bulunmaktadır.

Çizelge 2.2. Dört farklı lignoselülozik materyaldeki polisakkaritler. Çizelgedeki değerler ilişkili materyallerin asit hidrolizatlarının analizleri sonucu elde edilmiştir. [24]'e göre yeniden düzenlenmiştir.

	Pamuk*	Çam	Saman	Küspe
Glukan	42,38	42,37	31,93	38,84
Ksilan	13,03	5,94	18,95	21,43
Mannan	2,05	11,02	0,15	0,20
Arabinan	0,25	1,28	2,08	1,40
Galaktan	0,33	2,29	0,56	0,34
Toplam	58,2	62,90	53,80	62,46

* Değerler kuru hammaddenin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

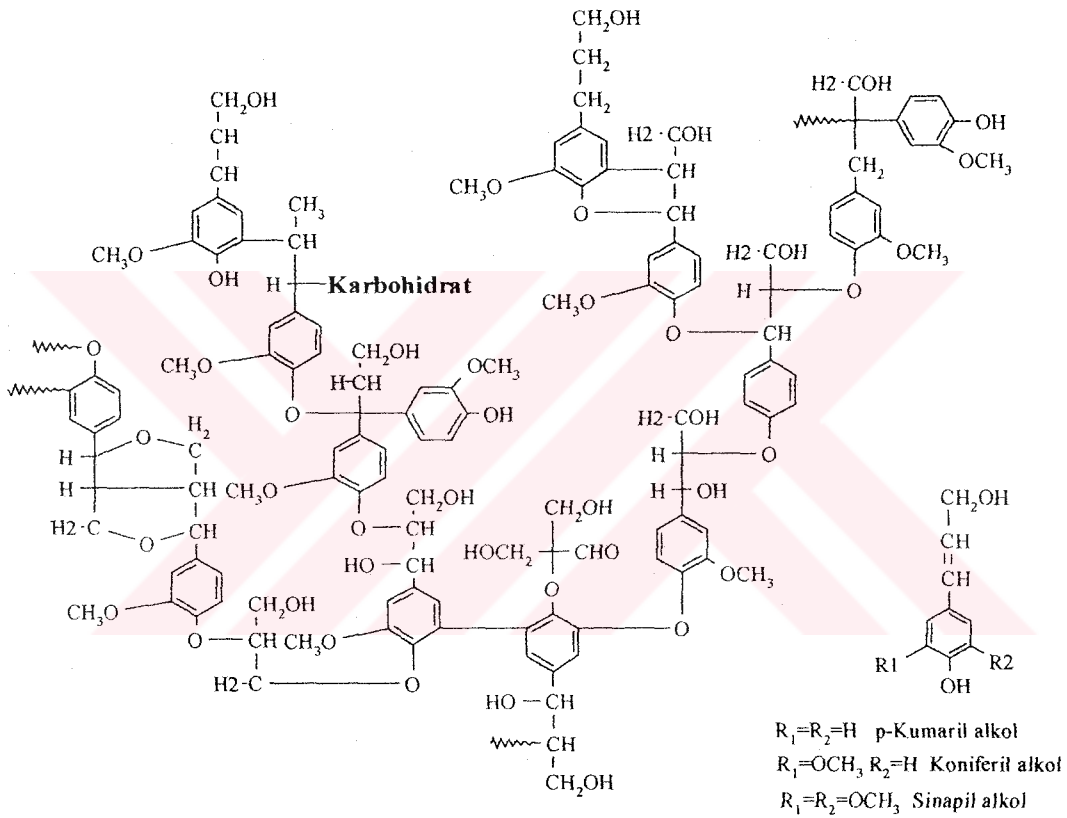
Karasal bitkilerin ksilanları, ligninlenmiş dokuların tamamının hücre duvarlarında çeşitli oranlarda buldukları gibi, yosunlar ve eğrelti otlarına kadar çeşitlenebilen bitki türlerinde de bulunabilmektedirler [25]. Ksilanlar, genellikle yapısal fonksiyonlara sahip dokuların sekonder duvarlarının bileşenidirler, fakat aynı zamanda depolama fonksiyonlarının olduğu bazı bitki türlerinde ve tohumların primer duvarlarında olduğu kadar, büyümekte olan hücrelerin birincil duvarlarında da bir dereceye kadar bulunabilmektedirler.

Ksilanlar, hücre duvarlarında yer aldıkları çeşitli yapısal yerleşimlerin tamamında, diğer yapısal bileşenlerle, özellikle selüloz mikrofibrilleri ve diğer selülozik olmayan polisakkaritlerle ve birçok durumda da ligninle ilişkiye girerler. Kovalent bağlar, ksilanları lignin ve bazı fenolik asitlere bağlarken, ksilanların diğer polisakkaritlerle olan kovalent olmayan bağlanmaları ise hidrojen bağlarının oluşması ile sağlanır.

2.1.3. Lignin

“Lignin” terimi Latince’de odun anlamına gelen “Lignum” kelimesinden türetilmiştir ve selülozdan sonra, doğada doğal olarak ortaya çıkan ve en bol bulunan polimerdir. Tipik bir odun fibrilinde lignin, orta lamelde, primer ve sekonder hücre

duvarlarında bulunur. Proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritler gibi doğal olarak ortaya çıkan diğer polimerlerden farklı olarak lignin, düzenli ve kesin bir kimyasal bileşime sahip değildir (Şekil 2.3). Lignin, bitkilerde *p*-hidroksinamil alkollerden bitki peroksidazları aracılığı ile gerçekleşen radikal eşleştirme ile sentezlenir. Bu rast gele eşleştirme aril gliserol- β -aril eter, bifenil, difenileter, fenilkumaran ve 1,2-diarilpropan gibi çeşitli kimyasal bağlar ile kompleks, üç boyutlu, fenolik bir polimerin oluşumu ile sonuçlanır [9].



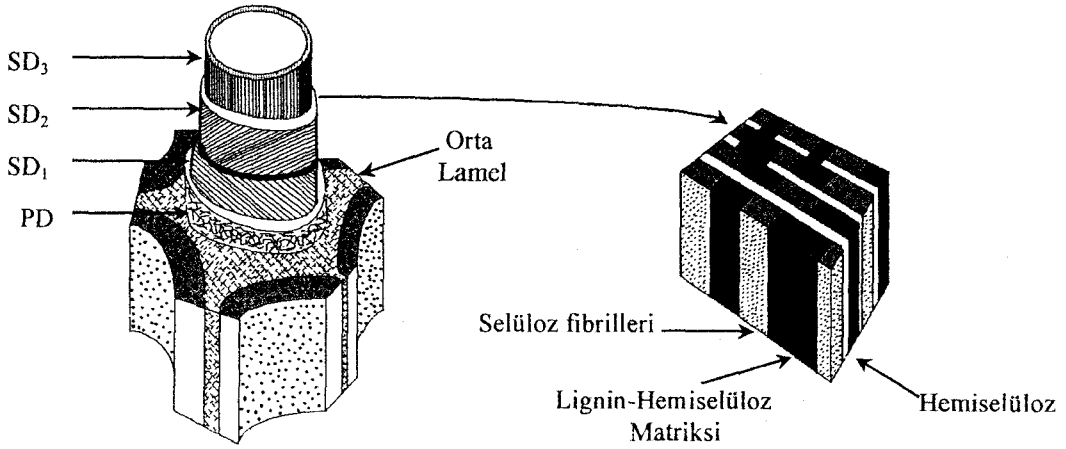
Şekil 2.3. Yumuşak odun lignininin şematik çizimi. [26]'ya göre yeniden çizilmiştir.

Ligninin bu moleküler kompleksliği onu, lignoselüloz ile birlikte, bitkisel materyallerin kimyasal ve biyolojik yıkımını sınırlayan inatçı bir doğal sübstrat yapar. Şekil 2.3'de ligninin şematik yapısal bir formülü gösterilmektedir. Bununla birlikte lignin, bitki dokularında çok önemli mekanik bir role sahip olmanın yanı sıra (örneğin; mekanik baskılara karşı direnç kazandırarak ve hücreler arasında bağlayıcı bir ajan rolü üstlenerek) [27], bitki patojeni mikroplar tarafından gerçekleştirilecek

mikrobiyal saldırıya karşı dirençlilik ve su geçirmez ksilem dokusunun oluşumunu da sağlamaktadır [28,29].

2.2. ODUN HÜCRE DUVARININ KİMYASAL YAPISI

Kerr ve Goring [30], selüloz, hemiselüloz ve ligninin hücre duvarı içindeki düzenini tanımlayan bir model öne sürmüşlerdir. Her odun hücresi orta lamel ve birbirine yapışık hücrelerin sekonder duvarlarında selüloz mikrofibrillerinin birbirine paralel senkronize olduğu, her bir tabakanın farklı yönelime sahip olduğu ve SD₁, SD₂ ve SD₃ olarak dizayn edilen birkaç tabaka oluşturur (bkz. Şekil 2.4). SD₃ tabakası, sekonder duvarın en dışındaki tabakadır. SD₂ tabakası ise en geniş tabakadır ve SD₁ ile SD₃ arasında bulunur. SD₁ tabakası, hücre lümenine en yakın olan tabakadır. Lignin temelde, orta lamelde en yoğun konsantrasyona sahiptir fakat, sekonder duvarın tamamında da bulunabilir. Selüloz ve hemiselüloz da temelde SD₁, SD₂ ve SD₃ tabakalarında, farklı fibril yönelimleri ile dağılmış olarak bulunabilir. Hemiselülozlar, ana-bileşenleri ksilanlar ve glukomannanlar olmakla birlikte, kompleks karbonhidrat polimerlerinin bileşimidirler. Çoğu ksilanlarda, ksilan iskeleti değişik oranlarda asetil, metilglukuronil ve arabinofuranozil yan zincirleri taşırlar [31]. Arabinofuranozil grupları daha sonra, lignin-hemiselüloz bağlarına neden olan eter bağlarına ortak oldukları düşünülen [32], ferulik ve *p*-kumarik asit gibi aromatik asitler tarafından esterleştirilebilirler [33]. Lignin yüksek derecede dallanma gösteren, aromatik alkollerin serbest radikal kondansasyonu ile oluşturulmuş rasgele bir polimerdir [34]. Hemiselüloz ve selüloz, sekonder hücre duvarında lignine fiziksel ve kimyasal olarak bağlıdır. Lignin ve polisakkaritler arasındaki kimyasal bağlardan bazıları ester, eter, ketal ve hidrojen bağlarını içerir [35,36]. Bunun da ötesinde Obst [37], ligninin her 36 fenilpropan birimine bir karbonhidrat bağı düştüğü şeklinde bir korelasyon önermiştir.



Şekil 2.4. Odun fibrillerinde hücre duvarı tabakalarının organizasyonu (a), sekonder hücre duvarlarında lignin ve hemiselülozun selüloz mikrofibrilleri ile olan muhtemel ilişkisi (b). Her bir hücrenin çapı yaklaşık 25 µm'dir. [15]'e göre yeniden çizilmiştir.

2.3. LİGNOSELÜLOZ YIKIMINDA ROL ALAN ENZİMLER

Teknolojik amaçlı kullanımlar için geliştirilebilir aktiviteye sahip farklı enzimlere olan ihtiyacın artması, araştırmaları, bu gibi enzimlerin kaynağını yüksek organizasyonlu hayvan ve bitkilerde [örneğin; bayırturpu ve şalgam köklerinden HRP (Horseradish Peroxidase)] aramaktansa, mikroorganizmalarda, özellikle de ekolojileri ve sekonder metabolit üretimleri hakkındaki çok iyi dokümantasyona sahip olunması nedeni ile aktinomisetlerde ve funguslarda, aramaya daha çok yönlendirmiştir. Mikroorganizmalardan izole edilen enzimler günümüzde, ilaç endüstrileri ve moleküler biyolojide olduğu kadar, gıda işlemlerini ve deterjan üretimini de içerisine alan çeşitli proseslerde kullanılmaktadır. Üretilen bu enzimler içerisinde selülazlar, ksilanazlar ve kitinazlar gibi bir takım hidrolitik enzimler vardır. Lignoselülozun degradasyonunda ise selülazlar [15], ksilanazlar [24], peroksidazlar ve lakkazlar [28] rol almaktadır.

2.3.1. Selülazlar

Lignoselülozik materyalleri degrades edebilen tüm organizmalar, birbirleriyle ortak işlev gören, farklı özelliklere sahip çeşitli enzimler üretirler (detaylı bilgi için bkz. [15]). Selülazlar ve ksilanazlar aerobları, anaerobları, mezofilleri, termofilleri

ve ekstremofilleri içine alan çok çeşitli bakteriler ve funguslar tarafından üretilmektedirler. Aerobik bakteriler ve funguslar, genellikle ekstraselüler selülozlar ve hemiselülozlar üretirler [38]. Temel olarak selüloz sistemleri aşağıdaki enzimlerden oluşmaktadır:

i. *Endo-1,4-β-endoglukanazlar (1,4-β-D-glukan 4-glukanohidrolaz; EC 3.2.1.4)*: Endoglukanazlar, sello-oligosakkaritlerin olduğu kadar amorf, şişirilmiş ve yan-gruplu selülozların zincir içi 1,4-β-glukozidik bağlarını spesifik olarak kırarlar [38,39]. Bazı endoglukanazlar β-1,4 ve β-1,3 bağların karışımından oluşan arpa glukana da saldırabilirler [40].

ii. *Ekzo-1,4-glukanazlar (1,4-β-D-glukan sellobiyohidrolaz; EC 3.2.1.91)*: Endoglukanazlar gibi bu enzimler de amorf ve şişirilmiş selüloz üzerinde yüksek aktivite gösterirler fakat, kristalli formdaki selülozu veya sello-oligosakkaritleri daha zayıf ölçüde degrade edebilirler [41]. Genel olarak, selüloz zincirinin indirgenmemiş ucundan sellobiyoz veya glukozun herhangi birini serbest bırakan enzimler olarak ifade edilebilirler [42,43].

iii. *1,4-β-glukozidazlar (1,4-β-D-glukozid glukohidrolaz; EC 3.2.1.21)*: β-glukozidazlar, özel olarak aril-β-D-glukozidleri hidrolize eden β-D-glukozidazlar, diglukozidleri ve sello-oligosakkaritleri hidrolize eden sellobiyazlar ve geniş sübstrat spesifitesine sahip β-glukozidazlar olarak sınıflandırılabilirler [38]. Genel olarak sellobiyozu, glukozu hidrolize eden enzimler olarak tanımlanabilirler [44].

Selülozlar genellikle, hidroliz ürünlerinin yüksek konsantrasyonlarında, muhtemelen katabolik represyonla, inhibisyona uğrarlar [43, 45-48]. *Aspergillus terreus*'dan elde edilen ekzo-1,4-glukanaz ve sellobiyazın, Hg²⁺ varlığında inhibe olduğu da bildirilmiştir [49]. Bununla birlikte, *Sclerotium rolfsii*'nin endo-1,4-β-endoglukanazı ile yapılan bir çalışmada sellobiyozun indükleyici etkisi de rapor edilmiştir [50].

Sellobiyoz oksidaz ve sellobiyoz dehidrogenaz gibi selülozun degradasyonunda oksidatif role sahip diğer enzimler, bir çok fungusta tanımlanmıştır [51]. Sonuçta, geçtiğimiz on yıl içerisinde, selülozun değerli ürünlere dönüştürülebilmesi için enzimlerin gelecekteki endüstriyel uygulamalarını geliştirme doğrultusunda, selüloz degradasyonu üzerine hatırı sayılır miktarda araştırmalar yapılmıştır.

2.3.2. Hemiselülazlar

Hemiselülozun yapısı, selülozun tekrarlamalı glukoz bloğu tipi yapısından daha komplekstir. Ksilan, hemiselülozda bulunan en yaygın iskelet yapısıdır. Bununla birlikte, hemiselüloz yapısı aynı zamanda, hidrolizi gerçekleştirebilmek için daha kompleks bir enzimler takımı gerektiren, dallanmış hetero-polisakkaritlere sahiptir. Monomerler arası bağları rast gele ayıran enzimlerin (endo- enzimler), zincirin sonundan monomerleri uzaklaştıran enzimlerin (ekzo- enzimler) ve dimerleri hidrolize eden enzimlerin birlikte çalışmasına ihtiyaç vardır. Bu enzimler, endo-1,4- β -ksilanaz (1,4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz; EC 3.2.1.8), β -ksilozidaz (1,4- β -D-ksilan ksilohidrolaz; EC 3.2.1.37), α -glukuronidaz (EC 3.2.1.139), α -L-arabinofuranozidaz (EC 3.2.1.55) ve asetil ksilan esterazı (EC 3.1.1.72) içerir. Dallanmış asetil ksilanın karbonhidrat monomerlerine tamamen degradasyonunun elde edilebilmesi doğrultusunda hemiselülolitik enzimlerin birlikte çalışması gerekmektedir [19,52-54].

Ksilanazların özellikleri hakkındaki mevcut bilginin çok büyük bir kısmı, bakteriyel ve fungal enzimler üzerine yapılan çalışmalardan köken almaktadır. Mikrobiyal ksilanazlar 8-145 kDa arasında değişen moleküler ağırlıkları ile tek alt-üniteli proteinlerdir [55]. Bakteriyel ve fungal kaynaklardan elde edilen endoksilanazların optimum aktivite sıcaklıkları 40°C ile 60°C arasındadır. Fungal ksilanazlar, genellikle bakteriyel ksilanazlara kıyasla daha az termostabildirler. Bakteriler, yüksek moleküler ağırlıklı asidik ksilanazlar ve düşük moleküler ağırlıklı bazik ksilanazlar olmak üzere iki tip ksilanaz üretirler. Bununla birlikte bu tarz bir ilişki funguslarda gözlenmez, fakat düşük moleküler ağırlıklı bazik ksilanazlar yaygındır [56].

Ksilanazlar tarafından gerçekleştirilen hidroliz, genellikle karbonhidratların indirgenmiş şeker monomerlerinin anomerik merkezinde tutuklanma veya inversiyon ile sonuçlanır. Bu durum, bir veya iki geçiş basamağının işe karıştığını gösterir [56,57]. Glukozil transferi, genellikle anomerik merkezdeki doymuş karbonda nükleofilik yer değiştirme ile sonuçlanır ve anomerik konfigürasyonun tutuklanması veya inversiyonu ile meydana gelir [57]. Selülazlar ve ksilanazlar gibi polisakkaritleri hidrolize eden enzimlerin çoğunun sübstratlarını, C₁ anomerik konfigürasyonunda tutuklama ile hidrolize ettikleri bilinmektedir. Ksilanazlar temelde, okso-karbonyum benzeri dönüştürme basamağı tarafından oluşturulan ve hidrolizlenen glukozil enzim ara-basamağı içeren, çifte yer değiştirme mekanizması sergilerler [56,57].

Leggio ve ark. [58] *Pseudomonas fluorescens*'in ksilanaz A enzimine, ksilopentoz bağlanmasının kristallografik çalışmasına dayanarak, klasik görüşleri ve kendi çalışmalarından ortaya çıkan sonuçları birleştirerek, uygun bir enzim mekanizması öne sürmüşlerdir. Bu araştırmacılara göre ksilanazların etki mekanizması şu şekilde gerçekleşmektedir:

i. Ksilan, ksilanaz tarafından tespit edilir ve üç katlı solak bir heliks şeklinde bağlanır,

ii. Birinci yan-grup bölgesindeki ksilozil yapısı eğilir ve aşağıya, katalitik yapıya doğru çekilir, daha sonra glukozidik bağ enzim-sübstrat kovalentini oluşturmak için gerilir ve kırılır.

iii. Ara ürün, aktive edilmiş su molekülü tarafından saldırıya uğrar ve bunu tutuklayıcı glukozil mekanizması takip eder ve ürün oluşturulur [58].

Ksilanazların, ksilobiyoz ve laktoz ile indüklendikleri bilinse de [50], arabinoz ve onun katabolik ürünü olan arabitolle indüklendikleri de rapor edilmiştir [48]. Selülazlar gibi endoksilanazlar da, hidroliz ürünlerinin yüksek konsantrasyonlarında inhibe olurlar, fakat ksilanazlar söz konusu olduğunda inhibisyon, ksilobiyozun

yüksek konsantrasyonları ile meydana gelirken, ksilozun yüksek konsantrasyonları için bu durum geçerli değildir [38]. Ksilanazların Hg^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} ve Pb^{2+} gibi inhibitörlerin bulunduğu da inhibe oldukları rapor edilmiştir [59].

Her ne kadar ksilanaz izo-formları arasında sinerji sergilense de, selülozlar ve ksilanazlar arasındaki sinerjistik etki henüz açık değildir. Selülozlar içerisinde bulunan endo-ekzo- tipi sinerjistik etki için çok fazla kanıt yoktur. Çünkü, çoğu β -ksilozidazlar ksilan üzerinde aktivite gösteremezler [53]. Sinerjistik faaliyet, ekzo-ksilanazların ksilan hidrolaz oranını, endo-ksilanazlar tarafından serbest bırakılan fakat, β -ksilozidazlara daha dayanıklı olan büyük oligosakkaritlere saldırarak artırdığında ortaya çıkmaktadır [60]. Bununla birlikte ksilanazlar içerisinde gerçek bir sinerji, ksilan iskeleti asetil, arabinozil, glukuronozil gibi yapılardan oluşan yan-gruplara sahip olduğunda ortaya çıkabilir [53].

2.3.3. Peroksidazlar

Lakkazlar, peroksidazlar (lignin peroksidazları, mangan peroksidazları ve mangan-bağımsız peroksidazları içerisine alır), ve H_2O_2 oluşturan oksidazlar, lignin degradasyonunu gerçekleştiren enzim sistemlerinin bileşenleridirler [61-67]. Peroksidazların ekstraselüler lokasyonları ve endüstriyel uygulamalardaki potansiyeli, bu potansiyelin çoğunun *P. chrysosporium* gibi bazidiomiset grubu funguslara ait peroksidazların lignine saldırabilmesinden ileri gelmesi nedeniyle, yakın zamanda fungal peroksidazlar üzerine çalışmaları harekete geçirmiştir. En yoğun biçimde çalışılmış olan iki *P. chrysosporium* peroksidazı lignin peroksidaz (LiP) ve mangan-bağımlı peroksidaz (MnP)'dir [68]. *P. chrysosporium*, yine lignin degradasyonunda rolü olan, 15'i lignin peroksidaz ve geriye kalan 6 tanesi de mangan-bağımlı peroksidaz olmak üzere en az 21 peroksidaz izo-formu üretmektedir [69].

P. chrysosporium tarafından üretilen ve genellikle ligninazlar olarak bilinen lignin peroksidaz izo-formları, 38-43 kDa arasında değişen moleküler ağırlıkları ile birlikte, glukolizasyon dereceleri ile de birbirlerinden ayrılırlar [70]. Bunun yanı sıra

Thermomonospora fusca BD25 [66] ve *Streptomyces avermitilis* UAH30 [67] gibi aktinomisetlerden elde edilen peroksidaz izo-formlarının moleküler ağırlıkları ise 40-50 kDa arasında değişmektedir. *P. chrysosporium* tarafından üretilen lignin peroksidazların her izo-formu, tek bir ferriprotoporfirin IX (hem) molekülünü içermekte ve birbirleri ile örtüşen sübstrat spesifiteleri sergilemekte iken [71], *T. fusca* ve *S. avermitilis* tarafından üretilen lignin peroksidazlarda hem grubu belirlenmemiştir [66,67]. *P. chrysosporium*'un lignin peroksidaz izo-formları, nutrient açlığı ile oluşturulan sekonder metabolizma sırasında üretilirken [70], aktinomisetlerin peroksidazları primer metabolizma ürünüdürler [65-67]. LiP izo-formları, lignin ve ilişkili bileşiklerin depolimerizasyonunun başlangıcında merkezi bir rol oynarlar [71,72] ve azo-boyalar ile diğer aromatik kirleticilere de saldırabilirler [67,73]. Lignin peroksidazların aynı zamanda, veratril alkolün veratraldehite okside ettikleri de bilinmektedir [74]. Veratril alkol, bazidiomisetler tarafından fenilalaninden üretilir ve üretimi LiP'in üretimi ve lignin degradasyonunun başlangıcı ile aynı zamana denk gelmektedir [68]. Veratril alkolün kültür ortamına eklenmesinin LiP üretimini artırdığı [75] ve LiP'in, aşırı hidrojen peroksid bulunduğunda inaktivasyonunu önlediği bilinmektedir [76]. Veratril alkolün üretiminin düzenlenmesi, mangan düzeyleri ile gerçekleşmektedir ve bundan dolayı, mangan düzeylerinin MnP üretimini düzenlenmesindeki rolünün yanı sıra LiP üretimini düzenlenmesinde de dolaylı bir role sahip olduğu öne sürülmektedir [68].

Mangan-bağımlı peroksidaz, aynı zamanda lignin ve bir grup fenolik lignin model bileşiklerinin oksidasyon ve depolimerizasyonunu da hidrojen peroksid aracılığı ile katalizlemektedir [77]. MnP, fenolik organo-kirletici sübstratlara [73] ve azo-boyalara karşı da katalitik aktivite göstermektedir [78]. MnP'in aktivitesinin şekli, adından da anlaşılacağı üzere, mangan iyonlarının bulunuşuna bağlıdır. MnP, mangan iyonları ile indüklenir ve Mn(II)'yi Mn(III)'e okside eder. Mn(III), *P. chrysosporium* tarafından üretilen oksalat gibi, bir organik asitle birleştiğinde, tiyollerin varlığında fenolik olmayan yapıları okside edebildiği kadar, bazı basit fenolik yapıları ve fenolik lignin sübstratlarını okside edebilme yeteneğindedir [79]. Kısacası, fenolik bileşikle reaksiyon, bir takım metabolik yollar boyunca kararlı bir

ürüne degrede edilecek olan, fenoksi radikali oluşturmak için tek elektron oksidasyonudur.

Bunların arasında LiP ve MnP, fungusların en iyi büyüme gösterdiği ve enzimlerin optimum pH'larının yakınında çalıştıkları, en düşük pH değerlerinde ve mezofilik ortamlarda lignin depolimerizasyonunda önemli bir rol oynamakla birlikte, ekolojik yönden en önemli peroksidaz gruplarından birisini oluştururlar.

2.3.4. Lakkazlar

Tanım olarak lakkazlar, her ne kadar gerçek sübstrat spesifiteleri çoğu kez oldukça geniş ve enzim kaynağına göre değişkenlik gösterse de [80,81] *p*-difenollerin oksidasyonunu (*p*-difenol:oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) ve aynı zamanda, meydana gelen dioksijenin suya indirgenmesini katalizlerler. Lakkazlar (benzenediol:oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2), çok büyük bir çoğunlukla, 60-80 kDa arasında değişen moleküler ağırlıkları ile bakır içeren ekstraselüler glukoproteinlerdir [82].

Kimyasal ve katalitik özelliklerinden dolayı [83,84] teknolojik prosesler için fungal lakkazlar ve peroksidazların kullanımı üzerine çok büyük ilgi oluşmuştur. Odun çürükçülü fungusların ve bunların ligninolitik enzimler ile biyolojik kağıt hamuru proseslerinde kullanımının keşfedilmesi, kağıt üretim endüstrilerinde daha az enerji kullanımının ve bu proseslerin kimyasal gereksinimlerinin azaltılmasının yolunu açabilir. Bir biyolojik beyazlatma prosesi, alkali pH ve yüksek sıcaklıkta çok yüksek enzim aktiviteleri gerektirir.

Lakkazlar ve peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlar oldukça benzerdir [85-88]. Her iki tip enzim de fenolik bileşikler ve aromatik aminleri, sonuçta radikalleri oluşturan, tek elektron oksidasyonu ile okside ederler. Prostetik gruplarındaki farklılıkların ötesinde lakkazlar, peroksidazlardan aynı zamanda genellikle daha düşük oksidasyon potansiyellerine sahip olmaları ile de ayrılırlar [89,90]. Lakkazın, lakkaz-bağımlı oksidasyon reaksiyonları sırasında oksijeni

elektron alıcısı olarak kullandığı bilinmektedir [91,92]. Aynı zamanda, veratril alkolün lakkaz üretimini stimüle ettiği de bulunmuştur [93].

Lakkaz benzeri enzimler fenolik merkezleri, spontan polimerizasyona neden olacak fenoksi serbest radikali oluşturarak, bir elektronla okside ederler [82,92]. Polifenollerin sentezi fenollerden, kinonlardan, karbonhidratlardan ve N'lu şekerlerden humik yapıların oluşumu sırasındaki gerekli bir basamaktır.

Lakkaz, bazı bazidiomiset ve askomiset bireylerinde tesbit edilmiştir [82,92]. Çoğu beyaz çürükçül fungus, *P. chrysosporium* hariç olmakla birlikte, ekstraselüler lakkazlar üretirler. Bu enzimin, lignin degradasyonuna [94, 95], fenolik bileşiklerin detoksifikasyonuna [96] ve bazı klorofenolik bileşiklerin deklorize edilmesine [97] karıştığına inanılmaktadır. Farklı beyaz-çürükçül funguslar, farklı enzim kombinasyonlarını üretirler: LiP ve MnP üreten; MnP ve lakkaz üreten; LiP ve lakkaz üreten ve LiP veya MnP'in her ikisini de üretmeyip lakkaz ve aril alkol oksidaz (AAO) veya bazı başka enzimleri üreten funguslar vardır [61]. LiP-lakkaz grubuna dahil olan fungusların lignin degradasyon yeteneği çok daha düşükken, LiP-MnP ve MnP-lakkaz gruplarına dahil bir kısım funguslar etkin lignin degrede edicileridir [61]. Bu, MnP'in lignin degradasyonundaki önemli rolü nedeniyle olabilir. Bununla beraber, lignin degradasyonu kompleks bir süreçtir ve muhtemelen enzimlerin birbirleri üzerine sinerjistik etkileri vardır.

2.4. LİGNOSELÜLOZ YIKIMINDA ROL ALAN ORGANİZMALAR

2.4.1. Lignoselüloz Degrede Eden Bakteriler

Genellikle lignoselülozik materyallerin degradasyonunun temelinde funguslar tarafından yürütüldüğü kabul edilmektedir. Bunun sebebi, kısmen bu organizmalara lignoselüloz içerisine nüfuz edebilme yeteneği kazandıran, fungal büyümenin hifli yapısıdır. Normalde bakterilerin, ligninleşmiş odun hücrelerinin duvarının yıkımında sınırlı bir kapasiteleri bulunmaktadır. Bununla birlikte bakteriler, genellikle karışık mikrobiyal populasyonlarda ortaya çıkarlar ve birbirleriyle sinerjistik etki

gösterebilen bir dizi enzim üretmektedirler. Bu ara ilişkiler, en sonunda aerobik koşullar altında CO₂'e, anaerobik koşullar altında ise CO₂, metan ve H₂O'ya dönüştürülecek olan lignoselülozun tamamen yıkımına öncülük etmektedir.

2.4.1.1. Aerobik yıkım

Lignoselülitik artıkların biriktiği toprak yüzeyi, en önemli mikrobiyal habitatlardan birini oluşturmaktadır. Yüksek lignin içeriğine bağlı olarak odun, lignoselülitik yapıların en dirençlisini temsil eder. Ligninin tamamen degradasyonu, sadece *P. chrysosporium* ve bir kısım *Streptomyces* gibi birkaç mikroorganizma tarafından yürütülen oksidatif bir süreçtir. Bununla birlikte, daha geniş çeşitliliğe sahip bir grup mikroorganizma, özellikle de aktinomisetler, selülozik ve hemiselülozik sübstratlara ulaşabilme doğrultusunda lignoselülozun kısmi delignifikasyonunu gerçekleştirebilme yeteneğindedirler [5]. Alkali pH ve yüksek sıcaklıklarda, yüksek düzeylerde lignoselülitik aktivite üreten organizmalar içerisinde *Bacillus* üyeleri de *Streptomyces* üyeleri ile birlikte dikkate değer mikroorganizmaları oluşturmaktadır [57]. Öte yandan bu mikroorganizmaların bazı üyelerinin ya hiç ya da çok düşük selülaz aktivitelerine sahip olmaları, bunların kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanılabilme potansiyellerini artırmaktadır. Aerobik, lignoselülitik toprak bakterileri arasında *Cellulomonas*, *Pseudomonas (Cellvibrio)*, *Thermomonospora* [65,66,98] ve *Mikrobispora*, genusuna ait bazı türler detaylı bir biçimde çalışılmıştır.

2.4.1.2. Anaerobik yıkım

Lignoselülozun anaerobik degradasyonu gübre, kompost, atık su işleme tesislerinin çamurları ve deniz veya tatlı su sedimentleri gibi çeşitli anaerobik habitatlarda meydana gelmektedir. Bunlara ek olarak, lignoselülozun rumen ve gastro-intestinal boşlukta bulunan anaerobik mikroorganizmalar tarafından hidrolizi, ot-obur hayvanların beslenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Hayvan yeminin rumende degradasyonu, çeşitli bir takım enzimler üreten bakteriler, funguslar ve protozoonların kompleks bir kombinasyonu tarafından

gerçekleştirilmektedir. Rumende lignoselüloz degradasyonunun kompleks bir mikro-flora tarafından gerçekleştirilmesinin nedeni, bitki hücre duvarındaki selülozun glukuronoarabinoksilanların dolaylı ortaklığı ile korunmasından kaynaklanmaktadır [99]. Buna ilaveten, ksilanlar yüksek derecede asetillenmişlerdir. Ksiloz yapılarının %70'i ksilopiranoz halkasındaki C₂ veya C₃ pozisyonundaki hidroksil grubundan esterlenmiştir [24]. Bunun da ötesinde, dallanmış ksilan polimerleri esterlenmiş ferulik asit ve *p*-kumarik asitlerle birbirlerine, bitki hücre duvarının yapısal birlikteliğini de sağlayan, çapraz bağlarla bağlanmışlardır [100]. Bu kompleks sübstratla yüzleştikten sonra, rumen mikroorganizmalarının farklı özelliklere sahip çok çeşitli lignoselülolitik enzimleri üretiyor olmaları ise sürpriz olmamaktadır.

Detaylı bir şekilde çalışılmış olan selülolitik ve ksilanolitik bazı rumen bakterilerinden gram-negatif türler *Fibrobacter* (eski isimlendirmeye göre *Bacteriodes*) *succinogenes* ve *Butyrivibrio fibrisolvens* ve gram-pozitif türler *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens*'tir [101]. Selülolitik rumen fungusları, anaerobik Chytridiomyces üyelerini, özellikle de *Neocallimastix frontalis*, *Neocallimastix patriciarum*, *Neocallimastix R1*, *Neocallimastix joyoni*, *Sphaeromonas communis*, *Piromyces communis*, *Orpinomyces bovis* ve *Anaeromyces mucronatus*'u içerisine almaktadır [101]. Rumende selülozik bitki parçalarını kullanan bazı anaerobik siliatlar da tanımlanmıştır, örneğin; *Diplodinium* ve *Eudiplodinium* genusuna ait olanlar [101,102]. Protozoa'nın selülozu fagositozla içeri almasından dolayı, hidrolitik enzimlerin protozoonlar tarafından mı üretildiği yoksa selülolitik bakteriler tarafından üretilip sübstratla birlikte mi içeri alındığı sorusu ortaya çıkmaktadır. En azından *Eudiplodinium maggii*'de selülolitik enzimler siliat tarafından üretiliyormuş gibi görünmektedir [103].

2.4.2. Lignoselülozu Degrede Eden Funguslar

Funguslar lignoselülolitik materyali degrede edebilme yetenekleri doğrultusunda üç kategoride sınıflandırılmaktadırlar: beyaz-çürükçül funguslar, kahverengi-çürükçül funguslar ve yumuşak-çürükçül funguslar [104]. Beyaz-

çürükçül funguslar, odun polisakkaritler ve ligninin her ikisine birden veya tercihen lignine saldırıp degrede ederek, lignoselülozu etkin bir biçimde degrede edebilir [52]. Tipik olarak beyaz-çürümede, etkilenmiş odundan her ne kadar tercihen sadece lignin uzaklaştırılsa da, sağlam odunda bulunan lignin ve polisakkaritlerin eşit biçimde uzaklaştırıldığı süngerimsi, ipliksi ya da yapraksı yapı olarak tanımlanan çürüklükler ortaya çıkmaktadır [105]. Lignoselüloz degrede eden beyaz-çürükçül fungusların çoğu *Basidiomycetes*'e (örneğin *Agaricaceae*, *Corticaceae*, *Hydnaceae*, *Polyporaceae* ve *Telesporaceae*) veya *Ascomycetes*'in *Sphaeriales* ordosuna (örneğin; *Ustilago vulgaris*, *Xylana polimorfin*) aittirler [104].

Kahverengi-çürükçül funguslar, özellikle konifer odunlarından selüloz ve hemiselülozu seçici biçimde uzaklaştıran, hem patojenik hem de saprofitik türleri içermektedir. Enfekte odun, çok hızlı biçimde doğal dayanıklılığını kaybeder. Ani ayrılmalar ve çürüyen odun fibrilleri boyunca kırılmalar meydana gelir. İlerleyen aşamalarda odun, temelde ligninin modifiye yapılarından oluşan, kübik, koyu-kahverengi, çabucak dağılabilen parçalar halini almaktadır. Kahverengi-çürükçül funguslar bazidiyomisetlerdir ve tüm odun çürükçülü bazidiyomisetler içerisinde azınlığı oluştururlar (%10-26) [105]. Kahverengi-çürükçül funguslar, lignin degredasyonu için gerekli olan oksidatif fenol oksidaz veya peroksidaz aktivitelerine sahip değildirler. Bununla birlikte selüloz hidrolizi için, muhtemelen Fenton reaksiyonu ile üretilen düşük moleküler ağırlıklı şelatörleri, oksalatları ve hidroksil radikallerini içeren, etkin bir mekanizma geliştirmişlerdir [106].

Yumuşak-çürümeye neden olan funguslar ise, yüksek nem içeren ve suya doymuş oduna saldırabilirler. Bu funguslar *Ascomycetes* (veya *Deuteromycetes*) üyeleri olan *Penicillium*, *Thielavia* ve *Dactylomyces*'i içerisine almaktadırlar [105]. Bunlar, odun hücrelerinin duvarlarından çok önemli miktarlarda selüloz ve hemiselülozu uzaklaştırabilirler. Bazı yumuşak-çürüme meydana getiren *Aspergillus* üyeleri, önemli ksilanaz üreticileridir ve lignin model bileşiklerini degrede edebilirler, fakat yüksek moleküler ağırlığa sahip lignini veya ¹⁴C-işaretili sentetik dehidrogenasyon polimerlerini (DHP) çok zayıf ölçüde degrede edebilmektedirler [107].

Lignoselülozu degrede etme yeteneği gösteren organizmalar içerisinde en detaylı çalışılmış olanı, beyaz-çürükçül bir fungus olan *P. chrysosporium*'dur (detaylı bilgi için bkz. [52,91]. Arora ve ark. [108] *T. versicolor*, *Daedalea flavida*, *Dichomitus squalens*, *Phlebia fascicularia*, *Phlebia floridensis* ve *Phlebia radiata*'nın lignoselüolitik enzimleri üzerine yaptıkları çalışmada, bu organizmalardan hiç birisinin *P. chrysosporium*'un toplam organik madde miktarında meydana getirdiği kayıp miktarına (%52,5) erişemediklerini rapor etmişlerdir. Adı geçen organizmalar içerisinde en yüksek aktivite gösteren *D. squalens*, ancak %36,8 oranında organik madde kaybı meydana getirebilmiştir [108]. Aktinomisetler ile lignoselüloz degradesyonunun çalışılmasında araştırmaya bir başlangıç noktası olarak, *P. chrysosporium* için hali hazırda geliştirilmiş olan metodoloji ve bilgi uyarlanarak kullanılabilir. Bundan dolayı, aktinomisetler tarafından lignoselüloz degradesyonunun tespit edilmesi doğrultusunda, *P. chrysosporium*'un lignoselüloz degradesyon sisteminin ve metodolojilerinin tüm ayrıntıları ile gözden geçirilmesi önemlidir.

P. chrysosporium'un, *Chrysosporium lignorum* P-127-1 ve *Sporotrichum pulverulentum* olarak adlandırılmış olan sinonimleri sırası ile İsviçre ve Rusya'da izole edilmişlerdir. Buna rağmen *P. chrysosporium* adı günümüzde genel olarak benimsenmiştir [109].

P. chrysosporium üzerine yapılan çalışmalar, iki ana laboratuvarda 1970'lerin başlarına kadar uzanmaktadır. Bu laboratuvarlar, Kirk (Forest Products Laboratory, Wisconsin, U.S.A.) ve Eriksson'un (Swedish Forest Product Research Laboratory, Stockholm, Sweden) laboratuvarlarıdır. [¹⁴C]-lignin işaretleme teknolojilerinin gelişimi [110] ile desteklenen bu ilk çalışmalar, bu fungus ile gerçekleşen lignin degradesyonunun fizyolojisi üzerine yoğunlaşmıştır.

2.4.3. Lignoselülozu Degrede Eden Aktinomisetler

Aktinomisetlerin çevresel olarak en önemli yeteneklerinden birisi, lignoselülozu degrede edebilmeleridir. Her ne kadar son yıllarda, lignoselüolitik

aktinomisetler üzerine yapılan çalışmaların çoğu ağırlıklı olarak Crawford'un (Department of Bacteriology and Biochemistry, University of Idaho, U.S.A.) ve McCarthy'nin laboratuvarlarında (Department of Genetics and Microbiology, University of Liverpool, U.K.) yürütülmüş olsa da, uzun zamandır aktinomisetler gibi bakterilerin doğal habitatlarda lignoselüloz degradasyonuna karıştığından şüphelenilmiştir [111].

1954'lere kadar gidildiğinde, Hintli balıkçıların pamuk ağlarındaki bozulmadan *Streptomyces* ve *Nocardia* türlerinin sorumlu olduğu görülmektedir [112]. 1968'de Sorensen, ligninin *in vivo* koşullarda toprak bakterileri tarafından degradasyonunu rapor etmiştir [113]. 1974'de *Thermomonospora fusca*'nın lignoselüloza saldırdığı rapor edilmiştir [114]. Bununla birlikte, 1977'de Trojanowski'nin bulgularından öncesine kadar, aktinomisetler tarafından lignoselüloz degradasyonuna ilişkin kesin bir kanıt bulunamamıştır [115].

1978'de Crawford, [¹⁴C]-lignin-işaretli-lignoselülozu [¹⁴C]'a okside etme yeteneğine sahip bir grup *Streptomyces* suşu elde etmiştir. Bu suşlar ile gerçekleştirilen [¹⁴C]-lignin-işaretli-lignoselülozun oksidasyonu sonucunda, kullanılan toplam süstratın %17,7'sine varan [¹⁴C] geri kazanım düzeyleri elde edilmiştir [7]. Crawford'un grubu tarafından topraktan izole edilen diğer iki aktinomiset suşu olan *Streptomyces viridosporus* T7A ve *Streptomyces setonii* 75Vi2'nin ise ot lignoselülozunun lignin içeriğinin, sırası ile %44 ve %39'unu uzaklaştırabildiği gösterilmiştir [116]. 1980'lerde Crawford'un grubu tarafından yürütülen çalışmaların çoğu *S. viridosporus* T7A'nın lignoselüloz degradasyonu çalışması üzerine yoğunlaşmıştır. Bu arada, öncelikle Paul Broda ile Manchester'da başlatılan ve daha sonra Liverpool'da devam eden McCarthy'nin grubu iyi derecede lignoselüloz degradasyonu gösteren aktinomisetlerin belirlenmesi üzerine aktif bir araştırma programı başlatmışlardır. *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Thermomonospora* genuslarına ait organizmalarda, lignin-[¹⁴C]-lignoselüloz için geliştirilmiş en yüksek lignoselüloz degradasyon aktivitesini; sırasıyla %8 ve 7,5 [¹⁴C] ile *Streptomyces* sp. MT813 ve *Thermomonospora mesophila* göstermiştir [117].

Tuncer ve Ball [118], *Thermomonospora fusca* BD25 tarafından üretilen ekstraselüler lignoselülitik enzimlerle, sübstrat olarak kullanılan yulaf ksilanının %28,9'unun hidroliz edildiğini rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, sübstrat olarak öğütülmüş buğday samanı ve solubilize karaft hamurunu kullandıklarında ise bu materyallerin hidroliz oranlarının yulaf ksilanına oranla, sırasıyla 4- ve 6-defa daha az olduğunu, fakat bu iki sübstratın içerdikleri hemiselüloz miktarları dikkate alındığında ise hemiselülozun hidroliz oranlarının yine sırasıyla %22,2 ve %25,9 olarak gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

2.4.3.1. Aktinomisetlerin genel özellikleri

Aktinomisetler, hem doğal hem de insan yapımı, çok geniş çeşitliliğe sahip çevrelerde yaşayan başarılı bir bakteri grubu olarak düşünülmektedir [119]. Difteri (*Corynebacterium diphtheria*), cüzzam (*Mycobacterium leprae*) ve aynı zamanda tüberküloz (*Mycobacterium tuberculosis*) etmeni olan türler gibi, bazıları insan ve hayvan patojenleri olarak tanımlanmışlardır. Aynı zamanda, aktinomisetler tarafından meydana getirilen bir takım bitki hastalıkları da vardır, özellikle mısırdaki küllemeye (*Corynebacterium nebraskense*) ve domateste çürümeye (*Corynebacterium michiganense*) neden olan *Corynebacterium* genusuna ait olanlar, bunlara örnek verilebilir. Streptomycetes üyeleri ise bitkilerde sadece tek bir hastalığa neden olurlar, o da patates ve şeker pancarında görülen scab'dır. Scab hastalığında, her ne kadar diğer türler de işe karışsa da, hastalığa neden olan ajanın *Streptomyces scabies* olduğu düşünülmektedir [120].

Aktinomisetler toprak, kompostlar, küflü yemler, tatlı su, aktif çamur ve hayvan gübresi gibi habitatlardan izole edilebilirler. Toprak, 4×10^6 kob gr^{-1} 'i geçebilen mikroorganizma popülasyonunu veren bazı verimli toprak örnekleriyle birlikte, aerobik aktinomisetlerin en önemli ve en detaylı çalışılmış kaynaklarından birisidir. 1900'lere kadar geriye gidilecek olursa, ilk keşfedilen aktinomiset üyesi *Streptothrix chromogena*'dır. Bu organizmalar, toprağın organik materyali üzerinde kolonize olmaları ve yıkımında aktif olarak işe karışmaları nedeni ile önemlidirler

[121,122]. Toprakta bulunan aktinomiset izolatlarının %95'ini meydana getiren *Streptomyces* en önemli genustur [123].

Topraktaki organik materyalin çoğu, bitkilerden kaynaklanan lignoselüloz ve hayvanlar ve funguslardan köken alan kitin gibi, suda çözünmeyen polimerler halinde bulunur. Aktinomisetlerin bu çözünmeyen bileşiklerin içerisine nüfuz edebilmeleri ve degrade edebilmeleri, onları toprak sistemleri içerisinde önemli yapmaktadır. Aktinomisetler, metabolik çeşitlilik ve fragmentli miselleri veya sporlarının hava ve su kaynaklı etkili dağılımlarına bağlı olarak, hemen her yerde bulunabilmektedirler [119]. Sporlar, uzun periyodlar boyunca canlılıklarını koruyabilirler ve daha sonra kök parçaları ve benzeri partiküler organik nütrient kaynaklarının bulunması gibi, uygun koşullar altında çimlenirler. Bunun neticesinde organizma, yaşam döngüsünün devam edebilmesi için, nütrient kaynağı üzerinde gelişecek ve sonunda sporulasyon veya fragmentasyon ile yeni yaşam birimlerini meydana getirmektedir. Her ne kadar topraklarda büyümeyi kontrol eden ana çevresel faktör nütrient kaynaklarının bulunabilirliği olsa da sıcaklık ve pH gibi diğer değişkenlerin de etkisi olabilmektedir.

Çoğu toprak bakterileri mezofiliktir ve aktinomisetler de, laboratuvar koşulları altında 25-30°C civarında en iyi büyümeyi göstermeleriyle, istisnai değildirler. Nötralden alkaliye kadar değişebilen toprak pH'sı, genellikle aktinomisetler tarafından tercih edilmektedir. Organizmalar pH değerleri 5,0'den 9,0'a kadar olan çevresel koşullarda büyüyebilirler. Bunun yanı sıra asidofilik topraklardan streptomisetler izole edilebilirse de [124,125], bu organizmaların optimum pH'ları 7,0'ye yakındır. Topraklar, toprağın kesin tipine bağlı olarak, genellikle mezofilik, nötrofilik ve asidofilik aktinomisetlerin bir karışımını içerirler. Bunun aksine kompostlar, küflü yemler ve diğer kendiliğinden ısınabilen sistemler daha yüksek düzeylerde alkalifilik ve termofilik aktinomiset suşlarını bulundurlar.

2.4.3.2. Lignoselülozun aktinomisetler tarafından yıkımı ve modifikasyonu

Aktinomisetler söz konusu olduğunda lignoselülozun biyodegradasyonu, hidrolitik ve aynı zamanda oksidatif bir prosestir. Termofilik aktinomisetler, örneğin, çöl kumu ve kompostlar gibi çok değişik doğal sübstratlardan izole edilmişlerdir [126]. Ekstrakte edilmiş lignini ve DHP'lerini (Dehidrogenasyon Polimeri) degrede edebilen birçok aktinomiset ve öbakteri genusu bulunmaktadır [104] ve bu bakteriler, funguslara nazaran daha yüksek sıcaklıklara ve pH'a tolerans gösterebilirler. Bakteriye suşlar arasında özellikle aktinomisetler, lignin yapısını çok iyi modifiye ve solubilize edebilirler, fakat lignini mineralize etme yetenekleri sınırlıdır [52,104,127-129]. Büyük çoğunluğu, lignini sekonder metabolizmaları yoluyla degrede eden beyaz-çürükçül funguslara kıyasla aktinomisetler lignini primer metabolik aktiviteleriyle ve yüksek azot düzeylerinde degrede ederler. *Streptomyces* ve *Nocardia*'nın bazı türlerinin topraktaki bazı ligninleri degrede ettikleri gösterilmiştir [130]. Ot ligninlerinin, odunsu ligninlere nazaran, aktinomisetler tarafından daha etkin olarak saldırıya uğradıklarına dair bazı bulgular da mevcuttur [104]. Olumsuz koşullar altında aktinomisetler sporları sayesinde hayatta kalırlar [126]. Bu özelliklerinden dolayı aktinomisetler, her ne kadar selülozu ve lignini degrede edebilme yetenekleri funguslarındaki kadar yüksek olmasa da, kompostlama sırasındaki sıcaklık tepe değeri gibi uç koşullar sırasında lignoselüloz degradasyonunda önemli rol oynamaktadırlar [128,131].

Lignin polimerini kısmen depolimerize etme prosesinde, ligninin β -arileter bağları ayrılır ve fenilpropan yan-zincirleri ya uzaklaştırılır ya da modifiye edilir [132]. Bu proses modifiye edilmiş, suda çözünebilir, asitleştirilmiş bir solüsyon içerisinde çökecek bir lignin polimerinin üretimi ile sonuçlanır. Bu polimer asitle çöktürülebilir polimerik lignin (APPL, Acid Parcipitable Polymeric Lignin) olarak adlandırılır [133] ve bazı durumlarda APPL'nin daha düşük moleküler ağırlıklara degrede edebildiği ortaya konmuş olsa da [129,134] kültür ortamındaki yavaş metabolizmasından dolayı bir ara-basamağın aksine, lignin degradasyonunun bir ürünü gibi görülmektedir [117,134]. McCarthy ve çalışma arkadaşlarının [135] daha sonraki çalışmaları, APPL'nin lignin orijinli olduğunu doğrulamıştır. Diğer

analizler, inoküle edilmiş ve edilmemiş örneklerin APPL'leri arasındaki kimyasal farklılıkları göstermiştir [133]. Bu farklılıklar *S. viridosporus* T7A [133] ve *Streptomyces sp.* EC1'in [136] APPL'lerindeki fenolik, hidroksil ve karboksil gruplarının sayısındaki bir artışı içermektedir. Bunun da ötesinde *T. mesophila* tarafında üretilen APPL'de, humik asitlere bazı benzerliklerle birlikte, karbonhidratlar ve proteinler de tespit edilmiştir.

Lignoselüloz degradasyon prosesi, aromatik asit esterazları [137], H₂O₂-bağımsız fenol oksidazları [138] ve katalazları [128] olduğu kadar, ekstraselüler peroksidazları [118], selülazları ve hemiselülazları [54] da içerisine alan oldukça kompleks bir enzim sistemini içeriyor gibi görünmektedir.

Ramachandra ve çalışma arkadaşları [139] tarafından yayınlanan önemli bir makale, ekstraselüler, lignin-indüklenebilen bir peroksidazın bir izo-formunun saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu içermektedir. Bu çalışmada, *S. viridosporus*'un ekstraselüler peroksidazının, bu organizmanın lignin degradasyon sisteminin ana bileşeni olduğu ileri sürülmüştür [139]. *S. badius* 252 [140], *Streptomyces sp.* EC1 [141]. *Streptomyces avermitilis* UAH30 [67] ve *T. fusca* BD25 [65] gibi diğer aktinomisetlerde de bunu takiben ekstraselüler peroksidazlar tanımlanmıştır. Aslında ekstraselüler peroksidaz aktivitesi, tüm aktinomisetler içerisinde, hatta lignoselüloz degrade etme yeteneği göstermiyor gibi görünen türler de bile [136,142], yaygın bir özelliktir [128]. Termofilik bir aktinomiset olan *S. termoviolaceus* [143] ve *T. fusca* BD25 [67]'den ekstraselüler peroksidaz enzimlerinin saflaştırılarak biyo-fiziksel özellikleri tanımlanmıştır.

2.5.LİGNOSELÜLOZUN KOMPOST BİR ÇEVREDEKİ DEGREDASYONU

Kompostlama sırasında mikroorganizmalar organik maddeyi CO₂, biyokütle, termal enerji (ısı) ve humus benzeri bir son-ürüne dönüştürürler. Organik maddenin ana bileşenleri karbonhidratlar (örneğin selüloz), proteinler, lipidler ve lignindir. Mikroorganizmaların organik maddeyi asimile etme kapasitesi, sübstratın degradasyonu için ihtiyaç duyulan enzimleri üretebilme yeteneklerine bağlıdır.

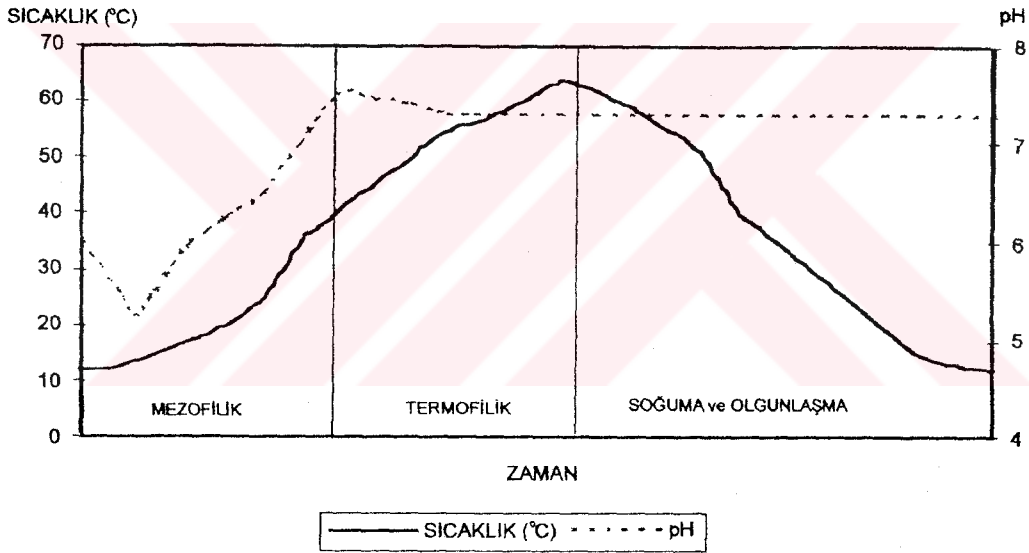
Sübstrat kompleksleştikçe daha geniş ve ayrıntılı enzim sistemine ihtiyaç duyulacaktır. Mikroorganizmaların bu sinerjistik aktiviteleri doğrultusunda kompleks organik bileşikler, mikrobiyal hücreler tarafından daha sonradan kullanılabilir daha küçük moleküllere yıkılırlar [144,145].

Optimal koşullar altında kompostlama, üç faz boyunca işleyiş gösterir: (i) mezofilik faz, (ii) birkaç günden birkaç aya kadar sürebilen termofilik faz ve (iii) birkaç ay süren soğuma ve olgunlaşma fazı (Şekil 2.5). Kompostlama fazlarının uzunluğu, kompostlanan organik maddenin yapısı, havalandırma ve karıştırmanın derecesi ile belirlenen, prosesin etkinliğine bağlıdır. Kompostlamanın başlangıcında kütle, çevrenin (oda) sıcaklığındadır ve genellikle hafif asidiktir. Monosakkaritler, nişasta ve lipidler gibi çözülebilir ve kolay yıkılabilir karbon kaynakları, mikroorganizmalar tarafından kompostlamanın ilk evrelerinde kullanılırlar. Bu bileşiklerin yıkımı sırasında organik asitlerin oluşmasından dolayı ortam pH'ı düşer. Bir sonraki basamakta mikroorganizmalar, amonyumun serbest kalması ve pH'ın artması ile sonuçlanacak olan proteinlerin yıkımına başlarlar. Kolay yıkılabilen karbon kaynakları tüketildikten sonra, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi daha dayanıklı bileşikler yıkılır ve kısmen humusa dönüştürülür [131].

Kompostlama, karışık mikrobiyal popülasyonların hızlı değişimleri ile yürütülen dinamik bir süreçtir. Kompostlamada rol alan mikroorganizmaların ana grupları aktinomisetleri de içine alan Bacteria ve Fungi'dir [145]. Her ne kadar kompostlama sırasında toplam mikroorganizma sayısı belirgin bir şekilde değişmese de, mikrobiyal çeşitlilik kompostlamanın değişik fazlarında değişiklik gösterebilir [146]. Değişimin kesin yapısı ve her bir kompostlama fazındaki mikroorganizma sayısı, sübstrata ve değişim sırasındaki bir önceki mikroorganizmaya bağlıdır [131].

Kompost yığınları ve benzer çevreler, çok çeşitli ve yoğun aktinomiset popülasyonları içerirler. Kompostlama prosesinin erken safhasında aktinomisetler öncül-dominant mezofilik türler olarak bulunurlar. Bununla birlikte, yığın içerisindeki organik maddelerin (genellikle hayvan dışkı ve saman gibi lignoselülozik materyal) dekompozisyonu devam ettikçe, kendiliğinden ısınma

meydana gelir. Sıcaklık yükseldikçe ortam koşulları mezofilikten termofilik popülasyonlar için daha uygun hal almaya başlar. Sıcaklık 60°C'ı aştığında mikrobiyal aktivite dramatik bir şekilde düşer, ama kompost soğuduktan sonra diğer bakteri grupları ile birlikte aktinomisetler yeniden dominant duruma geçerler [148, 149]. Nemli ve amonifikasyon sebebi ile nötralden alkaliye doğru değişen çevre de aktinomisetlerin büyümesini teşvik eder. Kontrollü kompost yığınlarının düzenli olarak karıştırılması, büyümeyi teşvik etmek için önemlidir ve kompostlama prosesini inhibe edebilecek anaerobik ve dolayısı ile de asidik mikro-çevrelerin oluşumunu önleyerek, aerobik bir çevrenin oluşması garanti altına alınmış olmaktadır [119]. Bu koşullar, aktinomisetlerin yoğun ve hızlı bir şekilde üremeleri için idealdir, öyle çok ürerler ki kompost yığınlarının yüzeyinde “yanma” olarak da bilinen şekilde, çıplak gözle bile görülebilirler.



Şekil 2.5. Optimal koşullar altında kompostlama süreci. [147]'den düzenlenmiştir.

Her ne kadar küçük miktarlarda *Saccharopolyspora* ve *Pseudonocardia* üyeleri de bulunsa da, olgun kompost yığınlarında bulunan aktinomisetlerin geneli *Streptomyces* ve *Thermomonospora*'nın termofilik suşlarıdır [150]. *Thermoactinomyces* ve *Bacillus* gibi aktinomiset olmayanlar da aynı zamanda yüksek miktarlarda bulunurlar. Odun çürükçülü *Streptomyces* türleri, oduna saldıran diğer mikroorganizmalara karşı antogonistik özellikleri ile önemli bir grup oluştururlar. Diğer bir taraftan, bir çok bakterininin beyaz-çürükçül funguslar ile

ilişki içinde olduğu belirlenmiştir. Bu bakteriler, hifsel büyümeyi teşvik edecek yapıları sağlıyor olabilirler ve aynı zamanda selüloz degradasyonunun sellobiyoz ve glukoz nedeniyle meydana gelen katabolik inhibisyonunu da, bu şekerleri kullanarak azaltıyor olabilirler [52].

Termofilik aktinomisetlerin kompost yığını çevresindeki etkisi, topraklardaki etkilerinden daha büyük olabilir. Bu nedenle aktinomisetler bu çevrede, termofilik faz sırasında 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda funguslar da dahil olmak üzere tüm ökaryotik faaliyetin sekteye uğraması nedeni ile aktinomisetlerin kompost yığınındaki lignoselülozik materyali ve diğer dirençli maddeleri kolonize etmesi ve yıkması, kompostlamanın başarısı açısından daha önemli bir hal almaktadır [147].

2.6. AKTİNOMİSET ENZİMLERİNİN ve DİĞER ÜRÜNLERİNİN ENDÜSTRİYEL ÖNEMİ

Geçtiğimiz kırk yıl içerisinde mikrobiyal endüstri, teknolojik ilerlemeyi destekleyen önemli bir alan haline gelmiştir ve çeşitli enzimler ve diğer mikrobiyal ürünler, bu proste önemli bir rol oynamıştır [151]. Aynı zamanda, şu anki enzim pazarının 1,4 milyar Amerikan Doları'na ulaşan değeri ve yıllık %5 oranında büyümesi beklenen pazarı ile birlikte, dünya çapında pazar meydana getiren bir endüstridir [152].

Selülaz, hemiselülaz ve pektinaz enzimleri, gıda biyoteknolojisinde, meyve ve sebze sularının ekstraksiyonu ve berraklaştırılmasında, meyve nektarlarının ve pürelerin üretiminde, zeytinyağının ekstraksiyonunda, fırıncılık ürünlerinin (unlu mamüllerin) kalitesini geliştirmede ve bira ve şarap endüstrisinde kullanılmaktadırlar. Selülaz ve hemiselülaz enzimleri, ayrıca hayvan yemi biyoteknolojisinde de kullanılmaktadır. Tekstil ve deterjan biyoteknolojisinde, çamaşırhanelerde de selülaz enzimleri kullanılmaktadır. Kağıt ve kağıt hamuru biyoteknolojisinde lakkazlar ve peroksidazlar gibi ligninolitik enzimlerin kullanımı üzerine yoğun araştırmalar mevcuttur. Bu araştırmaların sonucu olarak çevre dostu teknolojiler geliştirilmekte, Finlandiya ve Kanada gibi ormancılık endüstrisinin

gelişmiş olduğu ülkelerde kullanılmaktadır (detaylı bilgi için bkz. [153]). Deterjan ve gıda endüstrileri, kullanılan endüstriyel enzimlerin %75'ini kullanmaktadırlar: bunlar, diğer bütün ticari enzimlerin miktarlarına oranla kullanılan hacimler anlamında, temelde proteazlar ve amilazlar gibi hidrolitik enzimlerdir. Pazarın daha sonraki %10'luk kısmını, çoğu kez özel bir sübstrata karşı yüksek bir spesifite gösteren, hidrolitik olmayan "özel" enzimler oluşturur ve diagnostik, analitik ve farmasötik endüstrilerde uygulama alanları bulurlar.

Her ne kadar enzimler ve antibiyotikler, mikroorganizmaların en önemli iki ürünü olsalar da mikrobiyal endüstri, vitaminleri ve biyolojik insektisidleri de içerisine alan, çok çeşitli ve kullanışlı diğer ürünleri de üretmektedir. Endüstriyel ve ticari açıdan önemli ürünlerin üretiminde rol alan organizmaların çoğunluğunu ise aktinomisetler oluşturmaktadır [152].

2.7. ÇALIŞMANIN AMACI

Türkiye'de, Türkiye'ye özgü genelde aktinomiset özelde ise *Streptomyces* suşları ile lignoselülitik enzim aktiviteleri üzerine yapılmış mevcut bir çalışma henüz yoktur. Türkiye'de yapılan çalışmalarda kullanılan aktinomiset suşlarının genellikle Avrupa kökenli Kültür Koleksiyonlarından temin edilen suşlar olması nedeni ile, bu alanda Türkiye'ye ait suşların enzimatik potansiyellerinin tespit edilmesi, mevcut verilerle kıyaslanarak endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirliğinin belirlenmesi önemli görülmektedir.

Bu çalışmada, tamamı Türkiye'den izole edilmiş ve tanımlanmış olan *Streptomyces* suşlarının (bkz. Çizelge 3.1) lignoselülitik enzimlerinin üretilmesi ve sekresyonlarının sağlanması için gerekli olan optimal çevresel koşulların belirlenmesi temel hedef olarak düşünülmüştür. Çalışmadan elde edilecek verilerin daha ileri düzeydeki enzimatik ve biyoteknolojik çalışmalar için bir veri tabanı olarak kullanılabilmesi hedeflenmiştir.

Bu çerçevede:

i. Bu çalışmada kullanılmak üzere seçilmiş olan altı *Streptomyces* suşunun lignoselüloz degradasyonunda görev alan ekstraselüler endoksilanaz, endoglukanaz ve peroksidaz enzimlerinin büyüme kinetiğine bağlı olarak aktivite düzeylerinin belirlenmesi,

ii. Lignoselüloz degradasyonunda rol alan ekstraselüler enzimlerin, farklı karbon kaynakları ve bu karbon kaynaklarının değişik konsantrasyonlarındaki aktivite düzeylerinin belirlenmesi,

iii. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşları tarafından ekstraselüler endoksilanaz, endoglukanaz ve peroksidaz enzimlerinin farklı pH koşullarındaki sekresyon düzeylerinin belirlenmesi,

iv. Farklı çevresel sıcaklıklarda inkübe edilen *Streptomyces* suşlarının ekstraselüler endoksilanaz, endoglukanaz ve peroksidaz enzimlerinin sekresyon düzeylerinin belirlenmesi,

v. Ve bu sonuçlar ışığında her bir *Streptomyces* suşu ve ekstraselüler lignoselüolitik enzimler için optimum çevresel koşulların tesbit edilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kimyasallar ve Proteinler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, aksi belirtilmediği sürece, Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) ve Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) firmalarından ve mevcut olan en yüksek saflık derecesinde temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan *Streptomyces* Suşları

Çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşlarının tamamı, Dr. Nevzat Şahin ve çalışma arkadaşları tarafından (Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun) topraktan izole edilerek tanımlanmış ve lignoselülitik aktivitelerinin çalışılması için Bölümümüze bağışlanmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşları ve izole edildikleri ortamlar ise Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşları ve izole edildikleri ortamlar. Çelenk'den [154] düzenlenmiştir.

Suş Kodu	Tür	İzole Edildiği Yer
F2621	<i>Streptomyces</i> sp.	Eskişehir; Bahçe toprağı
F3118	<i>Streptomyces</i> sp.	Hatay; Bahçe toprağı
F3120	<i>Streptomyces</i> sp.	Hatay; Bahçe toprağı
F4880	<i>Streptomyces</i> sp.	Muğla; Orman toprağı
F6318	<i>Streptomyces</i> sp.	Şanlıurfa; Bahçe toprağı
F6616	<i>Streptomyces</i> sp.	Van; Bahçe toprağı

3.1.3. Cam Malzemeler

Kullanılan bütün cam malzemeler deterjanla yıkandıktan sonra, önce şehir suyu ile birkaç kez durulanmış ve ardından son bir defa da distile su ile durulanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Besiyeri içeren erlenler otoklavda 121°C'de 0,124 MPa basınç altında 15 dk süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Katı besiyerleri için kullanılan petri kapları ise besiyeri dökülmeden önce Pasteur fırınında 200°C'de 2 saat süre ile steril edilmişlerdir.

3.1.4. İnkübatörler

Streptomyces suşlarının kültürünün yapılması amacıyla kullanılan katı ortamların inkübasyonu, Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara, Türkiye) bir inkübatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşlarının ekstraselüler enzim üretimleri için kullanılan sıvı kültür ortamlarının inkübasyonunda ise J.P. Selecta marka Rotabit model (J.P. Selecta, Barcelona, Spain) orbital çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

3.1.5. Santrifüjler

Streptomyces suşlarının kültür sıvısından biyomasın ayrılarak süpernatant sıvısının elde edilmesinde ve enzim asseyleri sırasındaki santrifüjleme işlemlerinde Eppendorf marka 5804 model (Eppendorf, Hamburg, Germany) bir santrifüj kullanılmıştır.

3.1.6. UV/Visible Spektrofotometre

Enzimatik aktivitelerin belirlenmesi sırasında, dalga boyu taramaları ve absorbans değerlerinin elde edilmesi için Perkin Elmer marka Lambda EZ 210 serisi bir UV/Visible spektrofotometre (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, USA) kullanılmıştır.

3.2. METOD

3.2.1. *Streptomyces* Suşlarının Kültürü ve Muhafazası

Streptomyces suşları, %20 gliserol içerisinde -50°C'de, sporlar ve hif fragmentlerinden oluşan bir süspansiyon halinde muhafaza edilmişlerdir. Suşların belirli aralıklarla, temel karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanı (oat spelt xylan) içeren katı besiyerine [155], Bennet's Agar besiyerine ([156]'dan modifiye edilmiştir) veya ISP4 [157] besiyerine ekimleri yapılmış ve en az 72 saat ve sporulasyon meydana gelinceye kadar 28°C'de inkübe edilmişlerdir.

A. Katı Besiyerleri

i. Yulaf ksilanı içeren katı besiyerinin bileşimi:

Maya ekstraktı	1 gr.
Yulaf ksilanı (Sigma)	10 gr.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gr.
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,2 gr.
CaCl ₂	11 mg.
Agar	20 gr.
Fosfat tamponu (0,1 M; pH 7,6)	100 mL.
Distile su	900 mL.

Otoklavlamadan önce ortamın pH'ı NaOH ve HCl (1 M) kullanılarak 7,5'e ayarlanmıştır.

ii. Bennet's agar besiyerinin bileşimi:

Maya ekstraktı	1 gr.
Et ekstraktı	0,8 gr.
Gliserol	10 gr.
Tripton	2 gr.
Agar	15 gr.
Distile su	1 L.

Otoklavlamadan önce ortamın pH'ı NaOH ve HCl (1 M) kullanılarak 7,0'ye ayarlanmıştır.

iii. ISP4 (Inorganic salts-starch agar) besiyerinin bileşimi:

K ₂ HPO ₄	1 gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 gr.
NaCl	1 gr.
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gr.
CaCO ₃	2 gr.
İz element solüsyonu	1 mL.
Distile su	1 L.
Nişasta solüsyonu (%2 w/v).....	500 mL.
Agar	20 gr.
Distile su	500 mL.

İz element solüsyonu:

FeSO ₄ 7H ₂ O	0,1 gr.
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,1 gr.
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,1 gr.
Distile su	100 mL.

Otoklavlamadan önce ortamın pH'ı NaOH ve HCl (1 M) kullanılarak 7,0'ye ayarlanmıştır.

B. Sıvı Besiyeri (MS-YEM)

Streptomyces suşlarının sıvı besiyerlerinde üretimleri sırasında erlenler kullanılmıştır. 250 mL hacime sahip erlenler için 50 ml, 100 mL hacimli erlenler için ise 20 mL besiyeri kullanılmıştır. Her deney grubu için tek tip erlen kullanılmıştır. 10 Günlük inkübasyonlar sırasında 250 mL'lik erlenler kullanılırken, 48-72 saatlik inkübasyonlar için 100 mL'lik erlenler tercih edilmiştir. Sıvı kültürler için kullanılan besiyerinin bileşimi:

Maya ekstraktı	6 gr.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 gr.
NaCl	0,3 gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,1 gr.
CaCO ₃	0,02 gr.
İz element solüsyonu	1 mL.
Distile su	1 L.

Karbon ve enerji kaynağı olarak, amaca uygun şekilde yulaf ksilanı [%0,0-1,2 (w/v)] veya öğütülmüş buğday samanı [%0,0-1,2 (w/v)] ilave edilmiştir.

İz element solüsyonu:

FeSO ₄ 7H ₂ O	1 gr.
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,9 gr.
MnSO ₄ 7H ₂ O	0,2 gr.
Distile su	1 L.

Otoklavlamadan önce besiyerinin pH'ı NaOH ve HCl (1 M) kullanılarak 8,0'e ayarlanmıştır. İnokulasyondan sonra kültürler 30°C'de amaca uygun olarak 72 saat veya 10 gün süre ile 150 rpm'de inkübe edilmişlerdir. Çevresel koşulların ekstraselüler enzimlerin üretimi üzerine olan etkilerinin araştırılması sırasında kültür sıvısının pH'ı ve inkübasyon sıcaklıkları amaçlar doğrultusunda değiştirilmiştir.

3.2.2. Sübstratların Hazırlanması

Buğday samanı, blender ile iyice parçalanarak toz haline getirildikten sonra 500 µm por çapına sahip laboratuvar eleğinden geçirilerek (Alfa Laboratuvar Malzemeleri, Ankara, Türkiye) mümkün olduğunca küçük partikül yapısına sahip olan saman partikülleri kullanılmıştır.

3.2.3. İnokulum Hazırlanışı

Spor meydana getiren *Streptomyces* suşlarının spor ve/veya hif fragmentlerinin 10 mL steril fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) içerisinde, aseptik koşullar altında solüsyonları hazırlanmış ve bu solüsyon inokulum olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu inokulum solüsyonu her bir erlene, erlendeki besiyeri hacminin %2'sine denk gelen hacim kadar ilave edilmiştir. İnokulum sıvısından katı besiyerlerine de ekimler yapılarak, inokulumdaki kob hesaplanmıştır. Buna göre, kullanılan inokulumlar ortalama olarak $1,5 \times 10^5$ kob/mL olarak hesaplanmıştır.

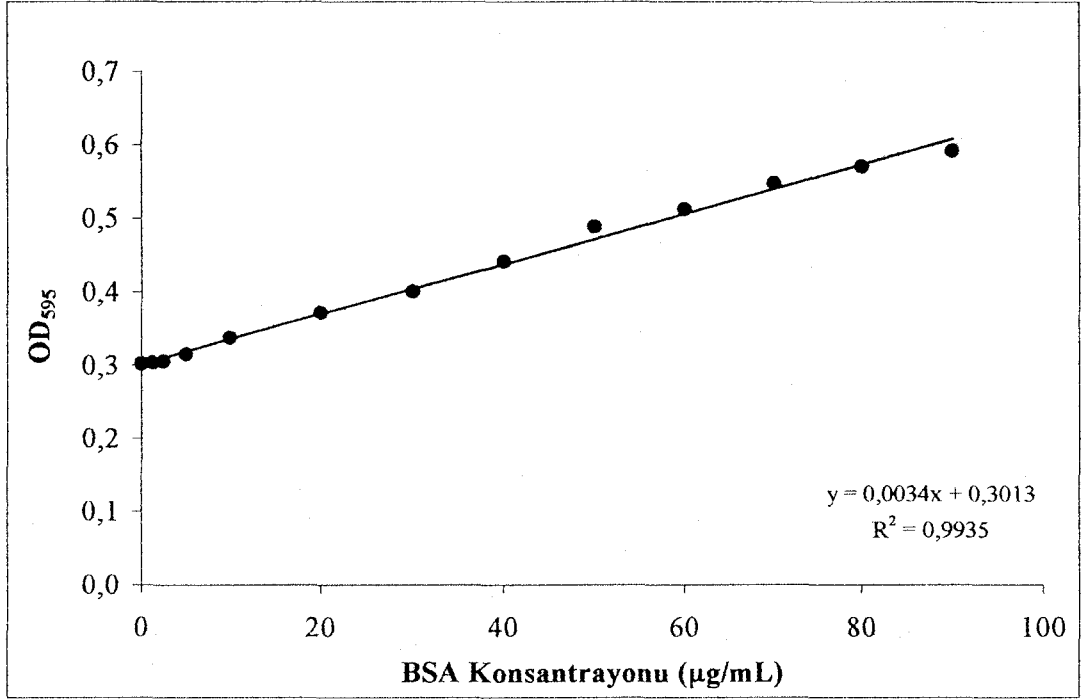
3.2.4. Süpernatant Sıvılarının Toplanması

Kültür süpernatant sıvıları, biyomas içeren kültür ortamlarının 12 000 g'de 5 dk. süreyle santrifüjlenmesi ile elde edilmiştir. Elde edilen bu süpernatant sıvılarının spor ve hif içermedikleri mikroskopik olarak belirlendikten sonra endoksilanaz, endoglukanaz ve peroksidaz asseyleri için ham enzim preperasyonları olarak kullanılmıştır.

3.2.5. Ekstraselüler Protein Miktarlarının Tayini

Sıvı kültürlerden elde edilen süpernatant sıvılarının protein konsantrasyonlarının belirlenmesi, Bradford protein assey [158] yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında 100 µL süpernatant sıvısı alınarak 1 mL Bradford solüsyonu ile vorteks yardımı ile karıştırılmış ve 10 dk sonra spektrofotometre ile OD₅₉₅ değeri kaydedilmiştir.

Protein konsantrasyonlarının tayini sırasında kullanılan protein standart eğrisi (bkz. Şekil 3.1.) ise bovin serum albuminin (BSA) 0,0-90,0 µg ml⁻¹ arasında değişen farklı konsantrasyonları ile elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın değişik konsantrasyonlarının Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğri.

3.2.6. Enzim Preperasyonları

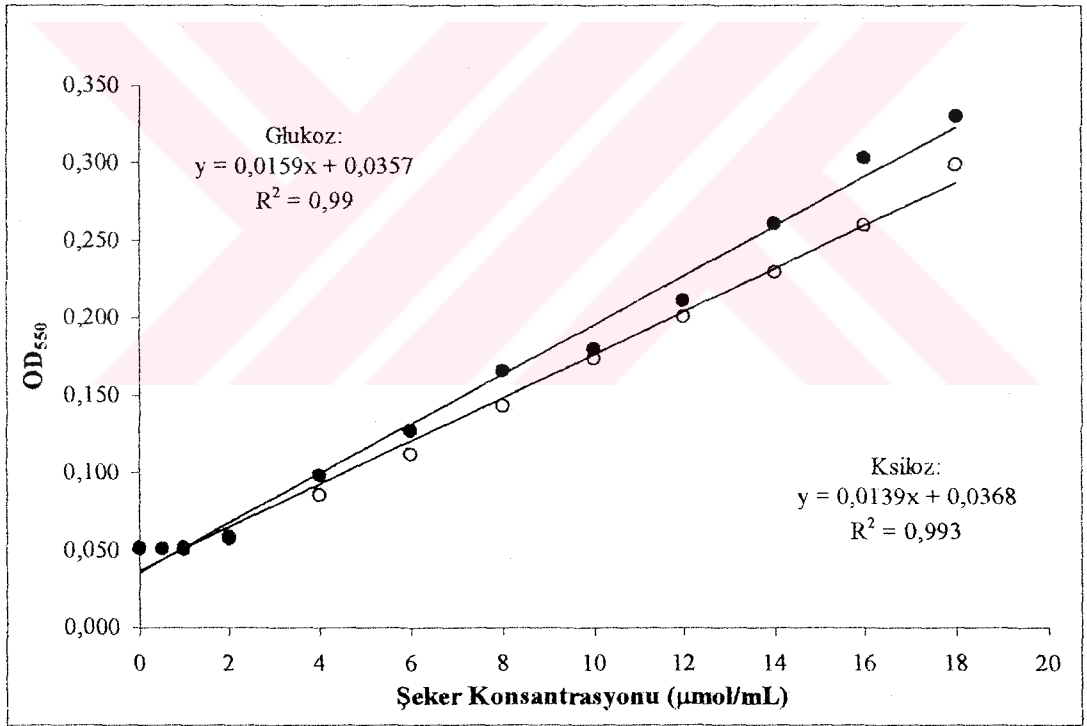
Ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin aktivite düzeylerinin belirlenmesi için sıvı kültür örneklerinden 24 saat aralıklarla, aseptik koşullar altında 2 mL örnek alınmış ve 12 000 g'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Biyomas ve diğer partiküler materyallerden arındırılan süpernatant sıvısı, ham enzim preperasyonu olarak kullanılmıştır.

3.2.7. Enzim Asseyleri

3.2.7.1. Endoksilanaz ve endoglukanaz asseyi

Endoksilanaz ve endoglukanaz aktiviteleri, sırasıyla, yulaf ksilanı ve karboksimetilselüloz'dan (CMC) indirgenen şekerlerin miktarının tesbit edilmesi ile belirlenmiştir. Rutin çalışmalar için 100 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde %1 (w/v) yulaf ksilanı ve CMC solüsyonu kullanılmıştır. Yeterli miktardaki (100 µL)

kültür süpernatant sıvısı, 300 µL yulaf ksilani veya CMC süspansiyonu ile 30°C'de (sıcaklığa bağlı çalışmalar sırasında 25-50°C arasında değişen sıcaklıklarda) 10 dakika (enzimatik aktivitenin bu süre boyunca lineer olarak arttığı ön çalışmalar ile belirlenmiştir) süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, ortamdaki katı substart partikülleri 12 000 g'de 5 dk süre ile santrifüjlenerek ayrılmış ve elde edilen süpernatant sıvısı, indirgenmiş şeker miktarlarının tayininde kullanılmıştır. İnkübasyon sıvısındaki indirgenmiş şeker miktarları ise Miller'in [159] dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir. Reaksiyon karışımında bulunan indirgenmiş şekerlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi, 0,0-18,0 µmol ml⁻¹ arasında değişen D-ksiloz (endoksilanaz aktivitesi için) ve D-glukoz (endokglukanaz aktivitesi için) standartları kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri (Şekil 3.2.) yardımı ile, spektrofotometrik olarak 550 nm'de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. D-glukoz ve D-ksiloz'un farklı konsantrasyonlarının Miller metodu ile analizi ile elde edilen indirgenmiş şeker standart eğrileri (● – glukoz standart eğrisini, ○ – ksiloz standart eğrisini ifade etmektedir).

Bir ünite (U) endoksilanaz veya endokglukanaz aktivitesi, assey koşulları altında, mililitre başına 1 dakikada 1 µmol indirgenmiş şeker (ksiloz veya glukoz

olarak ifade edilen) salınmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Tüm asseylerde enzim ve sübstrat kontrolleri de gerçekleştirilmiştir.

İndirgenmiş şekerlerin tayini için dinitrosalisilik asit (DNS) metodu şu şekilde uygulanmıştır; 4,5 gr 3,5-dinitrosalisilik asit, 90,9 gr sodyum potasyoum tartarat ve 7,3 gr sodyum hidroksitin 1 L distile su içerisinde çözünmesi ile hazırlanan DNS solüsyonu, enzimatik inkübasyon sonrasında elde edilen süpernatant sıvılara ve standartlara (400 µL) ilave edilmiştir. Vorteks yardımı ile bir süre karıştırmadan sonra karışımlar, 100 °C'de 5 dk kaynatılmışlardır. Musluk suyu altında bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra, karışımların 550 nm'deki optik densiteleri spektrofotometre ile elde edilmiştir. Spektrofotometrede okunan optik densite değerleri ise standart eğriler yardımıyla, indirgenmiş şeker miktarlarına dönüştürülmüştür.

3.2.7.2. Peroksidaz asseyi

Peroksidaz aktivitesi, 2,4-diklorofenol'ün (2,4-DCP) sübstrat olarak kullanılması ile belirlenmiştir. Ramachandra ve ark. [139,160] tarafından gerçekleştirilen bu metod, modifiye edilerek kullanılmıştır. Son reaksiyon karışımı 200 µL sodyum fosfat tamponu (100 mM, pH 7,0); 200 µL 16 mM 4-aminoantipirin (4-AAP); 200 µL 25 mM 2,4-DCP; 200 µL kültür süpernatant sıvısı ve 200 µL 50 mM hidrojen peroksit içermektedir. Reaksiyon, hidrojen peroksitin (200 µL ve 50 mM) ilavesi ile başlatılmıştır. Bu nedenden dolayı hidrojen peroksit, karışımın en son eklenen bileşenidir. Hidrojen peroksitin eklenmesinin ardından örnekler su banyosu içerisinde 30°C'de (sıcaklık çalışmaları sırasında 25-50°C arasında değişen sıcaklıklarda) 1 dk inkübe edilmişlerdir. 4-AAP'nin oksidasyonu sonucu absorbansta meydana gelen artış 510 nm'de spektrofotometre ile ölçülmüştür.

Bir ünite (U) peroksidaz aktivitesi, absorbansta 1,0 birim dk⁻¹ artış meydana getirmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.8. Ekstraselüler Lignoselüolitik Enzimlerin Üretiminin Optimizasyonu

3.2.8.1. Ekstraselüler lignoselüolitik enzim aktivitelerinin büyüme kinetiği ile olan ilişkisi

Bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşları tarafından sentezlenen ekstraselüler lignoselüolitik enzimlerin, kültür sıvısı içerisindeki aktivitelerinin büyüme kinetiğine bağlı olarak nasıl değişim gösterdiğini belirlemek için, organizmalar karbon ve enerji kaynağı olarak yalnızca yulaf ksilani (% 0,2 w/v) içeren MS-YEM sıvı besiyerlerinde 30°C'de 10 gün süreyle, 150 rpm'de inkübe edilmişlerdir. Çalışma sırasında 24 saat aralıklarla sıvı kültürlerden örnekler alınmış ve alınan bu örnekler, ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak organizmaların büyüme kinetiği boyunca endoglukanaz, endoksilanaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri standart assey metodları ile tesbit edilmiştir. Aynı zamanda, alınan örneklerdeki ekstraselüler protein miktarları da belirlenerek her bir enzimin spesifik aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı seriler halinde gerçekleştirilmiş ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.8.2. Kültür sıcaklığının ekstraselüler lignoselüolitik enzimlerin aktivite düzeyleri üzerine etkisi

Bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşları tarafından sentezlenerek kültür sıvısı içerisine salgılanan ekstraselüler lignoselüolitik enzimlerin üretilmesine, kültür sıcaklığının etkisini belirlemek için organizmalar 25-50 °C arasında değişen sıcaklıklarda, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece yulaf ksilani (% 0.2 w/v) içeren MS-YEM sıvı besiyerinde 72'şer saat süreyle, 150 rpm'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürlerden alınan örnekler ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak endoglukanaz, endoksilanaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri standart assey metodları ile tespit edilmiştir. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı seriler halinde gerçekleştirilmiş ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.8.3. Kültür pH'ının ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin aktivite düzeyleri üzerine etkisi

Streptomyces suşları tarafından sentezlenerek kültür sıvısı içerisine salgılanan ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin üretilmesine, kültür pH'ının etkisini belirlemek için organizmalar pH 5,0-9,0 arasında değişen, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece yulaf ksilani (% 0.2 w/v) içeren MS-YEM sıvı besiyerinde, 30 °C'de 72'şer saat süreyle, 150 rpm'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürlerden alınan örnekler ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak endoglukanaz, endoksilanaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri standart assey metodları ile tespit edilmiştir. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı seriler halinde gerçekleştirilmiş ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.8.4. Farklı karbon kaynaklarının ve konsantrasyonlarının ekstraselüler lignoselülitik enzim aktivitelerinin üretimi üzerine olan etkisi

Streptomyces suşlarının, farklı karbon ve enerji kaynaklarının üzerinde büyümeleri sırasındaki ekstraselüler lignoselülitik enzim aktivitelerinin belirlenmesi için organizmalar, %0,0-1,2 (w/v) arasında değişen konsantrasyonlarda yalnızca yulaf ksilani veya öğütülmüş buğday samanı içeren sıvı MS-YEM besiyerlerinde 30 °C'de, 72'şer saat süreyle, 150 rpm'de inkübe edilmişlerdir. Bu çalışmalar ile organizmaların ekstraselüler lignoselülitik enzim aktivitelerinin maksimuma ulaştığı karbon kaynağının tipi ve konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürlerden alınan örnekler ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak endoglukanaz, endoksilanaz ve peroksidaz enzim aktiviteleri standart assey metodları ile tespit edilmiştir. Ayrıca, süpernatant sıvısındaki protein konsantrasyonları da belirlenerek her bir enzimin spesifik aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı seriler halinde gerçekleştirilmiş ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

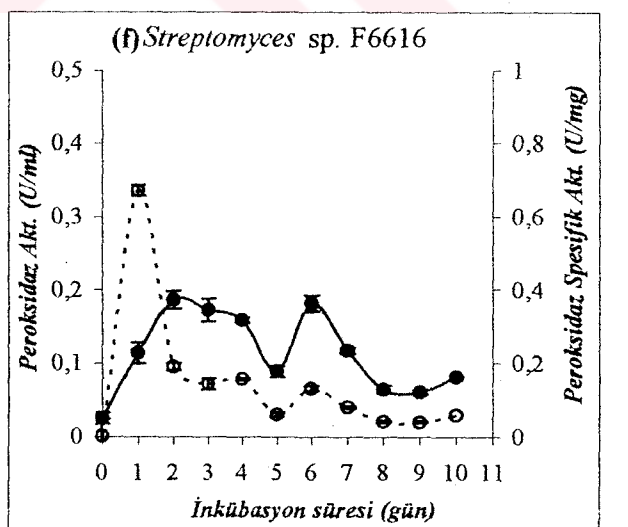
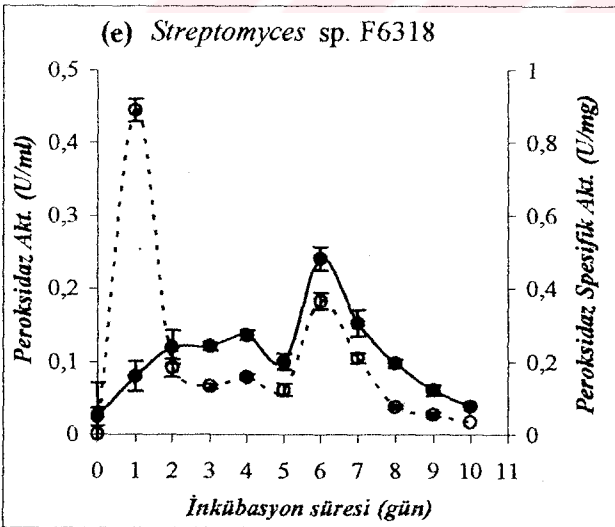
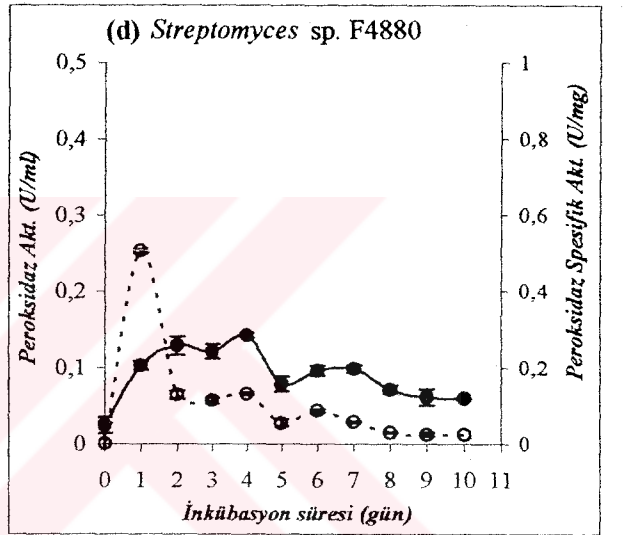
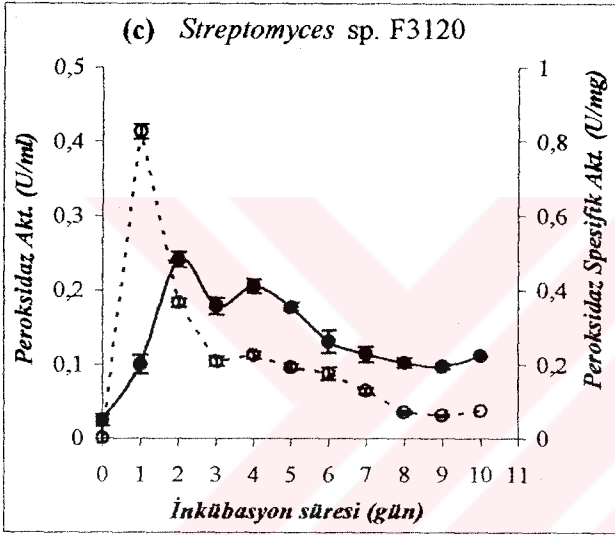
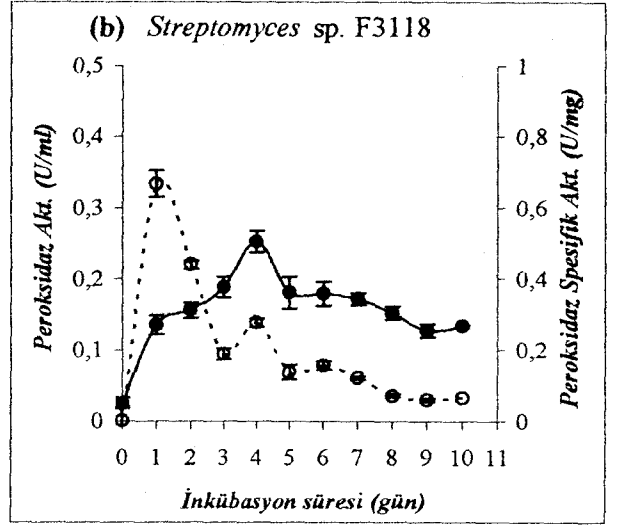
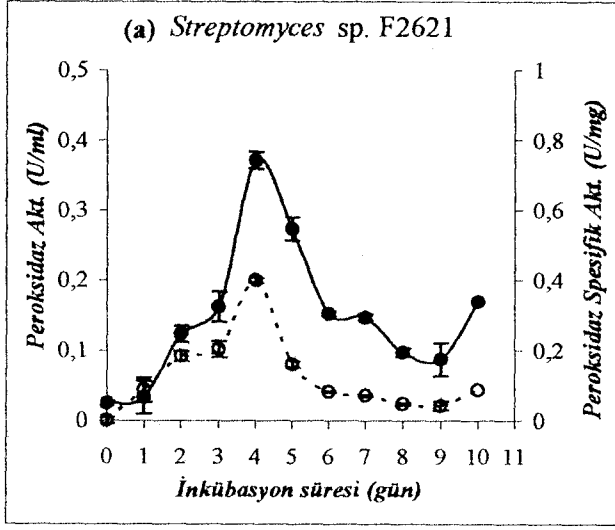
4.1. BULGULAR

4.1.1. Ekstraselüler Lignoselüloolitik Enzimlerin Üretiminin Büyüme Kinetiğine Bağlı Değişimi

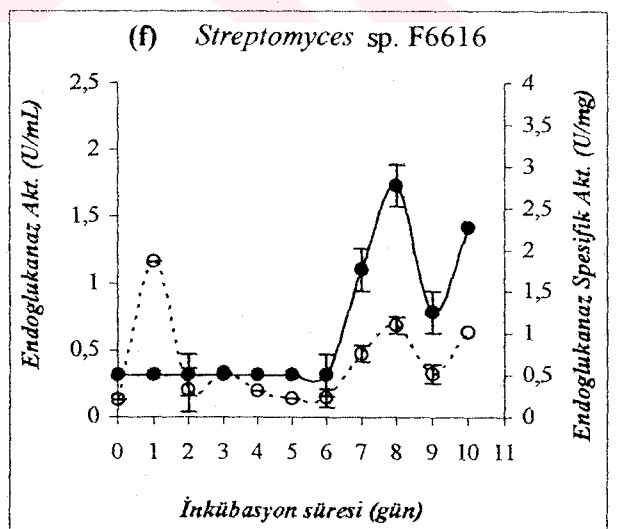
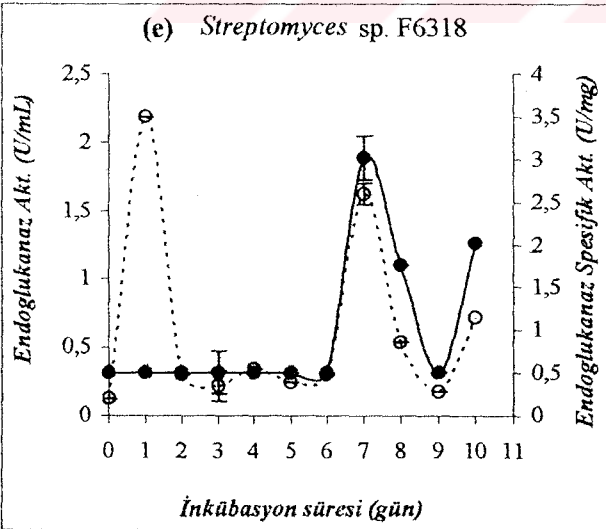
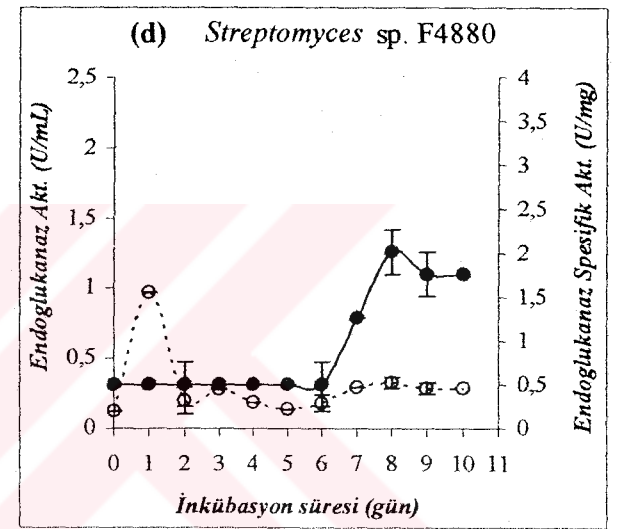
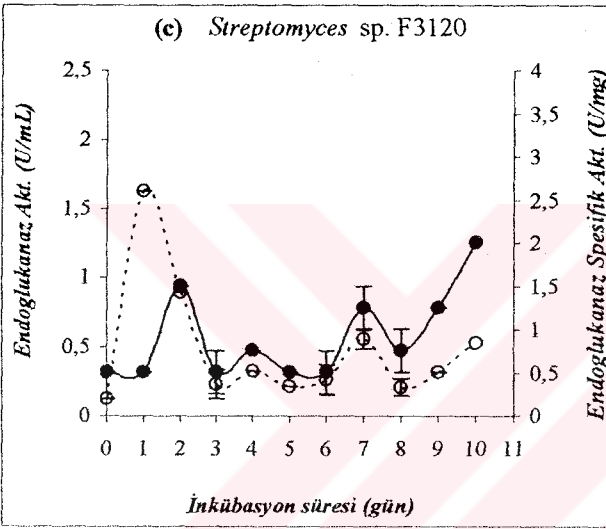
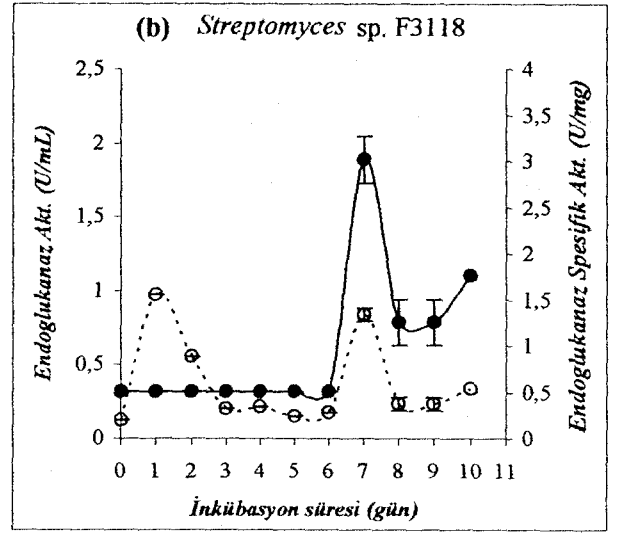
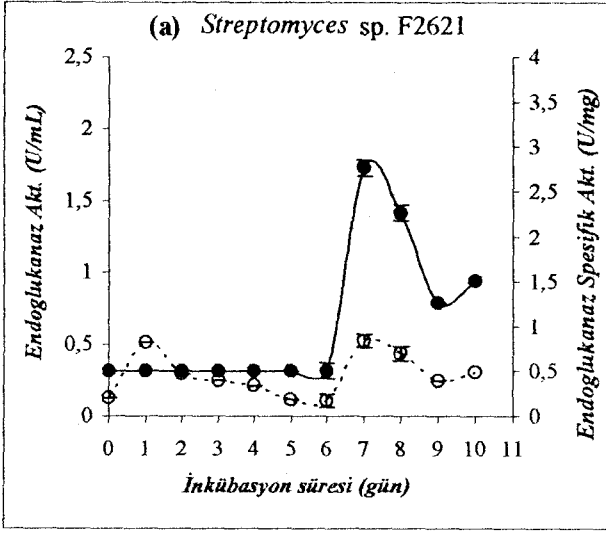
Karbon ve enerji kaynağı olarak % 0,2 (w/v) yulaf ksılanı içeren MS-YEM besiyerinde kültürleri yapılan *Streptomyces* suşlarının ekstraselüler peroksidaz (Şekil 4.1), endoglukanaz (Şekil 4.2) ve endoksilanaz (Şekil 4.3) enzimlerinin üretiminin zamana bağlı değişimi incelenmiştir. Ekstraselüler peroksidaz ve endoksilanaz enzimlerinin her ikisinin de sentezlerinin, çalışılan tüm organizmalarda, organizmaların logaritmik büyüme fazı (1-4. günler arası) sırasında belirgin biçimde artış gösterdiği gözlenmiştir. Buna rağmen endoglukanaz aktivitesi, ancak logaritmik büyüme fazının sona erdiği, durgun fazı takiben ölüm fazının başladığı inkübasyonun 6. gününden sonra kültür sıvısında belirgin olarak belirlenebilmiştir (bkz. Şekil 4.2).

Logaritmik fazdaki artıştan sonra, ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerin aktivitelerinde, bazı suşlarda tekrar küçük bir miktar artış gözlenmiş olmakla birlikte (örneğin, Şekil 4.3), genellikle büyüme kinetiğinin ölüm fazına kadar sabit biçimde seyretmiştir. *Streptomyces* kültürlerinin ölüm fazının sonunda ise (7-10. günler arası) bu enzimlerden endoksilanazın aktivitesinde artış gözlenmiş (Şekil 4.3), fakat endoglukanaz (Şekil 4.2) ve peroksidaz (Şekil 4.1) enzimlerinin aktivitelerinde düşüş meydana gelmiştir.

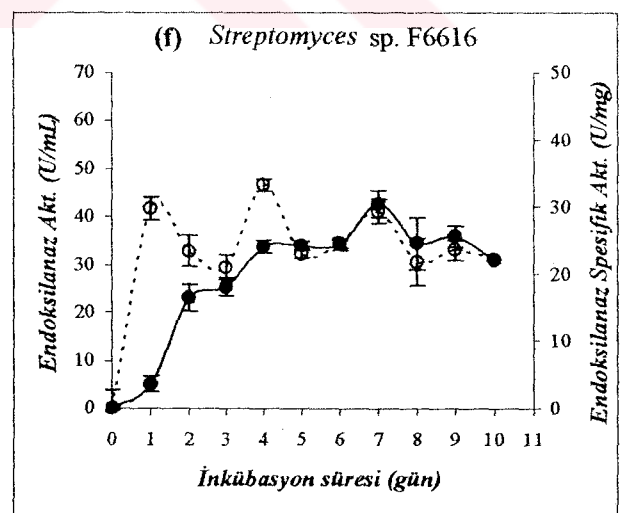
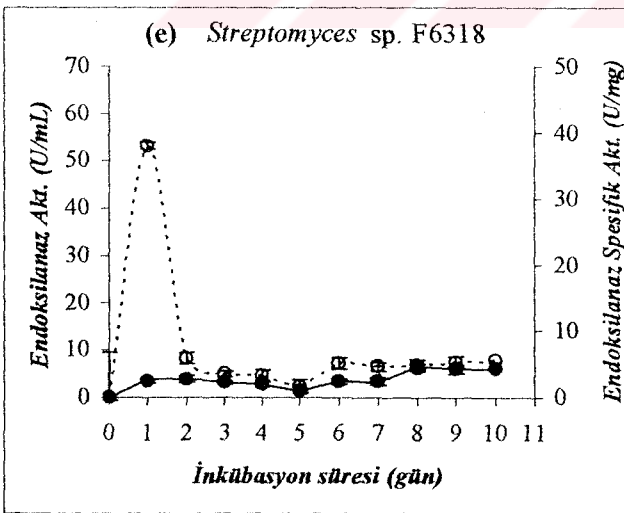
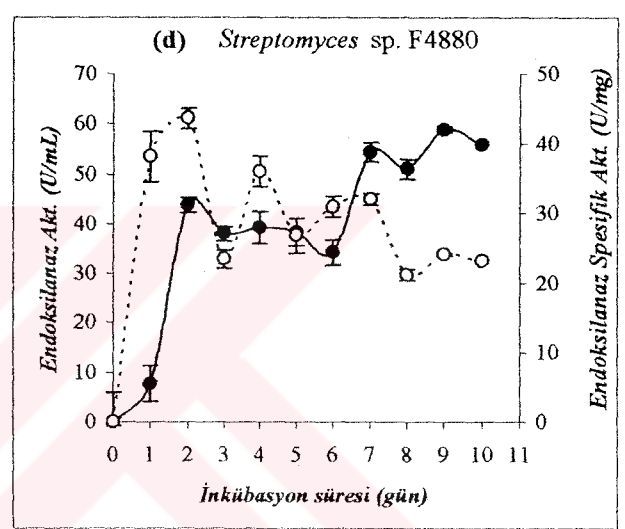
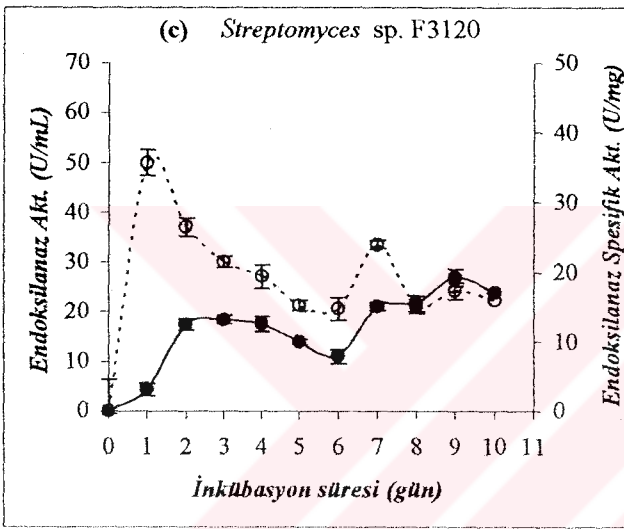
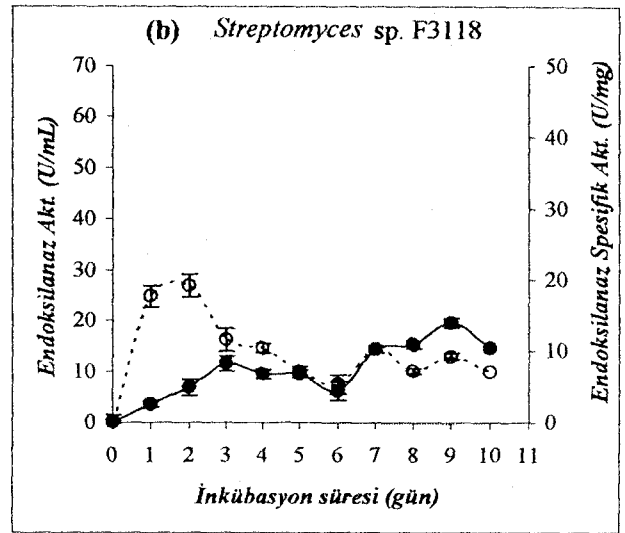
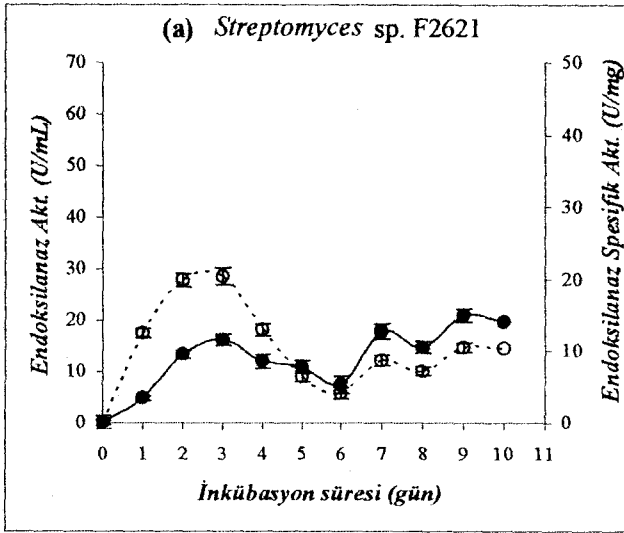
İnkübasyonun 10 gün boyunca sürdürülerek, ekstraselüler lignoselüloolitik enzim aktivitelerinin takip edildiği periyotta, en yüksek peroksidaz aktivitesi ise (0,371 U/mL) 4. günde *Streptomyces* F2621 tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1, a). *Streptomyces* F2621 tarafından logaritmik büyüme fazı sırasındaki en yüksek endoksilanaz aktivitesi (16,187 U/mL) ise inkübasyonun 3. gününde üretilmiştir (Şekil 4.3, a). Bu iki enzimden farklı olarak bu suş, en yüksek endoglukanaz



Şekil 4.1: Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince *Streptomyces* suşları tarafından üretilen peroksidaz aktiviteleri (-●-) ve spesifik aktivitelerinin (-○-) zamana bağlı değişimi.



Şekil 4.2: Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince *Streptomyces* suşları tarafından üretilen endoglukanaz aktiviteleri (-●-) ve spesifik aktivitelerinin (-○-) zamana bağlı değişimi.



Şekil 4.3: Büyüme kinetiğine bağlı olarak 10 günlük inkübasyon süresince *Streptomyces* suşları tarafından üretilen endoksilanaz aktiviteleri (-●-) ve spesifik aktivitelerinin (-○-) zamana bağlı değişimi.

aktivitesini (1,730 U/mL) hücre lizizinin gerçekleştiği ve büyüme kinetiğinin ölüm fazı olan inkübasyonun 7. gününde sergilemiştir (Şekil 4.2, a).

Çalışmada kullanılan altı *Streptomyces* suşu içerisinde en yüksek endoglukanaz aktivitesi (1,887 U/mL) hücre lizizinin gerçekleştiği ve büyüme kinetiğinin ölüm fazı olan inkübasyonun 7. gününde, *Streptomyces* F3118 tarafından sergilenmiştir (Şekil 4.2, b). Bu organizmanın logaritmik büyüme fazı sırasındaki en yüksek endoksilanaz aktivitesi (11,601 U/mL) inkübasyonun 3. gününde (Şekil 4.3, b), en yüksek peroksidaz aktivitesi (0,253 U/mL) ise inkübasyonun 4. gününde (Şekil 4.1, b) gerçekleşmiştir.

Çalışılan *Streptomyces* suşları içerisinde, logaritmik büyüme fazı sırasındaki en yüksek endoksilanaz aktivitesi (43,795 U/mL), inkübasyonun 2. gününde *Streptomyces* F4880 tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3, d). Bu organizma ile en yüksek endoglukanaz aktivitesi (1,258 U/mL) yine diğer suşlarda olduğu gibi hücre lizizinin gerçekleştiği ve büyüme kinetiğinin ölüm fazı olan inkübasyonun 8. gününde (Şekil 4.2, d), en yüksek peroksidaz aktivitesi ise (0,143 U/mL) inkübasyonun 4. gününde belirlenmiştir (Şekil 4.1, d).

Bu üç organizmanın (*Streptomyces* F2621, *Streptomyces* F3118 ve *Streptomyces* F4880) dışında kalan *Streptomyces* F3120, *Streptomyces* F6318 ve *Streptomyces* F6616'nın logaritmik büyüme fazı sırasındaki en yüksek endoksilanaz aktiviteleri, sırası ile, 18,435 U/mL (3. günde), 3,867 U/mL (2. günde) ve 33,403 U/mL (4. günde) olarak gerçekleşmiştir (bkz. Şekil 4.3, c, e, ve f; sırasıyla). Bu organizmalar içerisinde *Streptomyces* F6616'nın sergilediği endoksilanaz aktivitesi (33,903 U/mL), *Streptomyces* F4880 tarafından üretilen aktiviteden (43,795 U/mL) sonra en yüksek ikinci değerdir. *Streptomyces* F6616, logaritmik büyüme fazı sırasındaki en yüksek endoksilanaz aktivitesini inkübasyonun 4. gününde gerçekleştirmesine rağmen, en yüksek peroksidaz aktivitesini (0,186 U/mL) 2. günde (Şekil 4.1, f), en yüksek endoglukanaz aktivitesini (1,730 U/mL) ise diğer suşlarda olduğu gibi hücre lizizinin meydana geldiği, inkübasyonun 8. gününde (Şekil 4.2, f), sergilemiştir. *Streptomyces* F3120 ve *Streptomyces* F6318'in peroksidaz aktiviteleri

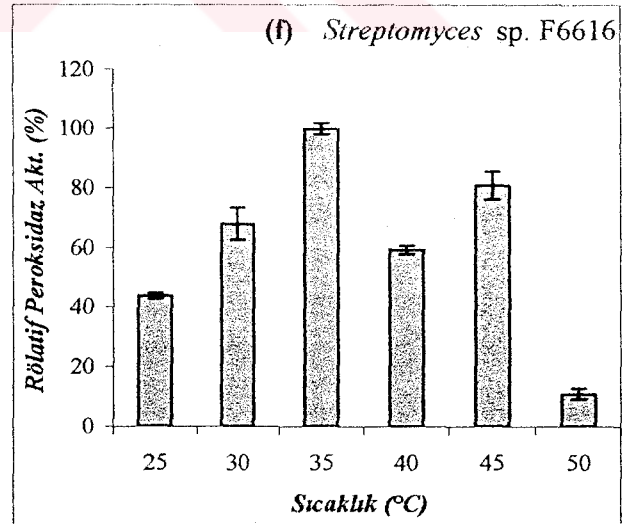
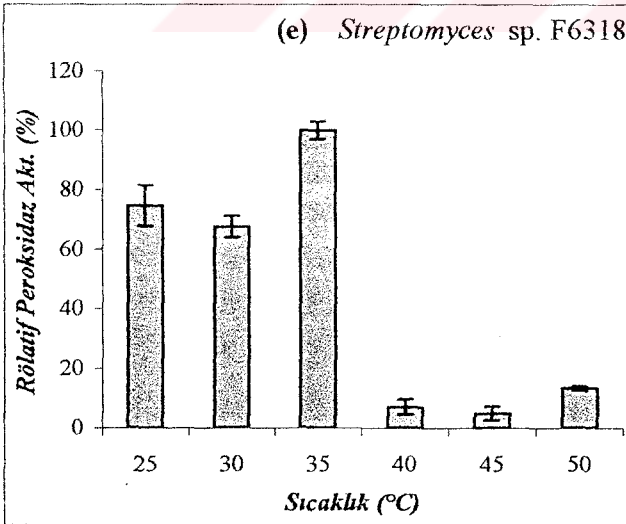
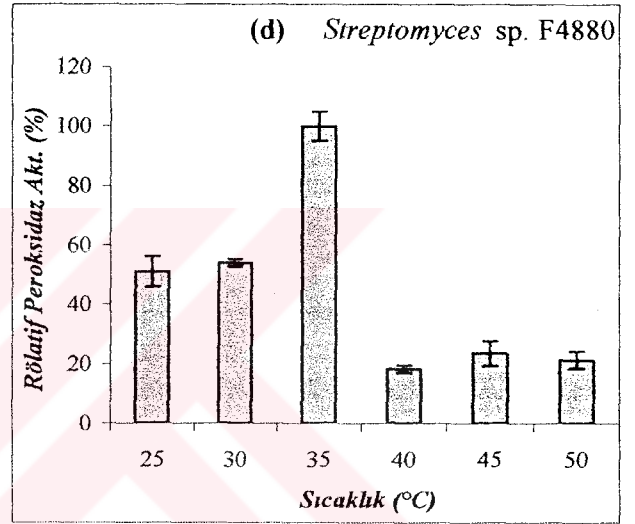
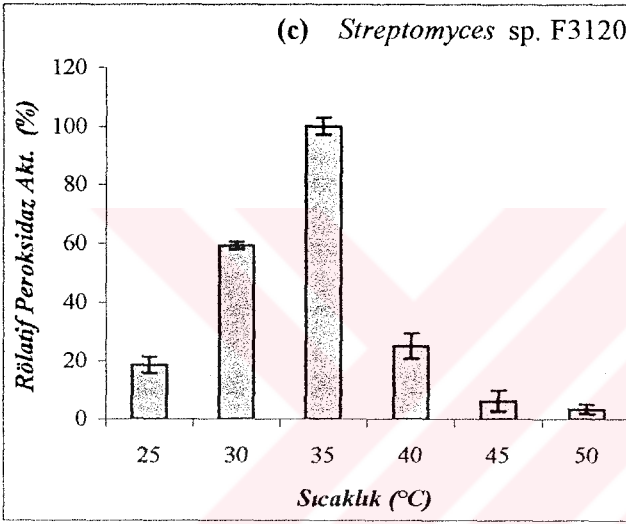
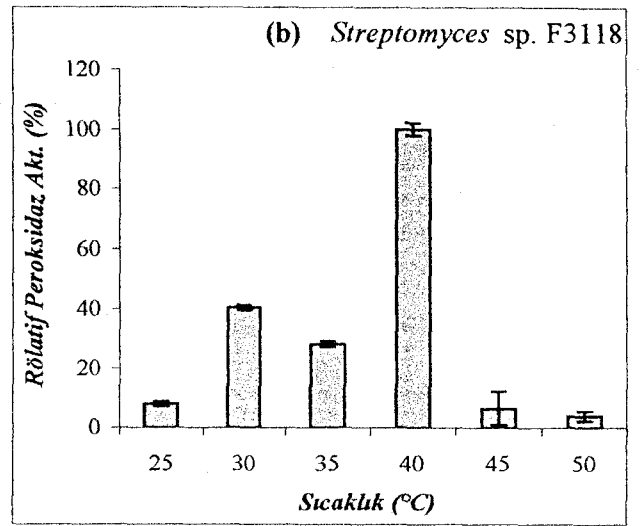
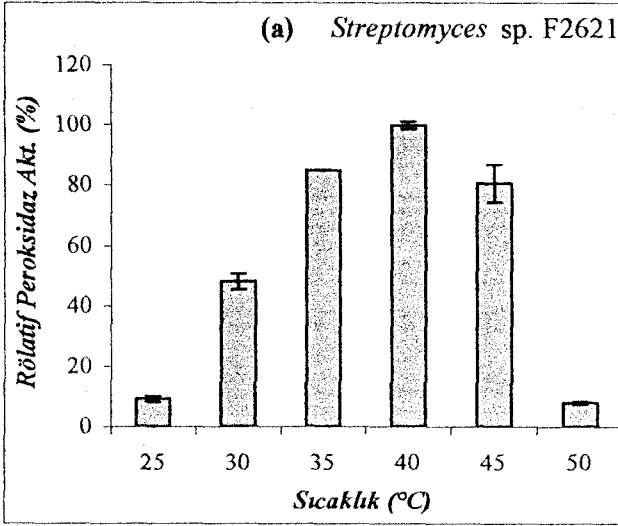
ise sırası ile, 2. günde 0,241 U/mL (Şekil 4.1, c) ve 4. günde 0,136 U/mL (Şekil 4.1, e); endoglukanaz aktiviteleri, sırası ile, 2. günde 0,943 U/mL (Şekil 4.2, c) ve 7. günde 1,887 U/mL (Şekil 4.2, e) olarak belirlenmiştir.

4.1.2. Farklı Sıcaklık Koşullarında Ekstraselüler Lignoselüloolitik Enzimlerin Üretimi

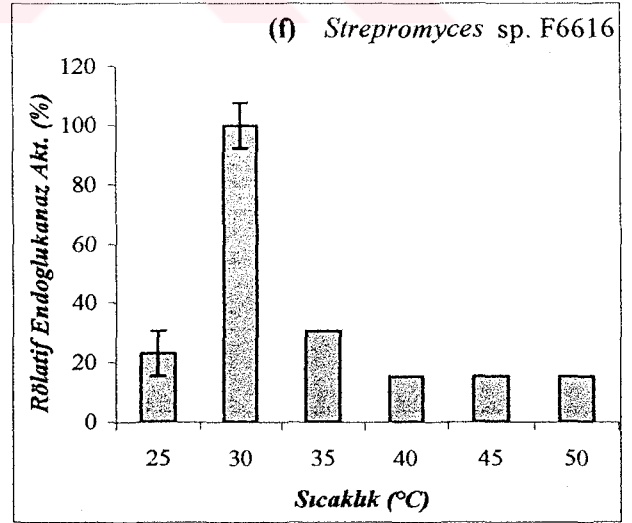
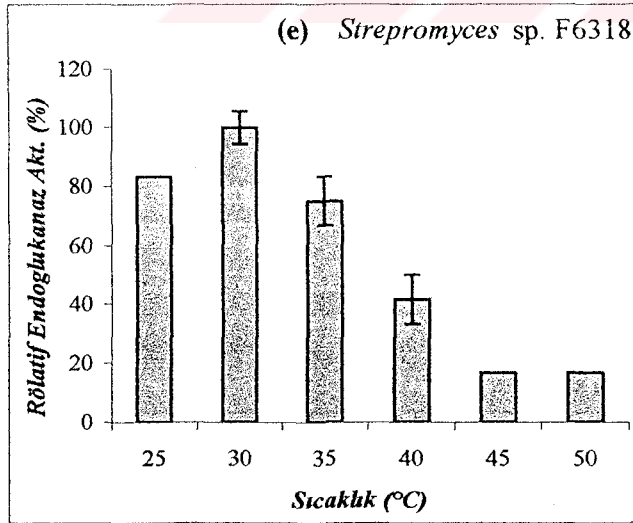
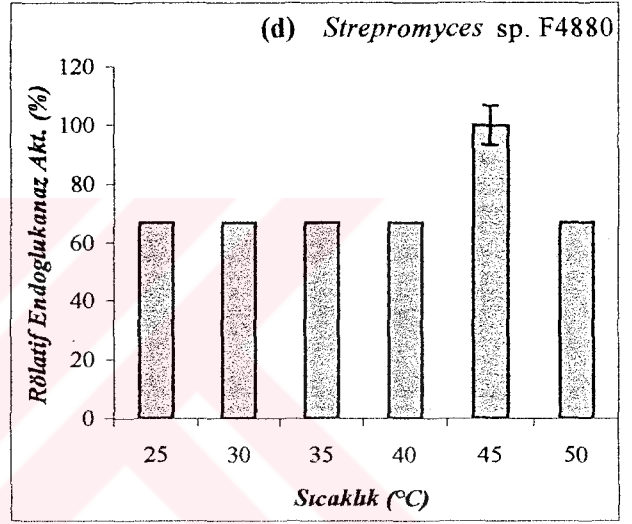
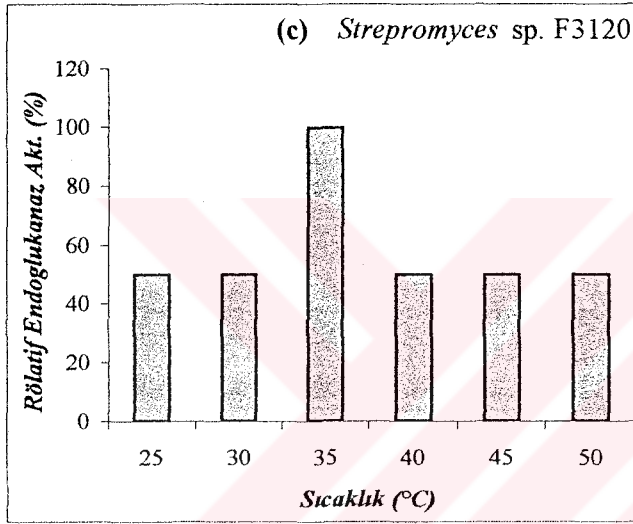
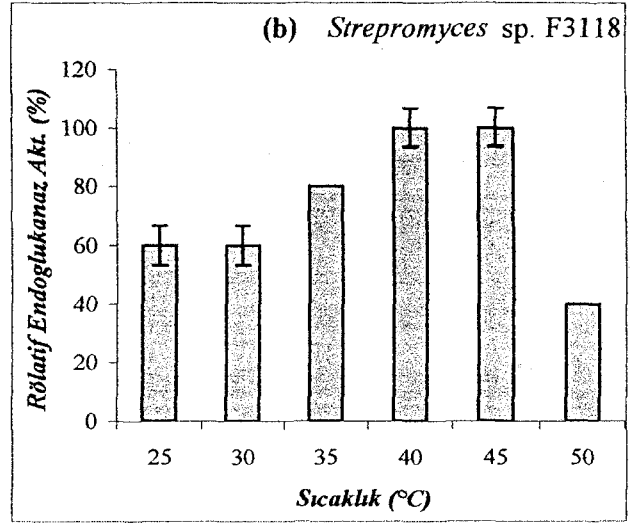
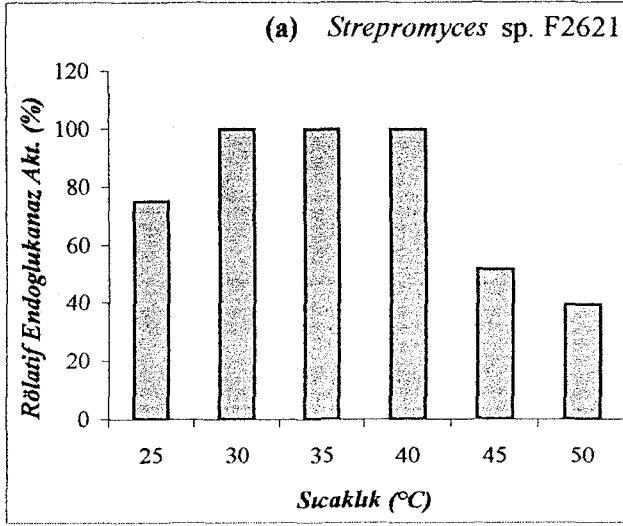
İnkübasyon sıcaklığının lignoselüloz degrade eden ekstraselüler enzimlerin üretimleri üzerine etkisini belirleyebilmek için *Streptomyces* suşları, 25-50 °C arasındaki sıcaklıklarda, 150 rpm'de, 72 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonda karbon ve enerji kaynağı olarak %0,2 (w/v) yulaf ksilanı içeren MS-YEM besiyeri kullanılmıştır.

İnkübasyon sıcaklığının lignoselüloolitik ekstraselüler enzimlerin üretimleri üzerine olan etkilerinin çalışıldığı bu evrede, en yüksek peroksidaz aktivitesi (0,493 U/mL) *Streptomyces sp.* F3120 tarafından 35 °C'de gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4, c). Bu suşun peroksidaz aktivitesi, çalışılmakta olan *Streptomyces* suşlarının tamamında da gözlemlendiği gibi rölatif olarak, 50 °C'deki inkübasyonda %3,7 ve 25 °C'deki inkübasyonda ise %18,5 olarak belirlenmiş olup, belirgin biçimde düşüş göstermiştir. *Streptomyces* F2621 (0,285 U/mL), ve *Streptomyces* F3118 (0,338 U/mL), rölatif olarak optimum peroksidaz üretimlerini %100 olarak 40 °C'de inkübe edildiğinde gösterirlerken (Şekil 4.4, a ve b), *Streptomyces* F4880 (0,164 U/mL), *Streptomyces* F6318 (0,178 U/mL) ve *Streptomyces* F6616 (0,320 U/mL), maksimum peroksidaz aktivitelerini 35 °C'de inkübe edildiklerinde göstermişlerdir (Şekil 4.4, d, e ve f). Her altı *Streptomyces* suş tarafından peroksidaz enzimlerinin üretimi, 35°C veya 40°C'deki aktivite seviyelerine oranla rölatif olarak, 50 °C'deki ve 25°C'deki inkübasyonlarda sırasıyla %3,6 ile %8,1 arasında belirlenmiş olup, büyük düşüş göstermişlerdir (Şekil 4.4).

Streptomyces F2621, *Streptomyces* F6318 ve *Streptomyces* F6616'nın endoglukanaz üretimleri optimal değerlerine (%100) 30 °C'deki inkübasyonları sırasında ulaşmıştır (Şekil 4.5, a, e ve f). Bu suşların 25 °C ve 50 °C'deki



Şekil 4.4: Farklı sıcaklık koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri rölatif peroksidaz aktiviteleri.

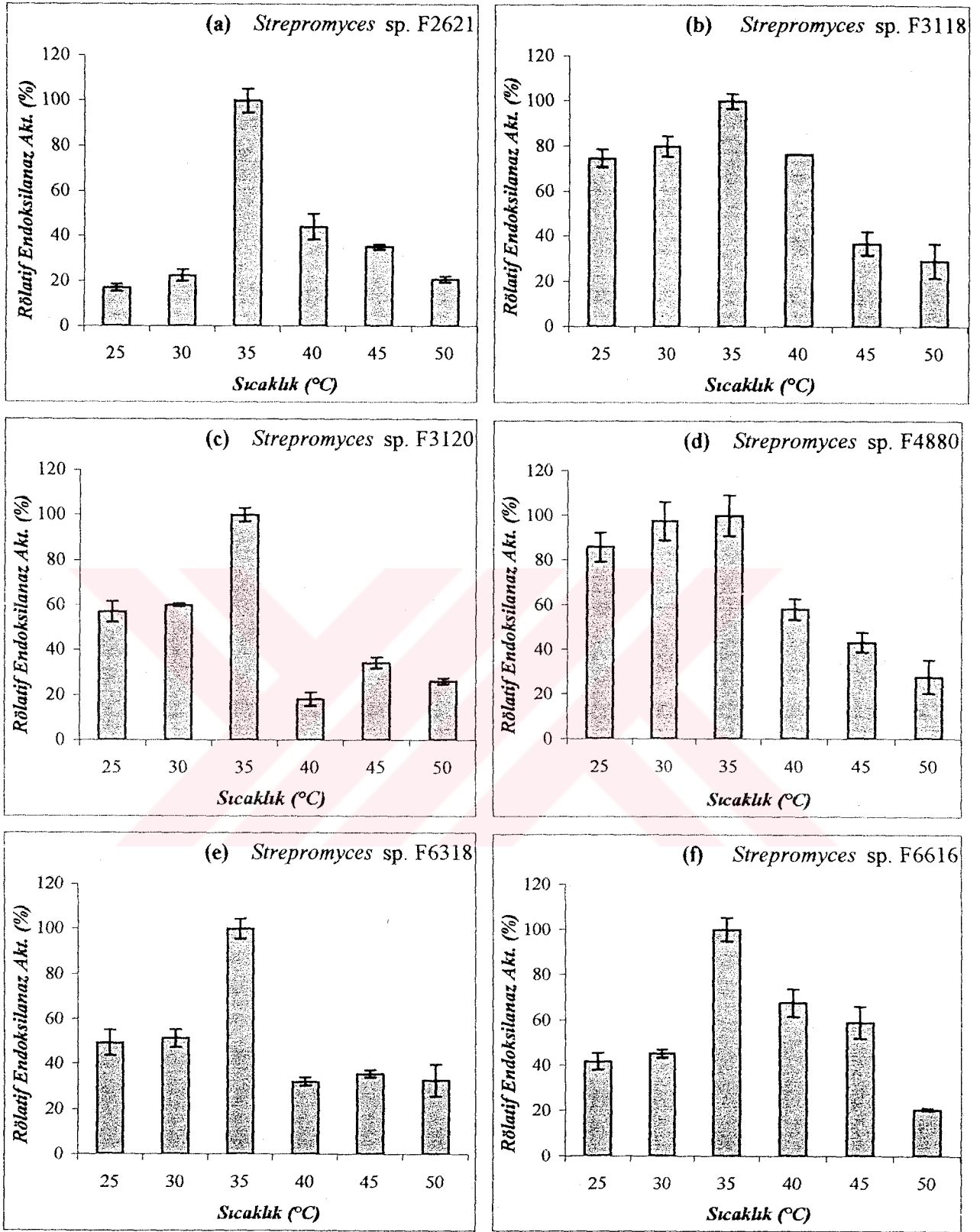


Şekil 4.5: Farklı sıcaklık koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri rölatif endoglukanaz aktiviteleri.

inkübasyonları sırasında ise rölatif endoglukanaz aktiviteleri sırası ile; %16,7 ve %83,3 arasında belirlenmiştir. *Streptomyces sp.* F6318'in endoglukanaz aktivitesi 25 °C'deki inkübasyonda optimal değerine yakın bir değere ulaşmışsa da (%83,3), 50 °C'de %16,7'ye gerilemiştir (Şekil 4.5, e). *Streptomyces* F3120'nin rölatif olarak %100 olan optimum endoglukanaz üretimi (Şekil 4.5, c), tıpkı endoksilanaz üretimi gibi (Şekil 4.6, c), 35 °C'de gerçekleşmiştir. Bu suş tarafından üretilen endoglukanaz üretimi de rölatif olarak, 50 °C'de ve 25 °C'de %50'ye düşmüştür (Şekil 4.5, c). *Streptomyces sp.* F3118 ve *Streptomyces sp.* F4880 suşları tarafından optimal endoglukanaz üretimi ise 45 °C'deki inkübasyonları sırasında üretilmiş olup (Şekil 4.5, b ve d; sırasıyla), 25 °C ve 50°C'deki inkübasyonları sırasında üretilen rölatif endoglukanaz aktiviteleri sırasıyla, %60-66,7 ile %40-66,7 arasında belirlenmiştir.

Ekstraselüler endoksilanaz aktivitelerinin belirlenmesinden sonra, endoksilanaz üretimi için optimum sıcaklığın çalışılan tüm *Streptomyces* suşları için 35 °C'de rölatif olarak %100'e ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Bu sıcaklıkta en yüksek endoksilanaz üretimini ortaya koyan suş *Streptomyces sp.* F2621 (52,338 U/mL) olurken (Şekil 4.6, a), onu küçük bir farkla *Streptomyces sp.* F6616 (52,158 U/mL) izlemiştir (Şekil 4.6, f). Bu iki organizmanın 50 °C'deki inkübasyonları esnasındaki rölatif endoksilanaz üretimleri birbirine yakın seyrederken (sırası ile; %20,6 ve %20,3), 25 °C'deki inkübasyonda *Streptomyces sp.* F6616'nın endoksilanaz üretiminin (%41,7), *Streptomyces sp.* F2621'in endoksilanaz üretiminden (%16,8) belirgin biçimde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6, a ve f). Bu iki organizmadan sonraki en yüksek endoksilanaz aktivitesini *Streptomyces sp.* F3120 sergilemiştir (35,072 U/mL). *Streptomyces sp.* F3120'nin 50 °C ve 25°C'de ürettiği rölatif endoksilanaz aktiviteleri sırası ile %49,3 (9,173 U/mL) ve %32,9 (8,633 U/mL) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.6, c).

Yukarıda söz edilen suşların dışında kalan *Streptomyces sp.* F3118, *Streptomyces sp.* F4880 ve *Streptomyces sp.* F6318'in, çalışmalarda kullanılan tüm suşların endoksilanaz aktiviteleri için optimum sıcaklık değeri olarak tespit edilen, 35 °C'deki endoksilanaz aktivteleri rölatif olarak sırası ile; 30,216 U/mL, 29,137 U/mL



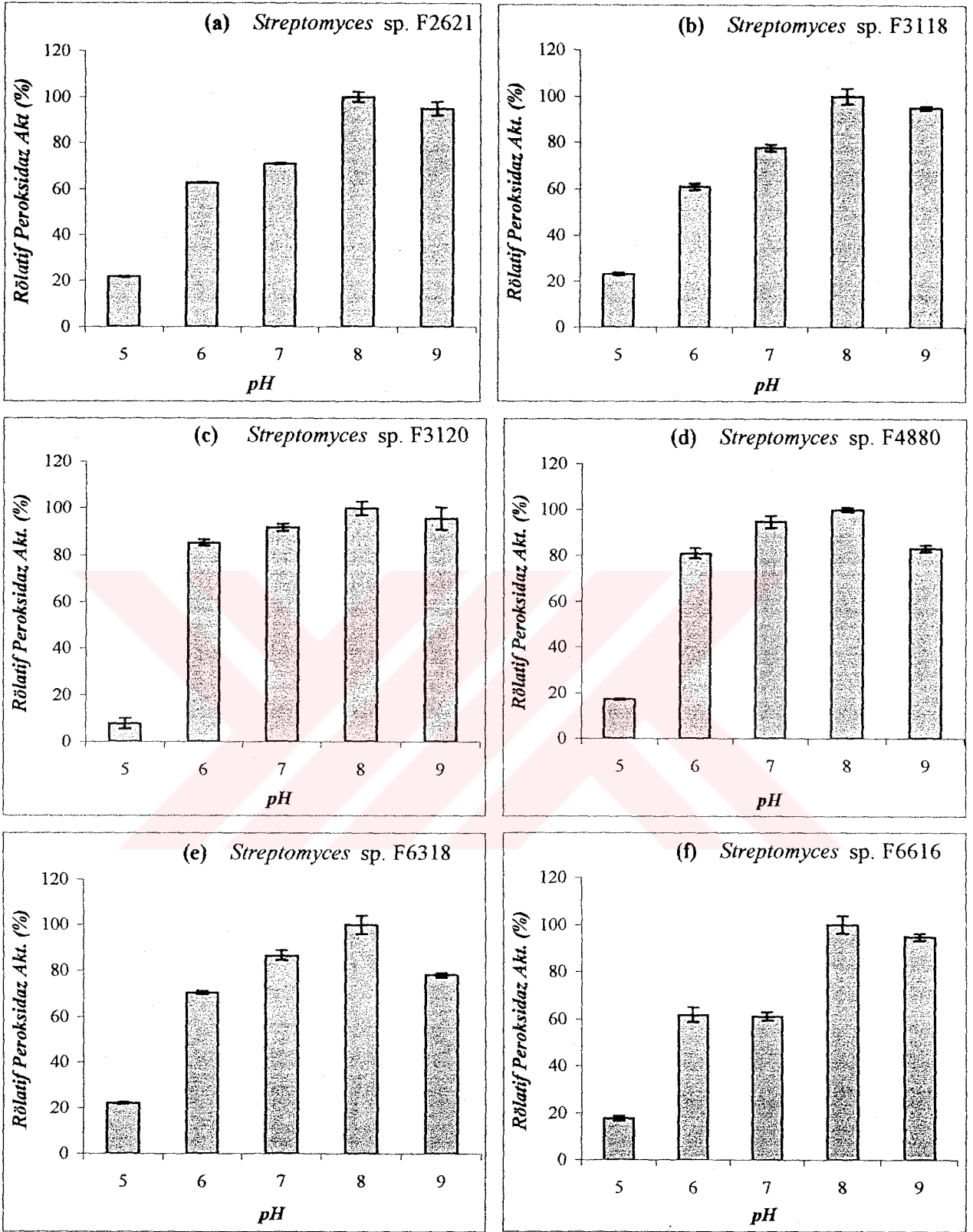
Şekil 4.6: Farklı sıcaklık koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri rölatif endoksilanaz aktiviteleri.

ve 26.259 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6, b, d ve e). Bu organizmalar içerisinde özellikle *Streptomyces sp.* F3118 ve *Streptomyces sp.* F4880'in rölatif endoksilanaz aktivitelerinde 50 °C'de meydana gelen düşüşün (sırası ile; %29,2 ve %27,8), 25 °C'de meydana gelen düşüşten (sırası ile; %74,4 ve %85,8) çok daha fazla olduğu görülmüştür. *Streptomyces sp.* F6318'de ise 50°C ve 25°C'de gerçekleşen rölatif aktivite sırasıyla %32,9 ve %26,2 şeklinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.6, e).

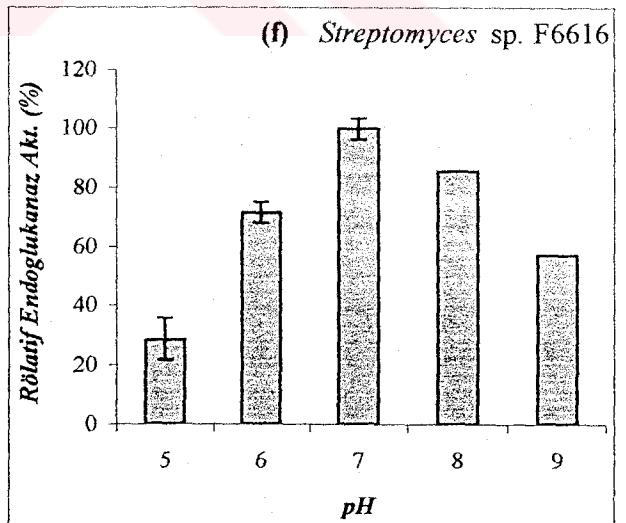
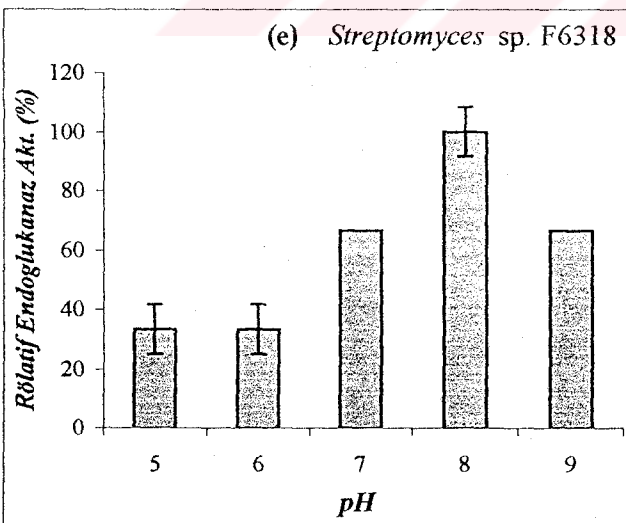
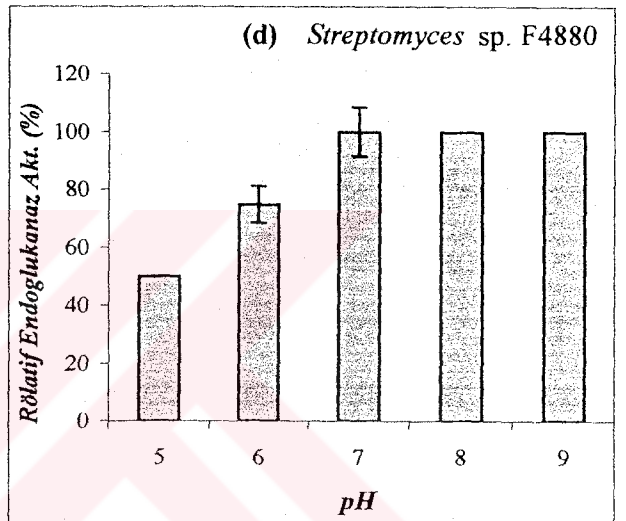
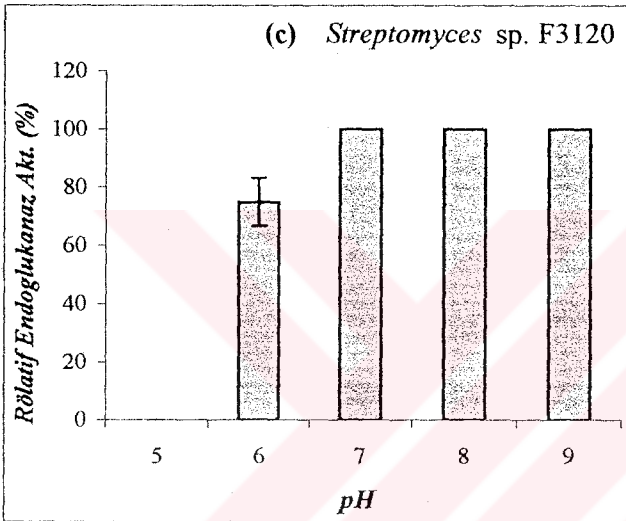
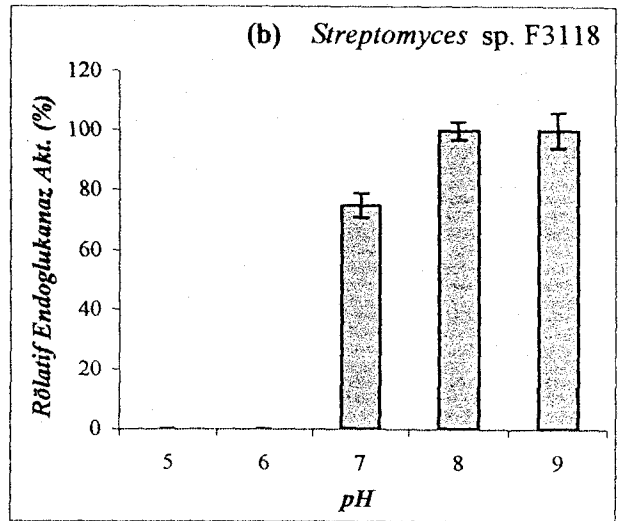
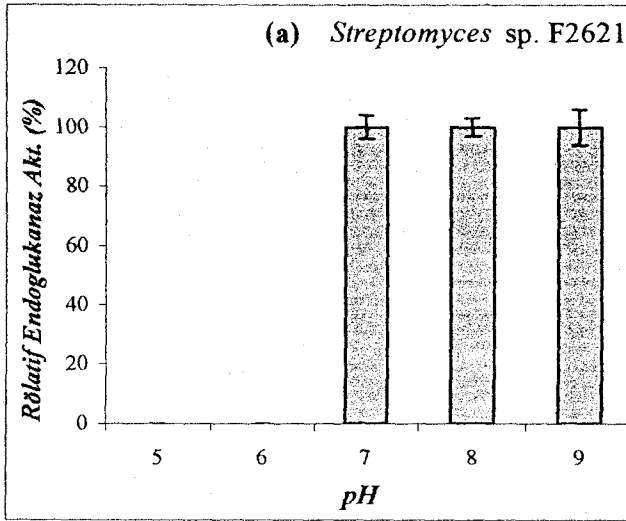
4.1.3. Farklı pH Koşullarında Ekstraselüler Lignoselüloolitik Enzimlerin Üretimi

Çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşlarının ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerinin üretimi üzerine kültür pH'ının etkisinin belirlenmesi, kültür ortamının pH'ı 5,0 ile 9,0 arasında ayarlanarak incelenmiştir. Çalışmada karbon ve enerji kaynağı olarak %0,2 (w/v) yulaf ksilanı içeren MS-YEM besiyeri büyüme ortamı olarak kullanılmış ve inkübasyon 30°C sıcaklıkta, 150 rpm'de, 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Ekstraselüler peroksidaz (Şekil 4.7), endoglukanaz (Şekil 4.8) ve endoksilanaz (Şekil 4.9) üretimlerinin maksimal seviyede gerçekleştiği kültür ortamlarının pH değerinin 7,0 ve 8,0 arasında olduğu tespit edilmiştir.

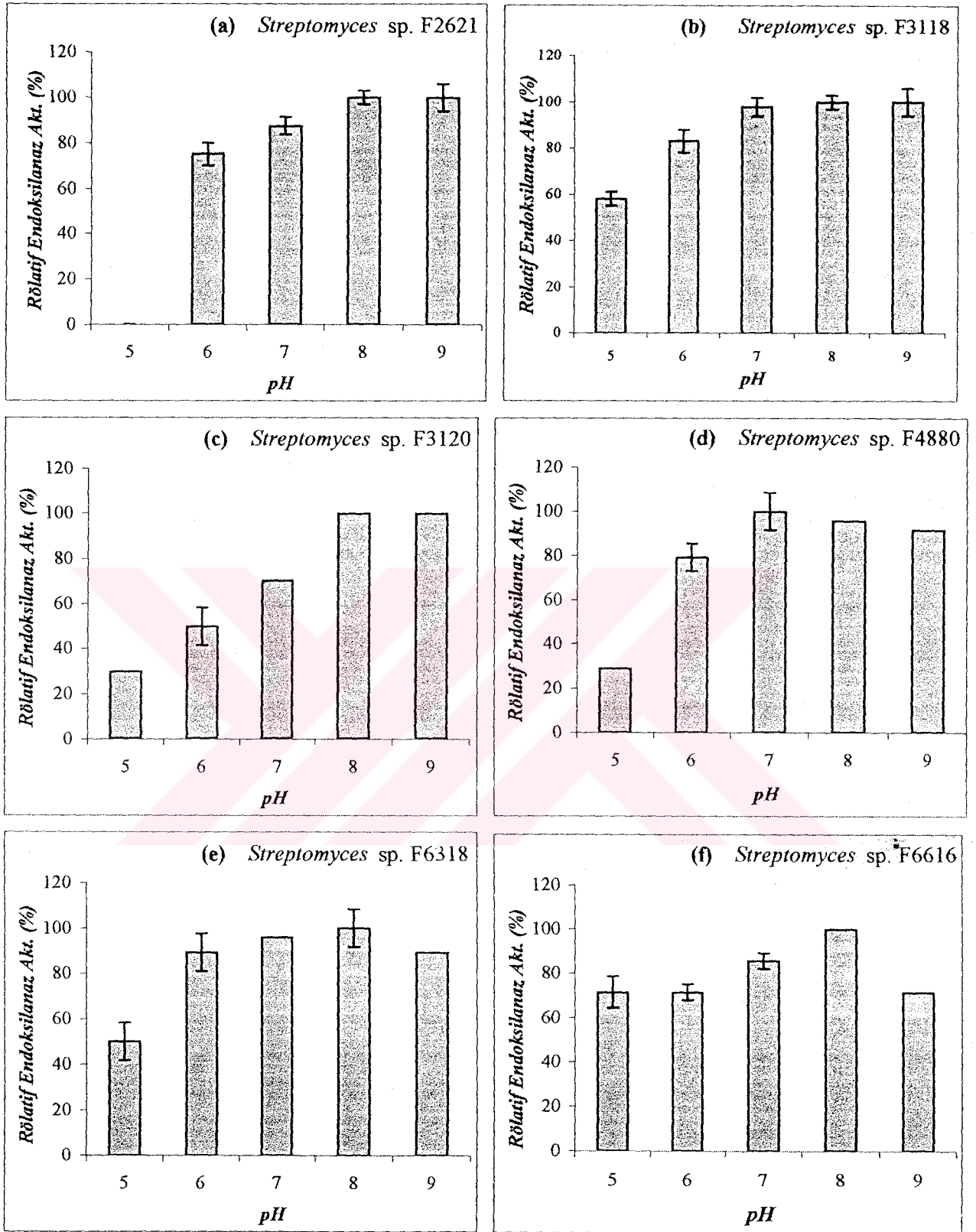
Bu çalışmalar sırasında kullanılan bütün *Streptomyces* suşları, en yüksek peroksidaz aktivitelerini pH 8,0'de göstermelerine rağmen, elde edilen en yüksek peroksidaz aktivitesi (0,472 U/mL) ise *Streptomyces sp.* F3120 tarafından üretilmiştir. pH 8,0'de rölatif olarak %100 olan bu suşun peroksidaz aktivitesi pH 9,0'da %85,8'e (0,405 U/mL) düşerken, pH 5,0'de ise %4,4'e (0,033 U/mL) kadar gerilemiştir (Şekil 4.7, c). *Streptomyces sp.* F2621, *Streptomyces sp.* F3118, *Streptomyces sp.* F4880 ve *Streptomyces sp.* F6318 suşlarının hepsi de rölatif olarak %100 olan en yüksek peroksidaz üretimlerini (sırası ile; 0,213 U/mL; 0,119 U/mL; 0,190 U/mL ve 0,261 U/mL) pH 8,0'de gerçekleştirmişlerdir (Şekil 4.7, a, b, d ve e, sırasıyla). pH 9,0'daki rölatif peroksidaz aktiviteleri ise %78,1 ile %95,1 arasında olup sırası ile; 0,203 U/mL, 0,114 U/mL, 0,158 U/mL ve 0,204 U/mL şeklinde gerçekleşirken pH 5,0'deki aktiviteler çok daha düşük seviyelerde, %17,1 ile %23,1 arasında (sırası ile; 0,046 U/mL, 0,028 U/mL, 0,033 U/mL ve 0,058 U/mL) seyretmiştir. *Streptomyces sp.* F6616 tarafından üretilen en yüksek rölatif



Şekil 4.7: Farklı pH koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri rölatif peroksidaz aktiviteleri.



Şekil 4.8: Farklı pH koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri rölatif endoglukanaz aktiviteleri.



Şekil 4.9: Farklı pH koşulları altında 72 saatlik inkübasyon sonrası *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri rölatif endoksilanaz aktiviteleri.

peroksidaz aktivitesi de (0,190 U/mL) diğer suşlarda olduğu gibi pH 8,0'de belirlenmiştir (Şekil 4.7, f). Bu suşun pH 9,0'daki rölatif peroksidaz aktivitesi %78,1'e (0,180 U/mL) gerilerken pH 5,0'de daha büyük bir düşüş gerçekleşmiş ve rölatif aktivite %22'ye (0,034 U/mL) gerilemiştir (Şekil 4.7, f).

Çalışılan *Streptomyces* suşları içerisindeki rölatif olarak en yüksek endoglukanaz aktivitesi (2,201 U/mL) *Streptomyces sp.* F6616 tarafından pH 7,0'de üretilmiştir (Şekil 4.8, f). Bu suşun endoglukanaz üretimi pH 9,0'da rölatif olarak %57,2'ye (1,258 U/mL), pH 5,0'de ise %28,6'ya (0,629 U/mL) gerilemiştir. *Streptomyces sp.* F6616'dan sonra en yüksek endoglukanaz aktivitelerini *Streptomyces sp.* F4880 ve *Streptomyces sp.* F6318 sırası ile pH 7,0'de (1,258 U/mL) ve pH 8,0'de (0,943 U/mL) üretmişlerdir (Şekil 4.8, d ve e). Bu suşlardan *Streptomyces sp.* F4880'in endoglukanaz aktivitesi pH 7,0 ve 9,0 arasında sabit kalırken (1,258 U/mL) *Streptomyces sp.* F6318'in pH 9,0'daki endoglukanaz aktivitesi %66,7 (0,629 U/mL) olarak gerçekleşmiştir. Her iki suşun endoglukanaz aktiviteleri pH 5,0'de düşüş göstererek sırası ile %50 (0,629 U/mL) ve %33,4'e (0,314 U/mL) gerilemiştir (Şekil 4.8, d ve e, sırası ile). Çalışılan suşlar arasından *Streptomyces sp.* F2621 ve *Streptomyces sp.* F3118 pH 7,0'nin ve *Streptomyces sp.* F3120 pH 6,0'nın altındaki pH değerlerinde endoglukanaz aktivitesi sergilememişlerdir (Şekil 4.8, a, b ve c sırası ile). Bu üç suş içerisinde pH 7,0'nin altında endoglukanaz aktivitesi sergilemeyen *Streptomyces sp.* F2621 pH 7,0 ve pH 9,0 arasında 0,629 U/mL ve *Streptomyces sp.* F3118 pH 8,0 ve pH 9,0'da 0,629 U/mL endoglukanaz aktivitesi ile en yüksek değerlerine ulaşmışlardır. Bu iki suş içinden *Streptomyces sp.* F3118'in endoglukanaz aktivitesi pH 7,0'de %75'e (0,472 U/mL) gerilemiştir. *Streptomyces sp.* F3120'nin endoglukanaz aktivitesi ise pH 7,0 ile pH 9,0 arasında 0,629 U/mL olarak gerçekleşirken suşun aktivitesi pH 6,0'da %75'e (0,472 U/mL) gerilemiştir.

Rölatif olarak en yüksek endoksilanaz üretimi (25,360 U/mL) *Streptomyces sp.* F3118 tarafından pH 8,0 ve 9,0'da sergilenmiştir. pH 5,0'de ise aynı organizmanın endoksilanaz aktivitesi rölatif olarak %58,2'ye gerilemiştir (Şekil 4.9, b). *Streptomyces sp.* F3120, pH 8,0 ve 9,0'da rölatif olarak en yüksek endoksilanaz

aktivitesini üretmiş ve bu aktivite pH 5,0'de %30'a düşmüştür (Şekil 4.9, c). *Streptomyces sp.* F3120'den sonraki en yüksek endoksilanaz aktivitesi *Streptomyces sp.* F6318 (21,942 U/mL) tarafından pH 8,0'de sergilenmiştir. *Streptomyces sp.* F6318 pH 6,0 ile 9,0'da birbirine yakın değerler sergilemekle birlikte (rölatif olarak %90 ve %88) pH 5,0'de endoksilanaz aktivitesi %50'ye (10,971 U/mL) gerilemiştir (Şekil 4.9, e). Çalışılan suşlar arasından *Streptomyces sp.* F2621 pH 6,0'nın altındaki pH değerlerinde endoksilanaz aktivitesi üretmezken en yüksek endoksilanaz aktivitesini pH 8,0 ve 9,0'da (1,439 U/mL) sergilemiştir. Bu organizmanın pH 6,0'daki endoksilanaz aktivitesi %75'e gerileyerek 1,079 U/mL olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.9, a). Yukarıda bahsedilen suşların dışında kalan suşlardan *Streptomyces sp.* F3120 ve *Streptomyces sp.* F6616'nın en yüksek endoksilanaz aktiviteleri pH 8,0'de (sırası ile; 1,799 U/mL ve 5,036 U/mL) gerçekleşirken *Streptomyces sp.* F4880'nin en yüksek endoksilanaz aktivitesi pH 7,0'de (4,137 U/mL) gerçekleşmiştir (Şekil 4.9, c, f ve d, sırası ile). *Streptomyces sp.* F4880'nin ve *Streptomyces sp.* F6616'nın endoksilanaz aktiviteleri pH 9,0'da düşüş gösterirken (sırası ile; %91,7 ve %71,4) *Streptomyces sp.* F3120'nin aktivitesinde değişim gözlenmemiştir. pH'ı 5,0'e ayarlanmış besiyerindeki inkübasyon sonrasında bu üç suş içinden *Streptomyces sp.* F3120 ve *Streptomyces sp.* F4880'nin endoksilanaz aktivitelerinde meydana gelen düşüşün (sırası ile %30 ve %29,1), *Streptomyces sp.* F6616'nın aktivitesinde meydana gelen düşüşle kıyaslandığında (%71,4) çok daha büyük olduğu görülmüştür.

4.1.4. Farklı Karbon Kaynakları ve Konsantrasyonlarının Lignoselülitik Ekstraselüler Enzimlerin Üretimi Üzerine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin üretimi üzerine etkisini araştırmak için, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece yulaf ksilanı veya sadece öğütülmüş buğday samanı içeren MS-YEM besiyeri kullanılmıştır. Karbon kaynakları besiyerine %0,0-1,2 (w/v) arasında değişen konsantrasyonlarda ilave edilmiş ve organizmalar 30 °C sıcaklıkta, 150 rpm'de, 72 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Kontrol olarak kullanılan ve yulaf ksilanı veya öğütülmüş buğday

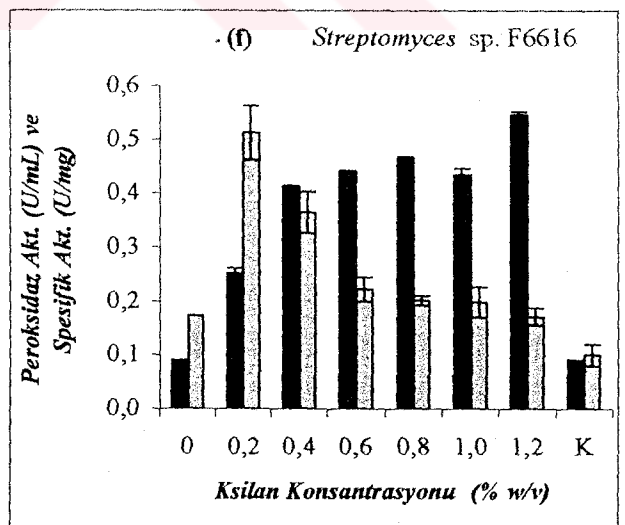
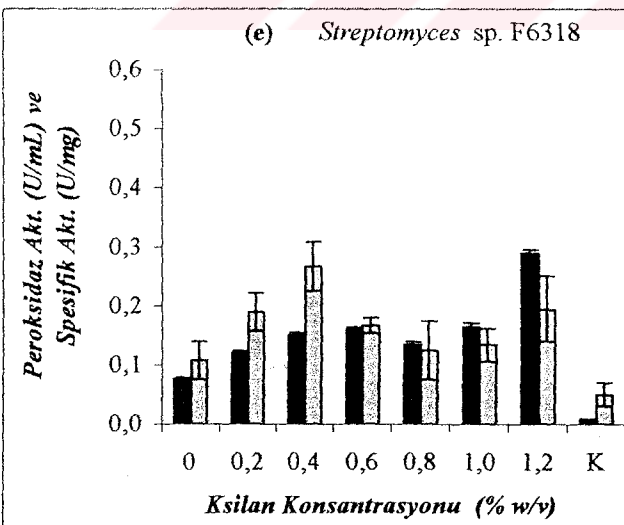
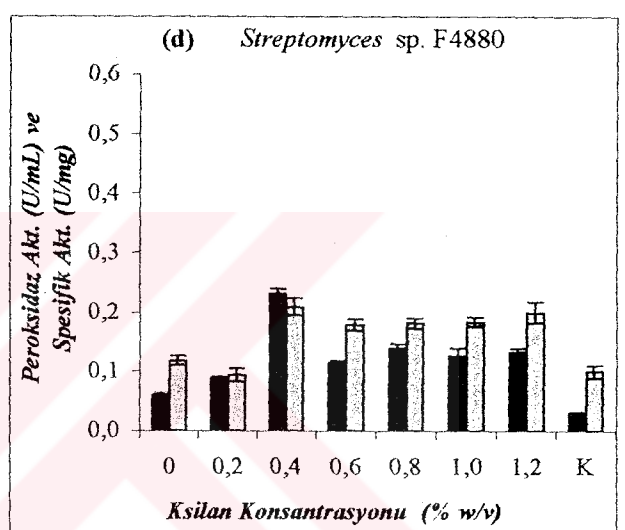
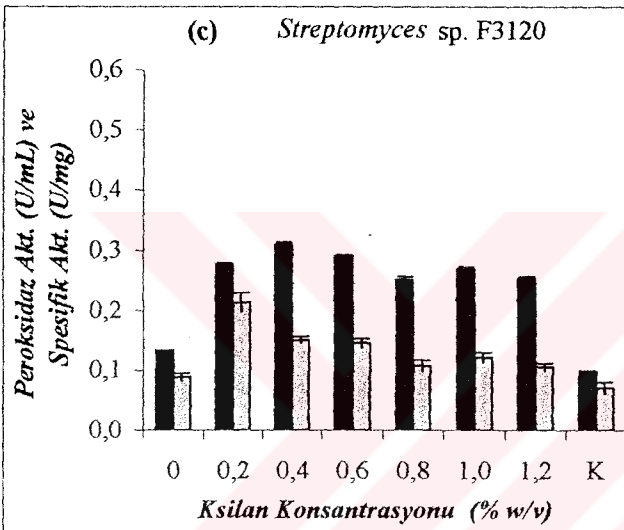
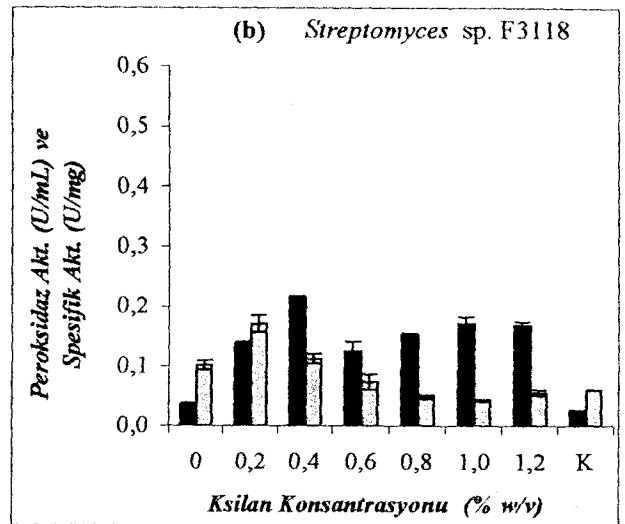
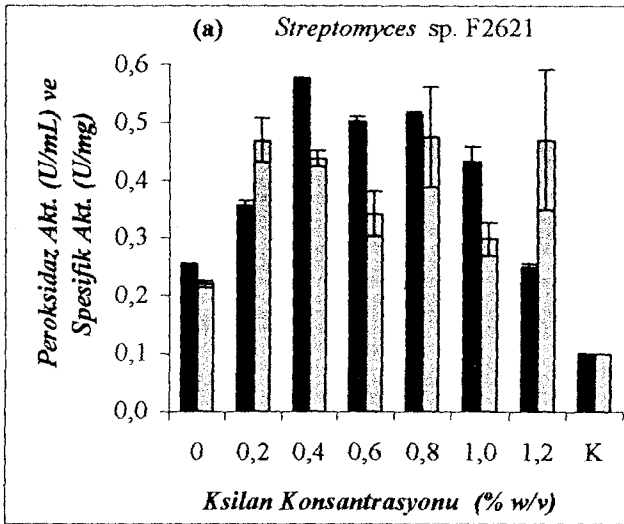
samanı içermeyen besiyerlerine ise ayrıca başka bir karbon kaynağı ilave edilmemiştir.

4.1.4.1. Farklı konsantrasyonlardaki yulaf ksilanının lignoselüloolitik ekstraselüler enzimlerin üretimi üzerine etkisi

Bu çalışmalar sırasındaki en yüksek peroksidaz aktivitesini, *Streptomyces sp.* F2621 %0,4 (w/v) ksilan içeriğine sahip besiyerinde üretmiştir (0,576 U/mL) (Şekil 4.10, a). Bunu, çok küçük farkla *Streptomyces sp.* F6616'nın %1,2 (w/v) ksilan konsantrasyonuna sahip besiyerinde ürettiği peroksidaz aktivitesi (0,548 U/mL) izlemiştir (Şekil 4.10, f). *Streptomyces sp.* F2621 ve *Streptomyces sp.* F6616'nın peroksidaz aktiviteleri %0,0 (w/v) ksilan içeren besiyerinde sırası ile 0,255 U/mL ve 0,090 U/mL şeklinde gerçekleşmiştir. *Streptomyces sp.* F6616'nın peroksidaz aktivitesi artan ksilan konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artış göstermiş ve optimum değerine çalışmalarda en yüksek konsantrasyon olan %1,2 (w/v)'de ulaşmıştır. *Streptomyces sp.* F2621'in peroksidaz aktivitesinde ise optimum ksilan konsantrasyonunun [%0,4 (w/v)] altındaki ve üstündeki konsantrasyonlarda belirgin düşüş gözlenmiştir. Bu düşüşün, en yüksek konsantrasyon olan %1,2 (w/v) de, en düşük konsantrasyondaki [%0,0 (w/v)] değere yakın bir değer olarak, 0,250 U/mL'ye gerilediği belirlenmiştir (Şekil 4.10, a).

Streptomyces sp. F3118 ve *Streptomyces sp.* F3120 en yüksek peroksidaz aktivitelerini (0,214 U/mL ve 0,310 U/mL, sırasıyla) %0,4 (w/v) ksilan konsantrasyonlarında göstermişlerdir. Organizmaların bu aktiviteleri %0,0 (w/v) ksilan konsantrasyonunda sırası ile; 0,036 U/mL ve 0,133 U/mL'ye; %1,2 (w/v) ksilan konsantrasyonunda ise 0,169 U/mL ve 0,254 U/mL'ye gerilemiştir (Şekil 4.10, b ve c).

Streptomyces sp. F4880, endoglukanaz ve endoksilanaz aktivitelerinin üretiminden farklı olarak, en yüksek peroksidaz aktivitesini %0,4 (w/v) yulaf ksilanı içeren besiyerinde üretmiştir (0,231 U/mL). Bu suşun peroksidaz aktivitesi, %1,2 (w/v) yulaf ksilanı içeren besiyerinde 0,122 U/mL iken %0,0 (w/v) yulaf ksilanı içeren besiyerinde ise 0,061 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10, d).



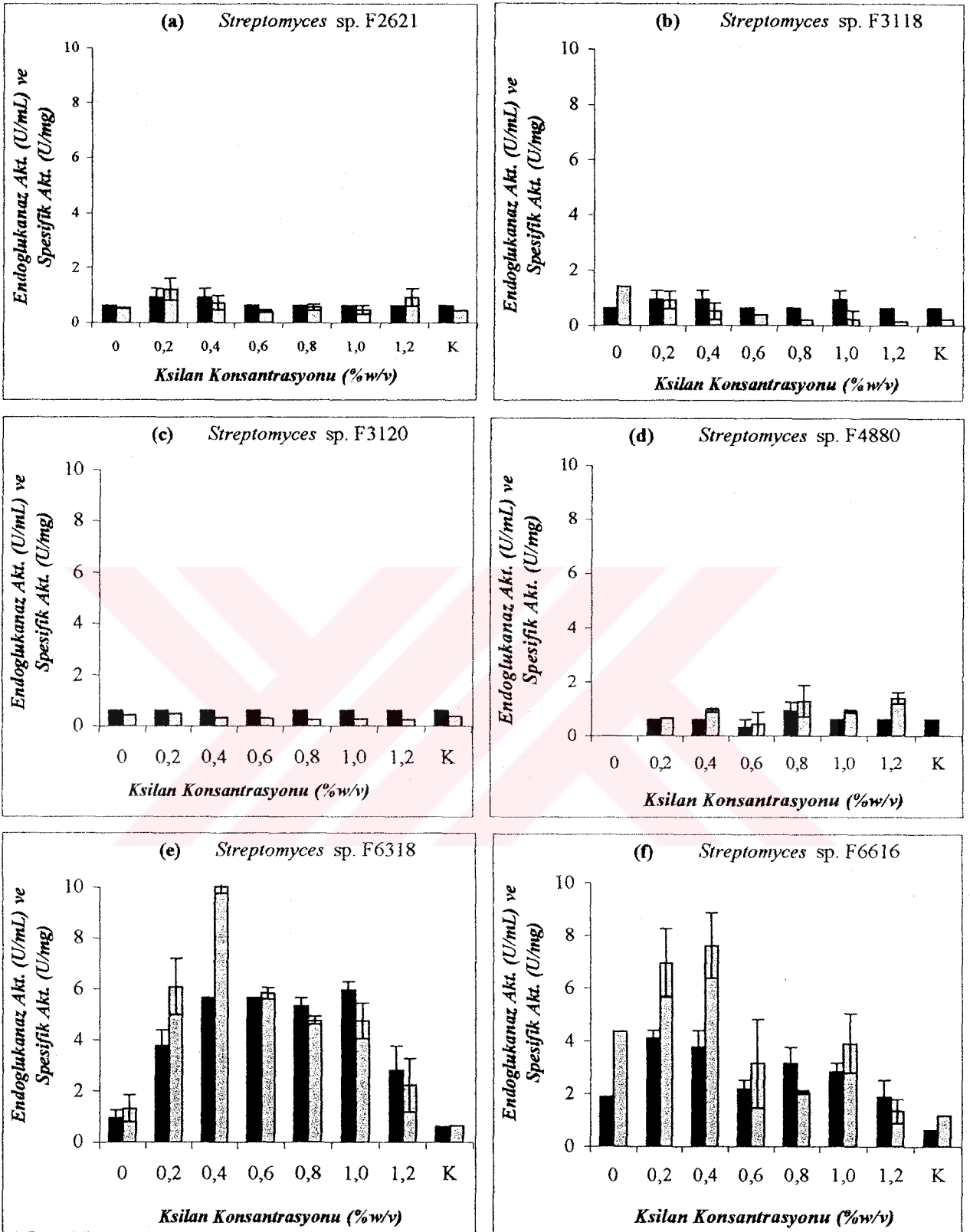
Şekil 4.10: Farklı ksılan konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri peroksidaz aktiviteleri (■) ve spesifik aktiviteleri (□).

Streptomyces sp. F6318'in peroksidaz aktivitesi için optimum konsantrasyonun %1,2 (w/v) olduğu belirlenmiş ve suşun bu konsantrasyondaki peroksidaz aktivitesi 0,290 U/mL olarak tespit edilmiştir. *Streptomyces sp.* F6318'in en düşük konsantrasyon olan %0,0 (w/v)'da ise ancak 0,078 U/mL peroksidaz aktivitesi üretebildiği görülmüştür (Şekil 4.10, e).

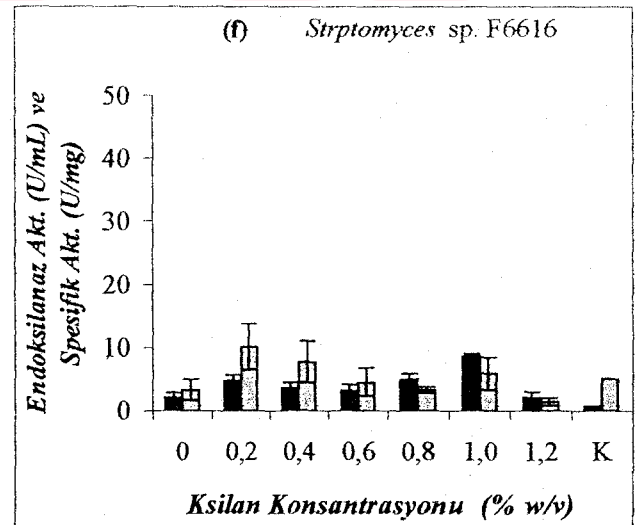
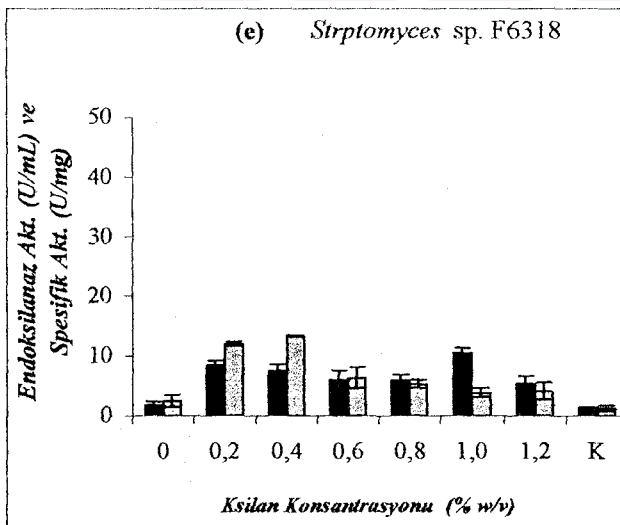
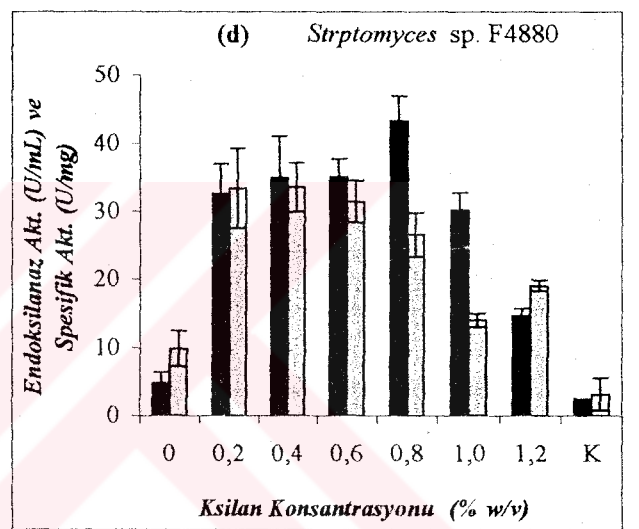
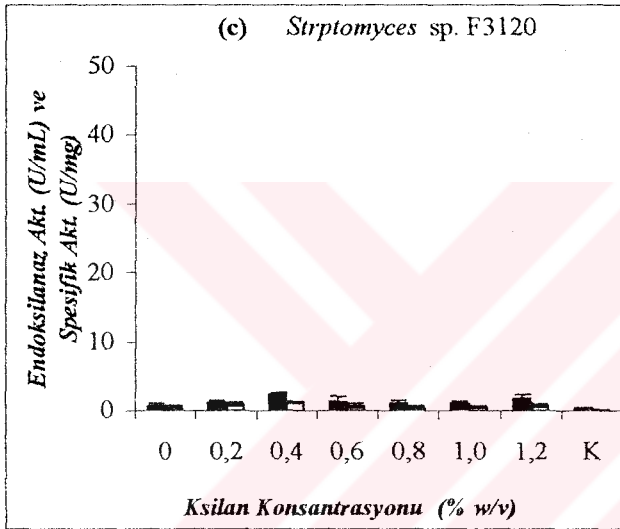
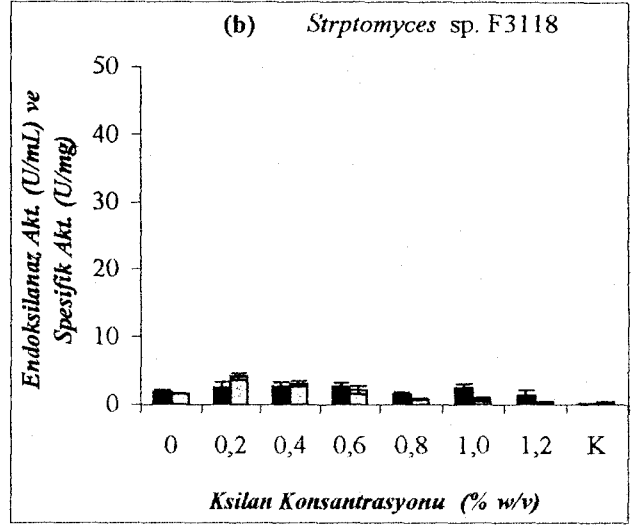
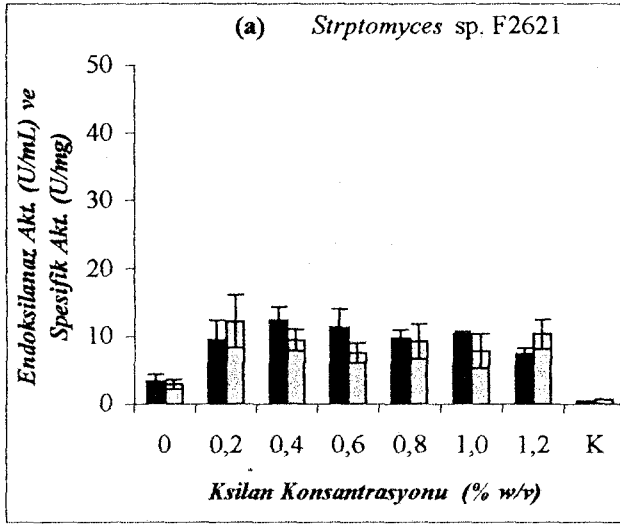
Farklı ksilan konsantrasyonları içeren besiyerlerindeki inkübasyon sırasında en yüksek endoglukanaz aktivitesi (5,975 U/mL) ise *Streptomyces sp.* F6318 tarafından %1,0 (w/v) ksilan içeren besiyerlerinde üretilmiştir (Şekil 4.11, e). Bu suşun %1,2 (w/v) ksilan içeren besiyerindeki endoglukanaz aktivitesi 2,836 U/mL olarak tesbit edilirken, %0,0 (w/v) ksilan içeren besiyerindeki endoglukanaz aktivitesi ise 0,943 U/mL olarak tespit edilmiştir. Bu suştan sonra, çalışılan altı *Streptomyces* suşu arasında en yüksek ikinci endoglukanaz aktivitesini ise *Streptomyces sp.* F6616 üretmiştir (Şekil 4.11, f). *Streptomyces sp.* F6616 en yüksek endoglukanaz aktivitesini (4,088 U/mL) %0,2 (w/v) ksilan konsantrasyonuna sahip besiyerinde üretmiştir. Bu organizmanın çalışmalardaki sınır konsantrasyonlar olan %0,0 (w/v) ve %1,2 (w/v) ksilan konsantrasyonlarındaki aktiviteleri ise 1,887 U/mL'ye gerilemiştir.

Çalışmada kullanılan toplam altı *Streptomyces* suşundan *Streptomyces sp.* F2621, *Streptomyces sp.* F3118, *Streptomyces sp.* F3120 ve *Streptomyces sp.* F4880 suşlarının hepsi de, kontrol grubu besiyerlerinde tespit edilen endoglukanaz aktivitelerinden belirgin bir farklılık gösterecek düzeyde endoglukanaz aktivitesi üretmemişlerdir (Şekil 4.11, a, b, c ve d).

Karbon ve enerji kaynağı olarak yulaf ksilanının kullanıldığı çalışmalarda en yüksek endoksilanaz aktivitesi (43,345 U/mL) ise *Streptomyces sp.* F4880 tarafından %0,8 (w/v) yulaf ksilanı içeren kültür ortamında üretilmiştir (Şekil 4.12, d). Bu suş, %0,0 (w/v) yulaf ksilanı içeren besiyerinde 4,856 U/mL ve %1,2 (w/v) yulaf ksilanı içeren besiyerinde ise 14,748 U/mL endoksilanaz aktivitesi üretmiştir. *Streptomyces sp.* F4880'den sonra ikinci en yüksek düzeydeki endoksilanaz aktivitesi (12,410 U/mL) ise *Streptomyces sp.* F2621 tarafından %0,4 (w/v) ksilan içeren kültür



Şekil 4.11: Farklı ksilan konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoglukanaz aktiviteleri (■) ve spesifik aktiviteleri (□).



Şekil 4.12: Farklı ksılan konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoksilanaz aktiviteleri (■) ve spesifik aktiviteleri (□).

ortamında belirlenmiştir (Şekil 4.12, a). Bu suşlardan her ikisi de endoksilanaz aktiviteleri için optimum ksilan konsantrasyonunun altındaki ve üstündeki konsantrasyonlarda enzim aktivitelerinde az da olsa düşüş göstermişlerdir. Bu düşüş *Streptomyces sp.* F2621 için %1,2 (w/v)'lik konsantrasyonda 7,374 U/mL ve %0,0 (w/v)'lik konsantrasyonda ise 3,417 U/mL olarak belirlenmiştir.

Streptomyces sp. F3118 ve *Streptomyces sp.* F3120 ise kontrol grubundan belirgin olarak düşük düzeylerde olsa da, %0,4 (w/v) yulaf ksilanı içeren besiyerlerinde maksimum olarak üretmiş oldukları endoksilanaz aktiviteleri (2,698 U/mL ve 2,338 U/mL, sırasıyla), çalışmalarda kullanılan diğer *Streptomyces* suşları tarafından üretilen endoksilanaz aktivitelerinden oldukça düşük seviyelerde belirlenmiştir (Şekil 4.12, b ve c).

Streptomyces sp. F6318 ise en yüksek endoksilanaz aktivitesini, aynı zamanda endoglukanaz aktivitesi için de optimum konsantrasyon olan, %1,0 (w/v) ksilan içeren besiyerinde üretmiştir (10,432 U/mL). *Streptomyces sp.* F6318'in endoksilanaz aktivitesinin, %1,2 (w/v) konsantrasyona sahip besiyerinde 5,396 U/mL'ye ve %0,0 (w/v) konsantrasyona sahip besiyerinde ise 1,799 U/mL'ye gerilediği belirlenmiştir (Şekil 4.12, e).

Streptomyces sp. F6616 ise, en yüksek peroksidaz aktivitesini üretmiş olduğu konsantrasyon olan %1,2 (w/v)'den farklı olarak, en yüksek endoksilanaz aktivitesini %1,0 (w/v) ksilan konsantrasyonuna sahip besiyerinde sergilemiştir (8,633 U/mL). Bu suşun en düşük ve en yüksek ksilan konsantrasyonları olan %0,0 (w/v) ve %1,2 (w/v)'lik besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri 2,158 U/mL şeklinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.12, f).

4.1.4.2. Öğütülmüş buğday samanının farklı konsantrasyonlarının lignoselülitik enzimlerin üretimi üzerine etkisi

Lignoselüloz olarak öğütülmüş buğday samanı kullanılarak yapılan indükleme çalışmaları sırasındaki en yüksek peroksidaz aktivitesi, *Streptomyces sp.* F6616

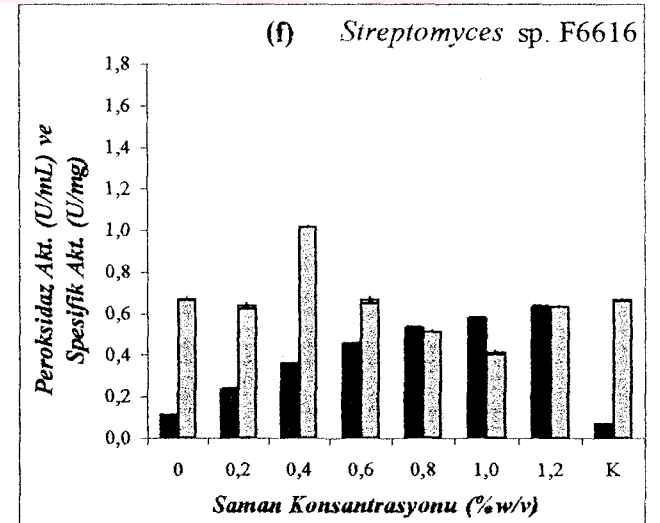
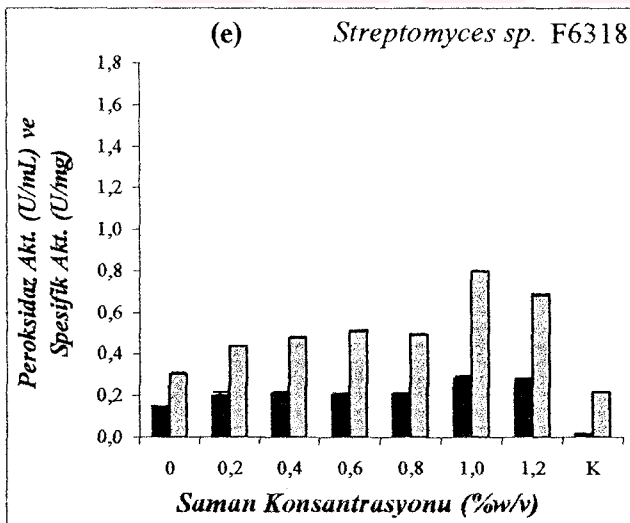
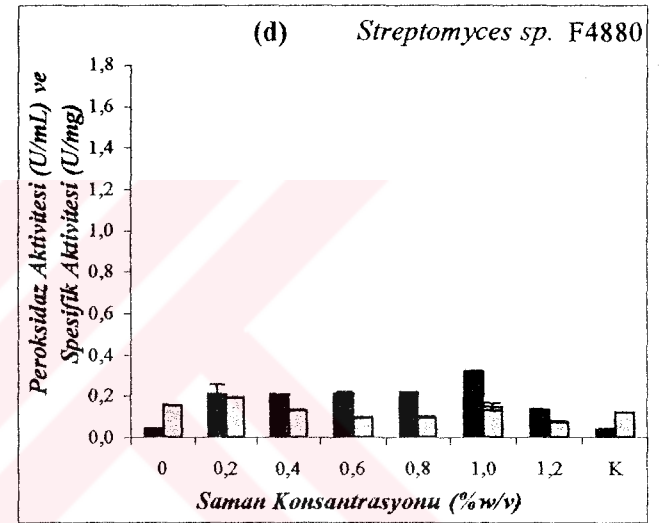
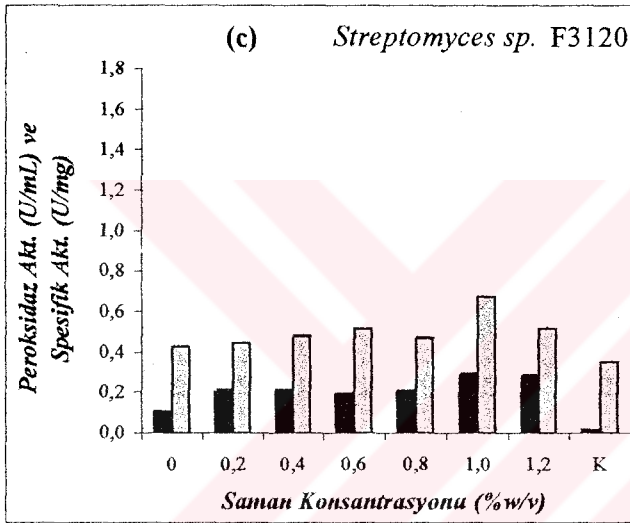
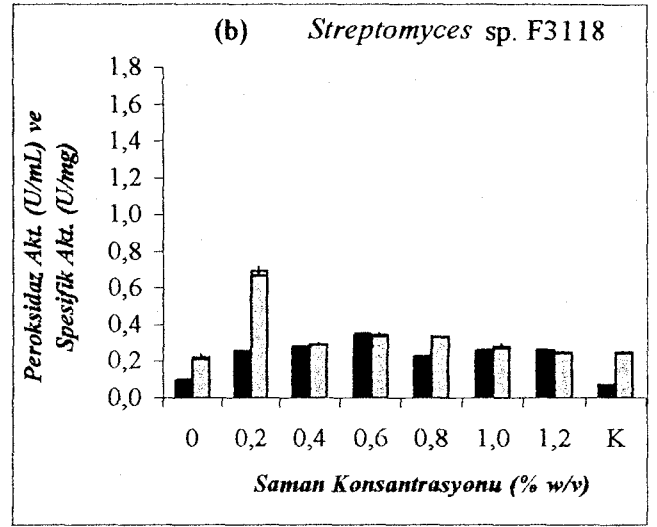
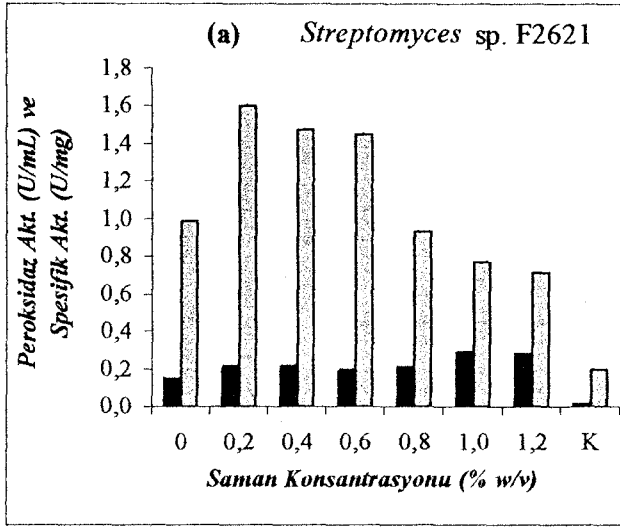
tarafından, %1,2 (w/v) saman içeren kültür ortamında belirlenmiştir (Şekil 4.13, f). Organizmanın bu konsantrasyonda sergilediği 0,631 U/mL peroksidaz aktivitesi, aynı zamanda tüm çalışmalar boyunca peroksidaz aktivitesi için kaydedilen en yüksek değer olmuştur. Bununla beraber, organizmanın %0,0 (w/v) saman konsantrasyonundaki peroksidaz aktivitesi 0,113 U/mL olarak tespit edilmiştir.

Streptomyces sp. F3118'in en yüksek peroksidaz aktivitesi sergilediği saman konsantrasyonu ise %0,6 (w/v) olarak belirlenmiş ve suşun bu konsantrasyondaki peroksidaz aktivitesi 0,340 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13, b). *Streptomyces sp.* F3118'in peroksidaz aktivitesi %1,2 (w/v) saman konsantrasyonuna sahip besiyerinde 0,263 U/mL'ye, %0,0 (w/v) saman konsantrasyonu içeren besiyerinde ise 0,099 U/mL'ye gerilemiştir.

Streptomyces sp. F4880 bu çalışmalar sırasında sergilediği en yüksek peroksidaz aktivitesi olan 0,319 U/mL aktiviteyi, endoglukanaz ve endoksilanaz enzimlerinden farklı olarak %1,0 (w/v) konsantrasyonunda saman içeren kültür ortamında göstermiştir (Şekil 4.13, d). Organizmanın %1,2 (w/v) saman konsantrasyonundaki peroksidaz aktivitesi 0,139 U/mL, %0,0 (w/v) konsantrasyonundaki peroksidaz aktivitesi de 0,045 U/mL olarak belirlenmiştir.

Çalışmalarda kullanılan *Streptomyces sp.* F2621, *Streptomyces sp.* F3120 ve *Streptomyces sp.* F6318'in üçünün de en yüksek peroksidaz aktiviteleri, %1,0 (w/v) saman konsantrasyonuna sahip besiyerinde tespit edilmiş ve bu konsantrasyondaki peroksidaz aktiviteleri her üç suş için de 0,288 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13, a, c ve e). Bu suşlar %1,2 (w/v) saman konsantrasyonunda da aynı peroksidaz aktivitesi değerini sergilerken (0,288 U/mL), %0,0 (w/v) saman konsantrasyonuna sahip besiyerlerindeki büyümeleri sırasındaki peroksidaz aktiviteleri ise sırası ile; 0,151 U/mL, 0,106 U/mL ve 0,149 U/mL şeklinde gerçekleşmiştir.

Bu çalışmalar sırasında kaydedilen 2,201 U/mL'lik en yüksek endoglukanaz aktivitesi ise *Streptomyces sp.* F3118 ve *Streptomyces sp.* F4880'in sırası ile, %0,4 (w/v) ve %0,8 (w/v) saman konsantrasyonları üzerindeki büyümeleri sırasında



Şekil 4.13: Farklı saman konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri peroksidaz aktiviteleri (■) ve spesifik aktiviteleri (□).

belirlenmiştir (Şekil 4.14, b ve d, sırasıyla). *Streptomyces sp.* F3118'in endoglukanaz aktivitesi %1,2 (w/v) saman konsantrasyonunda 0,314 U/mL'ye ve %0,0 (w/v) saman konsantrasyonunda ise 0,934 U/mL'ye gerilemiştir. *Streptomyces sp.* F4880'in %1,2 (w/v) saman konsantrasyonundaki endoglukanaz aktivitesi 1,415 U/mL iken %0,0 (w/v) saman konsantrasyonunda ise 0,157 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14, d).

Streptomyces sp. F2621, *Streptomyces sp.* F3120 ve *Streptomyces sp.* F6318'in, endoglukanaz aktiviteleri söz konusu olduğunda da peroksidaz aktivitelerine benzer şekilde, en yüksek aktivite değerlerine aynı saman konsantrasyonunda [%0,6 (w/v)] ulaşmışlardır ve suşların bu konsantrasyondaki aktiviteleri sırası ile; 1,101 U/mL, 1,730 U/mL ve 1,730 U/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14, a, c ve e, sırasıyla). Bu organizmaların %1,2 (w/v) saman içeren besiyerlerindeki endoglukanaz aktiviteleri *Streptomyces sp.* F2621 ve *Streptomyces sp.* F6318 için 0,786 U/mL olarak, *Streptomyces sp.* F3120 için ise 0,943 U/mL olarak belirlenmiştir. Saman konsantrasyonları %0,0 (w/v) olan kültür ortamlarında ise endoglukanaz aktivitelerinin sırası ile; 0,472 U/mL, 1,258 U/mL ve 0,629 U/mL olduğu belirlenmiştir.

Streptomyces sp. F6616 tarafından salgılanan endoglukanaz aktivitesinin en yüksek düzeyi (1,572 U/mL) ise %1,0 (w/v) saman konsantrasyonunda belirlenmiştir (Şekil 4.14, f). Bu organizmanın endoglukanaz aktivitesi, %1,2 (w/v) saman içeren kültür ortamında 0,629 U/mL'ye, %0,0 (w/v) saman içeren kültür ortamında ise 0,472 U/mL'ye gerilemiştir.

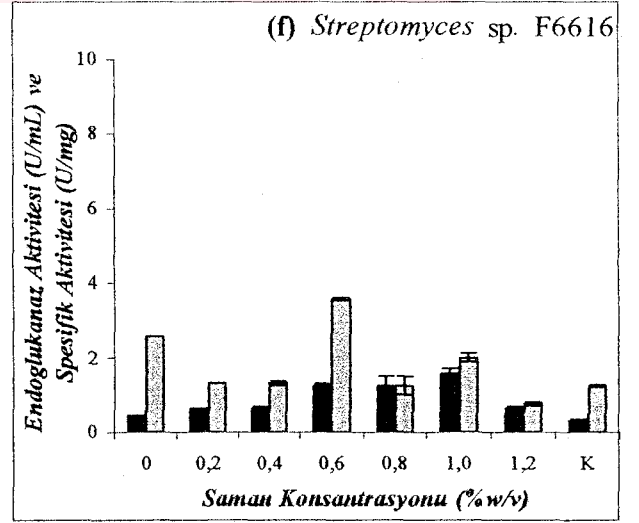
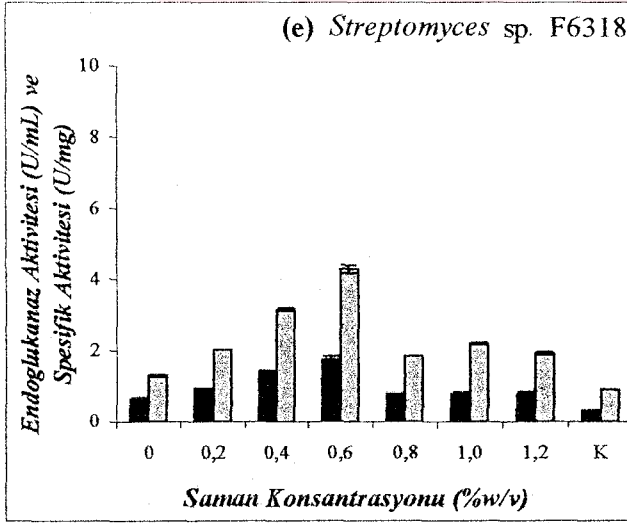
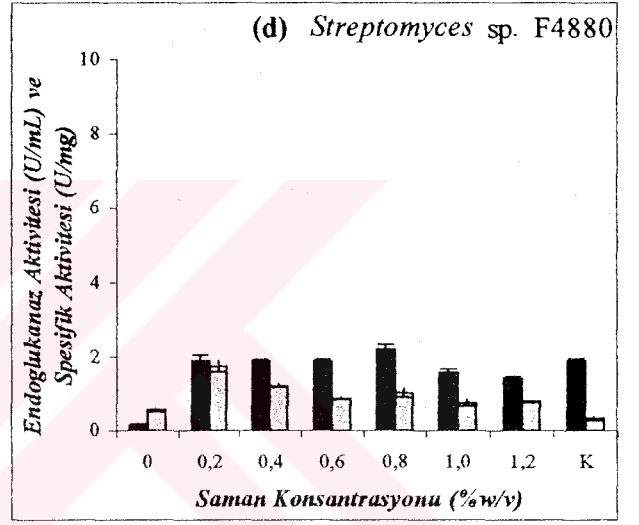
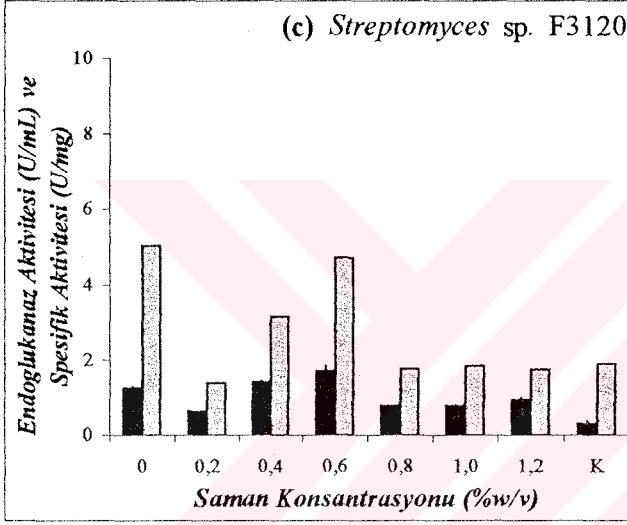
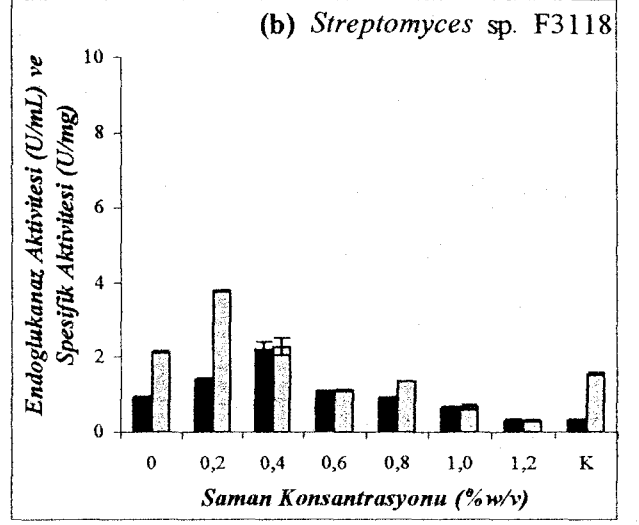
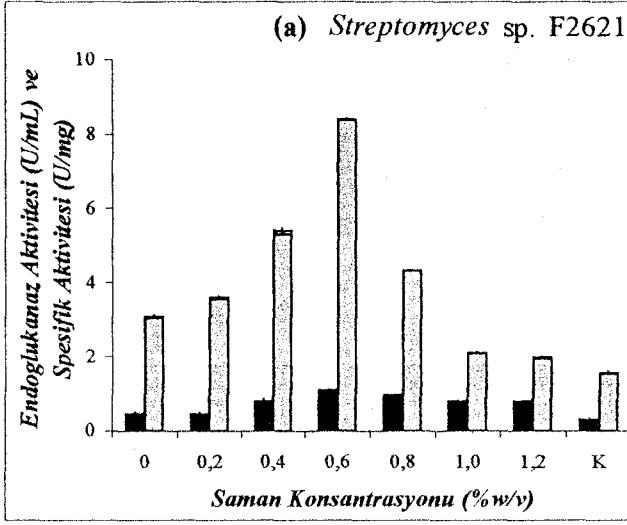
Ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerin sentezini indükleyici olarak sadece öğütülmüş buğday samanının farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı çalışmalarda, en yüksek endoksilanaz aktivitesi *Streptomyces sp.* F4880 tarafından %0,8 (w/v) saman konsantrasyonuna sahip kültürde üretilmiştir (27,968 U/mL) (Şekil 4.15, d). Bu suşun endoksilanaz aktivitesi çalışmalarda kullanılan en yüksek konsantrasyon olan %1,2 (w/v) saman konsantrasyonunda 18,076 U/mL'ye ve en düşük

konsantrasyon olan %0,0 (w/v) saman konsantrasyonunda ise 2,248 U/mL'ye düşmüştür (Şekil 4.15, d).

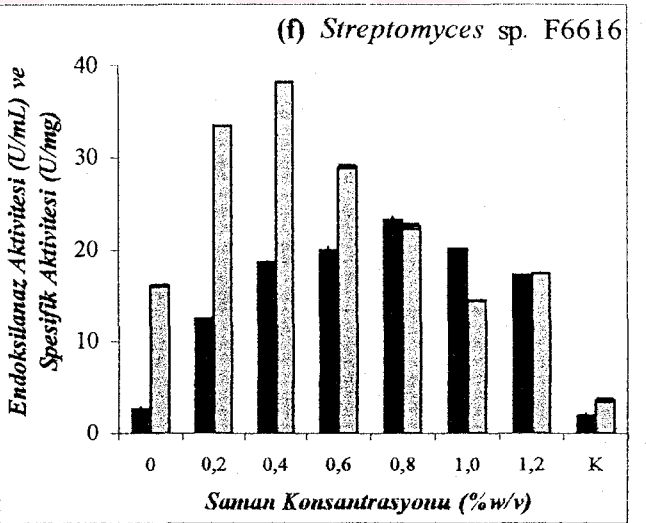
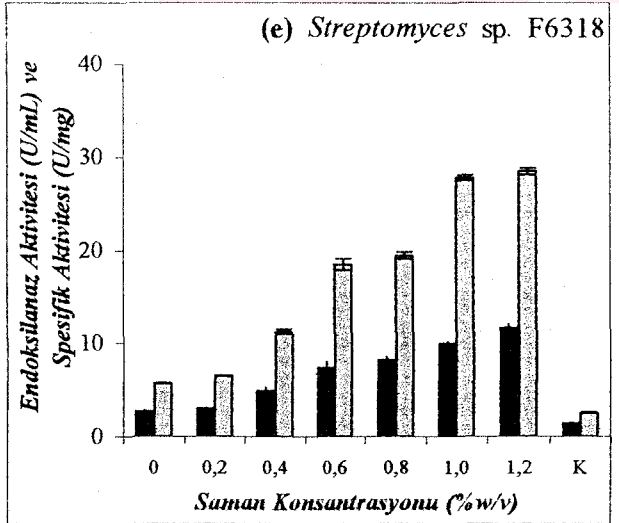
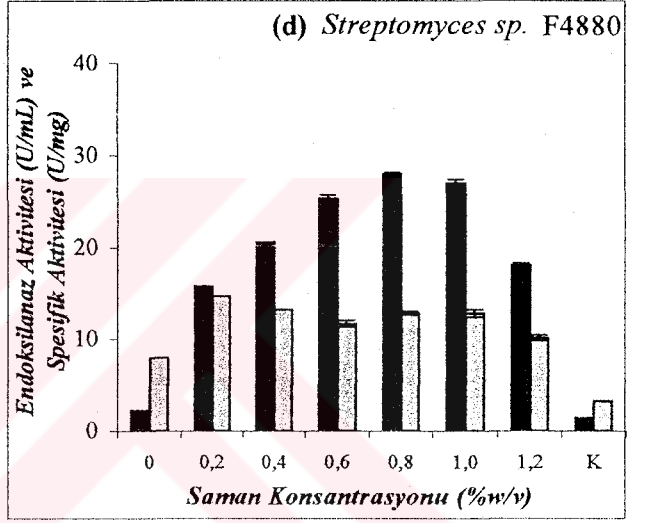
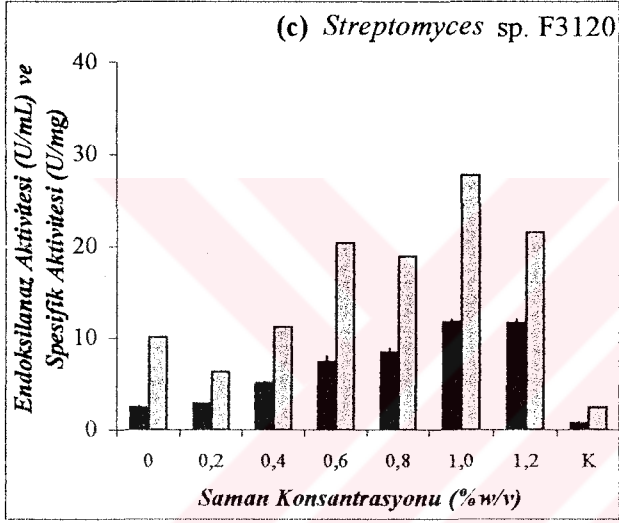
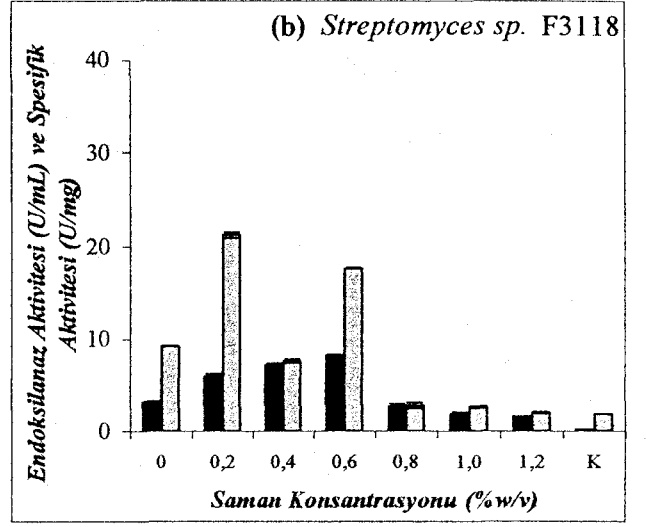
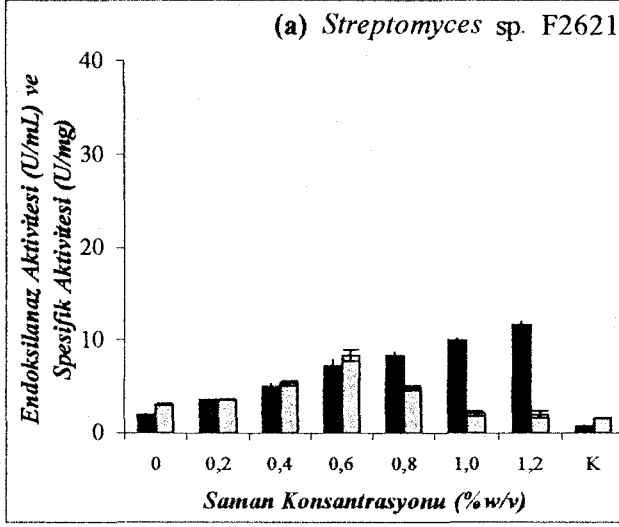
Streptomyces sp. F2621 ve *Streptomyces sp.* F6318, en yüksek endoksilanaz aktivitelerini %1,2 (w/v) saman içeren kültür ortamlarında 11,691 U/mL olarak sergilerken, *Streptomyces sp.* F3120 en yüksek endoksilanaz aktivitesini %1,0 (w/v) saman içeren besiyerinde 11,781 U/mL olarak ortaya koymuştur (Şekil 4.15, a, e ve c; sırasıyla). Fakat, *Streptomyces sp.* F3120 tarafından üretilen endoksilanaz aktivitesi, %1,2 (w/v) saman konsantrasyonunda diğer suşlar gibi 11,691 U/mL olarak gerçekleşmiştir. Bu üç suşun %0,0 (w/v) saman konsantrasyonundaki endoksilanaz aktiviteleri ise sırası ile; 1,978 U/mL, 2,788 U/mL ve 2,518 U/mL olarak belirlenmiştir.

Streptomyces sp. F3118'in en yüksek endoksilanaz aktivitesi olan 8,273 U/mL aktivite, %0,6 (w/v) saman konsantrasyonu üzerindeki büyüme sırasında tespit edilmiştir (Şekil 4.15, b). Organizmanın endoksilanaz aktivitesi %1,2 (w/v) saman konsantrasyonundaki üremesi sırasında 1,619 U/mL'ye, %0,0 (w/v) saman konsantrasyonunda üreme sırasında ise 3,237 U/mL olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.15, b).

Streptomyces sp. F6616 en yüksek endoksilanaz aktivitesini de, peroksidaz aktivitesi ile birlikte 72 saatlik inkübasyondan sonra salgılamıştır. Fakat, sergilediği en yüksek endoksilanaz aktivitesi olan 23,291 U/mL aktiviteyi, peroksidaz aktivitesinden farklı olarak %0,8 (w/v) saman konsantrasyonu üzerinde büyüme sırasında sergilemiştir (Şekil 4.15, f). Bu suşun endoksilanaz aktivitesi %1,2 (w/v) saman konsantrasyonunda 17,266 U/mL ve %0,0 (w/v) saman konsantrasyonunda ise 2,698 U/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14: Farklı saman konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoglukanaz aktiviteleri (■) ve spesifik aktiviteleri (▒).



Şekil 4.15: Farklı saman konsantrasyonları üzerinde büyüme sırasında *Streptomyces* suşlarının sergiledikleri endoksilanaz aktiviteleri (■) ve spesifik aktiviteleri (□).

4.2. TARTIŞMA

4.2.1. *Streptomyces* Suşları Tarafından Üretilen Lignoselülitik Enzimlerin Büyüme Kinetiğine Bağlı Değişimi

Yapılan çalışmalar sonucunda ekstraselüler lignoselülitik enzimlerden olan peroksidaz ve endoksilanaz aktivitelerinin, çalışılan bütün suşlarda, inkübasyonun 48-72 saatleri arasında maksimum aktivite düzeylerine ulaştıkları belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.1 ve 4.3). Ekstraselüler endoglukanaz aktivitesi ise peroksidaz ve endoksilanaz aktivitelerinin aksine *Streptomyces sp.* F3120 hariç, inkübasyon periyodunun genellikle 6. gününden sonra kültür sıvısında belirgin olarak tesbit edilebilmiştir (bkz. Şekil 4.2). Kültür sıvısı içerisindeki peroksidaz ve endoksilanaz enzimleri, maksimum seviyesine ulaştıktan sonra (genellikle inkübasyonun 2-4. günleri), enzim aktivitelerinin belirgin bir biçimde düşme trendi gösterdiği ve bu düşüşten sonra 7. güne kadar sabit kaldığı görülmüştür. İnkübasyonun 7. gününden sonra ise kültür sıvısındaki ekstraselüler enzimlerin aktivitelerinde yeniden bir artışı gözlenmiştir. Meydana gelen bu artış, bazı durumlarda 48-72 saat aralığındaki enzimatik aktivitelerden dahi daha yüksek seviyelere ulaşmıştır (bkz. Şekil 4.1; 4.2 ve 4.3).

Bu sonuçlar, çalışılan *Streptomyces* suşlarının lignoselüloz degradasyonunda rol alan enzimlerinin tamamı ile büyüme ile ilişkili olduğunu ve primer metabolizma sonucu üretildiklerini göstermektedir. Bu durum, aktinomiset kültürlerindeki ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin üretim ve sekresyonlarının büyüme ile ilişkili olduğunu göstermiş olan Ball ve McCarthy [161], Trigo ve Ball [129], Adhi ve ark. [162], Rob ve ark. [67] ve Tuncer ve ark. [65]'nin daha önceki çalışmaları ile uyum göstermektedir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, aktinomisetlerin logaritmik büyüme fazı sırasında üretilen endoksilanaz ve endoglukanaz enzimlerinden [67,98,129,136,160,163] farklı olarak peroksidazların, lignin peroksidazın sekonder bir metabolit olarak ortaya çıktığı *P. chrysosporium*'un [162,165] ligninolitik sistemine benzer şekilde, büyüme ile ilişkili olmayan metabolitler olduğunu savunmuşlardır [162,164]. Altı farklı *Streptomyces* suşunun

kullanıldığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ise, peroksidaz aktivitelerinin maksimum seviyelerine inkübasyon süresinin logaritmik büyüme fazında ulaşmaları nedeniyle bu gözlemi desteklememektedir.

İnkübasyonun 7. gününü takiben inkübasyonun sonlandırıldığı 10. güne kadar olan sürede, enzim aktivitelerinde (özellikle endoksilanaz ve endoglukanaz aktivitelerinde) meydana gelen artış ise kültürlerde hücre lizisinin başlaması ile açıklanabilir. Lignoselülitik enzim sistemleri, süstratın yapısına bağlı olarak oldukça komplekstir ve bu enzimlerin birbirleri üzerine olan sinerjistik ve kooperatif etkileri bilinmektedir [54,118]. Bu enzim sistemleri içerisinde, ekstraselüler enzimler gibi intraselüler enzimler de görev almaktadırlar. Hücre lizisiyle birlikte α -L-arabinofuranozidaz, β -ksilozidaz, asetil ksilan esteraz, ferulik asit esteraz (daha çok fungal kökenli bu enzimin birkaç *Streptomyces*'te de varlığı ortaya konmuştur [166-168]) gibi intraselüler enzimler de kültür sıvısına karışmaktadırlar. Aksesuar enzimler olarak da adlandırılan bu enzimler, lignoselülozik süstratın yapısında bulunan yan-grupların ayrılmasını veya çapraz bağların kırılmasını katalizlemektedirler [118]. Bu enzimlerin yanı sıra selülazların [169] ve endoksilanazların da [170] intraselüler izo-formlarının bulunduğu bilinmektedir. Hücre lizisinin bir sonucu olarak bütün bu enzimlerin ekstraselüler sıvıya karışması ile birlikte, lignoselüloz degradasyonunda rol alan bütün bu enzimlerin sinerjistik ve kooperatif aktiviteleri sonucu incelenen ekstraselüler enzimlerin aktivitelerinde bir artışın meydana geldiği görülmektedir. Lignoselüloz degradasyonunda rol alan enzimlerin saflaştırılması sonucunda saflaştırılan enzimin, lignoselüloz degradasyonundaki diğer enzimler ile sinerjistik ve kooperatif aktivite gösterdiği, bunun sonucu olarak da diğer enzimlerin ortamdaki uzaklaştırılması ile saflaştırılan enzimin aktivitesinde büyük kayıpların gözlemlendiği rapor edilen çalışmalar bulunmaktadır [54,171]. Bu sonuçlar ise lignoselülitik enzimler söz konusu olduğunda, sinerjistik ve kooperatif aktivitenin önemini ortaya koymaktadır. İntraselüler formlarının olduğuna dair herhangi bir bulgu olmayan peroksidaz aktivitesinde meydana gelen artışın, endoglukanaz ve özellikle endoksilanaz aktivitesinde meydana gelen artışa kıyasla, çok daha düşük gerçekleşmiş olması da bu görüşleri desteklemektedir.

4.2.2. İnkübasyon Sıcaklığının *Streptomyces* Suşları Tarafından Üretilen Ekstraselüler Lignoselüloolitik Enzimlerin Üretimi Üzerine Etkisi

Çalışmalarda kullanılan toplam altı *Streptomyces* suşu tarafından üretilen ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerin tamamının, *Streptomyces sp.* F6318'in 30 °C'de gerçekleşen maksimum endoglukanaz üretimi ve sekresyonu hariç tutulduğunda, 35-45°C arasında maksimum düzeylerine ulaştıkları belirlenmiştir (bkz. Şekil 4.4; 4.5 ve 4.6). İnkübasyon sıcaklığının 45°C'nin üzerinde olduğu koşullarda, ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerin aktivite seviyelerinde büyük düşüşler gözlenmiş, hatta bazı suşlar tarafından hiç bir enzim aktivitesinin üretilmediği belirlenmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 35°C'nin altında olduğu koşullarda ise lignoselüloolitik enzimlerin aktivite düzeyleri, 35-45°C aralığında gerçekleşen aktivitelere oranla daha düşük gerçekleşirken, meydana gelen kayıp 45°C'nin üstündeki sıcaklıklardaki kayıplara kıyasla daha az gerçekleşmiştir. Bu durum çalışılan suşların mezofilik doğaları (genellikle toprak kökenli olmaları) ile ve genel aktinomiset ekolojisi ile uyum içindedir [120].

Endüstriyel amaçlar doğrultusunda kullanılabilecek lignoselüloolitik enzimlerin üreticileri arasında, özellikle termofilik organizmalar araştırmacıların ilgisini çekmektedirler. Her ne kadar en yüksek lignoselüloolitik enzim aktiviteleri, termofilik ve mezofilik funguslarda gözlenirse de (örneğin; *Acrophialophora nainiana*'nın 620,50 U/mL endoksilanaz aktivitesi [171] ve *P. chryso sporium*'un 0,94 U/mL peroksidaz aktivitesi [108] gibi) özellikle kağıt ve kağıt hamuru sanayi açısından önemli olan ve selülaz aktivitesi içermeyen lignoselüloolitik enzim sistemlerine temelde *Bacillus sp.* ve *Cellulomonas sp.*'de rastlanmaktadır [172-175]. *Streptomyces*'ler içerisinde ise selülaz aktivitesi içermeyen lignoselüloolitik enzim sistemleri özellikle karbon ve enerji kaynağı olarak buğday kepeği içeren besiyerinde 37°C'de, pH 8,0'de ve inkübasyonun 5. gününde 7,5 U/mL ksilanaz aktivitesi üreten *Streptomyces sp.* Q113 [176], karbon ve enerji kaynağı olarak ksilan içeren besiyerinde 30°C'de, pH 7,5'de ve inkübasyonun 5. gününde 12 U/mL ksilanaz aktivitesi üreten *Streptomyces albus* [177] ve karbon ve enerji kaynağı olarak ksilan içeren besiyerinde 37°C'de, pH 7,5'de ve inkübasyonun 5. gününde 18 U/mL

ksilanaz aktivitesi üreten *Streptomyces cuspidosporus* [178] gibi mezofilik *Streptomyces*'lerde görülmektedir.

Bu çalışmalarda kullanılan altı farklı *Streptomyces* suşu arasından özellikle *Streptomyces sp.* F2621, *Streptomyces sp.* F3120 ve *Streptomyces sp.* F4880'in sergiledikleri endoglukanaz aktiviteleri, kontrolde gözlenen değerlerle kıyaslandığında, rölatif olarak oldukça düşüktür. Bu üç suş içerisinde *Streptomyces sp.* F2621 ve *Streptomyces sp.* F4880'in oldukça düşük endoglukanaz aktivitesi içermesine rağmen, yüksek endoksilanaz ve peroksidaz aktiviteleri sergilemeleri, bunların selülaz içermeyen lignoselülitik enzim sistemine sahip mezofilik *Streptomyces*'ler olabileceğine işaret etmektedir. Mezofilik *Streptomyces*'lerle yapılan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında, bu organizmaların ekstraselüler lignoselülitik aktivite düzeyleri ve bu değerlere inkübasyon süresinin 3-4. günlerinden sonra ulaşmaları ise kullanılan sübstratların iyi birer indükleyici olmadığına ya da organizmaların enzim sistemlerini değiştirebilmeleri için zamana gereksinimleri olduğuna işaret etmektedir. *Streptomyces sp.* F6318 ve *Streptomyces sp.* F6616 ise sergiledikleri endoglukanaz aktiviteleri ile bu grup dışında kalmışlardır fakat, ortaya koydukları aktiviteler (sırası ile; 3,774 U/mL ve 4,088 U/mL) dikkate değer orandadır.

4.2.3. Farklı pH Değerlerinin Kullanılan *Streptomyces* Suşlarının Ekstraselüler Lignoselülitik Enzimlerini Üretimi Üzerine Etkisi

Çalışmalarda kullanılan altı farklı *Streptomyces* suşunun en iyi büyüme ve lignoselülitik aktivite gösterdikleri pH değerlerinin 7,0-9,0 arasında olduğu tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.7; 4.8 ve 4.9). Her ne kadar daha önce çalışılmış olan *Streptomyces* suşları arasında asidik pH'larda optimal lignoselülitik aktivite gösteren organizmalar olsa da [164,179], genellikle termofilik [67,170] ve termotolerant [180] *Streptomyces*'ler kısmen daha asidik pH'ları tercih ederken, mezofilik *Streptomyces*'lerin [134,163,176] nötralden alkaliye doğru değişen pH'ları tercih ettikleri bilinmektedir (detaylı bilgi için bkz. [5]). Bu çalışmada kullanılan

Streptomyces suşlarına ait bulgular ise literatürde belirtilen diğer sonuçlar ile uyum göstermektedir.

Lignoselülozik materyallerin degradasyonunda başlangıç pH'sının önemli rol oynadığı [134] ve kültür pH'sının, ligninin degradasyonu sonucu ortaya çıkan bir ara ürün olan, APPL üretimi için hem katı kültürlerde [134] hem de sıvı kültürlerde [140] önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Ligninin degradasyonunu etkileyen bir faktörün, tüm lignoselüloolitik sistemi etkileyebiliyor olması kaçınılmazdır. Nath ve Rao [181], hem alkalifilik hem de termofilik olan *Bacillus* sp. NCIM59 ile yaptıkları bir çalışma ile pH'ın bu organizmanın ürettiği ksilanaz enzimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu araştırmacılar çalışmaları sonrasında, enzimin yapısında bulunan lizin, arjinin ve tirozin amino asitlerinin sırası ile; amino, guanidin ve fenol gruplarının deprotonasyona uğradığını, bunun sonucunda da doğal yapıda tolere edilemeyecek ve dolayısı ile enzim aktivitesinde kayba yol açabilecek bazı değişimlerin ortaya çıktığını önermişlerdir [181].

Biyoteknolojik uygulamalarda toplam maliyetin artmasında, sıcaklığın ayarlanmasının maliyeti kadar pH'ın düzenlenmesinin ortaya çıkardığı maliyet de önemli bir faktördür. Bu yüzden son yıllarda yapılan çalışmalar, alkalifilik ve termofilik organizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Fungusların aksine aktinomisetler, daha alkali pH değerlerinde yüksek aktiviteye sahip lignoselüloolitik enzimleri ile dikkat çekmektedirler [38,57]. Aktinomisetler içerisinde de özellikle *Streptomyces*'ler yüksek pH değerlerinde kararlı ve yüksek aktivite sergileyen lignoselüloolitik enzimlerin önemli üreticileridirler. Bu açıdan bakıldığında, bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşlarının pH 8,0-9,0 gibi alkali pH değerlerinde yüksek lignoselüloolitik aktivite göstermiş olmaları, hem genel aktinomiset karakteristiği ile uyumlu hem de bu organizmaların muhtemel biyoteknolojik potansiyelleri hakkında fikir veren önemli bir bulgudur.

4.2.4. Farklı Karbon ve Enerji Kaynaklarının Kullanılan *Streptomyces* Suşlarının Ekstraselüler Lignoselülitik Enzimlerinin Üretimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada kullanılan altı *Streptomyces* suşunun tamamı, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan yulaf ksilani ve öğütülmüş buğday samanı üzerinde büyüme yeteneği göstermişlerdir. Ayrıca, yulaf ksilani ve öğütülmüş buğday samanı, kullanılan *Streptomyces* suşlarının lignoselülitik enzim sistemlerini indüklemiş ve kontrol grubu kültür besiyerine göre belirgin bir şekilde enzim aktivitelerinde artış belirlenmiştir. Deneyler sonucunda en yüksek endoksilanaz aktivitesinin % 0,8 (w/v) yulaf ksilani içeren besiyerinde *Streptomyces sp.* F4880 tarafından 43,345 U/mL olarak üretildiği tespit edilmiştir (bkz. Şekil 4.12, d). Endoksilanazlar için ksilobiyoz, laktöz [50], arabinoz ve arabitölün [48] indükleyici etkisine dair raporlar bulunsa da, temel indükleyicilerinin ksilani olduğu bilinmektedir [163,166,168]. Bu nedenle, yulaf ksilanının yanı sıra buğday samanının da hemiselüloz içermesi nedeni ile bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, daha önceki raporlar ile uyumludur. Bununla birlikte suşların, hiç ksilani içermeyen besiyerinde de, kontrolle kıyaslandığında göz ardı edilebilecek kadar az miktarda endoglukanaz aktivitesi üretirken, belirgin bir miktar endoksilanaz sentezlediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar ise çalışmada kullanılan *Streptomyces* suşlarının, lignoselülitik enzimleri primer metabolizmalarının bir parçası olarak ürettiklerine işaret eden başka bir kanıtı oluşturmaktadır (bkz. Şekil 4.1; 4.2 ve 4.3).

Karbon ve enerji kaynağı olarak sadece yulaf ksilani içeren besiyerinde büyüme sırasında, özellikle *Streptomyces sp.* F6318 ve *Streptomyces sp.* F6616'nın belirgin bir miktar endoglukanaz aktivitesi sergiledikleri gözlemlenmiştir (bkz. Şekil 4.11. e ve f). Endoksilanazlar ve endoglukanazların sekresyonları arasındaki ilişkiye dair raporlar mevcuttur. Bazı funguslarda, ksilanolitik ve selülitik enzim sistemlerinin düzenleyici bir kontrol mekanizması ile birbirlerinden ayrılıyor olabilecekleri rapor edilmiştir [6]. Ksilani üzerinde büyüme sırasında bu türler, spesifik endoksilanazlar sentezlerken ya çok az miktarda ya da hiç selüloz sentezlememektedirler. Bununla birlikte, selüloz üzerinde büyüme sırasında ise

selülazlarla birlikte endoksilanazları da sentezlemektedirler. *S. lividans* [182] ve *S. flavogriseus*'da [183] ise bunun tersi bir durum gözlenmiştir; selüloz içeren besiyerinde çok düşük miktarda endoksilanaz sentezlenirken, ksilan üzerinde büyüme sırasında endoksilanaz ve endoglukanaz enzim sistemlerinin ikisi de etkin biçimde indüklenmiştir. Bu gözlemlerin doğruluğu, daha sonra *S. lividans*'ın yabani tip bir suşu ile yapılan mutagenез deneyleri ile onaylanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, selülazdan yoksun ve selülaz ve ksilanaz sistemlerinin her ikisinden birden yoksun suşlar elde edilebilirken, sadece ksilanaz sisteminden yoksun suşların elde edilemediği görülmüştür. Bu sonuçlar, endoksilanaz geninin bazı bölümlerinin endoglukanaz geninin ekspresyonu üzerinde kontrol edici etkisinin olduğuna işaret etmektedir [184].

Ksilan içeren besiyerinde *Streptomyces sp.* F2621 (bkz. Şekil 4.10. a) ve *Streptomyces sp.* F6616 (bkz. Şekil 4.10. f) sırası ile; % 0,4 (w/v) ksilan konsantrasyonunda 0,576 U/mL ve % 1,2 (w/v) ksilan konsantrasyonunda 0,548 U/mL peroksidaz aktivitesi sergileyerek, saman içeren besiyerinde tespit edilen ve yine *Streptomyces sp.* F6616'ya ait olan 0,631 U/mL aktiviteye (bkz. Şekil 4.13. f) oldukça yakın aktiviteler üretmişlerdir. Peroksidaz aktivitesinin konsantre edilmemiş süpernatant sıvılarında, düşük sekresyon düzeylerinden dolayı, tespit edilmesi alışıl gelmedik bir durumdur ve diğer araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir [129]. Bu çalışmada konsantre edilmemiş kültür süpernatant sıvılarının ham enzim preperasyonları olarak kullanıldığı göz önüne alınırsa (bkz. Kısım 3.2.4.) elde edilen değerlerin önemi daha iyi anlaşılacaktır. Saman, doğal lignoselülolizik yapısı içinde lignin bulundurduğundan dolayı, peroksidaz aktivitesi için daha iyi bir indükleyici olması beklenmektedir, fakat ksilan içeren besiyerinde lignin olmamasına rağmen yüksek peroksidaz aktivitesi değerlerinin gözlenmesi ilginçtir. Bu durum, endoksilanazların sekresyonu ile peroksidazların sekresyonu arasında da tıpkı endoksilanazlar ve endoglukanazlar arasındaki gibi bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir.

Saman üzerinde büyüme sırasında çalışmalarda kullanılan *Streptomyces* suşları, *Streptomyces sp.* F4880 hariç tutulduğunda (bkz. Şekil 4.15. d), genellikle ksilan

üzerinde büyümeleri sırasında sergiledikleri endoksilanaz değerlerine yakın değerler ortaya koymuşlardır. Diğer suşların endoksilanaz aktiviteleri, ksilan üzerinde büyümeleri sonucunda elde edilenlerle kıyaslandığında ya aynı düzeyde kalmış ya da küçük artışlar gözlenmiştir, fakat *Streptomyces sp.* F4880'de belirgin miktarda endoksilanaz aktivitesi kaybı meydana gelmiştir. Bu iki farklı sübstrat üzerinde, farklı enzim aktivitelerinin ortaya çıkması sübstratların yapısından kaynaklanıyor olabilir. Ksilanlar su ile ekstrakte edilip edilememelerine göre ikiye ayrılırlar [185]. Suyu ekstrakte edilemeyen ksilanların ekstraksiyonu için alkali ekstraksiyon yöntemi kullanılır ve alkali ile ekstraksiyon sırasında ksilanın yan-grupları ve çapraz bağları azalır, bunun sonucunda da doğal yapıdan farklı bir ksilan yapısı ortaya çıkar [186]. Dolayısı ile de yapı, endoksilanazlar için daha kolay bir sübstrat haline alır. Bu çalışmada kullanılan yulaf ksilanının suyla ekstrakte edilemeyen bir ksilan olduğu ve dolayısı ile alkali ile ekstrakte edildiği düşünülürse, endoksilanaz aktivitesinin bu sübstratla daha iyi indükleniyor olması şaşırtıcı gelmemektedir. Saman ise doğal lignoselülolizik bir sübstrattır ve bu sübstratta hemiselülozların ve selülozların degradesyonu, lignin tarafından sınırlandırılmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yüzyılımızda, bilim adamları ve politikacıların çözüm üretmesi gereken en büyük sorunlardan ikisi, gerekli olan enerji kaynaklarının teminini sağlamak ve çevresel kirliliğe çözüm bulmak olacaktır. Petrol, 19. yüzyıldaki sanayi devriminden bu yana temel enerji kaynağını oluşturmuştur, fakat doğal kaynakların azalması nedeniyle yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarının bulunması gerekmektedir. Doğal biyomas dönüşümü, tarım, ormancılık ve endüstriyel atıklardan köken alan lignoselüloz, alternatif bir enerji kaynağı oluşturmak için iyi bir materyaldir. Lignoselülitik atıkların miktarı, bütün dünyada giderek artmaktadır. Özellikle saman, bazı ülkelerde tarlalarda yakılması yasaklandıktan sonra, büyük problem oluşturmaktadır. Bu problemlerin en azından bir kısmına biyoteknolojik yaklaşımla çözüm üretilebilir.

Biyoteknolojik endüstri, her ne kadar daha çok insan ve hayvanlar için tıbbi materyallerin (örneğin; antibiyotikler, proteinler, aşılar vs.) üretimi ile ilgilense de çevresel sorunları da, lignoselülozun biyodegradasyon mekanizmasının anlaşılması ile biyoteknolojik olarak çözmek mümkündür. Bu olay, yeni ve ekonomik çevresel teknolojilerin geliştirilmesine öncülük edebilir. Bu gibi teknolojilerin geliştirilebilmesi, uygulanabilir ekonomik proseslere geçilmeden önce, potansiyel biyodegradatif mikroorganizmaların tanımlanmasını, genel büyüme koşullarının optimizasyonunu, enzimlerin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu, genetik olarak geliştirilmiş suşların kullanımını ve genellikle *in vivo* lignoselüloz degradasyon fenomeni hakkında iyi bir bilgi birikimini gerektirir.

Geçtiğimiz 20 yıl içerisinde ve daha öncesinde, lignoselüloz degradasyonu hakkında çok büyük miktarda ve önemli bilgiler elde edilmiştir. Yüksek lignoselülitik aktivitesinden dolayı, beyaz-çürükçül bir fungus olan *P. chrysosporium*, lignoselüloz degradasyon çalışmaları için model bir sistem oluşturmuştur. Doğada lignoselüloz, aynı zamanda aktinomisetler tarafından da degrade edilmektedir ve bundan dolayı da önemleri göz ardı edilmemelidir. Waksman ve Cordon 1939 yılında, lignoselülitik materyallerin aktinomiset suşları

ile degradasyonunu rapor etmişlerdir [111]. *Nocardia* ve *Streptomyces*'lerin lignini degrade edebildikleri ise 1977 ve 1978 yıllarında ¹⁴[C]-radyo-izotopik tekniklerin kullanımı ile kesin olarak ortaya konmuştur [7,115,187]. Crawford'un ve McCarthy'nin grupları tarafından yürütülen çalışmalar sonucunda lignoselüloz degradasyonunun, lignoselülozun yapısını polimerik lignin fragmentlerine dönüştürerek çözünebilir hale gelmesi ile sonuçlanacak şekilde bozan, bir takım oksidatif ve hidrolitik enzimlerin faaliyetleri ile gerçekleştiği görüşü ortaya çıkmıştır. Bu polimerik ve suda çözünebilir lignin fragmentleri APPL (Acid Precipitable Polymeric Lignin) olarak adlandırılmıştır. APPL üretim mekanizması ise henüz tam olarak anlaşılamadığı gibi kimyasal yapısı da tam olarak çözülebilmemiş değildir.

Crawford (University of Idaho, USA), Broda (University of Manchester, UK) ve McCarthy (University of Liverpool, UK), son zamanlarda yapılan aktinomisetlerle lignoselüloz degradasyonu alanındaki çalışmalara öncülük etmişlerdir. Kullanılan metodoloji, iyi bir lignoselüloz degradasyon yeteneğine sahip organizmaların belirlenmesi ve tanımlanmasını takiben, protein analizlerinin yapılması ve daha sonrasında ise pilot endüstriyel fermentörlerde üretime geçilmeden önce, organizmaların genetik olarak geliştirmesi şeklinde olmuştur.

Bu tezle ortaya konulan çalışmada, izole edildikleri ortamlar göz önüne alındığında, iyi derecede lignoselüloz degradasyonu potansiyeline sahip olabilecekleri düşünülen altı *Streptomyces* suşu seçilmiştir. Bu altı suşun lignoselüloz degradasyonunda rol alan ekstraselüler enzimlerinin üretim seviyeleri ise inkübasyon ortamının pH'nın ve sıcaklığının değiştirilmesinin yanı sıra, farklı karbon kaynaklarının farklı konsantrasyonlarının kullanılması ile optimize edilmiştir. Ekstraselüler lignoselülitik enzimlerin (endoglukanaz, endoksilanaz ve peroksidaz) üretimi, primer metabolizma sırasında gerçekleşmiş; endoksilanaz ve peroksidaz aktivitelerinin en yüksek sekresyon değerlerine ise logaritmik büyüme fazının sonunda ulaştıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlar, daha önceden McCarthy [5], Ball ve ark., [136], Rob ve ark. [67] ve Tuncer ve ark. [65] tarafından yapılan çalışmalarda da belirtilen ekstraselüler lignoselüloz degrade edici enzimler arasında kooperatif bir etki mekanizması olduğu fikrini desteklemektedir.

Bu çalışmalar sonrasında, çalışılan suşların ekstraselüler lignoselülitik enzim aktivitelerinin en yüksek değerlerine inkübasyonun 48-72. saatleri arasında ulaştıkları ve bu enzimler için optimal pH'ın 7,0-9,0 arasında, optimal sıcaklığın ise 35-45 °C arasında olduğu tespit edilmiştir. Karbon ve enerji kaynağı olarak ksilan kullanıldığında optimal konsantrasyonun genellikle %0,4 ile %1,2 arasında, öğütülmüş buğday samanı kullanıldığında ise %0,6 ile %1,2 arasında değiştiği görülmüştür. Fakat bu değerlerin kültür süpernatant sıvılarının ham enzim preparasyonları olarak kullanılması ile elde edildiği ve bu enzimlerin saf haldeyken optimal değerlerinin farklı olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bu organizmalardan elde edilecek enzimlerin endüstriyel uygulamalar için kullanılabilirliğinin anlaşılabilmesi için bu enzimlerin saflaştırıldıktan sonra optimal koşullarının belirlenmesi, kinetiklerinin çalışılması, indükleyici ve inhibe edici faktörlerinin, moleküler karakteristiklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Streptomyces suşları tarafından gerçekleştirilen lignoselüloz degradasyonunun mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi ise, potansiyel uygulamalarda alabilecekleri rolleri değerlendirirken önemli bir kriter olacaktır. Bu amaç doğrultusunda iki yaklaşım mümkündür. Bu yaklaşımlardan birincisi, saflaştırılmış enzimlerin tek başlarına veya kombinasyonlar halinde kullanıldıklarında lignoselülozik materyallerden oluşturdukları son ürünlerin karakterizasyonudur. İkincisi ise oksidatif (peroksidaz) ve hidrolitik (örneğin endoglukanaz ve endoksilanaz) enzimlerin çalışmasını ve bunların saman, ksilan ve sentetik lignin gibi farklı lignoselülozik sübstratlar kullanılarak test edilmesidir. Bu iki yaklaşımla gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbirlerini tamamlayarak, lignoselülitik enzimlerin, kültür süpernatant sıvılarında ve enzimatik sindirim çalışmaları örneklerinde tespit edilen, organik ürünlerle olan ilişkisini anlamamızı sağlayacaklardır. Daha ileri düzeyde çalışmalarla, rekombinant DNA teknikleri kullanılarak degradatif metabolik yolların ve bu yollarda anahtar rol oynayan enzimlerin belirlenmesi ve karakterizasyonu sağlanabilir. Tüm bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlarla, genetik olarak iyileştirilmiş suşlar ve daha geniş pH ve sıcaklık toleransına sahip, kararlı ve yüksek enzim aktiviteleri elde edilebilmesinin

yolu açılabilir. Günümüzde bu tür çalışmaların başarılı örneklerini görebilmek mümkündür (daha geniş bilgi için bkz. [56]).

Saflaştırılmış enzimlerin endüstriyel amaçlar için kullanımlarının yanı sıra, kısmen saflaştırılmış enzimlerin ve mikroorganizmaların doğrudan endüstriyel kullanımları da mümkündür. Ayrıca, verimli bir teknolojinin geliştirilmesinin temel koşullarından birisinin, yan-ürünlerin akıllıca kullanılmasına bağlılığı da göz önünde bulundurulduğunda, lignoselülitik enzimlerin ve organizmaların kullanılabileceği alanlar da iyi araştırılmalıdır. Bu kullanım alanları kağıt ve kağıt endüstrisini [1-4] içerisine aldığı kadar lignoselüloz kökenli şekerlerin yakıtla dönüştürülmesini [5], fırıncılığı ve meyve suları ve biranın bulanıklılığının giderilmesini içerisine alan gıda işlemlerini [6], tek hücre proteini üretimini de içerisine alır.

Her yeni teknolojiye olduğu gibi, enzim teknolojilerinin de geleneksel endüstride kabul görebilmesi için çeşitli koşulların sağlanması gerekmektedir. Bu koşullar (sistemin hayata geçirilmesi için başlangıçta yapılması gereken yatırımı ve daha sonrasında işletim maliyetini içerisine alan) prosesin ekonomik olarak uygulanabilirliğini, daha uygun alternatiflerin olmamasını ve enzimler tarafından sağlanan avantajların diğer yöntemlerle kıyaslandığında tercih edilmesini sağlayacak derecede eşsiz olmasını içerir.

Günümüzde, Kraft hamurunun ksilanazlar ile öncül olarak beyazlatılması söz konusu olduğunda, yöntem bu koşulları karşılamaktadır, fakat başarının en önemli kriteri sürekliliktir ve kağıt ve kağıt hamuru sanayinde yakalanan başarı gibi diğer sektörlerde de biyoteknolojinin başarı kazanmaya devam etmesi, geleneksel endüstrilerin enzimatik proseslere bakış açısını değiştirecektir. Bununla birlikte, ekonomik olarak kullanılabilir enzimatik teknolojilerin elde edilebilmesi için büyük miktarda finansal desteğin sağlanması ve bilim adamlarınca yoğun çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. and Linko, M. "Xylanases in bleaching: From an idea to the industry", *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**:335-350, (1994).
- [2] Nissen, A.M., Anker, L., Munk, N. and Krebs Lange, N. "Xylanases for the pulp and paper industry", J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van-Someren and A.G.J. Varagen (Ed), Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, s.325-337, (1992).
- [3] Reid, I.D. and Paice, M.G. "Effects of manganese peroxidase on residual lignin of softwood kraft pulp", *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:2273-2274, (1998).
- [4] Senior, D.J., Hamilton, J. and Bernier jr, R.L. "Use of *Streptomyces lividans* xylanase for bleaching of kraft pulps", J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van-Someren and A.G.J. Varagen (Ed), Xylans and Xylanases, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, s. 555-558, (1992).
- [5] McCarthy, A.J. "Lignocellulose Degrading Actinomycetes", *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**:145-163, (1987).
- [6] Biely, P. "Microbial xylanolytic systems", *Trends in Biotechnol.*, **3**(11):286-290. (1985).
- [7] Crawford, D.L. "Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**:1041-1045, (1978).
- [8] Kirk, T.K. and Fenn, P. "Formation and the action of the ligninolytic system in Basidiomycetes", M.J. Swift, J. Frankland and J.N. Hedger (Ed), Decomposer Basidiomycetes, Br. Mycol. Soc. Symp. 4., University Press, Cambridge, s.67-90, (1982).
- [9] Betts, W.B., Dart, R.K., Ball, A.S. and Pedlar, S.L. "Biosynthesis and structure of lignocellulose", W.B. Betts (Ed), Biodegradation. Natural and Synthetic Materials. Springer-Verlag, London. s.139-156, (1992).
- [10] Coombs, J. "EEC resources and strategies", *Phil. Trans. Soc. R.*, **331**:405-422, (1987).
- [11] Brown, R.M. "Structure and biochemistry of natural biological systems", M. Walker, (Ed), The 3rd Philip Morris Science Symp., New York, s.100-122, (1979).
- [12] Haug, A. "Chemistry and biochemistry of algal cell-wall polysaccharides", D.N. Norhcote (Ed), Plant Biochemistry, Butterworths, London, s.51-88, (1974).
- [13] Marchessault, R.H. and Sundararajan, P.R. "Cellulose", G.O. Aspinall (Ed), The Polysaccharides, Academic Press, London, Vol.2 s.12-97, (1983).

- [14] Jeffries, T.W. "Physical, chemical and biochemical considerations in the biological degradation of wood", J.F. Kennedy, G.O. Philips and P.A. Williams (Ed), Wood and Cellulosics: Industrial Utilisation, Biotechnology, Structure and Properties, Ellis Horwood Limited, England, s.213-230, (1987).
- [15] Béguin, P. and Aubert, J.P. "The biological degradation of cellulose", FEMS Microbiol. Rev., **13**:25-58, (1994).
- [16] Fengel, D. and Wegener, G. "Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions", Waltner de Gruyter, Berlin, (1983).
- [17] Delmer, D.P. "Cellulose biosynthesis", Ann, Revs. Plant Physiol., **38**:259-290., (1987).
- [18] Timell, T.E. "Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses", Wood Sci. Technol., **1**:45-70, (1967).
- [19] Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P. " β -1,4-D-xylan degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and applications", Biotechnol. Appl. Biochem., **17**:259-289, (1993).
- [20] Whistler, R.L. and Richards, E.L. "Hemicellulose", W. Pigman and D. Horton, (Ed), The Carbohydrates. Chemistry and Biochemistry 2nd edition, Vol.2A Academic Press, New York, s.447-469, (1970).
- [21] Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. "Hemicellulases: Their occurrence, purification, properties and mode of action", Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., **32**:277-352., (1976).
- [22] Barry, V.C. and Dillon, T. "The occurrence of xylan in marine algae", Nature, **146**:620, London, (1940).
- [23] Kato, Y. and Nevins, D. "Enzymic dissociation of zea shoot cell wall polysaccharides: (III) purification and partial characterisation of an endo-(1,4)- β -D-xylanase from a Bacillus subtilis enzyme preparation", Plant Physiol., **75**:753-758, (1984).
- [24] Puls, J. and Schuseil, J. "Chemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis", M.P. Coughlan, and G.P. Hazlewood (Ed), Hemicellulose and Hemicellulases, Portland Press, London and Chapel Hill, s.1-27, (1993).
- [25] Aspinall, G.O. "Chemistry of cell wall polysaccharides", J. Preiss (Ed), The Biochemistry of Plants (A Comprehensive Treaties), Vol. 3. Carbohydrates: Structure and Function Academic Press, New York. s.473-500, (1980).
- [26] Sakakibara, A. "Chemical Structure of Lignin Related Mainly to Degredation Products", T. Higuchi, H.M. Chang and T.K. Kirk (Ed), Recent Advances in Lignin Biodegradation Research, Uni. Publ., Tokyo, s.12-23, (1983).

- [27] Freudenberg, K. "Lignin: Its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols", *Science*, **148**:595-600, (1965).
- [28] Higuchi, T. "Biodegradation of lignin", *Wood Res.*, **67**:47-58, (1981).
- [29] Vance, C.P., Kirk, T.K. and Sherwood, R.T. "Lignification as a mechanism of disease resistance", *Ann. Rev. Phytopathol.*, **18**:259-288, (1980).
- [30] Kerr, A.J. and Goring, D.A.L. "The ultrastructural arrangement of the wood cell wall", *Cellul. Chem. Technol.*, **9**:563-573, (1975).
- [31] Joseleau, J.P., Comtat, J. and Ruel, K. "Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls", J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van-Someren and A.G.J. Varagen (Eds), *Xylans and Xylanases*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, s.1-15. (1992).
- [32] Scalbert, A., Monties, B., Lailemand, J.-Y., Guittet, Y. and Rolando, C. "Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw", *Phytochemistry*, **24**:1359-1362, (1985).
- [33] Hartley, R.D. and Ford, C.W. "Phenolic constituent of plant cell walls and wall biodegradability", N.G. Lewis and M.G. Paice (Ed), *ACS Symp. Ser. 339, Plant Cell Wall polymers, Biogenesis and Biodegradation*, American Chemical Society, Washington, D.C., s.135-145, (1989).
- [34] Gold, M., Wariishi, H. and Valli, K. "Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", J. Whitaker, P.E. and Sonnet, (Ed), *ACS Symp. Series No. 389. Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* American Chemical Society, Washington, D.C., s.127-140, (1989).
- [35] Freudenberg, K. and Neish, A.C. "Constitution and biosynthesis of lignin", Springer Verlag, New York, (1968).
- [36] Sarkanen, K.V, and Ludwig, C.H. "Definition and nomenclature", K.V. Sarkanen, and C.H. Ludwig (Ed), *Ugnins, Occurrence, Formation, Structure and Reactions*, Wiley-Interscience, New York, s.1-18, (1971).
- [37] Obst, J.R. "Frequency and alkali resistance of lignin-carbohydrate bonds in wood", *Tappi*. **65**:109-112, (1982).
- [38] Bhat, M.K. and Hazlewood, G.P. "Enzymology and Other Characteristics of Cellulases and Xylanases", M.R. Bedford and G.G. Partridge (Ed), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*, CAB International, s.11-60, (2001).
- [39] Eriksson, K.-E. and Pettersson, B. "Extracellular enzyme system utilized *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. I. Separation, purification and physico-chemical characterisation of five endo-1,4- β -endoglucanases", *Eur. J. Biochem.*, **51**:193-206, (1975).

- [40] Petre, D., Millet, J., Longuin, R., Beguin, P., Girard, H. and Aubert, J.-P. "Purification and properties of the endoglucanase C of *Clostridium thermocellum* produced in *Escherichia coli*", *Biochimie*, **68**:687–695, (1986).
- [41] Wood, T.M. and Bhat, K.M. "Methods for measuring cellulase activities", W.A. and S.T. Kellogg (Ed), Wood, *Methods in Enzymology*, Academic Press, London, Vol. 160, s.87–112, (1988).
- [42] Eriksson, K.-E. and Pettersson, B. "Extracellular enzyme system utilized *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. III. Purification and physico-chemical characterisation of an exo-1,4- β -glucanase", *Eur. J. Biochem.*, **51**:213-218, (1975).
- [43] Wood, T.M., McCrae, S.I., Wilson, C., Bhat, K.M. and Gow, L. "Aerobic and anaerobic fungal cellulases with special reference to their mode of attack on crystalline cellulose", J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (Ed), Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, FEMS Symposium No. 43, Academic Press, London, s.31–52, (1988).
- [44] Deshpande, V., Eriksson, K.-E. and Pettersson, B. "Production, purification and partial characterisation of 1,4- β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*." *Eur. J. Biochem.*, **90**:191-198. (1978).
- [45] Wood, T.M. and McCrae, S.I. "The cellulase of *Penicillium pinophilum*: synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special reference to the involvement of two immunologically distinct CBHs", *Carbohydrate Research* **234**:93–99, (1986).
- [46] Bhat, K.M., McCrae, S.I. and Wood, T.M. "The endo-(1-4)- β -D-glucanase system of *Penicillium pinophilum* cellulase: isolation, purification and characterisation of five major endoglucanase components", *Carbohydrate Research* **190**:279–297, (1989).
- [47] Bhat, K.M., Gaikwad, J.S. and Maheshwari, R. "Purification and characterisation of an extracellular β -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity", *Journal of General Microbiology*, **139**:2825–2832, (1993).
- [48] Vavilova, E. A. and Vinetskii, Yu. P. "Induction of the Synthesis of Endo-1,4- β -xylanase and β -Galactosidase in Original and Recombinant Strains of the Fungus *Penicillium canescens*", Translated from *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, Vol. 39, No. 2, 2003, s.167–172, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **39**(2):147–151, (2003).
- [49] Emtiazi, G., Naghavi, N. and Bordbar, A. "Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*", *Biodegradation* **12**:259–263, (2001).

- [50] Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K.D. and Haltrich, D. "Induction of Mannanase, Xylanase, and Endoglucanase Activities in *Sclerotium rolfsii*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:594-600, (1998).
- [51] Westermark, U. and Eriksson, K.-E. "Cellobiose dehydrogenase (quinone)", *Methods in Enzymology*, **160**:463-468, (1988).
- [52] Eriksson, K.-E., Blanchette, R.A. and Ander, P. "Biodegradation of cellulose", K.-E. Eriksson (Ed), "Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components", Springer Series in Wood Sciences, Springer-Verlag, Berlin, 407s. (1990).
- [53] Thomson, J.A. "Molecular biology of xylan degradation", *EMS Microbiol. Rev.*, **104**:5-82, (1993).
- [54] Tuncer, M. and Ball, A.S. "Co-operative actions and degradation analysis of purified xylan-degrading enzymes from *Thermomonospora fusca* BD25 on oat-spelt xylan", *Journal of Applied Microbiology*, **94**:1030-1035, (2003).
- [55] Sunna, A. and Antranikian, G. "Xylanolytic enzymes from fungi and Bacteria", *Crit. Rev. Biotechnol.*, **17**:39-67, (1997).
- [56] Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. "Molecular and biotechnological aspects of xylanases", *FEMS Microbiology Reviews*, **23**:411-456, (1999).
- [57] Subramaniam, S. and Prema, P. "Biotechnology Of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, And Application", *Critical Reviews In Biotechnology*, **22**(1):33-64, (2002).
- [58] Leggio, L. L., Jenkins, J., Harris, G.W., and Pickersgill, R. W. "X-ray crystallographic study of xylopentose binding to *Pseudomonas fluorescens* xylanase A", *Proteins: Struct. Function and Genetics*, **41**:362, (2000).
- [59] Gessesse, A. "Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:3533-3535, (1998).
- [60] Wong, K.K., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N. "Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Function and Applications", *Microbiol. Rev.*, **52**:305-317, (1988).
- [61] Hatakka, A. "Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation", *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**:125-135, (1994).
- [62] Glenn, J.K., Morgan, M.A., Mayfield, M.B., Kuwahara, M., Gold, M.H. "An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation in white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **114**:1077-1083, (1983).

- [63] Hatakka, A., Uusi-Rauva, A.K., "Degradation of ¹⁴C labeled poplar wood lignin by selected white-rot fungi", *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **17**:235-242, (1983).
- [64] Glenn, J.K., Gold, M.J., "Purification and characterization of an extracellular Mn (II) dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **242**:329-341, (1985).
- [65] Tuncer, M., Ball, A.S., Rob, A. and Wilson, M.T. "Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25", *Enzyme and Microbial Technology*, **25**:38-47, (1999).
- [66] Rob, A., Ball, A.S., Tuncer, M. and Wilson, M.T. "Thermostable novel non-haem extracellular glycosylated peroxidase from *Thermomonospora fusca* BD25", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **24**:161-170, (1996).
- [67] Rob, A., Hernandez, M., Ball, A.S., Tuncer, M., Arias, M.E. and Wilson, M.T. "Production and partial characterization of extracellular peroxidase produced by *Streptomyces avermitilis* UAH30", *Appl. Biochem. Biotechnol.* **62**:159-74, (1997).
- [68] Mester, T., De Jong, E., and Field, J.A. "Manganese regulation of veratryl alcohol in white-rot fungi and its indirect effect on lignin peroxidase", *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:1881-1887, (1995).
- [69] Leisola, M.S.A., Kozulic, B., Meussdoerffer, F. and Fiechter, A. "Homology among multiple extracellular peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*", *J. Biol. Chem.*, **262**:419-424, (1987).
- [70] Tien, M. and Kirk, T.K. "Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*", *Methods in Enzymology*. **161**:238-249, (1988).
- [71] Tien, M. and Kirk, T.K. "Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterisation and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**:2280-2284. (1984).
- [72] Tuisel, H., Sinclair, R., Bumpus, J.A., Ashbaugh, W., Brock, B.J. and Aust, S.D. "Lignin peroxidase H₂ from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterisation and stability to temperature and pH", *Arch. Biochem. Biophys.*, **279**:158-166, (1990).
- [73] Paszczynski, A., Pasti, M.B., Goszczyynski, S., Crawford, R.L. and Crawford, D.L. "New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*", *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, **13**:378-383, (1991).

- [74] Archibald, F.S. "Lignin peroxidase activity is not important in biological bleaching and delignification of unbleached Kraft Pulp by *Trametes versicolor*", Appl. Environ. Microbiol., **58**:3101-3109, (1992).
- [75] Faison, B.D., Kirk, T.K. and Parrel, R.L. "Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*.", Appl. Environ. Microbiol., **52**:251-254, (1986).
- [76] Cancel, A.M., Orth, A.B. and Tien, M. "Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*", Appl. Environ. Microbiol., **59**:2909-2913, (1993).
- [77] Li, D., Alic, M., Brown, J.A. and Gold, M.H. "Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen", Appl. Environ. Microbiol., **53**:341-345, (1995).
- [78] Bogan, B.W., Lamar, R.T. and Hammel, K.E. "Flourene oxidation *in vivo* by *Phanerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese-dependent lipid peroxidase", Appl. Environ. Microbiol., **62**:1788-1792, (1996).
- [79] Paice, M.G., Reid, I.D., Bourbonnais, R., Archibald, F.S. and Jurasek, L. "Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies Kraft pulp", Appl. Environ. Microbiol., **59**:260-265, (1993).
- [80] Dean, J.F.D., and Eriksson, K.-E.L. "Laccase and the deposition of lignin in vascular plants", *Holzforschung*, **48**:21-38, (1994).
- [81] Mayer, A.M., and Harel, E. "Polyphenol oxidases in plants", *Phytochemistry*, **33**:765-767, (1979).
- [82] Thurston, C.F. "The structure and function of fungal laccases", *Microbiology*, **140**:19-26, (1994).
- [83] Messner, K., and Srebotnik, E. "Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe paper-making technology", *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**:351-364, (1994).
- [84] Sayadi, S., and Ellouz, R. "Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters", Appl. Environ. Microbiol., **61**:1098-1103. (1995).
- [85] Higuchi, T. "Mechanisms of lignin degradation by lignin peroxidase and laccase of white-rot fungi", *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **399**:482-502, (1989).
- [87] Kersten, P.J., Kalyanaraman, B., Hamel, K.E., Reinhammer, B., and Kirk T.K. "Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes", *Biochem. J.*, **268**:475-480, (1990).

- [88] Higuchi, T. "Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation", *Wood Sci. Technol.*, **24**:23-63, (1990).
- [88] Milstein, O., Hüttermann, A., Fründ, R., and Lüdemann, H.-D. "Enzymatic copolymerization of lignin with low molecular mass compounds", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**:760-767, (1994).
- [89] Farhangrazi, Z.S., Copeland, B.R., Nakayama, T., Amach, T., Yamazaki, I., and Powers, L. S. "Oxidation-reduction properties of compounds I and II of *Arthromyces ramosus* peroxidase", *Biochemistry*, **33**:5647-5652, (1994).
- [90] Hayashi, Y., and Yamazaki, I. "The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C", *J. Biol. Chem.*, **254**:9101-9106, (1979).
- [91] Kirk, T.K., Farrel, R.L. "Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of lignin", *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**:465-505, (1987).
- [92] Yarapolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D. "Laccase properties, catalytic mechanism and applicability", *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, **49**:257-280, (1994).
- [93] Barbosa, A.M., Dekker, R.F.H. and St Hardy, G.E. "Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478", *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**:93-96, (1996).
- [94] Bourbonnais, R. and Pake, M.G. "Oxidative enzymes from the lignin-degrading fungus *Pleurotus sajor-caju*", N.G. Lewis and M.G. Paice (Ed), *Plant Cell Wall Polymers Biogenesis and Biodegradation*, American Chemical Series, Washington, DC, s.473-481, (1989).
- [95] Gold, M.H. and Alic, M. "Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *Microbiology Reviews*, **57**:605-622, (1993).
- [96] Bollag, J.M., Shuttleworth, K.L. and Anderson, D.H. "Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds", *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:3086-3091, (1988).
- [97] Roy-Arcand, L. and Archibald, F.S. "Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccases from *Trametes (Coriolus) versicolor*", *Enzyme Microbiol. and Tech.* **13**:194-203, (1991).
- [98] Bachmann, S.L. and McCarthy, A.J. "Purification and co-operative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**:2121-30, (1991)
- [99] Wilkie, K.C.B. "The hemicelluloses of grasses and cereals", *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* **36**:215-264, (1979).

- [100] Mueller-Harvey, L., Hartley, R.D., Harris, P.J. and Curzon, E.H. "Linkage of *p*-coumaryl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw", *Carbohydr. Res.*, **148**:71-85, (1986).
- [101] Malburg, Jr.L.M., Lee, J.M.T. and Forsberg, C.W. "Degradation of cellulose and hemicelluloses by rumen microorganisms", G. Winkelmann (Ed), Microbial degradation of Natural Products, VCH Press, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, s.128-159. (1992).
- [102] Orpin, C.G. "Genetic approaches to the improvement of lignocellulose degradation in the rumen", J.-P. Aubert, P. Beguin and J. Millet (Ed), FEMS Symp. No. 43. Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, Academic Press, London and New York, s.172-179, (1988).
- [103] Coleman, G.S. "The metabolism of cellulose, glucose and starch by the rumen ciliate protozoa *Eudiplodinium maggii*", *J. Gen. Microbiol.*, **107**:359-366, (1978).
- [104] Buswell, J.A., and Odier, E. "Lignin biodegradation", *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **6**:1-60, (1987).
- [105] Majjala, P., "*Heterobasidion annosum* and wood decay: Enzymology of cellulose, hemicellulose, and lignin degradation", *Doktora Tezi*, The Faculty of Science, University of Helsinki, Helsinki, 91s, (2000).
- [106] Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L. and Xu, G. "Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood", *J. Biotechnol.*, **53**:133-162, (1997).
- [107] Duarte, J.C. and Costa-Ferreira, M. "Aspergilli and lignocellulosics: enzymology and biotechnological applications", *FEMS Microbiol. Rev.*, **13**:377-386, (1994).
- [108] Arora, D.S., Chander, M., and Gill, P.K. "Involvement Of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase And Laccase In Degradation And Selective Ligninolysis Of Wheat Straw", *International Biodeterioration & Biodegradation*, **50**:115-120, (2002).
- [109] Johnsrud, S.C. and Eriksson, K.-E. "Cross-breeding of selected and mutated homokaryotic strains of *Phanerochaete chrysosporium* K-3: new cellulase deficient strains with increased activity to degraded lignin", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**:320-327, (1985).
- [110] Crawford, D.L., Crawford, R.L. and Pometto III, A.L. "Preparation of specifically labeled ¹⁴C-lignin and ¹⁴C-cellulose-lignocellulose and their decomposition by the microflora of soil", *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**:1247-1251, (1977).

- [111] Waksman, S.A. and Cordon, T.C. "Thermophilic decomposition of plant residues in composts by pure and mixed cultures of microorganisms", *Soil Sci.*, **47**:217-224, (1939).
- [112] Freitas, Y.J.M. and Bhat, J.V. "Micro-organisms associated with the deterioration of fish-nets and cordage", *J. Univ. Bombay*, **23**:53-59, (1954).
- [113] Sorensen, L.H. "Duration of aminoacid metabolites formed in soils during decomposition of carbohydrates", *Soil Sci.*, **104**:234-241, (1968).
- [114] Crawford, D.L. "Growth of *Thermomonospora fusca* on lignocellulosic pulps of varying lignin content", *Can. J. Microbiol.*, **31**:714-717, (1974).
- [115] Trojanowski, J.U., Haider, K. and Sundman, V. "Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenols by a *Nocardia* species", *Arch. Microbiol.*, **114**:149-153, (1977).
- [116] Antai, S.P. and Crawford, D.L. "Degradation of softwood, hardwood and grass lignocellulose by two *Streptomyces* strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**:378-380, (1981).
- [117] McCarthy, A.J. and Broda, P. "Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterisation of their activity against (¹⁴C)-lignin-labeled wheat lignocellulose", *J. Gen. Microbiol.*, **130**:2905-2913, (1984).
- [118] Tuncer, M. and Ball, A.S. "Degradation of lignocellulose by extracellular enzymes produced by *Thermomonospora fusca* BD25", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**:608-611, (2002).
- [119] McCarthy, A.J. and Williams, S.T. "Methods for studying the ecology of actinomycetes", *Methods in Microbiology*, **22**:533-563, (1990).
- [120] Goodfellow, M. and Williams, S.T. "Ecology of Actinomycetes", *Ann. Rev. Microbiol.*, **37**:189-216, (1983).
- [121] Lacey, J. "Actinomycetes as biodeteriogens and pollutants of the environment", M. Goodfellow, S.T. Williams and M. Mordarski (Ed), *Actinomycetes in Biotechnology*, Academic Press, London, s.359-432, (1988).
- [122] McCarthy, A.J. and Williams, S.T. "Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment-a review", *Gene*, **115**:189-192, (1992).
- [123] Lechevalier, H.A. and Lechevalier, M.P. "Biology of Actinomycetes", *Ann. Rev. Microbiol.*, **21**:71-100, (1967).
- [124] Khan, M.R. and Williams, S.T. "Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes", *Soil. Biol. Biochem.*, **7**:197-208, (1975).

- [125] Williams, S.T. and Mayfield, C.L. "Studies on the ecology of actinomycetes in soil III. The behavior of streptomycetes in acid soil", *Soil Biol. Biochem.* **3**:197-208, (1971).
- [126] Cross, T. "Thermophilic actinomycetes", *J. Appl. Bact.*, **31**:36-53, (1968).
- [127] Ball, A.S., Betts, W.B. and McCarthy, A.J. "Degradation of lignin related compounds by actinomycetes", *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:1642-1644, (1989).
- [128] Godden, B., Ball, A.S., Helvenstein, P., McCarthy, A.J. and Penninckx, M.J. "Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes", *J. Gen. Microbiol.*, **138**:2441-2448. (1992).
- [129] Trigo, C. and Ball, A.S. "Production of extracellular enzymes during the solubilisation of straw by *Thermomonospora fusca* BD25", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**:366-72, (1994).
- [130] Haider, K. and Trojanowski, J. "A comparison of the degradation of ¹⁴C-labeled DHP and corn stalk lignins by micro- and macrofungi and bacteria. T.K. Kirk, T. Higuchi, H.M. Chang, (Ed), Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry and Applications, vol. 1. CRC Press Inc., USA, s.111-134, (1980).
- [131] Crawford, J.H. "Composting of agricultural wastes - a review", *Process Biochem.*, **18**:14-18, (1983).
- [132] Crawford, D.L. and Pometto III, A.L. "Lignin-depolymerizing activity of *Streptomyces*", W.A. Wood, and S.T. Kellog (Ed), Methods in Enzymology, **161**:249-264, (1988).
- [133] Crawford, D.L. Pometto III, A.L. and Crawford, R.L. "Lignin degradation by *Streptomyces viridosporus*: Isolation and characterisation of a new polymeric lignin degradation intermediate", *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**:898-904, (1983).
- [134] Pometto III, A.L. and Crawford, D.L. "Effects of pH on lignin and cellulose degradation by *Streptomyces viridosporus*.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**:246-250, (1986).
- [135] McCarthy, A.J., Paterson, A. and Broda, P. "Lignin solubilisation by *Thermomonospora mesophila*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**:347-352, (1986).
- [136] Ball, A.S., Godden, B., Helvenstein, P., Penninckx, M.J. and McCarthy, A.J. "Lignocarbhydrate solubilisation from straw by actinomycetes", *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**:3017-22, (1990).

- [137] Donnelly, R.K. and Crawford, D.L. "Production by *Streptomyces viridosporus* T7A of an enzyme which cleaves aromatic acids from lignocellulose", *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:2237-2244, (1988).
- [138] Borgmeyer, J.R. and Crawford, D.L. "Production and characterisation of polymeric lignin degradation intermediates from two different *Streptomyces* spp", *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**:273-278, (1985).
- [139] Ramachandra, M., Crawford, D.L. and Hertel, G. "Characterisation of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:3057-3063., (1988).
- [140] Adhi, T.P., Korus, P.A., Pometto III. A.L. and Crawford, D.L. "Lignin degradation and production of microbially modified lignin polymers by *Streptomyces viridosporus* in slurry reactors", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **18**:291-301, (1988).
- [141] Ball, A.S., Braban, A. and McCarthy, A.J. "Studies on the extracellular β -D-cellobiosidase activity of a thermophilic *Streptomyces*", *Appl. Environ. Biotechnol.*, **36**:473-477, (1992).
- [142] Wang, Z., Bleakley, B.H., Crawford, D.L., Hertel, G. and Raffi, F. "Cloning and expression of a lignin peroxidase gene from *Streptomyces viridosporus* in *Streptomyces lividans*", *J. Biotechnol.* **13**:131-144, (1990).
- [143] Iqbal, M., Mercer, D. K., Miller, P.G.G. and McCarthy A.J. "Thermostable extra-cellular peroxidases from *Streptomyces thermoviolaceus*", *Microbiology*, **140**:1457-1465, (1994).
- [144] Golueke, C.G. "Bacteriology of composting", *BioCycle*, **33**:55-57, (1992).
- [145] Golueke, C.G., "Principles of composting", The Staff of BioCycle Journal of Waste Recycling, The Art and Science of Composting, The JG Press Inc., Pennsylvania, USA, s.14-27, (1991).
- [146] Atkinson, C.F., Jones, D.D., Gauthier, J.J. "Biodegradabilities and microbial activities during composting of oxidation ditch sludge", *Compost. Sci. Utiliz.*, **4**:84-96, (1996)
- [147] Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itavaara, M. "Biodegradation of lignin in a compost environment: a review", *Bioresource Technology*, **72**:169-183, (2000).
- [148] McKinley, V.L., Vestal, J.R. "Physical and chemical correlates of microbial activity and biomass in composting municipal sewage sludge", *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**:1395-1403, (1985).

- [149] Strom, P.F. "Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting", *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**:899-905, (1985).
- [150] Williams, S.T., Lanning, S. and Wellington, E.M.H. "Ecology of actinomycetes" M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams (Ed), The Biology of Actinomycetes, Academic Press, London, s.381-428, (1983).
- [151] Debabov, V.G. "The industrial use of bacilli", The molecular biology of bacilli, VI. Academic Press, New York, s.331-370, (1982).
- [152] Cowan, D. "Industrial enzyme technology", *Tibtech.*, **14**:177-178, (1996).
- [153] Bhat, M.K. "Cellulases and related enzymes in biotechnology", *Biotechnology Advances*, **18**:355-383, (2000).
- [154] Çelenk, F.G., "Türkiye Topraklarından İzole Edilen Nötrofilik-Mezofilik Streptomyces'lerin Nümerik Taksonomisi", Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, (2001).
- [155] Penninckx, M. and Kurzatowski, W. "Purification and characterization of exocellular xylanases from *Streptomyces*", Commission of EU, Copernicus no: ERBCIPACT930093, (1996).
- [156] Jones, K.L. "Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctating characteristics", *Journal of Bacteriology*, **57**:141-146, (1949).
- [157] Küster, E. "Outline of a comparative study of criteria used in charecterization of the actinomycetes", *Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon*, **9**:97-104, (1959).
- [158] Bradford, M.M. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding", *Anal. Biochem.*, **72**:248-254. (1976).
- [159] Miller, G.L. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", *Anal. Chem.*, **31**:426-428, (1959).
- [160] Ramachandra, M., Crawford, D.L., and Pometto III., A.L. "Extracellular enzyme activities during lignocellulose degradation by *Streptomyces* spp.: A comperative study of wild-type and genetically manipulated strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**:2754-2760, (1987).
- [161] Ball, A.S. and McCarthy, A.J. "Production and properties of xylanases from actinomycetes", *J. Appl. Bacteriol.*, **66**:439-44, (1989).

- [162] Adhi, T.D., Korus, R.A. and Crawford, D.L. "Production of major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two streptomycetes in agitated submerged culture", *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:1165-68, (1989).
- [163] Fernández L.C.L., Rodriguez, J., Soliveri, J., Copa-Patinà, J.L., Perez-Leblic, M.J. and Arias, M.E. "The effect of culture media on the production of xylan-degrading enzymes by *Streptomyces chattanoogensis* UAH 23", *J. Basic Microbiol.*, **35**:405-412, (1995).
- [164] Lodha, S.J., Korus, A.R. and Crawford, D.L. "Synthesis and properties of lignin peroxidases from *Streptomyces viridosporus* T7A", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28**:411-20, (1991).
- [166] Mackenzie, C.R., Bilous, D., Schnieder, H. and Johnson, K.G. "Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp.", *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**:2835-2839, (1987).
- [167] Johnson, K.G., Harrison, B.A., Schneider, H., MacKenzie, C.R. and Fontana, D. "Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp", *Enzyme Microb. Technol.*, **10**:403-409, (1988).
- [168] Garcia, B.L., Ball, A.S., Rodriguez, J., Pérez-Leblic, M.I., Arias, M.E. and Copa-Patiño, J.L. "Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30", *FEMS Microbiol. Lett.*, **158**:95-99, (1998).
- [169] Wachinger, G., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W.L. and Schrempf, H. "Identification of mycelium-associated cellulase from *Streptomyces reticul*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**:2653-2657, (1989).
- [170] Flores, M.E., Pérez, R. and Huitrón, C. " β -xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035", *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**:410-416, (1997).
- [171] Salles, B.C., Cunha, R.B., Fontes, W., Sousa, M.V. and Filho, E.X.F. "Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*", *Journal of Biotechnology*, **81**:199-204, (2000).
- [172] Gessesse, A. and Mamo, G. "High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid-state fermentation", *Microbiol. Technol.*, **25**:68-72, (1999).
- [173] Rani, D.S. and Nand, K. "Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702", *Process Biochem.*, **36**:355-362, (2000).
- [174] Hoq, M.M., Hempel, C. and Deckwer, W.D. "Cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* RT9 effect of agitation, aeration, and medium consumption", *J. Biotechnol.*, **37**:49-58, (1994).

- [175] Balakrishnan, H., Choudhury, M.D., Srinivasan, M.C. and Rele, M.V. "Cellulase-free xylanase production from an alkalophilic *Bacillus* species, World J. Microbiol. Biotechnol., **8**:627–631, (1992).
- [176] Beg, Q.K., Bharat, B., Mukesh, K. and Hoondal, G.S. "Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp", Enzyme Microbiol. Technol., **27**:459-466, (2000).
- [177] Antanopoulos, V.T., Hernandez, M., Arias, M.E., Mavrakos, E. and Ball, A.S. "The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp", Appl. Microbiol. Biotechnol., **57**:92–97, (2000).
- [178] Maheswari, M.U. and Chandra, T.S. "Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*", World J. Microbiol. Biotechnol., **16**:257-263, (2000).
- [179] Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Girio, F.M., Bon, E.P.S. and Amaral-Collaco, M.T. "Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil", Enzyme and Microbial Technology **31**:549-555, (2002).
- [180] Techapun, C., Charoenrat, T., Watanabe, M., Sasaki, K. and Poosaran, N. "Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design", Biochemical Engineering Journal, **12**:99-105, (2002).
- [181] Nath, D., Rao, M. "pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. (NCIM 59)", Enzyme and Microbial Technology, **28**:397-403, (2001).
- [182] Kluepfel, D., Shareck, F., Mandau, F. and Morosoli, R. "Characterisation of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*", Appl. Microbiol. Biotechnol., **24**:230-234 (1986).
- [183] Kluepfel, D. and Ishaque, M. "Xylan induced cellulolytic enzymes in *Streptomyces flavogriseus*", Dev. Ind. Microbiol., **23**:389-395, (1982).
- [184] Morosoli, R., Bertrand J.L., Mondou, F., Shareck, F. and Kluepfel, D. "Purification and properties of xylanase from *Streptomyces lividans*", Biochem. J., **239**:587-592, (1986).
- [185] Courtin, C. M. and Delcour, J. A. "Relative Activity of Endoxylanases Towards Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylan", Journal of Cereal Science, **33**:301–312, (2001).

- [186] Davies, G. and Henrissat, B. "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases", *Structure*, **3**:853-859, (1995).
- [187] Crawford, D.L. and Crawford, R.L. "Microbial degradation of lignin", *Enzyme Microbial Technol.*, **2**:11-22, (1980).



ÖZGEÇMİŞ

12.12.1978 yılında Rize’de doğdum. İlk ve ortaokul öğrenimimi Çorum’da, lise öğrenimimi Amasya’da tamamladım. 1996 yılında Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ne girdim ve 2000 yılında mezun oldum. Aynı yıl Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde yüksek lisansa başladım ve 27.12.2001 tarihinde yine aynı yerde araştırma görevlisi olarak başladığım görevime halen devam etmekteyim.

