

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**DENİZEL TÜREVLİ FİLAMANTÖZ FUNGUS**

**SUŞLARININ KSİLANAZ ÜRETİM**

**KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Melih Niyazi KORKMAZ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç UZEL**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 15.01.2016**

**Bornova-İZMİR**

**2016**



Melih Niyazi KORKMAZ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “**Denizel Türevli Filamentöz Fungus Suşlarının Ksilanaz Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.01.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ataç UZEL

.....

Raportör Üye : Prof. Dr. Seçil ÖNAL

.....

Üye : Doç. Dr. Halil BIYIK

.....



## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Denizel Türevli Filamentöz Fungus Suşlarının Ksilanaz Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15 / 01/ 2016

İmzası

Melih Niyazi KORKMAZ



**ÖZET****DENİZEL TÜREVLİ FİLAMANTÖZ FUNGUS SUŞLARININ KSİLANAZ****ÜRETİM KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

KORKMAZ, Melih Niyazi

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Ataç UZEL

Ocak, 2016, 88 sayfa

Genel olarak, birçok endüstriyel enzim karasal organizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte, dünya yüzeyinin %70'ini kaplayan okyanusların içerdiği tuzluluk, yüksek basınç, düşük sıcaklık ve özel ışık koşulları, denizel mikroorganizmalar ve karasal türlerinden üretilen enzimler arasında önemli farklılıklar oluşturmaktadır. Karasal çevre ile karşılaştırıldığında, denizel çevre denizel mikroorganizmalara eşsiz genetik yapı ve yaşama alanı sağlamaktadır. Bu yüzden, denizel koşullara adapte olmuş fungus örneklerinden biyoteknolojide kullanılacak enzimlerin elde edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, Ege ve Akdeniz Bölgesi'nden toplanan farklı sünger ve sediment örneklerinden izole edilmiş denizel türevli fungus izolatları ksilanaz enzimi üretme açısından taranmıştır. Toplamda 108 denizel türevli fungus izolattan 81 tanesinin (%75) tarama besiyerinde ksilanaz ürettiği belirlenmiştir. Tarama sonucunda en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip olduğu belirlenen 4 izolatın (06SK019, 08SK014, 08ÇK001 ve 08SK016) ksilanaz üretimleri araştırılarak izolatların fermentasyon sonucu ürettikleri protein miktarı, enzim aktivitesi ve spesifik aktiviteleri hesaplanmış ve en iyi aktivite gösteren izolat *Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001 olarak tespit edilmiştir. 08ÇK001 izolatı ile toplam hacim 1250 ml olacak şekilde fermentasyon yapılmış ve enzim amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz ile kısmi enzim saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Diyaliz işleminden sonra ksilanaz enzimi 1195.5 U/mg spesifik aktivite ve %40.3 verim ile 2.3 kat saflaştırılmıştır. Enzimin optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH'sı da 5.0 olarak belirlenmiştir. Enzim pH 5.0'de +4°C'de 1 saat boyunca aktivitesinin %53'ünü korurken, 50°'de 15 dakikalık inkübasyondan sonra aktivitesinin %18.1'ini koruyabilmiştir. K<sup>+</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup>, β-merkaptöetanol, Triton X-100 ve toluen enzim aktivitesini arttırdığı, Fe<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, PMFS,

hekzan, etanol ve izoamilalkolün enzim aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile denizel türevli *Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001 izolatından ksilanaz enzimi kısmen saflaştırılarak karakterize edilmiş olup, optimum pH ve sıcaklık değerleri ile inhibitör ve metal iyonlarına karşı gösterdiği direnç nedeniyle enzimin gıda ve hayvan yem endüstrisinde kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Denizel türevli fungus, ksilanaz, *Trichoderma pleuroticola*.



**ABSTRACT****DETERMINATION OF XYLANASE PRODUCTION CAPACITIES OF  
MARINE-DERIVED FILAMENTOUS FUNGAL STRAINS**

KORKMAZ, Melih Niyazi

MSc. in Biology

Supervisor: Prof.Dr. Ataç UZEL

January, 2016, 88 pages

In general, several industrial enzymes are derived from terrestrial organisms. However, Oceans, covering 70% of the earth surface, include salinity, high pressure, low temperature and special lighting conditions contribute to the differences between enzymes produced by marine microorganisms and homologous enzymes from terrestrial microorganisms. When compared with the terrestrial environment, marine environment gives marine microorganisms unique genetic structure and life habitats. Therefore, obtaining enzymes that can be used in biotechnology from fungal samples adapted to marine conditions is of a great importance.

In this study, marine-derived fungal isolates from different sponges and sediments samples from the Aegean and the Mediterranean Region were screened in terms of xylanase production. In total, it was determined that 81 (75%) out of 108 isolates exhibited xylanase activity in an agar plate assay. As a result of screening, protein concentrations, enzyme activities and specific activities of four isolates showed the highest xylanase activity (06SK019, 08SK014, 08ÇK001 and 08SK016) were calculated and isolate with the highest xylanase activity was identified as *Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001. Fermentation of 08ÇK001 was completed, with a working volume of 1250 ml, and partial purification of enzyme by ammonium sulphate precipitation was realized. Afer dialyses, xylanase was purified 2.3-fold with a recovery of %40.3 and its specific activity was up to 1195.5 U/mg. Optimum temperature and pH values of enzyme were determined as 50°C and 5.0, respectively. Enzyme showed stability at pH 5.0 and 4°C temperature by retaining %53 of initial activity after an hour incubation, and it was retained its activity %18.1 at the end of 15 minutes. It was found that the activity of enzyme was stimulated by K<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, β-

mercaptoethanol, Triton X-100 and toluene, but was inhibited  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , PMFS, hexane, ethanol and isoamyl alcohol. In this study, xylanase from marine-derived fungus isolate *Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001 was partially purified and characterized, because of its optimal pH and temperature values as well as its resistance to inhibitors and metal ions tested, it is thought that enzyme has a potential for being used in food and animal feed industry.

**Key Words:** Marine-derived fungi, xylanase, *Trichoderma pleuroticola*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren bana destek olan, beni yönlendiren, hiçbir zaman yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ataç UZEL'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana gerek bilimsel gerekse manevi desteğini esirgemedi sunan Arş. Gör. Sennur ÖZDEMİR'e teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu aşamaya gelirken, her zaman yanımda yer alan, her konuda benden maddi-manevi desteklerini esirgemeyen değerli babam ve annem Doğan ve Miyase KORKMAZ'a, manevi desteğiyle her zaman yanımda olan abim Kemal KORKMAZ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamın yürütülmesinde 15-FEN-002 no'lu proje ile araştırmamızı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda bu çalışma için 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı Kapsamında destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TUBİTAK) teşekkür ederim.



**İÇİNDEKİLER**

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Taksonomi .....	3
2.1.1 Kingdom fungi.....	3
2.2 Denizel Türevli Funguslar ve Tanımı.....	5
2.2.1 Denizel türevli fungusların denizel ekosistemdeki yeri.....	6
2.3 Ksilanazlar .....	9
2.3.1 Ksilanaz enziminin kullanım alanları .....	11
2.4 Ksilanaz Enzim Kaynağı Olarak Funguslar .....	17
3. MATERYAL VE METODLAR .....	24
3.1 Materyal.....	24
3.1.1 Deney mikroorganizmaları .....	24
3.1.2 Kullanılan besiyerleri.....	28

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1.3 Kullanılan tamponlar ve çözeltiler .....	31
3.2 Metod .....	32
3.2.1 Ksilanaz aktivitesinin kalitatif tayini ve izolat seçimi .....	32
3.2.2 Ksilanaz aktivitesinin kantitatif tayini .....	33
3.2.3 Protein miktarının belirlenmesi.....	34
3.2.4 Glukoz ve NaCl'ün ksilanaz enzim üretimine etkisinin belirlenmesi.....	34
3.2.5 Ksilanaz üretimi ve kısmi saflaştırma .....	35
3.2.6 Enzimin optimum pH'sının belirlenmesi .....	36
3.2.7 Enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi.....	36
3.2.8 Enzimin pH kararlılığının saptanması.....	37
3.2.9 Enzimin ısı kararlılığının saptanması.....	37
3.2.10 Enzim aktivitesine inhibitör, şelatör, denatürant, organik çözen ve çeşitli metal iyonlarının etkisi.....	37
4. BULGULAR .....	39
4.1 Ksilanaz Aktivitesinin Kalitatif Tayini ve İzolat Seçimi .....	39
4.2 Ksilanaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini .....	42
4.3 Glukoz ve NaCl'ün Ksilanaz Enzim Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	45
4.4 Ksilanaz Üretimi ve Kısmi Saflaştırma .....	47

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<b><u>Sayfa</u></b>
4.5 Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi .....	49
4.6 Enzimin Optimum Aktivite Sıcaklığının Belirlenmesi.....	50
4.7 Enzimin pH Kararlılığının Saptanması.....	51
4.8 Enzimin Isıl Kararlılığının Saptanması .....	51
4.9 Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Denatürant, Organik Çözgen ve Çeşitli Metal İyonlarının Etkisi.....	52
5. SONUÇ VE TARTIŞMA .....	54
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	86





**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Ksilanazların ksilan omurgasına etki noktaları; (a) Ksilanın yapısı ve ksilanın hidrolizinden sorumlu ksilanolitik enzimlerin etki bölgeleri, (b) $\beta$ -ksilosidaz enzimi ile ksilooligosakkarit hidrolizi .....	11
4.1 08SK008 ve 08ÇK002 izolatlarında ksilanaz taraması pozitif sonucu.....	39
4.2 Sırasıyla 06SK019, 08SK014, 08ÇK ve 08SK016 izolatlarının tuzlu ortamdaki fermantasyon görüntüleri .....	44
4.3 Sırasıyla 06SK019, 08SK014, 08ÇK ve 08SK016 izolatlarının tuzsuz ortamdaki fermantasyon görüntüleri.....	44
4.4 Glukoz ve NaCl'ün ksilanaz enzimi üzerine etkisinin araştırılması için hazırlanan dört farklı fermantasyon ortamının görüntüsü.....	45
4.5 Ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH grafiği.....	50
4.6 Ksilanaz enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık grafiği .....	50
4.7 Ksilanaz enziminin pH kararlılığı .....	51
4.8 Enzimin enziminin ısı kararlılığı .....	52
4.9 Ksilanaz enzimi üzerine inhibitör, şelatör, denatürant, organik çözügen ve çeşitli metal iyonlarının etkisi .....	53

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Ticari ksilanaz preparatları .....	14
2.2 Funguslardan elde edilen bazı ksilanazlar ve özellikleri .....	18
2.3 Karasal kökenli funguslardan elde edilmiş bazı ksilanazlar ve uygulama alanları. ....	20
3.1 Fungusların izole edildiği örnek tipi, örnek lokasyonu ve izolatların genusları.....	24
4.1 Fungusların kalitatif ksilanaz aktivitesi tarama sonuçları. ....	40
4.2 Seçilen izolatların sıvı besiyerinde tuzlu ve tuzsuz ortamdaki enzim aktiviteleri.....	43
4.3 08ÇK001 ksilanaz aktivitesi üzerine dört farklı ortamda farklı konsantrasyonda bulunan glukoz ve NaCl'ün etkisi. ....	46
4.4 Gradient amonyum sülfat çöktürme basamakları.....	48
4.5 Direkt amonyum sülfat (%80, w/v) çöktürmesi .....	49

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\mu$ l	: Mikrolitre
AZCL	: Azurine-crosslinked
cm	: Santimetre
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
E.C	: Enzyme Commission
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
ITS	: Internal transcribed spacer
kDA	: Kilodalton
L	: Litre
LSU	: Large-subunit
M	: Molar
Min	: Minute (dakika)

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
PMSF	: Fenil metil sülfonil florit
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Random amplified polimorphic DNA
RFLP	: Restriction fragment length polimorphism
rRNA	: Ribozomal RNA
rDNA	: Ribozomal DNA
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: SDS poliakrilamid jel elektroforezi
<i>sp.</i>	: Tür

SSU : Small-Subunit

Tris : 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol

U : Enzim ünitesi



## 1. GİRİŞ

Ksilanazlar enzimleri (E.C. 3.2.1.x), bir bitki hücre duvarı polisakkariti olan ksilan molekülünü hidrolize ederek farklı uzunlukta ksilooligomerleri oluşturan enzimlerdir. Ksilanazların potansiyel biyoteknolojik uygulamalarından dolayı son yıllarda bu enzimlere olan ilgi oldukça artmaktadır. Ksilanazlar lignoselülozik materyallerin fermantatif ürünlere dönüşümü, hayvan yem katkısı, meyve sularının berraklaştırılması, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi gibi birçok endüstriyel alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda ksilanaz enzimi, selülaz ve pektinaz ile birlikte dünya enzim piyasasının %20'sini oluşturmaktadır (Polizeli et al., 2005).

Günümüzde enzimlerin endüstriyel alanındaki kullanımları oldukça artmaktadır ve bu enzimlerin elde edildikleri kaynaklar ele alındığında bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar bulunmaktadır. Bu kaynaklar arasında en çok mikroorganizmalar göze çarpmaktadır. Endüstriyel alanda enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların seçilmesinde az miktarda yan ürün oluşturmaları, enzim aktivitelerinin yüksek olması, kültüre edilebilmelerinin az maliyetli olmaları ile birlikte daha ekonomik olmaları, yüksek kararlılık göstermeleri ve büyük ölçüde ve saflıkta çoğaltılabilmeleri gibi sebepler yer almaktadır (Wiseman, 1987).

Enzimlerin aynı zamanda canlı organizmalar dışında da işlev göstermeleri endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu açıdan bakıldığında enzimler deterjan, gıda, tekstil, hayvan yemi, deri, kağıt ve kağıt hamuru ve tarım endüstrilerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Kirk et al., 2002).

Enzimlerin endüstriyel alandaki kullanımları incelendiğinde ortalama olarak %75'i hidrolitik enzim grubundan oluşmaktadır. Bu alanda sıralamada ilk olarak proteaz grubundaki enzimler yer alırken, ikinci sırada ise karbonhidrat parçalayan enzimler bulunmaktadır (Hamilton et al., 1999; Bhat, 2000). Son yıllarda ise kağıt hamurunun beyazlatılması işleminde ajan olarak etkin bir şekilde ksilanaz enziminin kullanılmasında büyük bir artış gözlemlenmektedir.

Funguslar biyoteknolojik alanda büyük önem taşıyan çok sayıda ekstraselüler enzim üreten canlılardır. Karasal ve denizel habitatlara adapte olmuş funguslar, varlıklarını sürdürdükleri ortamlara karşı oluşturdukları adaptasyon sayesinde, içerdikleri metabolit profili farklı olmaktadır (Abe et al., 2001, 2006; Damare, 2007).

Enzimler ile ilgili uzun zamandan beri yapılan çok sayıdaki çalışma tatlı su ve karasal habitatlarda yaşayan mikroorganizmalara odaklanmış bulunmaktadır. Bununla birlikte, taksonomik ve biyokimyasal olarak karakterize edilmemiş denizel türevli mikroorganizmalar üzerine yapılan çalışmalar, biyoteknolojik olarak potansiyel önem taşıyan enzimleri hedef almaktadır (Damare et al., 2012). Tuzluluk, yüksek basınç, düşük sıcaklık, oligotrofik koşullar, ekstrem pH koşulları, geniş bir oranda değişen deniz suyundaki mineral içerik ve spesifik ışık koşulları denizel mikroorganizmalardan üretilen enzimler ve karasal mikroorganizmalardan üretilen benzer enzimler arasındaki farklılığı oluşturmaktadır (Booth and Kenkel, 1986; Jones, 2000; Gomes et al., 2008; Madhu et al., 2009; Pang et al., 2011; Intriago, 2012; Passarini et al., 2013; Rämä et al., 2014).

Denizel çevredeki mikroorganizmaların çok sayıda farklı aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Antibakteriyal, antifungal, antidiyabetik, anti-enflamatuar, anti-tüberküloz, antiviral, antitümör ve sitotoksik aktivite denizel çevrede canlılığını sürdüren organizmaların ürettiği spesifik enzimler sayesinde sahip olduğu aktiviteler arasında yer almaktadır (Mayer et al., 2013). Dolayısıyla karasal türevli fungus suşları ile yapılan enzim çalışmaları sonucunda elde edilen enzimlerin yeniden keşfi gibi dezavantajından dolayı farklı nişleri içeren denizel çevreye adapte olmuş spesifik mikroorganizmalar enzim çalışmaları için kaynak teşkil etmektedir.

Bu bilgiler ışığında yapılan bu çalışmanın amacı, Ege ve Akdeniz Bölgesi'nden toplanan farklı sünger ve sediment örneklerinden izole edilmiş denizel türevli fungus suşlarının ksilanaz enzimi açısından taranarak potansiyel üreticilerin belirlenmesidir. Ayrıca potent suşların ürettiği enzimlerin kısmi karakterizasyonu da hedeflenmiştir.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Taksonomi

#### 2.1.1 Kingom fungi

Heterotrofik organizmalar olarak çevrede bulunan funguslar birkaç istisna dışında hücre duvarı tarafından çevrilmiş bir filamentli yapıya sahiptir ve hareketsiz olup ve sporlar ile hem eşeyli hem de eşeysiz olarak üreyebilmektedir. Funguslar ekosistemdeki hayati önem taşıyan etkilerinden ve aynı zamanda insanlar ve insanlar ile ilişkili faaliyetler üzerindeki etkilerinden dolayı dünyadaki en önemli organizmalar arasında yer almaktadır. Fungusların ekosistemdeki önem taşıyan aktiviteleri arasında ayrıştırma, besin döngüsü ve besin taşınımı yer almaktadır ve bu aktiviteler sürdürülebilir gelişimi elde etmede hayati bir rol üstlenmektedir (Palm and Chapela, 1997).

Fungusların doğru bir şekilde tanımlanması ve sınıflandırılması çok önemlidir ve fungus suşlarının karakterizasyonu için yapılan kimyasal çalışmalar fungusların sınıflandırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Mikologlar tarafından fungus türlerini belirlemek için yapılan çalışmalarda farklı yaklaşımlar izlenmektedir. Mikologların sınıflandırmada kullanmış oldukları eski ve klasik bir yöntem olan morfolojik yaklaşım, karakterlerin kombinasyonuna bağlı olan politetik yaklaşım, bitki patojeni fungusların tanımlanmasını ele alan ve aynı zamanda belirli bir habitata adaptasyona dayandırılan ekolojik yaklaşım ve modern filogenetik analizlerin doğuşundan önce kullanılmakta olan ve türler arasındaki genetik alışverişin üzerinde duran biyolojik yaklaşım ve son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılan moleküler ve filogenetik yaklaşım fungusların sınıflandırılmasına uzun bir süredir yardımcı olmaktadır (Guarro et al., 1999).

Mikoloji ile çalışan araştırmacılar organizmaları Protozoa, Straminipila ve Funguslar (gerçek funguslar) olarak 3 kingdoma ayırmaktadır. Kingdom Fungi 4 ayrı büyük sınıf içermektedir; Chytridiomycota, Zygomycota, Basidiomycota ve Ascomycota (Barr, 1992). Deutoromycetes de bu kingdom içerisinde ayrı bir gruptur fakat bir sınıf olarak sınıflandırılmamaktadır. Fungusların sınıflandırılması ve belirlenmesinde morfolojik özellikler uzun bir süredir katkı sağlamaktadır. Bununla birlikte, bir fungus suşunun morfolojik özelliklerinin ayırt

edilmesi fungus suşlarının iyi bir şekilde tanımlanmasına izin vermemesi ve hem zaman alıcı hem de zahmetli biyokimyasal testlerin taksonomi çalışmalarında yeterli ayırt etme gücü sağlamaması gibi sebeplerden dolayı taksonomi ve filogeni çalışmalarında moleküler yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır (Guarro, 1999). Geçmiş yıllarda mikologlar fungusların sınıflandırılmasında DNA analizine bağlı olarak oluşturulan iskelet bir filogeni oluşturmuşlardır (Bruns et al., 1991). Klasik DNA tabanlı metotlar arasında nükleer DNA GC içeriği yer almaktadır. GC içeriğinin %2'lik farklılığı iki izolatın birbirinden farklı tür olacağını işaret etmektedir fakat, ekolojik olarak tanımlanmış taksonlarda yapılan son çalışmalarda bu oran %1 olarak belirlenmiştir (Kurtzman, 1994). DNA-DNA hibridizasyon yöntemleri de moleküler teknikler arasında yer almaktadır. Bunlara ilaveten elektroforetik yöntemler de taksonomik çalışmalara başarılı bir şekilde katkı sağlamaktadır. Başlıca elektroforetik yöntemler arasında yer alan RAPD (random amplified polymorphic DNA) fingerprints ve RFLP (restriction fragment length polymorphism) identifikasyon çalışmaları ile ilgilenen araştırmacılar için daha hızlı ve etkili veriler sağlamaktadır. rDNA'nın çoklu kopya olarak bulunması, art arda dizilmiş tekrarlanan kopyaları ortak evrimin bir sonucu olarak homojen olarak dağılması gibi özelliklerinden dolayı bu çalışmalarda oldukça yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Guarro, 1999). Taksonomi ve filogenetik çalışmalarda en çok kullanılan genlerden biri de rRNA kodlayan genlerdir. rRNA genleri tüm canlılarda işlevsel olarak homoloji göstermesi ve bu genlerin bulunduğu bölgelerdeki farklılıklardan dolayı uzun bir süredir moleküler marker olarak kullanılmaktadır. Fungal rRNA genlerinin çoklu bölgeleri SSU (small-subunit), LSU (large-subunit) rRNA genlerini ve ITS (internal transcribed spacer) bölgelerini içermektedir. ITS bölgeleri oldukça değişken bölgelerdir ve taksonomi çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte Graeser ve arkadaşları (1999), bu bölgelerin genellikle tür farklılıklarını belirlemek için kullanıldığını aynı zamanda da mikroevrimin şekillerini de gösterdiğini belirtmektedir. Taksonomik çalışmalarda ITS bölgeleri belirli primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldıktan sonra sekanslanır ve elde edilen bilgiler GenBank ile karşılaştırılıp suşlar hakkında taksonomik bilgi elde edilmektedir. Bunlara ek olarak, taksonomi çalışmalarında sekonder metabolitler de kullanılmaktadır. Sekonder metabolitler organizmanın büyümesinde ya da temel metabolizmasında aracı rol almayan fungusların yaşam döngülerinin belirli evrelerinde ve spesifik koşullarda önemli rol oynayan bileşenlerdir. Steroidler, terpenler, alkaloidler, siklopeptinler, kumarinler ve mikotoksinler taksonomik çalışmalarda en yaygın kullanılan sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitler organizmanın bulunduğu çevre şartlarından

dolayı üretimi etkilenebileceği için taksonomik çalışmalarda bir soru olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, bu bileşenlerin Ascomycete taksonomisindeki potansiyeli Eurotiales ordosunda yapılan kemotaksonomik çalışmalarla iyi bir şekilde gösterilmiştir (Frisvad, 1994; Frisvad and Filtenborg, 1990).

## 2.2 Denizel Türevli Funguslar ve Tanımı

Karasal çevrelerde yaşayan funguslar ayrıştırıcı, parazit ve simbiyont olarak önemli işlevler göstermekle birlikte aynı zamanda organik ve inorganik çevrelerdeki besinlerin besin döngüsüne de katkı sağlamaktadırlar (Webster and Weber, 2007). Fungusların dünya üzerinde göstermiş oldukları çeşitlilik uzun zamandan beri araştırılmaktadır ve toplam fungus tür sayısı yaklaşık olarak 1,5-1,6 milyon arasında olduğu tahmin edilmektedir (Hawksworth, 2001). Fungusların ekolojisi ve evrimsel karmaşıklığını anlamak için elde edilen bilgiler çoğunlukla karasal çevrelerden izole edilen kültüre edilebilir organizmalar ile yapılan çalışmalar ile ortaya çıkmıştır. Fungusların çeşitliliğini ve evrimsel ilişkisini anlayabilmek için yapılan morfolojik ve biyokimyasal analizler kimi zaman kısıtlı kalmaktadır. Bununla birlikte bazı organizmaların kültüre edilememesi fungus çeşitliliğine yönelik yapılan çalışmalarda güçlü moleküler tekniklere ihtiyacı doğurmaktadır. Toprakta izole edilen DNA örneklerindeki ITS bölgelerinin sekanslanarak yapılan bir çalışmanın sonucunda küresel fungal çeşitliliğin yaklaşık olarak 3.5-5.1 milyon arasında tür içerdiği belirtilmiştir (O'Brien et al., 2005). Bununla birlikte fungusların güncel kültür koleksiyonunda yaklaşık olarak 75.000 izolat bulunduğu bilinmektedir (Hawksworth, 2001; Kis-Papo, 2005). Bu bilgiler ışığında bakıldığı zaman yeni fungus türlerinin keşfedilme olasılığının yüksek olduğu anlaşılmaktadır ve bu çalışmaların sonucunda elde edilen bilgilerin hem fungal çeşitliliğin belirlenmesi için yapılan çalışmalara hem de farmosötik ve biyoteknolojik çalışmalara yarar sağlayacağına inanılmaktadır.

Denizel mikrobiyal topluluk oldukça çeşitlidir. Bakteriler, funguslar, algler, planktonlar ve virüsler bu topluluğun üyeleri olup gerçekleştirdikleri biyokimyasal faaliyetlerinden dolayı denizel çevredeki büyük öneme sahip ekolojik bileşenler olarak nitelendirilmektedirler (Sowell et al., 2008). Sınıflandırma ile yapılan çalışmalara bakıldığında denizel fungusların tanımlanması için kabul edilen genel bir görüş ile bu grup "obligat" ve "fakültatif" olarak iki kısma ayrılmıştır. Obligat olarak tanımlanan denizel funguslar sadece nehir ağzı ve denizel çevrede gelişip spor oluşturabilen organizmaların,

fakültatif denizel funguslar ise karasal çevrede ve tatlı sularda gelişip spor oluşturabilmektedir ve aynı zamanda denizel ortamda da çoğalabilme yeteneğine sahiptir (Kohlmeyer and Kohlmeyer, 1997). Bununla birlikte yapılan bazı çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilere göre denizel ortamdan izole edilen fungusların çoğu ispatlanabilir bir şekilde fakültatif ya da obligat olarak sınıflandırılmadığı için genel olarak bu organizmalar denizel türevli funguslar olarak isimlendirilmektedir (Osterhage, 2001).

Denizel çevrede bulunan fungusların buldukları ortamların etkisiyle dağılımları, yayılmaları ve faaliyetleri değişebilmektedir. Süngerler, algler, odun parçaları, tunikatlar, sedimentler, yumuşakçalar, mercanlar gibi farklı substratlar üzerinde yaşayan fungusların olduğu bilinmektedir. Fungusların göstermiş olduğu büyük çeşitliliğin mangrov, sahil, kumsal, göl ve nehir ağzı gibi kıyı şeritleri habitatlarında olması büyük olasılıkla sel ve rüzgâr gibi çevresel etkilerin karasal fungusları denizel çevreye taşımış olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Bu nedenle denizel türevli funguslar morfolojik olarak sıklıkla karasal türevli akrabalarına benzerlik göstermektedirler. Yapılan çalışmalar sonucunda kayda geçirilmiş 530 filamentöz denizel türevli fungus içerisinde 424 türün Ascomycetes, 94 türün Anamorfik ve 12 türün Basidiomycetes içerisinde yer aldığı tespit edilmiştir ve bu fungusların çoğunun kıyısız bölgelerde yer alan çürüyen lignoselülozik materyaller üzerinde bulunduğu gözlemlenmiştir (Jones et al., 2009). Obligatif fungusların aksine denizel ortamdan izole edilmiş fakültatif fungusların denizel koşullara iyi bir şekilde adapte oldukları ve büyük olasılıkla da özel biyokimyasal özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir (Damare et al., 2006a, b).

### **2.2.1 Denizel türevli fungusların denizel ekosistemdeki rolü**

Denizel ortamda bulunan hayvan ve bitkiler üzerinde saprofit, parazit ve simbiyont olarak yaşayan funguslar güçlü bir kitin duvarına sahiptirler ve besinlerini ozmotrofi ile sağlamaktadırlar ve bu işlem genellikle depolimerizasyon enzimlerinin salgılanması aracılığı ile monomerlerine ayrılan besinlerin hücre içine alınmasını içermektedir (Richards et al., 2012).

Fungusların ekolojik başarısının temel sebepleri altında;

- Kitin ve selüloz' un fungal hücreleri destekleyip güçlendirmesi,

- Genellikle hif ya rizoid şeklinde kutuplaşmış hücrelerin büyüme esnasında yapısal olarak gerilmesi,

- Fungal filamentlerin büyüüp geliştiği çevrenin farklılığı ve heterojenitesi,

gibi etmenler yer almaktadır ve fungusların sahip oldukları bu adaptasyonlar bu organizmalara hızlı büyüme, yüksek metabolik oran ve ekolojik başarı sağlamaktadır (Bartnicki and Garcia, 1987). Denizel funguslar denizel çevreye karşı oluşturdukları adaptasyon ile sahip oldukları yaşam şekillerinin sonucunda beslenmeye ihtiyaç duydukları hücreleri fagositoz yapma yeteneğinden yoksun kalmıştır ve bitki ve hayvan konak organizmaları, sedimentler, topraklar ve detritus gibi besin anlamında zengin çevrelerde gelişmektedirler ve bu substratlara tutunan denizel funguslar enzim salgılayarak karmaşık biyolojik polimerlerin yıkılması sonucunda açığa çıkan besinleri almaktadırlar (Richards et al., 2012). Bu ekolojik karakteristikler fungusların birçok üst ve yüzey deniz suyu örneklerinde çeşitliliklerinin ve yoğunluklarının az olarak bulunmasının sebebi açıklayabilmektedir. Birçok pelajik ve yüzey deniz çevreleri besin açısından düşük yoğunluktadır ve planktonik besin zincirinin mikrobiyal ökaryotik bileşeni baskın olarak serbest yüzen ya da yüzen tek hücreli organizmalardır. Bu gibi çevrelerin geniş fiziksel substratlara tutunup osmoz ile beslenen organizmalara olanak sağlamamasının sebebi sıvı çevredeki besinlerin hızlı bir şekilde difüzyon ile kaybolması olarak düşünülmektedir (Richards et al., 2012).

Denizel funguslar geniş çapta saprofitler, parazitler, simbiyontlar, endofitler ve epifitleri kapsamaktadır (Panno et al., 2013) ve planktonik komüniteler, denizel bitkiler, denizel invertabratlar, vertabratlar ve inorganik maddeler gibi denizel habitatlarda bulunabilmektedirler (Jones et al., 2012). Denizel habitatlarda hastalık yapıcı ya da hastalıkla ilişkili olan denizel fungusların iyi bir şekilde karakterize edilmiş denizel olmayan taksonlarda yakın bir şekilde ilişkilendirilmektedir. Denizel çevrelerdeki DNA analizlerinden elde edilen SSU rDNA sekans çalışmaları sonucunda bazı örneklerin *Cardyiceps/Paecilomyces*, *Geomyces*, *Taphrina*, *Candida*, *Malassezia* ve *Ustilago* gibi karasal parazitik funguslar ile yakından ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Richards et al., 2012). *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Fusarium*, *Histoplasma*, *Sporothrix* gibi karasal funguslar ile yakından ilişkili olduğu bilinen bazı fungal patojenlerin ise denizel memelilerde belirgin bir şekilde yaygın olduğu bulunmuş ve bu grupların çoğu eDNA analizi ile belirlenmiştir (Bass et al., 2007; Cathrine and Raghukumar, 2009; Edgcomb et al., 2002).

Fungusların genel olarak mercanlarla ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve aynı zamanda çevresel strese maruz kalan zayıf mercanların fırsatçı patojen oldukları ileri sürülmektedir ve karasal *Aspergillus* türü ile yakından ilişkili olan *Aspergillus sydowii* bu duruma örnek gösterilip deniz fan mercanlarının bir patojeni olduğu tanımlanmıştır (Alker et al., 2001, Shinn et al., 2000).

Denizel çevrelerde bulunan parazitik funguslara ek olarak saprofitik funguslar da göze çarpmaktadır. Karasal ekosistemde funguslar biyopolimerleri ve döngüdeki besinleri parçalayarak detrital çevrelerde saprofit olarak kritik rol oynamaktadırlar ve bu işlem daha geniş ekosistem sağladığı için önemlidir (Richards et al., 2012). Detritus içerisindeki yaşam ve saprotrofun sıklıkla anoksik ya da kısmi anoksik koşullar ile ilişkilendirildiği bilinmektedir ve fungusların anoksik çevrelere karşı oluşturdukları hücresel ve genomik adaptasyona sahip oldukları belirtilmektedir. Dolayısıyla, denizel fungus çeşitliliği karasal çevreye kıyasla kısıtlamış gözükse de funguslar denizel ekosistemde detritus sürecinde kritik rol oynamaktadır (Mann, 1998; Raghukumar, 2004). Bunun sonucunda ise lizin ve metiyonin gibi aminoasitler, çeşitli vitaminler, çoklu doymamış yağ asitleri ve steroller (denizel hayvanlardaki kolesterolün üretimi için önemli bir prekürsör) gibi daha geniş besin ağı için temel besinler sağlanmaktadır (Phillips, 1984).

Çevresel denizel fungal sekansların filogenetik analizi çok sayıda sekansın *Aspergillus*, *Fusarium*, *Coprinus* ve *Exidia* gibi bilinen saprofitik funguslar ile yakın bir şekilde dallandığını göstermiştir (Richards et al., 2012).

Denizel fungus etkileşimleri ile ilişkili olan bir çalışma kalkerli substratların funguslar tarafından degradasyonuna odaklanmaktadır. Denizel funguslar yumuşakça kabukları gibi yapıları degrede etmesiyle bilinmektedir (Hyde ve ark., 1998). Örnek olarak, *Arenariomyces*, *Corollospora* ve *Lindra* gibi Askomycetes genuslarının foraminifer kabukları degrede ettikleri bilinmektedir (Sponner and Roberts, 2005). Birçok mercan ile ilişkilendirilen diğer endolitik funguslar (kayaların içerisinde yaşayanlar ve kalkerli substratları delenler için genel bir terim) ise Basidiomycetes ve çoğu Ascomycetes genuslarını kapsamaktadır (Richards et al., 2012).

Fungusların tüm denizel çevrede bulunan otsu ve odunsu substratların temel ayrıştırıcıları oldukları uzun zamandan beri bilinmektedir. Denizel çevrede yaşayan fungusların öneminin altında lignoselülozu parçalayabilme yetenekleri

yatmaktadır ve birçok denizel fungus lignoselüloz içeren substratlardan izole edilmeleri ile tanımlanmıştır. Denizel funguslar tarafından lignoselüloz degradasyonunun kanıtı olarak, denizel çevrelerden izole edilen filogenetik olarak farklı, 30'dan fazla fungus suşunda bulunması gösterilmektedir (Hyde et al., 1998).

*Spartina alterniflora* yapraklarından izole edilen fungus suşlarının selüloz, sellobiyoz, pektin, lipit, tannik asit, nişasta ve ksilan degradasyonlarını yapabilme yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur (Gessner, 1980).

### 2.3 Ksilanazlar

Dünyada oluşan çoğu tarımsal ve agro-endüstriyel atıklar hemiselülozdan oluşmaktadır (Lee et al., 2015). Doğada bulunan lignoselülozik bitki biyokütlesi %20-30 oranında hemiselülozik bileşiklerden oluşmaktadır ve bu bileşikler yaygın bir şekilde selüloz ile birlikte bulunan heterojenik polisakkaritler (Timell, 1967). Biyokütle, dünya yakıt piyasasındaki talebi karşılamak için alternatif bir doğal kaynaktır. Ksilanazların substratı olan ksilan hemiselülozun temel bileşeni olup, doğada en bol bulunan ikinci büyük polisakkarit ve dünyadaki yenilenebilir kaynakların yaklaşık olarak üçte birini oluşturan heterojenik polisakkaritlerden biridir (Prade, 1995). Doğada yaygın olarak bulunan bir heteropolisakkarit olan ksilan  $\beta$ -1,4 bağlı ksilopiranozil rezidülerinden oluşan bitki duvarının büyük bir bileşendir ve aynı zamanda asetil, arabinozil ve glukonozil taşıyan yan bağlardan oluşmuştur (Wong et al., 1998).

Ksilanazlar lignoselülozik materyalin önemli bir bileşeni olan hemiselülozun biyodönüşümünde önemli bir yer aldığı için son yıllarda artan sanayileşme ile birlikte bu enzimlerin üretimine ve uygulamalarına endüstriyel olarak ilgi artmaktadır. Ksilanaz enziminin kullanım alanlarına örnek olarak başlıca kağıt endüstrisi ile gıda ve hayvan yemi endüstrileri örnek gösterilmektedir.

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ksilanaz enzimleri, ksilandaki  $\beta$ -1,4-D-ksilozidik bağlarını hidrolizini katalizleyen glikosidazlardır (o-glikozid hidrolazlar; E.C. 3.2.1). Bu enzimler hücre metabolizması için primer karbon kaynağı olan ksilozu oluşturur ve aynı zamanda bitki patojenlerince bitki hücre enfeksiyonunda ilişkilidir. (Collins et al., 2005). Birçok bakteri, fungus, aktinomiset ve maya gibi mikrobiyal kaynaklar ksilanı parçalayabilmek için

ksilanaz üretmektedir ve bu enzimler aynı zamanda deniz alglerinde, protozoonlarda, kabuklu hayvanlarda, böceklerde, salyangozlarda ve karasal bitkilerin tohumlarında bulunabilmektedir (Harris and Ramalingam, 2010).

Ksilanaz üreticisi olan organizmalar arasında yer alan filamentöz funguslar enzimi ortama salgıladığı için bakteri ve mayalara kıyasla daha fazla ksilanaz seviyelerine sahiptir. Filamentöz fungusların bir gurubu olan *Aspergillus* genusu, yüksek verimde ksilanı parçalayan enzimleri salgıladığı için son yıllarda bu genusa olan ilgi artmaktadır (Miao et al., 2015). Bununla birlikte, bakterilerdeki ksilanazlar glikozilasyon gibi post-translasyonel mekanizmalardan yoksun olması ve ürettikleri enzimlerin periplazmik boşluklarda ya da intraselüler alanda kalması ile sınırlıdır (Polizeli et al., 2005).

Hemiselülozun temel bileşeni olan ksilan, kompleks bir yapı olduğu için tamamen hidrolizi için farklı enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 1.1). Bu enzimler ksilanolitik enzim kompleks olarak adlandırılmaktadır. Ksilanolitik enzim sistemi içerisinde yer alan enzimler şunlardır (Subramaniyan and Prema, 2002);

- Ksilan omurgasındaki glikozidik bağları rastgele kıran endo-1,4,- $\beta$ -ksilanazlar (E.C. 3.2.1.8),

- Ksilobiyozu ksiloza hidrolizini sağlayan  $\beta$ -D-ksilosidazlar (E.C. 3.2.1.37),

- Ksilan içerisindeki L-arabinoz zincirlerini hidrolize eden  $\alpha$ -L-arabinofuranosidazlar (E.C. 3.2.1.55),

- Asetillenmiş ksilan içerisindeki ksiloz rezidülerinin 2 ve 3 pozisyonlarındaki O-asetil gruplarını hidroliz eden asetil ksilan esterazlar (E.C. 3.1.1.6),

- Glukuronoksilanda bulunan  $\beta$ -D-ksilopiranozil omurgası ve glukuronik asit rezidüleri arasındaki  $\alpha$ -1 ve 2 bağlarını hidroliz eden  $\alpha$ -glukuronidazlar (E.C. 3.2.1.131),

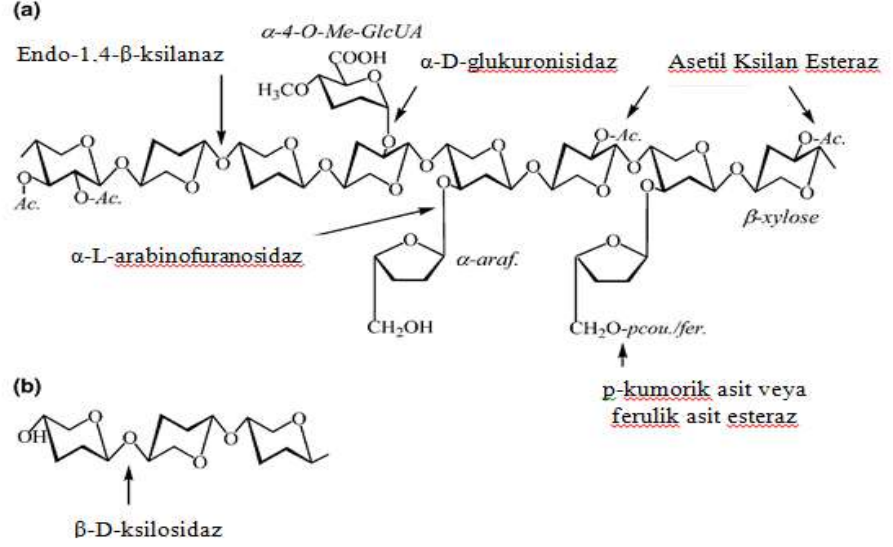
- Ferulik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.73),

- p-kumarik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.-),



- Ekzo-1,4- $\beta$ -D-ksilanazlar (E.C. 3.2.1.37)

Endoksilanazlar bu ksilanolitik enzim kompleksi arasında glikozidik bağlar ile doğrudan ilişkili kurup bu bağları rastgele kırdığı için en önemli ksilanazlar olarak görülmektedir (Juturu and Wu, 2011).



**Şekil 2.1.** Ksilanazların ksilan omurgasına etki noktaları; (a) Ksilanın yapısı ve ksilanın hidrolizinden sorumlu ksilanolitik enzimlerin etki bölgeleri; Ac: asetil grup,  $\alpha$ -Araf: arabinofuranoz,  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA:  $\alpha$ -4-O-metilglukuronik asit, pcou: *p*-kumarik asit, fer: ferulik asit. (b)  $\beta$ -D-ksilosidaz enzimi ile ksilooligosakkarit hidrolizi (Collins et al., 2005)

### 2.3.1 Ksilanaz enziminin kullanım alanları

Mikroorganizmalardan üretilen ksilanaz enzimlerine olan ilgi birçok endüstriyel işlemlerdeki uygulamalarından dolayı oldukça artmaktadır. 1980'li yılların başlarında kullanılmaya başlayan ksilanaz enzimi, ilk olarak hayvan yemlerinin hazırlanmasında daha sonra gıda, tekstil ve kağıt endüstrilerinde kullanılmaya başlanmıştır. Ksilanaz enzimleri gıda endüstrisinde keklerin, pastaların, krakerlerin ve diğer gıdaların hamurda bulunan polisakkaritleri dönüştürerek pişirilmelerinin hızlandırmasında kullanılmaktadır. Hayvan yemlerinde kullanılan ksilanaz enzimleri domuz ve kümes hayvanlarında intestinal viskoziteyi azaltarak yemden yararlanmayı arttırmaktadır. Çoğu ticari ksilanaz enzimleri başlıca *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* ve *Talaromyces* türleri tarafından üretilmektedir.

Ksilanaz enzimleri son yıllarda birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. Collins ve arkadaşları (2004) bu enzimleri endüstriyel alandaki kullanımına göre 4 gruba ayırmıştır ve bu alanlar:

- Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi
- Gıda endüstrisi
- Hayvan besleme
- Diğerleri olarak belirlenmiştir.

Ksilanazların temel endüstriyel kullanım alanlarının başında kağıt ve hamuru endüstrisi gelmektedir. Çevresel düzenlemeler kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde klor kullanımına kısıtlama koymaktadır. Kağıt hamurundaki lignin karakteristik olarak kahverengi bir renk oluşturmaktadır ve bu lignin kimyasal olarak klor kullanılarak uzaklaştırılmaktadır ve ağartma işlemi yapılmaktadır. Klor tabanlı beyazlatma işlemleri sonucunda ortaya çıkan klorlanmış organik bileşiklerin toksik, karsinogenik ve mutajenik gibi etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Biyolojik olarak yapılan ağartma işlemlerinde manganaz, peroksidaz, lakkaz gibi lignolitik enzimler ve ksilanaz gibi hemiselülotik enzimler kağıtdaki ligninin uzaklaştırılması amacıyla kullanılarak klor ve klorlu bileşiklere gereksinimi büyük ölçüde azaltmaktadır (Raghukumar et al., 2004). Selüloz lifleri lignin ve hemiselüloz ile korunmaktadır ve bu bağ lignin ve ksilan tarafından sağlanmaktadır. Ksilanaz enzimi bu açıdan önemli hemiselülaz olarak görülmektedir (Raghukumar et al., 2004). Lignin ve karbonhidrat arasındaki bağların ksilanaz enzimi kullanılarak kırılması ve ligninin lignolitik enzimler ile parçalanması sonucu ile kağıt hamurunun beyazlatılması ve hamur parlaklığının artırılması sağlanmaktadır.

Ksilanolitik enzimlerin gıda endüstrisindeki kullanımı fırıncılıktaki potansiyel etkilerinden dolayı son yıllarda artış göstermektedir. Diğer hemiselülazlar gibi ksilanazlar buğday unundaki hemiselüloza etki ederek hamurdaki suyun yeniden dağılmasına ve hamurun daha yumuşak ve daha kolay yoğrulmasına katkı sağlamaktadır. Ksilanazlar suda çözünmez hemiselülozu çözünür hemiselüloza dönüştürdüğü; çözünür hemiselülozun daha fazla su bağlayarak hamur sağlamlığını ve kalitesini arttırdığı bilinmektedir (Butt et al., 2008). Hemiselülozların başlıca üyesi olan arabioksilanlar ksilanaz enziminin

substratıdır. Ekmek yapımında kullanılan ksilanazlar suda çözünmeyen arabinoksilanlar üzerine etkili olan enzimlerdir ve bu enzimlerin kullanılmasıyla hamurda %2-3 oranında bulunan arabinoksilanların tuttuğu su serbest kalarak hamur daha yumuşak hale gelir ve işleme özelliğini artar (Harris and Ramalingam, 2010). Ekmek yapımında kullanılan ksilanazların ekmek için yapısını ve son ürün hacmini arttırarak, un kalitesindeki çeşitlilikten kaynaklanabilecek olan problemlerin azaltılmasına yardımcı oldukları belirlenmiştir (Harris and Ramalingam, 2010). Gıda endüstrisinde kullanılacak ksilanaz enzim seçiminde temel aranan özellikler bu enzimlerin yüksek sıcaklık kararlılığına ve asidik koşullarda optimum aktivite göstermesine bağlı olmaktadır.

Günümüzde yem katkısı olarak kullanılan enzimlerden biri olan ksilanazlar yem bitkilerine uygulanmasıyla geviş getiren hayvanların sindirimini kolaylaştırmaktadır (Gilbert and Hazlewood, 1993). Ksilanazlar enzimleri hayvan yemlerinde glukanaz, pektinaz, selülaz, fitaz, amilaz, lipaz ve galaktosidaz enzimleri ile birlikte kullanılarak yem içerisinde bulunan arabinoksilanları dönüştürerek sindirim bağırsak viskozitesini azalttığı bunun sonucunda yemden daha iyi bir şekilde yararlanmayı sağladığı bilinmektedir (Twomey et al., 2003). Ksilanaz enzimleri aynı zamanda çavdar kullanılarak hazırlanan yemler ile beslenen et tavuklarında intestinal viskoziteyi azalttığı ve bu şekilde yemden daha iyi bir şekilde faydalanılarak kilo artışına katkı sağladığı bildirilmiştir (Harris and Ramalingam, 2010).

Ksilanaz enzimleri gıda, hayvan yemi ve kağıt ve kağıt endüstrilerine ek olarak aynı zamanda meyve ve sebzelerin işlenmesinde, tekstil endüstrisinde keten, kendir ve rami işlenmesinde ve biyodönüşüm endüstrisinde endüstriyel, evsel ve tarımsal atıkların çevreye karşı etkilerinin azaltılmasında kullanılmaktadır (Collins et al., 2005).

Ksilanazların aynı zamanda biyoetanol üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. Biyoetanol üretimi için başlangıç materyali olarak bitki biyokütlesini kullanmak birçok dönüşümü içeren karmaşık bir işlemdir. Başlangıçta, lignoselülozik materyalin delignifiye edilmesi; ksilanın ve selülozun sırasıyla ksilooligosakkarite ve sellobiyoza hidrolizinin gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu oligosakkaritler ksiloz ve glukoz gibi basit şekerlere dönüştürülebilmektedir ve sonuç olarak biyoetanol üretimi için ilgilenilen bileşikler sağlanmaktadır. Selülaz aktivitesine sahip endo-1,4- $\beta$ -ksilanaz gibi çift fonksiyonlu ksilanazların çeşitli enzimlere olan ihtiyacı azalttığı bilinmektedir

(Sharma and Kumar, 2013). Bu şekilde lignoselülozik biyokütlenin şekerleşme (sakkarifikasyon) işlemi daha verimli ve ucuz bir şekilde yapılmaktadır.

Ksilanaz enzimleri içerisinde yer alan endoksilanazların ksilanı hidrolize ederek ksilooligosakkaritleri oluşturduğu bilinmektedir. Ksilooligosakkaritlerin bağırsakta yaşayan ve sindirime yardımcı bazı bifidobakterilerin büyümesini teşvik ederek probiyotik etkilerinin olduğu ve bu şekerlerin aynı zamanda bazı zararlı bakterilerin çoğalmasını kısıtladığı belirtilmiştir (Aachary and Prapulla, 2011). Sonuç olarak, ksilooligosakkaritler gıda katkısı olarak soya sütü, çay, kahve bisküvi, puding, marmelat, reçel gibi gıdalarda kullanılmaktadır. Ksilooligosakkaritler aynı zamanda sarcoma-180 ve diğer tümörlerin büyümesini dolaylı olarak spesifik olmayan immünolojik bağışıklığı uyararak kısıtladığı belirtilmiştir (Ebringerova and Hromadkova, 1999). Bağışıklığı uyarıcı etkilerinin yanında bu şekerlerin antienflamatuvar etkilerinin olduğu ve bu gibi özellikler ksilooligosakkaritleri farmasötik endüstrisi için daha ilgi çekici bir hale getirdiği bilinmektedir (Aachary and Prapulla, 2011).

Ticari ksilanazlar Japonya, Finlandiya, Almanya, İrlanda, Danimarka, Kanada ve Amerika'da endüstriyel olarak üretilmektedir. Bu enzimler genel olarak *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. ve *Humicola insolens* gibi mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Çizelge 2.1, ticari ksilanazları ve kaynaklarını göstermektedir.

**Çizelge 2.1.** Ticari ksilanaz preparatları (Harris and Ramalingam, 2010).

Şirket	Ürün ismi	Organizma	Uygulama Alanı
<b>Altech,Inc, (USA)</b>	“Allzym PT”	<i>Aspergillus niger</i>	Hayvan katkı yemi
<b>Altech,Inc, (USA)</b>	“Fibrozyme”	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Hayvan katkı yemi
<b>Amano Pharmaceutical Co, Ltd (Japonya)</b>	“Amano 90”	<i>Aspergillus niger</i>	Farmasötik, gıda ve besi endüstrisi
<b>Biotec</b>	“Ecosane”	<i>Trichoderma reesei</i>	Hayvan yemi

Çizelge 2.1. (devam)

Şirket	Ürün ismi	Organizma	Uygulama Alanı
<b>Clariant (Birleşik Krallık)</b>	“Catazyme”	<i>Termomonospora fusca</i>	Kağıt hamuru ağartma
<b>Ciba-Geigy Ltd (İsviçre)</b>	“Irgazyme40”	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi ve hayvan yemi
<b>Danisco Ingredients (Danimarka)</b>	“Grindazym PF” ve “Grindazym GP 5000)	<i>Aspergillus niger</i>	Kümes ve domuz hayvanları katkı yemi
<b>Danisco Ingredients (Danimarka)</b>	“Grindazym PF” ve “Grindazym GP 5000)	<i>Aspergillus niger</i>	Kümes ve domuz hayvanları katkı yemi
<b>Gamma Chemie GmbH (Almanya)</b>	“Gammafeed x” “Gammazym X4000L”	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Trichoderma reesei</i>	Buğday nişasta üretimi, ekmek yapımı ve mayalama, yem ve mayalama endüstrisi
<b>Geecor International Europe Ltd (Finlandia)</b>	“Multifect XL”	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Gıda endüstrisi
<b>Hankyo Bioindustry Co.Ltd (Japonya)</b>	“Xylanase250” “Hemicellulase 100”	<i>Trichoderma viride</i> <i>Aspergillus niger</i>	Ekmek yapımı, meyve ve sebzelerin sıvılaştırılması
<b>Iogen Corp (Japonya)</b>	“Xylanase GS35”	<i>Trichoderma reesei</i>	Kağıt hamuru ağartma, hamur temizleme ve yem işleme

Çizelge 2.1. (devam)

Şirket	Ürün ismi	Organizma	Uygulama Alanı
	“Bio-feed-plus”	<i>Humicola insolens</i>	Hayvan yemi
<b>Novozymes (Danimarka)</b>	“Novozym 431”	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Hayvan yemi
	“Pulpxyme”	<i>Bacillus</i>	Selüloz ve kağıt endüstrisi
<b>Primalco Ltd Biotech (Finlandiya)</b>	“Ecopulp X-200”	<i>Trichoderma reesei</i>	Ağartma işleminin geliştirilmesi, yumuşak ve sert odun ambalaj kağıt hamuru
<b>Quest International Ireland (İrlanda)</b>	“Bioxlanase”	<i>Trichoderma reesei</i>	Mayalama ve hayvan yemi endüstrisi
<b>Rohm GmbH (Almanya)</b>	“Rohalasa 7118”	<i>Aspergillus sp. &amp; Trichoderma sp.</i>	Nişasta işlenmesinde viskozitenin azaltılması
	“Vernon 191”	<i>Aspergillus sp. &amp; Trichoderma sp.</i>	
<b>Seikagaku Corporation (Japonya)</b>	Ticari ismi yok	<i>Trichoderma sp.</i>	Karbonhidratların yapı çalışmaları
<b>Shin Nihon Chemical (Japonya)</b>	“Sumizyme X”	<i>Trichoderma koningii</i>	Mantar ve sebze ekstraktlarının üretimi, mısır gevreklerinin enzimatik olarak soyulması, ekmek endüstrisi

Çizelge 2.1. (devam)

Şirket	Ürün ismi	Organizma	Uygulama Alanı
Solvay Enzymes GmbH&Co. (Almanya)	“Solvay pentosanasa”	<i>Trichoderma reesei</i>	Nişasta ve ekmek endüstrisi
Stern-Enzyme GmbH & Co (Almanya)	“Sternzym HC46”	<i>Trichoderma reesei</i>	Ekmek endüstrisi
	“Sternzym HC40”	<i>Aspergillus niger</i>	Hayvan yemi, bitki ham materyallerinin hidrolizi

## 2.4 Ksilanaz Enzim Kaynağı Olarak Funguslar

Mikroorganizmaların yararlı bir enzim kaynağı olarak kullanılmalarının altında; yüksek oranda çoğalma kapasitesi ve insanlar tarafından kontrol edilebilen biyolojik aktif ürünleri sentezleyebilmeleri yatmaktadır. Mikrobiyal ksilanazlar yüksek spesifite, ılımlı reaksiyon koşulları, göz ardı edilebilen substrat kaybı ve yan ürün oluşturmaları gibi özelliklerinden dolayı ksilan hidrolizi için tercih edilen katalizörlerdir. Mikroorganizmalardan elde edilen ksilanazlar kâğıt ve kâğıt hamuru, gıda ve yem gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

1960'lara kadar mikrobiyal ksilanazlar ile ilgili birçok araştırma bulunmasına rağmen, öncelikli odak bitki patolojisi ile ilişkili araştırmalar üzerine olmuştur (Lebeda et al., 2001). 1982'li yıllarda kâğıt endüstrisinde ağartma işlemleri için ksilanaz enzimleri kullanılmaya başlanmıştır. 1982 yılından beri ise bakteri ve fungusları içeren bazı mikroorganizmaların ksilanı hidrolize ettiği bildirilmiştir (Motta et al., 2013).

Ksilanaz enzimlerini üreten filamentöz funguslar, enzimleri büyüme ortamına yüksek oranda salgıladıkları için endüstriyel alanda en çok kullanılan mikroorganizmalardır. Ksilanazlara ek olarak, funguslar ksilana eklenen bazı yan gruplar ile oluşan heteropolisakkaritlerin degradasyonu için birçok yardımcı enzimi ürettiği bilinmektedir. Çizelge 2.2, funguslardan elde edilen bazı ksilanazların özelliklerini içermektedir.

**Çizelge 2.2.** Funguslardan elde edilen bazı ksilanazlar ve özellikleri (Harris and Ramalingam, 2010).

Fungus Örneği	Moleküler Ağırlık (kDa)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Referans
<i>Acrophialophora nainiana</i>	17	6	50	Ximenes et al., 1999
<i>Aspergillus niger</i>	13.5-14.0	5.5	45	Frederick et al., 1985
<i>Aspergillus kawachii</i> <i>IFO4308</i>	26-35	2-5.5	50-60	Ito et al., 1992
<i>Aspergillus nidulans</i>	22-34	5.4	55	Fernandez-Epsinar et al., 1992
<i>Aspergillus fischeri</i> Fxn1	31	6	60	Raj and Chandra, 1996
<i>Aspergillus sojae</i>	33, 36	5.0, 5.5	50, 60	Kimura et al., 1995
<i>Aspergillus sydowii</i> MG 49	30	5.5	60	Ghosh and Nanda, 1994
<i>Aspergillus aculeatus</i>	18, 26, 52	4.0, 4.0, 5.0	50, 50, 70	Fujimoto et al., 1995
<i>Aspergillus awamori</i>	39, 23, 26	4.0-5.5	45-55	Kormelink et al., 1993
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19, 8.5	5.5	55	Silva et al., 1999
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	5.0	60	Kitamoto et al., 1999
<i>Cephalosporium sp.</i>	30, 70	8	40	Bansod et al., 1993



Çizelge 2.2. (devam)

Fungus Örneği	Moleküler Ağırlık (kDa)	Optimum pH	Optimum Sıcaklık (°C)	Referans
<i>Fusarium oxysporum</i>	20.8, 23.5	6	60, 55	Christakopoulos et al., 1996
<i>Geotrichum candidum</i>	60-67	4	50	Radionova et al., 2000
<i>Paecilomyces varioti</i>	20	4	50	Kelly et al., 1989
<i>Penicillium purpurogenum</i>	33, 23	7, 3.5	60, 50	Belancic et al., 1995
<i>Thermomyces lanuginosus</i> DSM5826	25.5	7	60-70	Cesar and Mrsa, 1996
<i>Thermomyces lanuginosus</i> -SSBP	23.6	6.5	70-75	Lin et al., 1999
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	5	50	Tan et al., 1985
<i>Trichoderma reesei</i>	20, 19	5-5.5, 4-4.5	45-40	Tenkanen et al., 1992
<i>Paecilomyces varioti</i>	20	4	50	Kelly et al., 1989

*Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pichia* ve *Chytridomycetes* genusları ksilanaz enzimini üreten üreticiler arasında yer almaktadır ve bu genoslara ek olarak beyaz çürükçül fungusların besin kaynağı olarak çok çeşitli sayıdaki hemiselülozik materyallere etki eden ekstraselüler ksilanazları ürettiği bilinmektedir (Motta et al., 2013). Beyaz çürükçül basidiomycetes lignoselülozik materyalleri parçalayabilen bu enzimleri büyük bir miktarda üretmektedir. Örnek olarak, *Phanerochaete crysosporium* türünün yüksek miktarda  $\alpha$ -glukoronidaz enzimi ürettiği (Castanares et al., 1995) ve *Coriolus versicolor* türünün ise bir ksilanolitik enzim karışımını oluşturduğu belirtilmiştir (El-Nasser et al., 1997). Aynı zamanda, *Cunninghamella subvermispora* türünün bitki hücre duvarı polisakkaritleri ya da talaş üzerinde büyüdüğünde ksilanaz enzimi ürettiği tespit edilmiştir (De Souza-Cruz et al., 2004).

Fungal ksilanazlar genel olarak selüloz ile ilişkilendirilmektedir. Bu suşlar selüloz üzerinde hem ksilanaz hem de selülaz üretebilmektedir. Bununla birlikte, ksilanaz enziminin seçici bir şekilde üretimi sadece karbon kaynağı olarak ksilan kullanılmasıyla mümkün olabilmektedir. Büyüme ortamında bulunan karbon kaynağı ile ilişkili olan ekstraselüler enzimlerin oluşumunu kontrol eden mekanizma, protein sentezi için gerekli olan öncül maddenin bulunmasından etkilenmektedir. Bu nedenle bazı funguslar içerisinde; selüloz içermeyen ve daha düşük azot/karbon oranındaki ortamda hücreleri büyütme, selülaz içermeyen ksilanolitik enzim sistemini üretmek için olası bir strateji olarak görülmektedir (Biely, 1991).

Ksilanaz enzimleriyle yapılan çalışmalar sonucunda bu enzimlerin mezofil organizmalar tarafından üretildiği bilinmektedir (Smith et al., 1991). Mezofilik funguslar arasında *Aspergillus* ve *Trichoderma* genusu ksilanaz üretiminde ön plana çıkmaktadır. Son yıllarda daha yüksek kararlılığa sahip oldukları için termofilik ve hatta ekstremofilik mikroorganizmaların izolasyonu üzerine çalışmalar artmıştır.

Ksilanaz enzimlerinin keşfi için uzun yıllardan beri karasal kökenli funguslar ile kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır ve bunun sonucunda birçok ksilanaz enzimi elde edilmiştir. Çizelge 2.3, karasal kökenli funguslara ait ksilanazlara dair bazı araştırmaların (Kalim et al., 2015) listesini içermektedir.

**Çizelge 2.3.** Karasal kökenli funguslardan elde edilmiş bazı ksilanazlar ve uygulama alanları.

Fungus Örneği	Enzim Aktivitesi	Potansiyel Uygulamaları	Literatür
<i>Armillaria gemina</i>	1270 U/ml	Ksilooligosakkarit üretimi	Dhiman et al., 2012
<i>Aspergillus japonicas</i> CY6-1	5-7 U/ml	Ksilooligosakkarit üretimi	Yang et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i> F <sub>7</sub>	961.29±7.14 U/g	Biyooetanol üretimi	Sharma et al., 2012
<i>Aspergillus niger</i> IME-216	74.8 U/μl	Biyooetanol üretimi	Tian et al., 2014
<i>Aspergillus niger</i> XZ- 3S	42.33 U/mg	Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi	Fu et al., 2012

Çizelge 2.3. (devam)

Fungus Örneği	Enzim Aktivitesi	Potansiyel Uygulamaları	Literatür
<i>Aspergillus oryzae</i>	45.0 U/ml	Endüstriyel prosesler	Yin et al., 2013
<i>Clostridium BOH3</i>	44.05±0.25 U/mg	Bütanol ve hidrojen üretimi	Rajagopalan et al., 2014
<i>Colletorichum graminicola</i>	378.1±23.3 U/mg	Biyotanol üretimi	Zimbardi et al., 2013
<i>Fusarium verticillioides</i>	114.6 U/ml	Biyotanol üretimi	De almedia et al., 2014
<i>Humicola brevis var. thermoidea</i>	5791±411.2 U/mg	Kağıt hamuru ağartma endüstrisi	Masui et al., 2012
<i>Humicola insolens Y1</i>	20.5 U/mg 1.7 U/mg	Bitki biyokütlesinin verimli hidrolizi	Yang et al., 2013
<i>Leptosphaerulina chartarum SJTU59</i>	17.566 U/ml	Kağıt ve kağıt hamuru, tekstil, hayvan katkı yemi endüstrileri	Wu et al., 2013
<i>Penicillium glabrum</i>	89.84	Hayvan katkı yemi, meyve sularının berraklaştırılması	Knob et al., 2013
<i>Penicillium occitanis</i> PoI6	58.82 U/ml	Yem ve gıda endüstrisi	Driss et al., 2012
<i>Simplicillium obclavatum</i> MTCC 9604	236.4 µM min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	Biyoyakıt, hayvan katkı yemi ve gıda endüstrisi	Roy et al., 2013

Ksilanaz enzimlerinin endüstriyel uygulamaları, kontrol edilebilen rutin koşullar altında oldukça stabil enzimlerin tanımlanmasına ihtiyaç duymaktadır. Termofillerin biyoteknolojik işlemlerde kullanılması sonucunda azalmış kontaminasyon riski ve daha hızlı reaksiyon oranları gibi avantajlar sunulmaktadır. Genel olarak pH, sıcaklık, kimyasal ve enzimatik kararlılığa herhangi bir enzimin endüstriyel uygulamalarda kullanılması için büyük önem taşımaktadır. Endüstriyel olarak uygun ksilanaz enzimlerini tanımlanması,

ekstremofilik mikroorganizmlardan elde edilen enzimlerin araştırılmasıyla daha mümkün hale gelmektedir.

Alkalifilik mikroorganizmalar ile ilgili çalışmalar çoğunluklu kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde büyük önem taşımaktadır. Genel olarak alkalik ksilanaz enzimleri funguslardan çok bakterilerden ve özellikle *Bacillus sp.* suşlarından elde edilmektedir. Funguslar ile yapılan bir çalışmada *Aspergillus fischeri* türünden elde edilen bir alkalik-tolerant ksilanaz enziminin pH 9.0' da kararlılığa gösterdiği bilinmektedir (Yoshioka et al., 1981). Buna ek olarak sadece *Cephalosporium*, pH 6.5-9.0 arasında aktivite gösteren bir ksilanaz üreten alkalifilik fungus olduğu belirtilmiştir (Kulkarni, 1999).

Son yıllarda daha yüksek kararlılığa sahip oldukları için termofilik mikroorganizmaların izolasyonu üzerine çalışmalar artmıştır. Termofilik funguslar arasında *Chaetomium thermophile*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus albomyces*, *Paecylomyces variotii*, *Talaromyces byssochlamydoides*, *Talaromyces emersonii*, *Thermomyceslanuginosus* ve *Thermoascus aurantiacus* türleri yer almaktadır ve bu funguslardan elde edilen ksilanazların optimum sıcaklıkları 60 ve 80°C arasında olup bu sıcaklıklarda oldukça stabildir (Polizeli et al., 2005). Bununla birlikte bu enzimler glikoprotein yapısında olup asidik pH da aktivite göstermektedir.

Birçok endüstriyel enzimler karasal kaynaklardan elde edilmektedir ve bu alanlarda kullanılacak enzimlerin ekstrem sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonlarında kararlı olması istenmektedir. Dolayısıyla denizel çevrenin sahip olduğu eşsiz fizyokimyasal özellikler sayesinde, bu koşullara adaptasyon sağlamış fungusların endüstriyel alanda kullanılabilecek enzimleri ile ilgili yapılan çalışmalar son yıllarda artmaktadır. Denizel türevli funguslar tarafından üretilen enzim çalışmaları 1980'li yıllarda yapılmasına rağmen, bu çalışmaların çoğu 1999-2000 yıllarından sonra yayınlanmaya başlanmıştır (Velmurugan and Lee, 2012). Tuzluluk, yüksek basınç, özel ışık koşulları ve değişken mineral içeriği denizel mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler ve bu organizmaların karasal homologları tarafından üretilen enzimler arasında farklılıklar oluşturduğu bilinmektedir.

Özellikle mangrove ve deniz yosunu gibi denizel çevrelerdeki lignoselülozik substratlardan izole edilen obligat ve fakültatif funguslar (denizel türevli) lignoselüloz parçalayan enzimlerin önemli kaynakları olarak görülmektedir ve

yüksek tuz içeriğinde çoğaldıkları bilinmektedir (Raghukumar et al., 2004). Mangrove ortamlardan elde edilen fungusların çoğu deniz suyu içeriği ile hazırlanan büyüme ortamlarında selüloz, ksilanaz ve lakkaz gibi enzimleri üretebildiği bilinmektedir (Raghukumar et al., 1994). Son yıllarda özellikle kâğıt ve kâğıt hamuru gibi birçok endüstride kullanılabilecek olan üstün özelliklere sahip ksilanazlara olan talep arttığı için denizel çevrelerde elde edilen funguslar ile ilgili yapılan çalışmalar artmaktadır. Denizel türevli funguslar ile yapılan ksilanaz çalışmaları mevcuttur. Örneğin, denizel türevli *Cladosporium sp.* türünün ksilanaz enzimini ürettiği gösterilmiştir (Del-Cid et al., 2014). Buna ek olarak mangrove ortamından elde edilen *Aspergillus niger* suşunun bir ksilanaz enzimini ürettiği belirtilmiştir (Raghukumar, 2004).

### 3. MATERYAL VE METODLAR

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Deney mikroorganizmaları

“Denizel Aktinomisetlerden Yeni Antimikrobiyal Moleküllerin Elde Edilmesi” isimli ve SBAG 109S361 numaralı tamamlanmış olan TUBİTAK projesi kapsamında Ege ve Akdeniz Bölgesi’ndeki çeşitli lokasyonlardaki farklı derinliklerden toplanan sünger ve sediment örneklerinden izole edilmiş ve genus seviyesinde tanımlanmış olan 108 adet denizel türevli filamentöz fungus izolatu kültür materyali olarak kullanılmıştır. Bu izolatlara ait bilgiler Çizelge 3.1 de gösterilmektedir.

**Çizelge 3.1** Fungusların izole edildiği örnek tipi, örnek lokasyonu ve izolatların genusları.

İzolat No	Fungus ismi	Lokasyon	İzole edildiği materyal	Derinlik (m)
06ÇK001	<i>Aspergillus sp.</i>	Kaş	Sediment	12
06SK002	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	Sünger	Kaydedilmemiştir
01SK001	<i>Penicillium sp.</i>	Bodrum	Sünger	34
05SK003	<i>Trichoderma sp.</i>	Teos	Sünger	Kaydedilmemiştir
06ÇK003	<i>Aspergillus sp.</i>	Kaş	Sünger	12
06SK003	<i>Geomyces sp.</i>	Kaş	<i>Axinella polypoides</i>	12
04SK002	<i>Penicillium sp.</i>	Ayvalık	<i>Axinella polypoides</i>	28
06SK004	<i>Beauveria sp.</i>	Kaş	<i>Agelas oroides</i>	24
06SK005	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Agelas oroides</i>	24
05SK004	<i>Fusarium sp.</i>	Teos	<i>Chondorsia reniformis</i>	4
06ÇK005	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	Sediment	5
06ÇK006	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	Sediment	1
07SK001	<i>Penicillium sp.</i>	Kekova	<i>Ircinia sp.</i>	26
06SK006	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Axinella polypoides</i>	12
06SK007	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Dysidea sp.</i>	26
06SK009	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Axinella polypoides</i>	12

Çizelge 3.1. (devam)

İzolat No	Fungus ismi	Lokasyon	İzole edildiği materyal	Derinlik (m)
06SK010	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Agelas oroides</i>	24
06SK011	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Agelas oroides</i>	24
07SK002	<i>Scolecobasidium sp.</i>	Kekova	<i>Ircinia sp.</i>	26
07SK003	<i>Penicillium sp.</i>	Kekova	<i>Surkotragus foctitus</i>	24
06SK012	<i>Aspergillus sp.</i>	Kaş	<i>Axinella polypoides</i>	12
06SK013	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Coeacallida carballoi</i>	24
07SK004	<i>Penicillium sp.</i>	Kekova	<i>Ircinia sp.</i>	26
06SK014	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Coeacallida carballoi</i>	24
06SK015	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Coeacallida carballoi</i>	24
06SK016	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Sargot ragus foctitus</i>	27
06SK017	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Diridera awa a</i>	24
06SK018	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Coco spongia</i>	1
06SK019	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Kaş	<i>Coco spongia</i>	1
06SK020	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Axinella polypoides</i>	12
06SK021	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Coeacallida carballoi</i>	24
06SK022	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Axinella polypoides</i>	12
06SK023	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Petrocia ficiformis</i>	24
06SK025	<i>Penicillium sp.</i>	Kaş	<i>Petrocia ficiformis</i>	24
08SK001	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella sp.</i>	12.3
08SK002	<i>Aspergillus sp. (novel)</i>	Mersin	<i>Axinella sp.</i>	12.3
08SK003	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	19.9
08SK004	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	19.9
08SK005	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	<i>Petrosia ficiformis</i>	18.4
08SK006	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	29
08SK007	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Chondrilla nucula</i>	2
08SK008	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	13

Çizelge 3.1. (devam)

İzolat No	Fungus ismi	Lokasyon	İzole edildiği materyal	Derinlik (m)
08SK009	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Dysidera sp.</i>	22.5
08SK010	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	<i>Agelas oroides</i>	21
08SK011	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	21
08SK012	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	21
08SK013	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	8
08SK014	<i>Penicillium crustosum</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	8
08ÇK001	<i>Trichoderma pleuroticola</i>	Mersin	Sediment	31
08ÇK002	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK003	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK004	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	24
08ÇK005	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK006	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08SK015	<i>Acremonium sp.</i>	Mersin	<i>Chondrilla nucula</i>	2
08ÇK007	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK008	<i>Hypocrea sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK009	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK010	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08SK016	<i>Ascomycota sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	13
08ÇK011	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	9.5
08SK017	<i>Microsphaeropsis sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	12.3
08SK018	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	12.3
08SK019	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	19.9
08SK020	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	19.9
08SK021	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Petrosia ficiformis</i>	18.4
08SK022	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella sp.</i>	12.3
08SK023	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Oscarella sp.</i>	5



Çizelge 3.1. (devam)

İzolasyon No	Fungus ismi	Lokasyon	İzole edildiği materyal	Derinlik (m)
08SK024	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	12.3
08SK025	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	19.9
08ÇK012	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	9.5
08ÇK013	<i>Ascomycota sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK014	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	13
08SK026	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Phorbas sp.</i>	12.3
08SK027	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Chandrosia reniformis</i>	15.7
08SK028	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Chandrosia reniformis</i>	15.7
08SK029	<i>Aureobasidium sp.</i>	Mersin	<i>Chandrosia reniformis</i>	15.7
08SK030	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Dysidera sp.</i>	22.5
08ÇK015	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK016	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK017	<i>Volutella sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK018	<i>Trichoderma sp.</i>	Mersin	Sediment	31
08ÇK019	<i>Auxarthron sp.</i>	Mersin	Sediment	13
08SK031	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	12.3
08SK032	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	<i>Dysidera sp.</i>	22.5
08ÇK020	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08SK033	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Petrosia ficiformis</i>	18.4
08SK034	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Spirastrella cunctatrix</i>	11.3
08SK035	<i>Davidiella sp.</i>	Mersin	<i>Phorbas sp.</i>	12.3
08SK036	<i>Davidiella sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	8
08SK037	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella sp.</i>	12.3
08SK038	Tanımlanmayan tür	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	8
08SK039	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	19.9
08SK040	<i>Aureobasidium sp.</i>	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	29

Çizelge 3.1. (devam)

İzolot No	Fungus ismi	Lokasyon	İzole edildiği materyal	Derinlik (m)
08ÇK023	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK024	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	9.5
08ÇK025	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	15.7
08ÇK026	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	15.7
08ÇK027	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK028	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK029	<i>Phoma sp.</i>	Mersin	Sediment	15.7
08ÇK030	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	15.7
08ÇK031	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	Sediment	11
08ÇK032	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK033	<i>Cladosporium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08ÇK034	<i>Penicillium sp.</i>	Mersin	Sediment	8
08SK041	<i>Aspergillus sp.</i>	Mersin	<i>Axinella damicornis</i>	12.3
08SK042	Tanımlanmayan tür	Mersin	<i>Ircinia sp.</i>	8

### 3.1.2 Kullanılan besiyerleri

#### 3.1.2.1 Besiyeri 1: Modifiye malt ekstrakt agar (mMEA)

Aşağıda belirtilen ortam içeriği tartılarak 1 L distile suda tamamen çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra pH 5.6 olarak ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların aktifleştirilmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Rapp, 1974).

#### Modifiye Malt Ekstrakt Agar (g/L):

Malt ekstrakt 30

Pepton 3

Yapay deniz tuzu	25
Agar	15
Distile su	1

### **3.1.2.2 Besiyeri 2: Patates dekstroz agar (PDA)**

Aşağıda belirtilen ortam içeriği 1 L distile suda tamamen çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra pH 5.6 olarak ayarlanmış ve 121°C’de 1.1 atmosfer basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların stok kültür yapılması çalışmalarında kullanılmıştır (Beever, 1970).

#### Patates Dekstroz Agar içeriği (g/L):

Patates özütü	4
Glikoz	20
Agar	15
Distile su	1

### **3.1.2.3 Besiyeri 3: Modifiye wickerham ortamı**

Aşağıda belirtilen ortam içeriği 1 L distile suda tamamen çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra pH 7.2–7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri izolatların petri ortamında ekstraselüler ksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Kjer et al., 2010).

#### Modifiye Wickerham Ortam içeriği (g/L):

Pepton	5
Malt ekstrakt	3
Glukoz	10

Yeast ekstrakt	3
Yapay deniz tuzu	24,4
Distile su	1
AZCL xylan	1

#### **3.1.2.4 Besiyeri 4: Fermantasyon ortamı**

Aşağıda belirtilen Wickerham ortam içeriği içerisinde %1 ksilan içerecek şekilde 1L distile suda tamamen çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra pH 7.2–7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve 1,1 atmosfer basınç altında 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. Bu besiyeri, aktiviteleri belirlenen izolatların fermentasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Bununla birlikte tuz ve glukoz konsantrasyonları ksilanaz aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması için amaca uygun olarak değiştirilmiştir.

##### Fermantasyon ortamı (g/L):

Pepton	5
Malt ekstrakt	3
Glukoz	10
Yeast ekstrakt	3
Yapay deniz tuzu	24,4
Distile su	1
Ksilan (Beechwood xylan)	10

### **3.1.3 Kullanılan tamponlar ve çözeltiler**

#### **3.1.3.1 NaOH çözeltisi**

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak için 1 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır (Santos and Martins, 2003).

#### **3.1.3.2 DNS (Dinitro salisilik asit)**

Enzim aktivitesini tayin etmek amacıyla kullanılmıştır. 1 gr DNS (50 ml de-iyonize su içerisinde çözüldükten sonra), 30 gr K-Na-Tartarat ve 20 ml 2 N NaOH ilave edilerek, son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır (Miller, 1959).

#### **3.1.3.3 %1 Ksilan çözeltisi**

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla substrat olarak kullanılmıştır.

#### **3.1.3.4 Na-Asetat tamponu ( 0,1M, pH 5.0)**

Enzim aktivitelerini saptanması, amonyum sülfat ile proteinlerin çöktürülmesi işleminde santrifüj işleminden sonra oluşan pelletin çözülmesi ve diyaliz işleminde tuz gibi küçük moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmıştır.

#### **3.1.3.5 Glisin-HCl tamponu**

Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim çözeltisinin pH 2.0-4.0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır.

#### **3.1.3.6 Na-asetat tamponu**

Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim çözeltisinin pH 5.0-6.0 aralığındaki aktivitesini belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.7 Na-fosfat tamponu**

Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim çözeltisinin pH 7.0-8.0 aralığındaki aktivite düzeylerini saptamak amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.8 Tris-HCl**

Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim çözeltisinin pH 9.0-10.0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.9 Glisin-NaOH**

Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim çözeltisinin pH 11.0-12.0 aralığındaki aktivite düzeylerini saptamak amacıyla kullanılmıştır.

### **3.1.3.10 Kısmi saflaştırmada kullanılan materyaller**

#### **Amonyum sülfat**

Hücrelerinden ayrılmış fermantasyon sıvısındaki proteinlerin çöktürülmesi için kullanılmıştır.

#### **Diyaliz torbası**

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pelletten iyonik olan ve olmayan tüm küçük molekülleri uzaklaştırmak için diyaliz torbası (Selüloz membran, Thermo, MWCO-Molecular Weight Cut Off 10 kDa) kullanılmıştır.

## **3.2 Metod**

### **3.2.1 Ksilanaz aktivitesinin kalitatif tayini ve izolat seçimi**

Ege ve Akdeniz Bölgesi'ndeki farklı istasyonlardan ve farklı derinliklerden toplanan sünger ve sediment örneklerinden izole edilmiş 108 denizel türevli fungus suşunun ksilanaz enzim aktivitelerinin kalitatif olarak belirlenmesi için %0,1'lik (w/v) AZCL-ksilan içeren 3 No'lu besiyerine spor süspansiyonlarından tek nokta halinde ekim yapılmıştır. 27 °C' de 1 haftalık inkübasyondan sonra

ksilanaz enzim aktivitesi, petri üzerinde organizmaların oluşturdukları zon  $\left(\frac{\text{aktivite zonu (mm)}}{\text{koloni zonu (mm)}}\right)$  oranı dikkate alınarak hesaplanmıştır.

Bu işlem sonucunda koloni etrafında oluşan mavi zon çapının büyüklüğüne göre izolatlar değerlendirilmiş ve göreceli olarak en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip izolatlar belirlenmiştir.

### 3.2.2 Ksilanaz aktivitesinin kantitatif tayini

Seçilen izolatların enzim aktivitelerinin belirlenmesi serbest kalan şekerin ölçülmesi esasına göre yapılmıştır. Ekstraselüler ksilanaz enzim aktivitesinin belirlendiği karışım 0,5 ml enzim çözeltisi ve 0,1 M, pH 5.0 sodyum asetat tamponu içerisinde hazırlanmış 0,5 ml %1'lik (w/v) kayın ağacı ksilan (Beechwood xylan) çözeltisi içermektedir. Enzim ilavesi sonucunda 50°C'de 15 dakika inkübe edilen karışımdaki reaksiyon 1 ml DNS ayracı eklenerek durdurulmuştur ve renk reaksiyonu için 5 dakika süre içerisinde kaynatma işlemi yapılmıştır. Tüpler soğutulduktan sonra spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Ksilanaz aktivitesi, standart olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ksiloz çözeltisi kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden hesaplanmıştır. 1 U (ünite) ksilanaz aktivitesi; optimal koşullar altında, 1 dakikada 1µmol substrattan (ksilandan) indirgen şeker oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Miao et al., 2015).

Tarama besiyerinde en yüksek nispi ksilanaz aktivitesi gösteren suşlar ile tuz içeren (%2,44) (w/v) ve tuz içermeyen 4 numaralı besiyeri kullanılarak 250 ml'lik erlenlerde, 50 ml sıvı besiyerinde, 150 rpm, 27°C'de 10 gün süre ile fermantasyonları yapılmıştır. Fermantasyonun 7. ve 10. günlerinde fermantasyon sıvılarından aseptik şartlarda örnekler alınmış ve enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite hesaplanmıştır. Hücreler fermantasyon sıvılarından 6.000 rpm'de 15 dakikada santrifüj yapılarak ayrılmış ve hücre içermeyen fermantasyon sıvıları +4°C'de saklanmıştır. Fermantasyon sıvılarındaki ksilanaz enzim aktivitesi belirlenip taranan fungus izolatlarından en uygun olanı ile kısmi saflaştırma ve karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

### 3.2.3 Protein miktarının belirlenmesi

İzolatların ekstraselüler protein miktarlarının belirlenmesi Bradford yönteminde 595nm’de absorbans veren mavi rengin ölçülmesi esasına dayanılarak yapılmıştır (Bradford, 1976).

### 3.2.4 Glukoz ve NaCl’ün ksilanaz enzim üretimine etkisinin belirlenmesi

Glukoz ve NaCl’ün ksilanaz enzim üretimi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla izolatlar arasında ksilanaz enzimini üreten en uygun suşun 4 No’lu besiyeri kullanılarak 4 farklı fermantasyon ortamına ekimi yapılmıştır. Bu amaçla 4 No’lu besi yeri kullanılarak hazırlanan fermantasyon ortamları aşağıda verilmiştir.

<u>Ortam 1 içeriği (g/L);</u>		<u>Ortam 2 içeriği (g/L);</u>	
Pepton	5	Pepton	5
Malt ekstrakt	3	Malt ekstrakt	3
Glukoz	10	Glukoz	10
Yeast Ekstrakt	3	Yeast ekstrakt	3
Yapay deniz tuzu	2,44	Distile su	1
Distile su	1	Ksilan (beechwood)	10
Ksilan (beechwood)	10		
<u>Ortam 3 içeriği (g/L);</u>		<u>Ortam 4 içeriği (g/L);</u>	
Pepton	5	Pepton	5
Malt ekstrakt	3	Malt ekstrakt	3



Glukoz	1	Glukoz	1
Yeast ekstrakt	3	Yeast ekstrakt	3
Yapay deniz tuzu	2,44	Distile su	1
Distile su	1	Ksilan (beechwood)	10
Ksilan (beechwood)	10		

### 3.2.5 Ksilanaz üretimi ve kısmi saflaştırma

Taranan izolatlar arasında en aktif suş olarak seçilen 08ÇK001 suşu, 1 No'lu besiyerinde aktifleştirilmiş ve alınan sporlar enzim üretimi için 500ml'lik erlenlere 125ml'de hazırlanan ve %1'lik (w/v) ksilan içeren 4 No'lu besiyeri ortamına inoküle edilerek 27°C' de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 7 gün boyunca toplam 1250 ml hacim olacak şekilde fermantasyonları yapılmıştır. Fermantasyon işleminin sonunda, fermantasyon sıvılarından hücreler 6.000 rpm'de 15 dakikada santrifüj ile ayrılmış ve hücre içermeyen fermantasyon sıvıları +4°C'de saklamıştır.

Hücrelerinden ayrılmış fermantasyon sıvısından proteinlerin ayrılması ve deriştirilmesi için doygun amonyum sülfat tuzu kullanılmıştır. Fermantasyon sıvısından belirli miktarda örnek alınıp %0-40, %40-60, %60-80, %80-90 (w/v) aralıklarında +4°C'de gradient yapılarak çöktürme işlemi yapılmıştır. İlk önce ham ekstrakta %40 (w/v) konsantrasyonda yavaş yavaş doygun amonyum sülfat eklenerek manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırılmıştır. Amonyum sülfat çözüldükten sonra çözelti 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Bu süre sonunda süpernatant ve pelletler birbirinden ayrılarak enzim sıvı fazdan geri kazanılmıştır. Pellet, 0,1M sodyum asetat (pH 5.0) tamponunda çözülmüştür. Süpernatanta sırasıyla diğer konsantrasyonlarda doygun amonyum sülfat eklenerek çöktürme işlemine devam edilmiştir. Bütün fraksiyonlar sodyum asetat tamponuna karşı (0,1M, pH 5.0) 10kDA'luk diyaliz torbası kullanılarak 24 saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz torbası bu süre zarfında tampon her iki saatte bir 4 kere değiştirilmiştir. Diyaliz işleminden sonra spesifik aktivite, saflaştırma katsayısı ve saflaştırma verimi hesaplanmıştır. Seçilen suşun fermantasyon ortamında ürettiği proteinlerin çökmesi için en uygun amonyum sülfat konsantrasyonu belirlenerek, belirlenen uygun amonyum sülfat konsantrasyonu ile geriye kalan fermantasyon

sıvısının tamamı +4°C’de amonyum sülfat eklenip manyetik karıştırıcıda yavaş yavaş karıştırılarak inkübe edilmiştir. Amonyum sülfat çöktürmesi ile izole edilen proteinlerden tuz diyaliz ile uzaklaştırılmış ve ardından enzimatik aktivite ve protein tayini yapılmıştır.

### **3.2.6 Enzimin optimum pH’ının belirlenmesi**

Kısmi saflaştırma işlemi ile elde edilen enzim çözeltisinin maksimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için Glisin-HCl (pH 2.0-3.0-4.0), Na-asetat (pH 5.0-6.0), Na-fosfat (pH 7.0-8.0) Tris-HCl (pH 9.0-10.0), Glisin-NaOH (pH 11.0-12.0) tamponları kullanılarak %1’lik (w/v) kayın ağacı ksilan substrat çözeltileri hazırlanmıştır (Lee et al., 2009; Nair et al., 2008).

Aktivite tayini için 0,5 ml enzim çözeltisi ve her pH’daki substrat çözeltilerinden 0,5 ml örnek, tüplere koyularak 50°C ‘de sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda her bir örnek tüpüne eşit miktarda DNS ayırıcı konularak (1 ml enzim+substrat, 1 ml DNS) 5 dakika kaynatma işlemi uygulanmıştır. Tüpler soğuduktan sonra spektrofotometrede 550 nm dalga boyu kullanılarak, köre karşı okuma yapılmıştır. Kör 0,5 ml %1’lik substrat tamponu ve 0,5 ml Na-asetat tamponu (0,1M, pH 5.0) içermektedir.

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri temel alınarak % bağıl enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Her test 2 seri tüpün ortalaması alınarak, iki kez tekrarlanmıştır.

### **3.2.7 Enzimin optimum sıcaklığının belirlenmesi**

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın saptanması için 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C’lik sıcaklıklar seçilmiştir (Li et al., 2006). Aktivite tayini için 0,5 ml enzim ve 0,5 ml substrat çözeltisi karıştırılarak (optimum pH değerinde hazırlanmış) belirtilen sıcaklıklarda 15 dakika inkübe edildikten sonra eşit hacimde DNS eklenerek 5 dakika kaynatma işlemi uygulanmıştır. Soğutulan örneklerin absorbansları 550nm dalga boyunda UV visible spektrofotometrede belirlenmiştir. En yüksek aktivitenin elde edildiği sıcaklık değeri baz alınarak % bağıl aktivite hesaplanmıştır.

### 3.2.8 Enzimin pH kararlılığının saptanması

+4°C'de saklanan enzim preparasyonundan Glisin-HCl (pH 2.0-3.0-4.0), Na-asetat (pH 5.0-6.0), Na-fosfat (pH 7.0-8.0) Tris-HCl (pH 9.0-10.0), Glisin-NaOH (pH 11.0-12.0) pH tamponları ile hazırlanan seyreltmeler 1 saat boyunca +4°C'de ön inkübasyona bırakılmıştır (Huang et al., 2015). Ön inkübasyon sonunda 0,5 ml enzim (farklı pH çözeltilerinde inkübe edilmiş) ve 0,5 ml substrat (optimum pH daki tamponda hazırlanmış substrat çözeltisi) çözeltisinden alınarak optimum sıcaklığın gerçekleştiği sıcaklık değerinde 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Örneğin üzerine eşit hacimde DNS ayracı eklendikten sonra soğutma işlemi uygulanmış ve spektrofotometrede 550 nm dalga boyunda okuma yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

### 3.2.9 Enzimin ısı kararlılığının saptanması

Isıl kararlılığının saptanması için enzim preparasyonu 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C sıcaklıklarda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Deesukon et al., 2011). İnkübasyonun 15. ve 60. dakikalarında örnekler alınarak standart enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

### 3.2.10 Enzim aktivitesine inhibitör, şelatör, denatürant, organik çözügen ve çeşitli metal iyonlarının etkisi

İnhibe edici ajanlar, şelatör ve denatürantların enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla; serin spesifik inhibitörü olan fenil metil sülfonil florit (PMSF); SH- grubu (sülfidril grubu) inhibitörü olan β-merkaptoetanol; kuvvetli bir metal tutucu olan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA); denatürantlar olarak SDS, üre, Triton X-100 ve Tween 80 kullanılmıştır. Enzim çözeltisine son konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde PMSF, EDTA, SDS, β-merkaptoetanol ve üre ve son konsantrasyonları %0,05 (v/v) Triton X-100 ve Tween 80 içeren çözeltiler eklenmiş ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra standart enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir (Chanwicha et al., 2015).

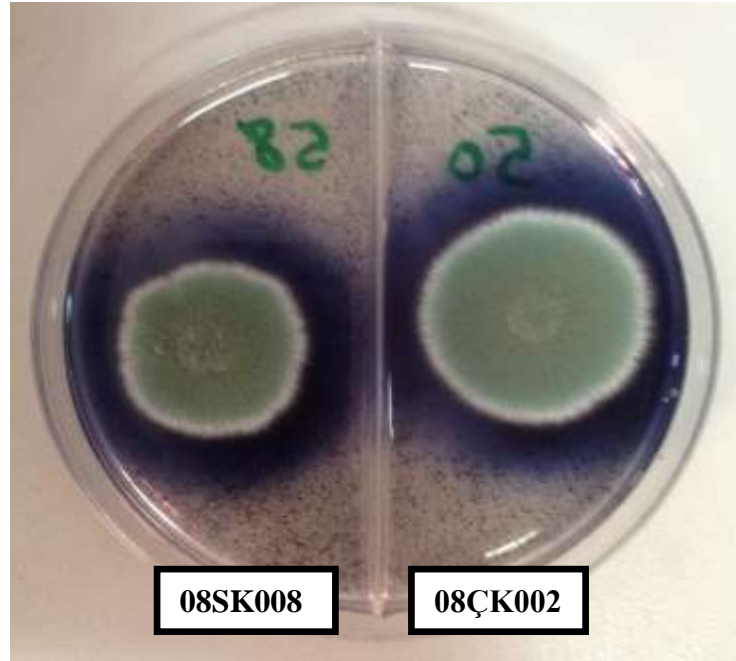
Ksilanaz enzimine organik çözügenlerin etkisinin belirlenmesi için enzim çözeltisine son konsantrasyonu %5 (v/v) olacak şekilde aseton, toluen, hekzan, etanol ve izoamilalkol eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır ve daha sonra standart enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir.

Farklı metal iyonlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{BaCl}_2$  ve  $\text{NaCl}$  çözeltileri kullanılmıştır. Enzim çözeltisi son iç konsantrasyonu 5 mM olan bu çözeltiler ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra standart enzim aktivite tayini gerçekleştirilmiştir (Chanwicha et al., 2015). Metal çözeltisi içermeyen enzim çözeltisine aynı işlemler uygulanmış ve saptanan aktivite kontrol olarak alınmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Ksilanaz Aktivitesinin Kalitatif Tayini ve İzolat Seçimi

Tamamlanmış olan TUBİTAK SBAG 109S361 numaralı proje kapsamında Ege ve Akdeniz Bölgesi'ndeki farklı istasyonlardan ve farklı derinliklerden elde edilen sünger ve sediment örneklerinden izole edilmiş 108 denizel türevli fungus suşu ksilanaz aktivitesi açısından taranmıştır. Bu izolatlar aktive edilerek spor süspansiyonlarından %0,1'lik (w/v) AZCL-ksilan içeren 3 No'lu besiyerine tek nokta halinde ekimi yapılmış ve petriyerler 27°C'de bir hafta boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde bulunan AZCL-ksilan ksilanaz enzimi için spesifiktir ve organizmaların ürettiği ekstraselüler ksilanaz petri ortamında boya ile konjuge olan bu substratı parçalayarak koloni etrafında mavi zon oluşturmaktadır. İzolatların inkübasyon sonucunda oluşturdukları mavi zon pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1). 108 adet izolatın tarama besiyerindeki ksilanaz aktiviteleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 08SK008 ve 08ÇK002 izolatlarında ksilanaz taraması pozitif sonucu.

Çizelge 4.1. Fungusların kalitatif ksilanaz aktivitesi tarama sonuçları.

İzolat No	Fungus Örneği*	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	ZÇ/KÇ
06ÇK001	<i>Aspergillus sp.</i>	20	45	2.2
06SK002	<i>Penicillium sp.</i>	24	50	2
01SK001	<i>Penicillium sp.</i>	45	63	1.4
05SK003	<i>Trichoderma sp.</i>	-	-	-
06ÇK003	<i>Aspergillus sp.</i>	22	35	1.5
06SK003	<i>Geomyces sp.</i>	Üreme yok	-	-
04SK002	<i>Penicillium sp.</i>	10	-	-
06SK004	<i>Beauveria sp.</i>	Üreme yok	-	-
06SK005	<i>Penicillium sp.</i>	20	46	2.5
05SK004	<i>Fusarium sp.</i>	26	46	1.7
06ÇK005	<i>Penicillium sp.</i>	30	44	1.4
06ÇK006	<i>Penicillium sp.</i>	25	25	1
07SK001	<i>Penicillium sp.</i>	Üreme yok	-	-
06SK006	<i>Penicillium sp.</i>	23	35	1.5
06SK007	<i>Penicillium sp.</i>	35	56	1.6
06SK009	<i>Penicillium sp.</i>	21	45	2.1
06SK010	<i>Penicillium sp.</i>	24	40	1.6
06SK011	<i>Penicillium sp.</i>	30	53	1.7
07SK002	<i>Scolecobasidium sp.</i>	22	42	1.9
07SK003	<i>Penicillium sp.</i>	20	40	2
06SK012	<i>Aspergillus sp.</i>	65	-	-
06SK013	<i>Penicillium sp.</i>	37	57	1.5
07SK004	<i>Penicillium sp.</i>	50	62	1.2
06SK014	<i>Penicillium sp.</i>	45	65	1.4
06SK015	<i>Penicillium sp.</i>	35	55	1.5
06SK016	<i>Penicillium sp.</i>	42	50	1.2
06SK017	<i>Penicillium sp.</i>	45	64	1.4
06SK018	<i>Penicillium sp.</i>	24	56	2.3
06SK019	<b><i>Cladosporium sphaerospermum</i></b>	<b>20</b>	<b>75</b>	<b>3.7</b>
06SK020	<i>Penicillium sp.</i>	34	58	1.7
06SK021	<i>Penicillium sp.</i>	52	60	1.1
06SK022	<i>Penicillium sp.</i>	51	61	1.2
06SK023	<i>Penicillium sp.</i>	40	64	1.6
06SK025	<i>Penicillium sp.</i>	31	50	1.6
08SK001	<i>Penicillium sp.</i>	27	46	1.7
08SK002	<i>Aspergillus sp.</i> (novel)	41	52	1.2
08SK003	<i>Penicillium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK004	<i>Penicillium sp.</i>	28	41	1.4
08SK005	<i>Aspergillus sp.</i>	28	-	-
08SK006	<i>Aspergillus sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK007	<i>Penicillium sp.</i>	25	-	-
08SK008	<i>Penicillium sp.</i>	45	59	1.3
08SK009	<i>Penicillium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK010	<i>Aspergillus sp.</i>	27	44	1.6

Çizelge 4.1. (devam)

İzolat No	Fungus Örneği*	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	ZÇ/KÇ
08SK011	<i>Penicillium sp.</i>	30	60	2
08SK012	<i>Penicillium sp.</i>	37	72	2
08SK013	<i>Penicillium sp.</i>	26	57	2.2
08SK014	<b><i>Penicillium crustosum</i></b>	<b>25</b>	<b>65</b>	<b>2.6</b>
08ÇK001	<b><i>Trichoderma pleuroticola</i></b>	<b>34</b>	<b>70</b>	<b>2</b>
08ÇK002	<i>Penicillium sp.</i>	36	50	1.4
08ÇK003	<i>Penicillium sp.</i>	37	52	1.4
08ÇK004	<i>Penicillium sp.</i>	15	25	1.6
08ÇK005	<i>Penicillium sp.</i>	34	65	2
08ÇK006	<i>Penicillium sp.</i>	36	65	1.8
08SK015	<i>Acremonium sp.</i>	35	51	1.4
08ÇK007	<i>Penicillium sp.</i>	45	59	1.3
08ÇK008	<i>Hypocrea sp.</i>	Üreme yok	-	-
08ÇK009	<i>Penicillium sp.</i>	30	50	1.6
08ÇK010	<i>Penicillium sp.</i>	42	62	1.5
08SK016	<b><i>Ascomycota sp.</i></b>	<b>12</b>	<b>40</b>	<b>3.3</b>
08ÇK011	<i>Penicillium sp.</i>	33	55	1.6
08SK017	<i>Microsphaeropsis sp.</i>	25	55	2.2
08SK018	<i>Cladosporium sp.</i>	20	40	2
08SK019	<i>Cladosporium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK020	<i>Penicillium sp.</i>	21	50	2.4
08SK021	<i>Penicillium sp.</i>	35	66	1.9
08SK022	<i>Cladosporium sp.</i>	30	47	1.5
08SK023	<i>Cladosporium sp.</i>	17	30	1.7
08SK024	<i>Penicillium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK025	<i>Cladosporium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08ÇK012	<i>Penicillium sp.</i>	22	50	2.3
08ÇK013	<i>Ascomycota sp.</i>	30	60	2
08ÇK014	<i>Penicillium sp.</i>	37	67	1.8
08SK026	<i>Penicillium sp.</i>	34	53	1.5
08SK027	<i>Cladosporium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK028	<i>Cladosporium sp.</i>	18	35	1.9
08SK029	<i>Aureobasidium sp.</i>	30	48	1.6
08SK030	<i>Cladosporium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08ÇK015	<i>Penicillium sp.</i>	30	50	1.6
08ÇK016	<i>Aspergillus sp.</i>	25	49	1.9
08ÇK017	<i>Volutella sp.</i>	Üreme yok	-	-
08ÇK018	<i>Trichoderma sp.</i>	17	35	2
08ÇK019	<i>Auxarthron sp.</i>	20	36	1.8
08SK031	<i>Aspergillus sp.</i>	25	46	1.8
08SK032	<i>Aspergillus sp.</i>	26	46	1.8
08ÇK020	<i>Aspergillus sp.</i>	25	45	1.8
08SK033	<i>Penicillium sp.</i>	25	37	1.5
08SK034	<i>Cladosporium sp.</i>	20	-	-
08SK035	<i>Davidiella sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK036	<i>Davidiella sp.</i>	Üreme yok	-	-
08SK037	<i>Cladosporium sp.</i>	20	40	2

Çizelge 4.1. (devam)

İzolat No	Fungus Örneği*	Koloni Çapı (mm)	Zon Çapı (mm)	ZÇ/KÇ
08SK038	Tanımlanmayan tür	Üreme yok	-	-
08SK039	<i>Penicillium sp.</i>	30	-	-
08SK040	<i>Aureobasidium sp.</i>	27	-	-
08ÇK023	<i>Penicillium sp.</i>	35	50	1.4
08ÇK024	<i>Penicillium sp.</i>	34	45	1.3
08ÇK025	<i>Penicillium sp.</i>	26	45	1.7
08ÇK026	<i>Penicillium sp.</i>	30	50	1.6
08ÇK027	<i>Penicillium sp.</i>	32	46	1.4
08ÇK028	<i>Penicillium sp.</i>	25	45	1.8
08ÇK029	<i>Phoma sp.</i>	Üreme yok	-	-
08ÇK030	<i>Penicillium sp.</i>	32	50	1.5
08ÇK031	<i>Cladosporium sp.</i>	27	45	1.6
08ÇK032	<i>Penicillium sp.</i>	Üreme yok	-	-
08ÇK033	<i>Cladosporium sp.</i>	30	50	1.6
08ÇK034	<i>Penicillium sp.</i>	34	51	1.5
08SK041	<i>Aspergillus sp.</i>	32	52	1.6
08SK042	Tanımlanmayan tür	Üreme yok	-	-

\*: ITS (internal transcribed spacer) dizi analizi sonuçları ile elde edilen fungus örnekleri.

## 4.2 Ksilanaz Aktivitesinin Kantitatif Tayini

Katı besiyerinde oluşturdukları zon çapına göre belirlenen 06SK019, 08SK014, 08ÇK001 ve 08SK016 suşları %1 (w/v) oranında beechwood ksilan içeren, %2,44 (w/v) tuz içeren ve tuzsuz fermantasyon ortamlarında 27°C'de 150 rpm'de 10 gün süre boyunca inkübe edilip 7. ve 10. günlerde örnek alınmıştır. İnkübasyon sonunda alınan örnekler +4°C'de 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen üst sıvı enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Seçilen 4 suşun 7. ve 10. günlerdeki %2,44 (w/v) tuz içeren ve tuzsuz fermantasyon ortamlarındaki protein miktarları, enzim aktiviteleri ve spesifik aktiviteleri (Çizelge 4.2) belirlenmiştir.



Çizelge 4.2 Seçilen izolatların sıvı besiyerinde tuzlu ve tuzsuz ortamdaki enzim aktiviteleri.

İzolat No	Tuzlu Ortam (%2,44, w/v)					
	7.gün			10. gün		
	Enzim aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)
06SK019	2,61	0,06	43,5	1,66	0,3	5,5
08SK014	9,53	0,3	31,7	5,8	0,1	58
08ÇK001	7,16	0,09	79,5	7,47	0,08	93,3
08SK016	4,23	0,3	14,1	2,8	0,7	4
İzolat No	Tuzsuz Ortam					
	7.gün			10. gün		
	Enzim aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Protein miktarı (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)
06SK019	6,45	0,05	129	2,3	0,8	2,8
08SK014	8,93	0,08	111,6	2	0,2	10
08ÇK001	12,4	0,2	62	4,42	0,3	14
08SK016	1,04	0,1	10,4	0,61	0,4	1,5



**Şekil 4.2.** Sırasıyla 06SK019, 08SK014, 08ÇK001 ve 08SK016 izolatlarının tuzlu ortamdaki fermantasyon görüntüleri.



**Şekil 4.3.** Sırasıyla 06SK019, 08SK014, 08ÇK001 ve 08SK016 izolatlarının tuzsuz ortamdaki fermantasyon görüntüleri.

### 4.3 Glukoz ve NaCl'ün Ksilanaz Enzim Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Dört izolat (06SK019, 08SK014, 08ÇK001 ve 08SK016) arasında yapılan kantitatif analizler sonucunda ksilanaz üreticisi en aktif suş 08ÇK001 olarak belirlenmiştir. Bazı *Aspergillus* ve *Trichoderma* türlerinde glukozun katabolik represyonda rol aldığı belirtilmiştir (Prade, 1995). Fermantasyon besiyerinin içeriğinde yer alan 10g/L glukozun katabolit represyonda rol oynayıp oynamadığını araştırmak için besiyerindeki glukoz miktarı 1g/L olacak şekilde modifiye edilerek hazırlanan besiyerinde fermantasyon gerçekleştirilmiştir. İleriki çalışmalar için seçilmiş olan 08ÇK001 suşu denizel kökenli bir suştur. Bu nedenle suşun fermantasyon ortamında deniz tuzunun bulunmasının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenebilmesi için besiyerine deniz tuzu ilave edilmiştir. Besiyerinin hazırlanmasında standardizasyonun sağlanması için doğal deniz suyu yerine, %100 doğal deniz suyunun kullanılmasına karşılık gelen 24,4 g/L derişimde yapay deniz tuzu kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda 4 farklı fermantasyon ortamı hazırlanarak deniz tuzu ve glukozun 08ÇK0001 suşunun ksilanaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla 200 ml'lik 13 günlük fermantasyon yapılmıştır. Fermantasyon sonunda enzim aktivitesi, protein miktarı ve spesifik aktivite belirlenmiştir (Çizelge 4.3).



**Şekil 4.4.** Glukoz ve NaCl'ün ksilanaz enzimi üzerine etkisinin araştırılması için hazırlanan dört farklı fermantasyon ortamının görüntüsü.

**Çizelge 4.3** 08ÇK001 ksilanaz aktivitesi üzerine dört farklı ortamda farklı konsantrasyonda bulunan glukoz ve NaCl'in etkisi.

Fermantasyon Ortamları	7. Gün			10. Gün			11. Gün			12. Gün			13. Gün		
	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg)
<b>Ortam 1</b>	55	0,34	161,7	18	0,5	36	26	0,15	173,3	21	0,22	95,4	26	0,34	76,4
<b>Ortam 2</b>	27	0,67	40,2	17	0,76	22,3	25	0,28	89,2	22	0,58	37,9	18	0,1	180
<b>Ortam 3</b>	11	0,33	33,3	5	0,18	27,7	10	0,37	27	7	0,28	25	8	0,37	21,6
<b>Ortam 4</b>	45	0,56	80,3	14	0,39	35,8	29	0,6	48,3	24	0,45	53,3	31	0,61	50,8

**Not:** Ortam içerikleri;

Ortam 1 içeriği (g/L):

Pepton	5
Malt ekstrakt	3
Glukoz	10
Yeast ekstrakt	3
Yapay deniz tuzu	24,4
Distile su	1
Ksilan	10

Ortam 2 içeriği (g/L):

Pepton	5
Malt ekstrakt	3
Glukoz	10
Yeast ekstrakt	3
Distile su	1
Ksilan	10

Ortam 3 içeriği (g/L):

Pepton	5
Mal ekstrakt	3
Glukoz	1
Yeast ekstrakt	3
Yapay deniz tuzu	24,4
Distile su	1
Ksilan	10

Ortam 4 içeriği (g/L):

Pepton	5
Malt ekstrakt	3
Glukoz	1
Yeast ekstrakt	3
Distile su	1
Ksilan	10

#### 4.4 Ksilanaz Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

En aktif ksilanaz üreticisi olarak seçilen 08ÇK001 izolatının ileriki çalışmalar için fermantasyonu yapılmıştır. Fermantasyon sonunda üretilen enzim ekstraselüler olduğu için, fermantasyon sıvısı hücrelerinden santrifüj yoluyla ayrılmış ve hücre içermeyen sıvı “Ham ekstrakt” olarak adlandırılmıştır.

Ham ekstrakt içerisindeki proteinlerin ayrılması ve deriştirilmesi için küçük ölçekte kademeli olarak % 0-40, % 40-60, % 60-80, % 80-90 (w/v) +4°C amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Elde edilen pellet sodyum asetat tamponunda (0,1M pH 5.0) çözülmüş ve aynı tampona karşı 24 saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra aktivite, protein miktarı ve % verim hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). 08ÇK001 numaralı izolatın fermantasyon ortamında ürettiği proteinlerin çökmesi için en uygun konsantrasyon %0-80 (w/v) olarak belirlenmiş ve büyük ölçekteki 500 ml fermantasyon sıvısına uygulanmıştır.

9000 rpm 30 dakika 4°C 'de santrifüjlenen amonyum sülfatlı enzim çözeltisinden proteinler ayrılmıştır. Ardından diyaliz işlemi yapılarak tuzların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Diyaliz işleminden sonra aktivite, protein miktarı ve % verim hesabı yapılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4 Gradient amonyum sülfat çöktürme basamakları.

	Toplam Hacim (ml)	Protein (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
<b>Ham Ekstrakt</b>	30	0.105	3.15	53.4	1602	508.5	100	1
<b>%0-40</b>	4	0.025	0.1	2.69	10.7	107	0.67	0.21
<b>%40-60</b>	4	0.14	0.56	17	68	121.4	4.2	0.24
<b>%60-80</b>	3	0.20	0.6	31.7	95.1	158.5	5.9	0.31
<b>%80-90</b>	3	0.003	0.009	1.7	5.1	566.7	0.32	1.1

NOT: Saflaştırma basamakları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

Toplam protein (mg)= Protein (mg/ml) X Hacim (ml)

Toplam aktivite (U) = Enzim aktivitesi (U/ml/min) X Hacim (ml)

Spesifik aktivite (U/mg) = Toplam aktivite/Toplam protein

Verim (%) = Toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi

Saflaştırma katsayısı = Spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

Çizelge 4.5 Direkt amonyum sülfat (%80, w/v) çöktürmesi.

Saflaştırma Adımı	Toplam Hacim (ml)	Toplam Protein(mg)	Enzim Aktivitesi (U/ml)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katsayısı
Ham Ekstrakt	500	52.5	53.4	26717	508.9	100	1
%0-80 (Diyaliz sonrası)	45	9	239.1	10759.5	1195.5	40.3	2.3

NOT: Saflaştırma basamakları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

Toplam protein (mg)= Protein (mg/ml) X Hacim (ml)

Toplam aktivite (U) = Enzim aktivitesi (U/ml/min) X Hacim (ml)

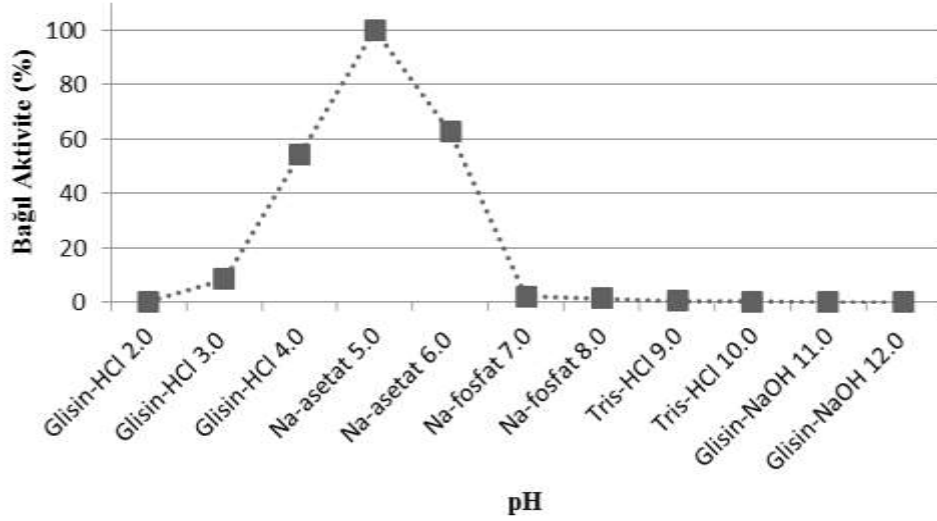
Spesifik aktivite (U/mg) = Toplam aktivite/Toplam protein

Verim (%) = Toplam aktivite/Ham ekstraktın toplam aktivitesi

Saflaştırma katsayısı = Spesifik aktivite/Ham ekstraktın spesifik aktivitesi

#### 4.5 Enzimin Optimum pH' sının Belirlenmesi

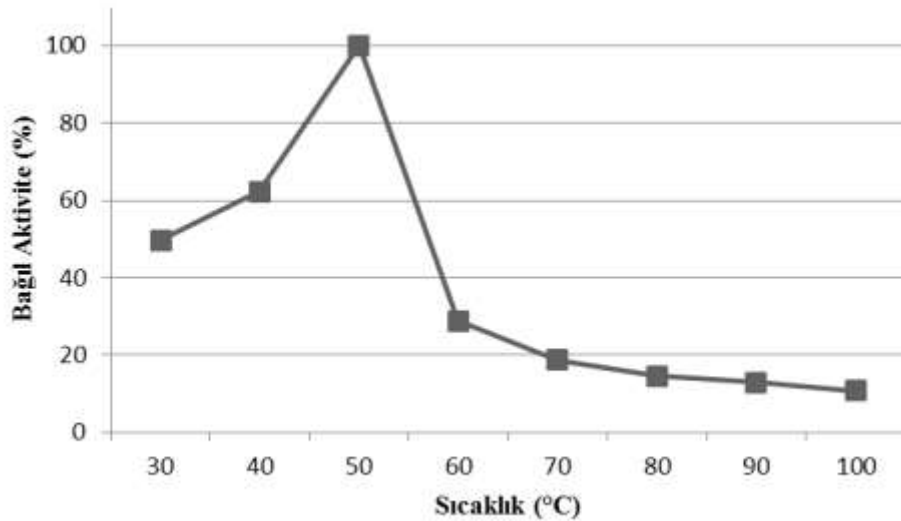
*Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001 izolatına ait ksilanaz enziminin en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH değerini belirlemek için, beechwood ksilan substratı varlığında farklı pH değerlerindeki (pH 2.0-12.0) tamponlar kullanılarak enzim aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak pH-% bağıl aktivite eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH grafiği.

#### 4.6 Enzimin Optimum Aktivite Sıcaklığının Belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış ksilanazın optimum çalışma sıcaklığın saptanması için 30-100°C aralığındaki sıcaklıklarda aktivite analizleri yapılmıştır. Analizler için kullanılan substrat optimum aktivitenin gerçekleştiği pH 5.0 değerinde hazırlanmıştır. Aktivite tayininde inkübasyon süresi 15 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

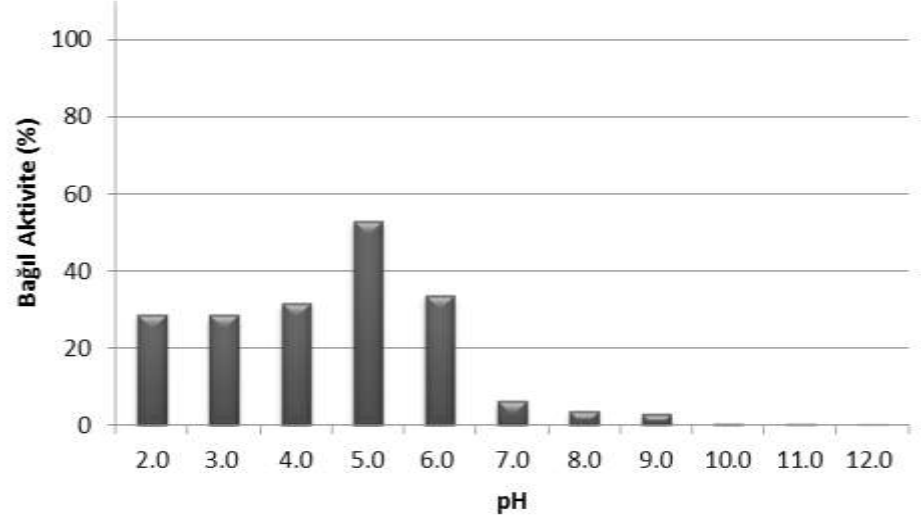


Şekil 4.6 Ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık grafiği.



#### 4.7 Enzimin pH Kararlılığının Saptanması

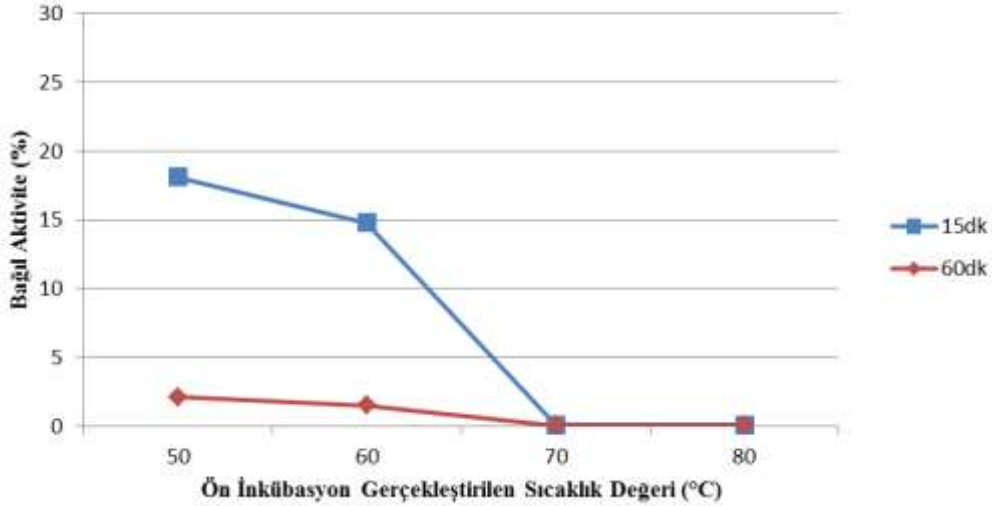
Kısmi saflaştırılan ksilanaz enziminin her bir pH tamponu (pH 2.0-12.0) ile hazırlanan seyreltmeleri, 1 saat boyunca +4°C’de ön inkübasyona bırakılarak enzimin farklı pH değerlerindeki kararlılığı araştırılmıştır. Enzimin optimum sıcaklık ve pH (pH:5.0-50°C) değerlerindeki aktivitesi ölçülerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Ksilanaz enziminin pH kararlılığı.

#### 4.8 Enzimin Isıl Kararlılığının Saptanması

Isıl kararlılığının belirlenmesinde, enzim 1 saat boyunca farklı sıcaklıklarda (50, 60, 70 ve 80°C) inkübe edildikten sonra optimum aktivite ölçüm koşullarında aktivite tayini yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



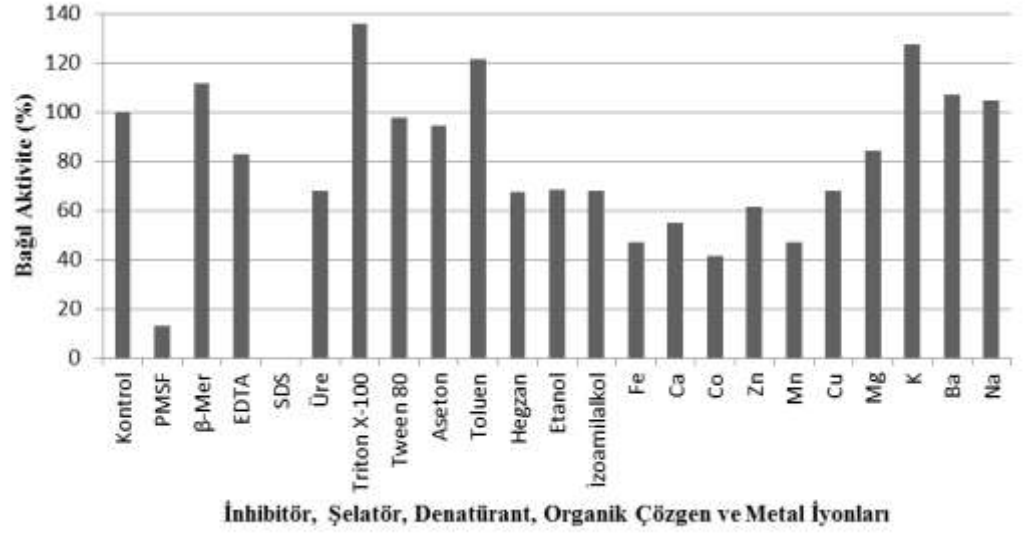
Şekil 4.8 Ksilanaz enziminin ısıl kararlılığı.

#### 4.9 Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Denatürant, Organik Çözgen ve Çeşitli Metal İyonlarının Etkisi

*Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001 izolatından kısmi saflaştırılan ksilanaz enziminin aktivitesi üzerine inhibitör, şelatör ve denatürantların etkisini belirlemek amacıyla; son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde PMSF,  $\beta$ -merkaptotanol, EDTA, denatürantlar olarak son konsantrasyonları 5mM olacak şekilde SDS ve üre ve son konsantrasyonları %0,05 (v/v) olacak şekilde Triton X-100 ve Tween 80 kullanılmıştır.

Ksilanaz enzimine organik çözümlerin etkisini araştırmak için enzim çözeltisine son konsantrasyonu %5 (v/v) olacak şekilde aseton, toluen, hekzan, etanol ve izoamilalkol eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyon yapılmıştır.

Çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için  $FeCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $KCl$ ,  $BaCl_2$  ve  $NaCl$  çözeltileri kullanılmıştır. Son konsantrasyonları 5 mM olacak şekilde hazırlanan bu çözeltilerin enzim ile oda sıcaklığında 60 dakika ön inkübasyonu gerçekleştirildikten sonra standart enzim aktivite tayini uygulanmış ve bağlı aktivite hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir.



**Şekil 4.9** Ksilanaz enzimi üzerine inhibitör, şelatör, denatürant, organik çözgen ve çeşitli metal iyonlarının etkisi.

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Endüstride kullanılan enzimler mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerden izole edilip saflaştırılmaktadır. Bunlar arasında mikroorganizmalar geniş biyokimyasal çeşitlilik, kültür kolaylığı ve kolay manipüle edilebilir genetik yapıya sahip olma gibi özelliklerinden dolayı en yaygın enzim kaynaklarıdır (Niehaus et al., 1999). Denizlerin dünya yüzeyinin %70'inden fazlasını kapsıyor olması, sayısız denizel mikroorganizmaların yeni enzimlerin keşfedilmelerini sağlayabilecek biyokimyasal özelliklere sahip olduğunu düşündürmektedir (Zhang and Kim, 2010). Mikrobiyal enzimler bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerden daha kararlı ve aktif olduğu için, yeni enzimlerin keşfedilmesinde bir kaynak olan denizel mikroorganizmalar gittikçe ilgi çekici hale gelmektedir (Lam, 2006).

Biyoteknolojide geline nokta ile yeni özelliklere sahip enzimlere olan talep ve ilgi oldukça artmaktadır. Karasal çevreler ile karşılaştırıldığında, denizel çevreler mikroorganizmalara eşsiz genetik yapı ve yaşam habitatı vermektedir (Stach et al., 2003). Denizel çevreler besinsel olarak zengin bölgelerden sadece birkaç organizmanın yaşayabileceği ekstrem çevrelere kadar çeşitlilik göstermektedir. Denizel çevrelerin sahip olduğu yüksek tuzluluk, yüksek basınç, düşük sıcaklık ve özel ışık koşulları ile denizel ve karasal mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler arasında farklılıklar oluşabilmektedir (Zhang and Kim, 2010). Bu çalışmada daha önce gerçekleştirilmiş olan TUBİTAK SBAG 109S361 numaralı proje kapsamında Ege ve Akdeniz Bölgesi'ndeki 8 ayrı istasyonun farklı derinliklerinden (35 metreye kadar), SCUBA dalışı yapılarak toplanan farklı sünger ve sediment örneklerinden izole edilmiş denizel türevli fungusların ksilanaz aktiviteleri taranmış ve görece yüksek aktiviteli *Trichoderma pleuroticola* 08ÇK001 izolatının hücre dışı ksilanaz enzimi bazı özellikleri bakımından karakterize edilmeye çalışılmıştır.

Tez çalışmamızda 108 adet denizel türevli fungus izolatının ksilanaz aktivitesi petri ortamında taranması için 3 No'lu besiyerine spor süspansiyonlarından tek nokta ekim yapıp 27 °C' de 1 haftalık inkübasyona bırakılmıştır. Taramalar sonucunda 108 izolattan 81 tanesinin (%75) ksilanaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar arasında göreceli olarak daha iyi üretici olanlar zon çapı/koloni çapı oranları dikkate alınarak araştırılmış (Çizelge 4.1), petri ortamında en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip izolatlar *Cladosporium sphaerospermum* 06SK019, *Penicillium crustosum* 08SK014, *Trichoderma*

*pleurotica* 08ÇK001 ve *Ascomycota sp.* 08SK016 olarak belirlenmiştir ve bu izolatlar ile küçük ölçekli fermantasyon çalışmalarına geçilmiştir.

Torres ve arkadaşları (2013) tarafından ksilanaz üreten denizel fungusların tarama çalışmaları yapılmış ve 44 mangrove fungus izolatından 41 tanesinin ksilanaz ürettiğinin belirlenmesi çalışmamızda elde edilen bulgularla uyum göstermektedir. Raghukumar ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan bir çalışmada ise Hindistan Okyanusunda Bengal Körfezinden izole edilen 17 denizel fungus içerisinde 9'unun ksilanaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada, Chora Adasındaki çürüyen mangrove bitki yapraklarından ve Bengal Körfezinin 850 metre derinlerindeki kalkerli materyallerden izole edilen 6 fungus suşu ksilanaz enzimi açısından taramış ve bunlardan 5'inin ksilanaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. (Raghukumar et al., 2004). Thirunavukkarasu ve arkadaşları (2012) yaptıkları bir çalışmada deniz yosunu ve alglerden izole ettikleri 16 denizel endofitik fungusu petri ortamında ksilanaz aktivitesi bakımından taramış ve bunun sonucunda 8'inin ksilanaz üreticisi olduğu sonucuna varmıştır. Bu konuda literatürde çok fazla çalışma olmamakla birlikte, mevcut çalışmalar denizel kaynaklardan izole edilen fungus suşlarının çoğunlukla ksilanaz üretim kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da literatür ile uyum içerisinde. Fungusların tüm denizel çevrede bulunan otsu ve odunsu substratların temel ayrıştırıcıları oldukları bilinmektedir. Fungusların denizel çevredeki öneminin altında lignoselülozu parçalayabilme yetenekleri de bulunmaktadır ve birçok denizel fungus lignoselüloz içeren substratlardan izole edilerek tanımlanmıştır (Hyde et al., 1998). Funguslar için bir substrat olan lignoselüloz üç temel bileşenden oluşmaktadır; selüloz, lignin ve hemiselüloz. Ksilan ise hemiselülozun temel bileşeni olup doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci polisakkarittir (Collins et al., 2005). Dolayısıyla bu bilgiler, denizel fungusların lignoselülozu parçalayabilen enzimlerden biri olan ksilanazı üretebildiğini desteklemektedir.

Çalışmamızda petri ortamında en yüksek aktiviteye sahip izolatlar belirlendikten sonra aktif izolatların küçük ölçekte fermantasyonu yapılmıştır. Fermantasyon sürecinin 7. gününde tuz içeren ortamda *C. sphaerospermum* 06SK019 izolatı 43,5 U/mg spesifik aktivite, *P. crustosum* 08SK014 31,7 U/mg, *T. pleurotica* 08ÇK001 79,5 U/mg ve *Ascomycota sp.* 08SK016 izolatı ise 14,1 U/mg spesifik aktivite göstermiştir (Çizelge 4.2). Fermantasyonun 7. gününde ve tuzlu ortamda en yüksek spesifik aktiviteyi *T. pleurotica* 08ÇK001 suşu göstermiştir. 10. gün sonunda *C. sphaerospermum* 06SK019 ve *Ascomycota sp.*

08SK016 izolatlarının spesifik aktivitelerinin düştüğü, *P.crustosum* 08SK014 ve *T. pleurotica* 08ÇK001 izolatlarının ise spesifik aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir.

İzolatlar ile tuz içermeyen ortamda fermantasyon gerçekleştirildiğinde 7. gün sonunda *C. sphaerospermum* 06SK019 izolatı 129 U/mg spesifik aktivite, *P.crustosum* 08SK014 111,6 U/mg, *T. pleurotica* 08ÇK001 62 U/mg ve *Ascomycota sp.* 08SK016 izolatı ise 10,4 U/mg spesifik aktivite göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.2). Tuzlu ortam ile karşılaştırıldığında *C. sphaerospermum* 06SK019 ve *P.crustosum* 08SK014 izolatlarının spesifik aktivitelerinde artış gözlemlenirken, *T. pleurotica* 08ÇK001 ve *Ascomycota sp.* 08SK016 izolatlarının spesifik aktivitelerinde azalma gözlemlenmiştir. Her ne kadar da tuz içermeyen ortamda *C. sphaerospermum* 06SK019 ve *P.crustosum* 08SK014 fungus izolatları yüksek spesifik aktivite göstermiş olsa da literatür incelendiğinde bu türlerin patojenik özellikte olmalarından dolayı bundan sonraki çalışmalarımızda patojenik olmayan *T. pleurotica* 08ÇK001 izolatı ile devam edilmiştir. Denizel organizmalardan elde edilen enzimlerin taranması ve üretimi sırasında tuzun varlığı büyük önem taşımaktadır. Denizel türevli fungal metabolizmanın deniz tuz içeriğine adapte olduğu kabul edilmektedir (Bonugli-Santos et al., 2015).

Denizel funguslar bir görüşe göre fakültatif ve obligat olarak ikiye ayrılmaktadır; fakültatif denizel funguslar tatlı sularda veya karasal bölgelerde ve aynı zamanda bu ortamların ikisinde de yaşayabilmekteyken, obligat funguslar ise sadece denizel ortamda yaşayabilmektedir (Kohlmeyer and Volkmann-Kohlmeyer, 2003). Çalışmamızda incelediğimiz 4 izolatın hem % 100 doğal deniz suyunun kullanılmasına karşılık gelen 24,4 g/L derişimdeki yapay deniz tuzu içeren ortamda hem de bu tuz içeriğinin olmadığı ortamda büyüebilmesi bu izolatların fakültatif organizmalar olduğunu göstermektedir.

Mersinde 31 m derinlikten alınan bir sediment örneğinden izole edilen *T. pleurotica* (08ÇK001) suşunun tuz içermeyen ortamda daha az aktivite göstermesi sonucunda bu izolatın denizel çevreye daha çok adapte olduğu düşünülmektedir.

Torres ve arkadaşları (2013) denizel türevli funguslar ile yaptıkları bir çalışmada *Paeciomyces sp.* FDCAB-7, *Aspergillus sp.* PAQ-H, *Fusarium sp.* KAWITA ve *Aureobasidium sp.* 2LIPA-M fungus türlerinin deniz tuzu içeren büyüme ortamında inkübe edildiğinde daha yüksek spesifik aktivite gösterdiğini,

*Colletotrichum sp.* WABA-L, *Guignardia sp.* 2SANQ-F, *Phomopsis sp.* MACA-J ve *Penicillium sp.* LIABA-L fungus türlerinin ise deniz tuzu içermeyen ortamda daha yüksek aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Çalışmamızda fermantasyon ortamı olarak kullandığımız 4 No'lu besi yeri içerisinde 10g/L glukoz bulunmaktadır. Literatür incelendiğinde bazı *Trichoderma* ve *Aspergillus* suşlarının glukoz tarafından ksilanolitik enzimlerinin üretiminin baskılandığı belirtilmiştir (Prade, 1995). Bu amaçla kısmi saflaştırma ve karakterizasyon aşamalarından önce uygun fermantasyon içeriğini belirlemek ve glukozun katabolik represyonda görev alıp almadığını araştırmak için, *T. pleuroticola* 08ÇK001 izolatını glukoz miktarı 1g/L olacak şekilde hazırlanmış olan 4 No'lu besiyerine Bölüm 3.2.4.'de anlatılan şekilde 13 gün süre fermantasyonu yapılmıştır. Bu ortamların aynı zamanda tuzsuz içeriği de hazırlanarak fermantasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara (Çizelge 4.3) bakıldığında *T. pleuroticola* 08ÇK001 izolatı 7. günde % 1'lik (w/v) glukoz ve % 2,44'lük (w/v) yapay deniz tuzu içeren ortamda 161,7 U/mg spesifik aktivite gösterirken, % 0,1'lik glukoz (w/v) içeren ortamda ise spesifik aktivite 33,3 U/mg spesifik aktivite göstermiştir. 10. günde ise hazırlanan tüm ortamlarda spesifik aktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir. Bu açıdan bakıldığında *T. pleuroticola* 08ÇK001 fungus suşu için glukozun katabolik represyona sebep olmadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda seçilen *T. pleuroticola* 08ÇK001 fungus suşunun, kısmi saflaştırma ve karakterizasyon işlemlerine geçilmeden önce Bölüm 4.4'de anlatıldığı gibi büyük ölçekte fermantasyonu yapılmıştır. Elde edilen fermantasyon sıvısından 30 ml örnek alınıp Bölüm 4.4'de anlatıldığı gibi kademeli tuz çöktürmesi uygulanmıştır. Buna göre %80-90'lık çöktürmeden elde edilen enzimin saflaştırma katsayısı 1,1'dir (Çizelge 4.4). Bununla birlikte protein miktarının çoğunun %60-80'lik konsantrasyonda çöktüğü ve bu basamaktaki verimin daha fazla olduğu anlaşıldığı için bundan sonraki aşamalarda %80'lik (% 0-80) amonyum sülfat çöktürmesi yapılmıştır. Elde edilen pellet sodyum asetat tamponuna (0.1M pH 5.0) karşı 24 saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra aktivite, protein miktarı ve verim hesabı yapıp (Çizelge 4.5), elde edilen enzim çözeltilisi karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. %80'lik çöktürme ve diyaliz sonucunda 1195.5 U/mg spesifik aktivite ve %40,3 verim elde edilirken, enzim preparatı 2,3 kat saflaştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada, *Aspergillus versicolor*'dan elde edilen ksilanaz saflaştırıp karakterize edilmiş ve saflaştırmanın ilk aşamasında %80'lik amonyum sülfat kullanılmış, %83 verimle 7 kat ksilanaz enzimi saflaştırılmıştır (Salama et al., 2008). Lin ve arkadaşları (1999) *Thermomyces lanuginosus*-SSBP'den ürettikleri ksilanazı, %80'lik amonyum sülfat ile çöktürerek %84 verimle 1 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada Maalej ve arkadaşları (2009), *Talaromyces thermophilus*'dan elde ettikleri ksilanazı, %80 amonyum sülfat çöktürmesi ile 1,15 kat saflaştırdıklarını ve %48 verim elde ettiklerini belirtmişlerdir. Soroor ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, ksilanaz enziminin saflaştırılmasında ilk aşamada %85'lik amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış ve enzim %78,5 verim ile 1,2 kat saflaştırılmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise, bir rumen fungusu *Neocallimastix frontalis*'dan elde edilen ksilanaz enziminin saflaştırılmasında %85'lik amonyum sülfat ile enzim % 27,5 verimle 0,99 kat saflaştırılmıştır (de Segura et al., 1993). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre, %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi ile yoğunlaştırdığımız ksilanaz enziminin verimi genel anlamda literatürde verilen sonuçlarla uyumludur.

*T. pleuroticola* 08ÇK001 izolatından kısmi saflaştırılan ksilanaz enziminin optimum pH değerini saptamak için beechwood ksilan substratı varlığında farklı pH değerlerindeki (pH 2.0-12.0) tamponlar ile enzim aktivite tayini yapılmıştır. Şekil 4.5'de verilen pH değerlerine göre, maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde, bağıl enzim aktivitesi pH 2.0'da en düşük değerde (0.2) olup, pH'daki 1 birimlik artışla beraber, aktivite doğrusal bir şekilde artarak pH 5.0'te maksimum seviyeye ulaştığı ve optimum pH değerinin üstündeki değerlerde ise aktivitenin hızlı bir şekilde düştüğü belirlenmiştir. Genel olarak bakıldığında ksilanaz enzimi pH 4.0-6.0 aralığında ortalama %70'in üzerinde aktivite göstermiştir. pH 4.0'ün üzerinde ksilanaz aktivitesi hızlı bir şekilde artmış ve pH 5.0'den sonra aktivite düşmeye başlamıştır. Enzim pH 7.0'den sonra aktivitesinin %98'den fazlasını kaybetmiştir. Sonuçlar, kısmi saflaştırılan ksilanaz enziminin asidik karakterde olduğunu göstermiştir.

Fungal kaynaklardan elde edilen ksilanazlar genellikle asidik pH aralığında (pH 4.0-6.0) aktivite gösterirken, bakteri ve aktinomisetlerden elde edilen ksilanazlar ise geniş bir pH aralığında (pH 5.0-9.0) aktivite gösterdiği bilinmektedir (Beg et al., 2001)



Denizel türevli funguslardan elde edilen ksilanaz ile ilgili çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Çoğunlukla kalitatif düzeyde olan bu çalışmalarla birlikte az sayıda kantitatif olarak yapılan çalışmalar mevcuttur. Denizel türevli funguslardan ile yapılan çalışmalar incelendiğinde, Del-Cid ve arkadaşları (2014), Antarktik denizel süngerlerden elde edilen *Cladosporium sp.* türünün ürettiği ksilanaz enziminin pH 6.0'da maksimum aktivite gösterdiği belirmiştir. Torres ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, *Paecilomyces sp.* FDCAB-7, *Aspergillus sp.* PAQ-H, *Fusarium sp.* KAWITA ve *Aureobasidium sp.* 2LIPA-M türlerinden elde ettikleri ksilanaz enzimlerinin pH 7.0'da maksimum aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir. Raghukumar ve arkadaşları (2004), *Aspergillus niger* ve *Aspergillus ustus* türlerinden elde edilen ksilanaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği pH değerleri incelemiştir. *Aspergillus niger* tarafından üretilen ksilanaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği değer pH 3.5 olarak belirlenmiş ve ayrıca aktivitesinin %40'ının pH 8.5'de gösterdiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada *Aspergillus ustus* türünden elde edilen ksilanaz enziminin pH 4.5'de optimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Literatüde, karasal kaynaklardan izole edilen fungus suşlarının ksilanaz enzimleri üzerine yapılan çok sayıda çalışma olduğu görülmektedir. Bu çalışmalara bakıldığında, *Trichoderma viride* (Irfan and Syed, 2012)' den elde edilen ksilanazın maksimum aktivitesinin pH 5.0'da olduğu saptanmış olup, çalışmamızda kullanılan ksilanaz ile benzerlik göstermektedir. Asidik koşullarda aktivite gösteren pH 5.0 ile *Trichoderma harzianum* (Tan et al., 1985), pH 5.5 ile *Aspergillus niger* (Frederick et al., 1985), pH 5.4 ile *Aspergillus nidulans* (Fernandez-Espinar et al., 1992), pH 5.5 ile *Aspergillus sydowii* MG 49 (Gosh and Nanda 1994), pH 4.0 ile *Geotrichum candidum* (Radionova et al., 2000), pH 4.0 ile *Paecilomyces varioti* (Kelly et al., 1989), pH 3.0 ile *Laetiporus sulphureus* (Lee et al., 2009), pH 5.5 ile *Trichoderma reesei* (Soroor et al., 2013), pH 4.5 ile *Aspergillus terreus* (Sorgatto et al., 2012), pH 5.5 ile *Penicillium expansum* (Querido et al., 2006), pH 5.0 ile *Trichoderma harzianum* 1073 D3 (Isil and Nilufer, 2005) gibi fungal kaynaklardan elde edilen ksilanaz enzimleri de mevcuttur. *Penicillium capsulatum* türünden elde edilen ksilanaz enzimi asidik pH'da aktivite göstermekle birlikte çalışmamızda elde edilen verilere paralel olarak pH 5.0'dan sonra denatüre olarak aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Ryan et al., 2003).

Denizel türevli fungus suşlarından elde edilen ksilanazlar hem asidik hem de alkali pH'da yüksek aktivite gösterirken (Raghukumar et al., 2004), literatür

incelendiğinde karasal kökenli fungal kaynaklardan elde edilen ksilanaz enzimleri ise genellikle pH 4.0-7.0 arasında maksimum aktivite göstermektedir. Çalışmamızda *T. pleurotica* 08ÇK001 izolatından elde ettiğimiz ksilanaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH değerinin, denizel türevli funguslardan elde edilen ksilanaz çalışmaları az olsa da literatüre bakıldığında farklılık gösterdiği anlaşılmıştır ve bu farklılığın denizel türevli fungus izolatlarının izole edildiği derinlikten kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hayvan katkı yemi olarak kullanılan ksilanazların temel kaynağının funguslar olduğu bilinmektedir ve bu kaynaklar arasında en çok *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri yer almaktadır (Aehle, 2004). Hayvan yem endüstrisinde kullanılan ksilanaz enziminin pH değerinin 4.8 olması ile birlikte çalışmamızda kullanılan enzimin optimum pH'sının 5.0 olması, bu enzimin yem endüstrisi ve gıda endüstrisi için uygun olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda *T. pleurotica* 08ÇK001 suşundan kısmen saflaştırılan ksilanaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklığın saptanması için 30-100°C aralığındaki sıcaklık değerleri kullanılmıştır. Elde ettiğimiz ksilanaz enziminin optimum aktivitesini 50°C'de gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Maksimum enzim aktivitesi 100 olarak kabul edildiğinde enzim 30°C'de %49,6, 40°C'de %62,2 aktiviteye sahiptir. Optimum aktivite 50°C'de (% 100) elde edilirken, sıcaklık 60°C ve üzeri sıcaklıklara çıkarıldığında enzim aktivitesinde hızlı bir düşüş görülmektedir. Enzim 30-50°C aralığında ortalama %70,6 aktivite göstermekle birlikte 60-100°C aralığında ise ortalama %17 aktivite göstermektedir.

Denizel türevli funguslardan elde edilen enzimler çevresel adaptasyon ve taksonomik farklılıklarından dolayı karasal türlerden elde edilen enzimlerden farklılık göstermektedirler (Damare, 2007). Denizel türevli funguslardan elde edilen ksilanaz çalışmaları çoğunlukla kalitatif olarak sınırlı kalmıştır.

Literatür incelendiğinde denizel türevli funguslar ile ilgili yapılan bir çalışmada, Torres ve arkadaşları (2013), *Paeciomyces* sp. FDCAB-7, *Aspergillus* sp. PAQ-H, *Fusarium* sp. KAWITA ve *Aureobasidium* sp. 2LIPA-M türlerinden elde ettikleri ksilanaz enzimlerinin elde ettikleri ksilanaz enzimlerinin 50°C'de maksimum aktivite gösterdiklerini belirtmişlerdir.

Antarktik denizel süngerlerden elde edilen *Cladosporium* sp. türünün ürettiği ksilanaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 50°C olarak belirtilmiştir (Del-Cid et al., 2014). Raghukumar ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, *Aspergillus niger* türünden elde edilen ksilanaz enzimi, enzim aktivite tayininde kullanılan pH 3.5 olduğunda 50°C’de optimum aktivite gösterirken, pH 8.5 olduğunda ise 80°C optimum gösterdiği belirtilmiştir. Optimal sıcaklığa bağlı olarak enzimler mezofilik (40-60°C), termofilik (50-80°C) ve hipertermofilik (>80°C) olarak sınıflandırılmaktadır (Polizeli et al., 2005). Fungal orijinli ksilanazların optimum sıcaklıkları genellikle 40-60°C arasında değişmektedir.

Literatür incelendiğinde, karasal kaynaklardan izole edilen fungus suşları ile ilgili yapılan ksilanaz çalışmaları oldukça fazladır. *Aspergillus awamori* (Kormelink et al., 1993), *Aspergillus sojae* (Kimura et al., 1995), *Cephalosporium sp.strain* RYM-202 (Kang et al., 1996), *Penicillium purpurogenum* (Belancic et al., 1995), *Trichoderma harzianum* (Tan et al., 1985), *Penicillium sclerotiorum* (Knob and Carmona, 2010), *Aspergillus sydowii* SBS 45 (Nair et al., 2008), *Penicillium rolfsii* c3-2(1) IBRL (Lee et al., 2015) ve *Aspergillus giganteus* (Fialho and Carmona, 2004)’dan elde edilen ksilanazların maksimum aktiviteleri 50°C’de olduğu saptanmış olup, çalışmamızda kullanılan ksilanazla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte maksimum aktivitelerini daha yüksek sıcaklıklarda gösteren ksilanazlar da mevcuttur. *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50 (Yoshioka et al., 1981), *Aspergillus aculeatus* (Fujimoto et al., 1995) ve *Trichoderma harzianum* (Tan et al., 1985) ksilanazları maksimum aktivitelerini 70°C’ de, *Gloephyllum trabeum* (Ritschkoff et al., 1994) ksilanazı ise 80°C’de gösterdiği bildirilmiştir.

Karasal fungus suşları ile yapılan çalışmalara bakıldığında, elde edilen ksilanaz enzimlerinin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40-60°C arasında olmakla birlikte, denizel türevli fungus suşlarından elde edilen ksilanaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerini belirtmek, bu konuda yapılan çalışmaların kısıtlı olmasından dolayı zor olmaktadır.

Çalışmamızda *T. pleurotica* 08ÇK001 izolatından elde edilen ksilanaz enziminin pH kararlılığının belirlenmesi için farklı pH değerlerinde (pH 2.0-12.0) +4°C’de ön inkübasyona bırakılmıştır. Analizler sonunda pH 2.0 ve pH 3.0’de bağıl enzim aktivitesi ortalama olarak %28,7 olarak gerçekleşirken, pH 4.0’de %31,5’e çıkmıştır (Şekil 4.7). Enzim en yüksek dayanımını pH 5.0 değerinde

göstermiştir ve 1 saat sonunda aktivitesinin %53'ünü korumuştur. pH 6.0 değerindeki bağlı aktivitesi %33,7 iken, pH 7.0'de aktivitesi oldukça azalarak %6,3'e düşmüş ve pH 8.0-pH 12.0 arasındaki değerlerde aktivitesini neredeyse kaybetmiştir. Kısmi saflaştırılan ksilanaz enziminin asidik bölgede nispeten daha dayanıklı olduğu sonucuna varılmıştır.

Bakteri kaynaklı ksilanazlar daha çok pH 5.0-7.5 arasında aktif iken, funguslardan elde edilen ksilanazlar ise genellikle pH 3.5-5.5 aralığında daha aktiftir (Querido et al., 2006). Alkali-tolerant termofillerden üretilen ksilanazlar pH 5.5-9.5 arasında kararlıdır (Dimitrov et al., 1997).

Ksilanazların pH kararlılıkları ile ilgili literatürdeki verilere bakıldığında sonuçlar değişkenlik göstermektedir. *Aspergillus sojae*'den elde edilen ksilanazların (X-I, X-II) pH kararlılıkları incelenmiş ve her iki enzimin pH 5.0-8.0 arasında 24 saat kararlılık gösterdikleri belirtilmiştir (Kimura et al., 1995). *Aspergillus ficuum* AF-98 türünden elde edilen ksilanazın asidik koşullarda daha stabil olduğu belirlenmiştir (Lu et al., 2008). *Penicillium purpurogenum* türünden elde edilen ksilanaz enziminin pH 6.0-7.5 arasında 24 saat stabil kaldığı belirtilmiştir (Belancic et al., 1995). *Trichoderma harzianum* 1073 D3'den elde edilen ksilanaz enziminin pH 3.0-7.0 arasında stabil olduğu ve 4 aydan sonra aktivitesinin % 50'sini koruyabildiği belirtilmiştir (Isil ve Nilufer, 2005).

Ksilanaz enzimleri gıda, hayvan yemi ve kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Collins et al., 2005). Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanılan ksilanazların yüksek sıcaklıklarda ve alkali pH'da kararlı olması beklenmektedir (Raghukumar et al., 2004). Çalışmamızda elde ettiğimiz ksilanaz enzimi asidik pH'da kararlı olduğu için kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanıma uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte ksilanazlar gıda sektöründe de kullanılmaktadır ve bu alanda en çok fırıncılıkta kullanıldığı bilinmektedir (Harris and Ramalingam, 2010). Gıda endüstrisinde kullanılan ksilanazlarda aranan temel özelliğin asidik pH'da yüksek kararlılık ve yüksek aktivite göstermesi, çalışmamızda elde edilen ksilanaz enzimini bu alanda kullanıma uygun olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda *T. pleurotica* 08ÇK001 izolatından elde ettiğimiz ksilanaz enziminin ısı kararlılığı incelenmiştir (Şekil 4.8). Enzimin 15 dakika 50°C'de ön inkübasyondan sonra yapılan aktivite tayini sonucunda aktivitesinin %18,1 'ini koruduğu görülmüştür. 50°C'de 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda ise enzim

ancak aktivitesinin %2,1'ini koruyabilmiştir. 60°C'de 15 dakika inkübasyon sonunda aktivitesinin %14,8'ini korurken, 60°C'de 60 dakika ön inkübasyon sonunda ise aktivitesinin çoğunu (%98,5) kaybetmiştir. 70°C ve 80°C' de yapılan 15 ve 60 dakikalık ön inkübasyon sonunda ise enzimin aktivitesinin tamamını kaybettiği gözlemlenmiştir. Kısmi saflaştırılan ksilanaz enziminin ısı kararlılığının olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatür sonuçları ile farklılık göstermektedir. *Acrophialophora nainiana* türünden elde edilen ksilanaz enziminin 55°C'de 44 saat stabil kalabildiği belirtilmiştir (Salles et al., 2000). *Penicillium purpurogenum* türünden elde edilen ksilanaz enzimi 40°C'de 3 saat boyunca stabil kalıp aktivitesini koruyabilmiştir (Belancic et al., 1995). *Aspergillus sojae*'den elde edilen iki ksilanazın (X-I, X-II) ısı kararlılığı araştırılmış ve X-I ksilanaz 50°C'de 10 dakika kararlılığını korurken, X-II ksilanaz ise 35°C'de 10 dakika kararlılığını koruyabilmiştir (Kimura et al., 1995). *Trichoderma reesei* türünden elde edilen ksilanazların (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>) ısı kararlılığı incelenmiş ve 50°C'de 15 dakika öninkübasyon sonucunda enzimlerin stabil olduğu, 55°C' de sırasıyla %47, %37 ve %41'e düştüğü fakat 80°C'de ise aktivitelerinin tamamını kaybettiği bildirilmiştir (Soroor et al., 2013).

Çalışmamızda elde edilen ksilanaz enzimi 15 dakikada 50°C'de maksimum aktivite göstermiştir. Bununla birlikte enzimin ısı kararlılığının değerlendirilmesinde, 50°C'de 15 dakika ön inkübasyona bırakıldığında, enzimin aktivitesinin çoğunu kaybetmesi, yüksek sıcaklıklarda kararlılık gerektiren endüstriyel alanlarda kullanılabilir olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, düşük sıcaklık tercih edilen endüstriyel işlemlerde, özellikle gıda endüstrisinde, ksilanazların kullanıldığı bilinmektedir (Del-Cid et al., 2014)

Fungal kaynaklardan elde edilen ksilanazlar genellikle bakteriyel kaynaklı ksilanazlara göre daha az ısı kararlılığı sahiptir (Kulkarni et al., 1999). Ksilanaz enzimlerinin ısı kararlılıkları enzimlerin farklı özelliklerinden kaynaklanmaktadır ve ısı kararlılığına etki eden faktörler her bir enzim için özeldir. Hidrojen bağlarının sayısı, iyonik çiftler, enzim yüzeyinde bulunan yüklü aminoasitlerin oranı (özellikle Arginin) ksilanazların ısı kararlılıkları ile paralel bir ilişkide olup aynı zamanda protein yüzeyindeki aromatik rezidüer ya da çok sayıdaki iyon çiftleri ile yoğunlaşan ksilanazlar da ısı kararlılıkları arttırabilmektedir (Polizeli et al., 2005). Ek olarak, karbonhidrat gruplarının enzimlerin aktiviteleri ile birlikte ısı kararlılıklarında önemli bir rol aldığı bilinmektedir (Woodward, 1984).

Çalışmamızda elde edilen ksilanaz enzimi 15 dakikada 50°C’de maksimum aktivite göstermiştir. Bununla birlikte enzimin ısı kararlılığının değerlendirilmesinde, 50°C’de 15 dakika ön inkübasyona bırakıldığında, enzimin aktivitesinin çoğunu kaybetmesi, yüksek sıcaklıklarda kararlılık gerektiren endüstriyel alanlarda kullanılabilir olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, düşük sıcaklık tercih edilen endüstriyel işlemlerde, özellikle gıda endüstrisinde, ksilanazların kullanıldığı bilinmektedir (Del-Cid et al., 2014)

Çalışmamızda, karakterizasyon çalışmalarının son kısmında inhibitör, şelatör, denatürant, organik çözügen ve çeşitli metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Enzim 5mM PMSF ile muamele edildiğinde, aktiviteyi büyük oranda inhibe ettiği gözlemlenmiş ve inhibisyon derecesi %86,8 olarak ölçülmüştür (Bkz. Şekil 4.9). Elde edilen sonuçlara paralel olarak *Trichoderma reesei* suşundan elde edilen ksilanazın 5 mM PMSF varlığında aktivitesini büyük oranda azaldığı belirlenmiştir (Soroor et al., 2013). Enzim aktivitesinde meydana gelen bu inhibisyon etkisinin katalitik proseslerde serin ve/veya sistein rezidülerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Soroor et al., 2013).

$\beta$ -Merkaptoetanol 5 mM konsantrasyonda enzim aktivitesini indüklemiş ve %11,8 oranında artışa neden olmuştur (Bkz. Şekil 4.9). Elde edilen sonuca paralel olarak *Paecilomyces thomophila* suşundan elde edilen ksilanaz enziminin  $\beta$ -Merkaptoetanol varlığında aktivitesini %16,9 oranında arttırdığı belirtilmiştir (Li et al., 2006).

EDTA’nın 5 mM konsantrasyonda enzimi inhibe ettiği, aktivitede yaklaşık olarak %16,9 oranında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar *Trichoderma viride* ksilanazı ile yapılan çalışma ile paralellik göstermektedir. *Trichoderma viride* ksilanazının aktivitesi üzerine 5 mM EDTA’nın etkisinin olduğu belirtilmiştir (Irfan and Syed, 2012). Ek olarak, Lee ve arkadaşları (2009) *Laetiporus sulphureus* suşundan elde ettikleri ksilanaz enziminin 5 mM EDTA varlığında aktivitesinde yaklaşık olarak %9 oranında azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Lee et al., 2009). Bir metal bağlayıcı ajan olan EDTA’nın enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırıldığında elde edilen sonuçlar ile metal iyonlarının kısmi saflaştırılan enzimin aktivitesi için gerekli olduğu düşünülmektedir.

Kuvvetli anyonik sürfaktanlardan olan SDS 5 mM konsantrasyonunda kullanıldığında, enzim tamamen inhibisyona uğramış ve aktivite gözlenememiştir (Bkz. Şekil 4.9). Elde edilen sonuçlara paralel olarak *Trichoderma reesei* suşundan elde edilen ksilanaz enziminin 5 mM SDS varlığında aktivitesinin çoğunu kaybettiği belirtilmiştir (Soroor et al., 2013). Bu durum, kuvvetli bir denatürant olan SDS'in enzimin yapısını tamamen bozması ile açıklanabilmektedir.

Protein denatürantı olan ürenin 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesini %31,9 oranında azalttığı tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.9).

İyonik olmayan sürfaktanlardan Triton X-100 ve Tween 80 son konsantrasyon %0,05 (v/v) oranında kullanılarak enzimle muamele edildiğinde, Triton X-100 aktiviteyi %35,9 oranda artırırken, Tween 80 enzim aktivitesini çok düşük bir oranda inhibe etmiş ve bu oran %2,2 olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9). Elde edilen sonuçlara paralel olarak *Aspergillus fumigatus* Z5 suşundan elde edilen ksilanaz enziminin %0,05 (v/v) Triton X-100 konsantrasyonunda aktivitesinde artış meydana geldiğini belirtmiştir (Miao et al., 2015). Miao ve arkadaşları (2015) aynı zamanda %0,05 (v/v) konsantrasyonda Tween 80 varlığında ksilanaz enziminin aktivite değişimi araştırmış ve Tween 80'nin enzim aktivitesinde fazla etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Ksilanaz enzimine organik çözümlerin etkisinin belirlenmesi için enzim çözümlisine son konsantrasyonu %5 (v/v) olacak şekilde aseton, toluen, hekzan, etanol ve izoamilalkol eklenmiştir. Toluene enzim aktivitesini %21,6 oranında artırırken ve asetonun enzim aktivitesini az miktarda azalttığı ve bu oranın %5,6 olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9). Hekzan, etanol ve izoamilalkol enzim aktivitesini inhibe ettiği, inhibisyon oranlarının sırasıyla %32,3, %31,6 ve %31,9 olduğu belirlenmiştir.

Literatüre incelendiğinde, organik solventlerin ksilanaz enzimleri üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, bazı çalışmalar mevcuttur. Maalej-Achouri ve arkadaşları (2012) *Talaromyces thermophilus* türünden elde ettikleri ksilanaz enziminin aktivitesini aseton, etanol ve metanol gibi organik çözümlerin %5 (v/v) varlığında incelemiştir. Araştırmanın sonunda, ksilanaz enziminin etanol varlığında aktivitesinde artış gözlemlenirken, aseton ve metanol varlığında aktivitesinin %90'nını koruduğu görülmüştür.

Başka bir çalışmada Faulet ve arkadaşları (2006), simbiyotik bir fungus olan *Termitomyces* sp. türünden elde ettikleri ksilanaz enziminin, %5 (v/v) konsantrasyonda etanol ve aseton gibi organik çözümlerin varlığındaki aktivitesini incelemiş ve asetonun enzim aktivitesinde artışa sebep olduğu, etanolün varlığında ise enzim aktivitesinin %80'ini koruduğu belirtilmiştir.

Organik çözümlerle ile yapılan çalışmalara ek olarak, *Aspergillus niger* C3386 izolatından elde edilen ksilanaz enziminin, etanol ve izopropanol gibi organik çözümlerin %5 (v/v) konsantrasyonda aktivitesi incelenmiştir (Yang et al., 2010). Araştırmanın sonunda etanol ve izopropanolün enzim aktivitesini yaklaşık olarak %10 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Organik solventler enzimatik reaksiyonlarda hidrofobik substratların çözümlenmesi işleminde kullanılmaktadır. Organik ortamlarda enzimatik reaksiyonların uygulanmasının esas avantajı suda bulunan hidrofobik substratların çözünme sorunun ortadan kaldırılmasıdır (Faulet et al., 2006). Hemiselüloz, hücre duvarında lignin ve selülozla birlikte bulunmaktadır ve hemiselülozun elde edilmesi için fiziksel ön işlemler ile birlikte kimyasal ön işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Lignoselülozik materyallerin enzimlerin daha hidroliz edebileceği şekilde getirilmesinde organik çözümler kullanılmaktadır (Saha, 2003). Bu açıdan bakıldığında, endüstriyel alanda kullanılacak enzimlerin organik çözümlere karşı kararlı olması aranan özelliklerden biridir. Çalışmamızda kullanılan hekzan, etanol ve izoamilalkol varlığında enzim aktivitesinin yaklaşık olarak %60'ını koruması, toulenin enzim aktivitesini artırması ve aseton varlığında ise aktivitesinin %90'ını koruması, enzimin gıda ve biyodönüşüm endüstrilerinde kullanılabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, çeşitli metal iyonlarının ve inhibitör maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. *T. pleuroticola* 08ÇK001 fungus suşundan elde ettiğimiz ksilanaz enzimi,  $Fe^{+2}$  iyonunun 5 mM konsantrasyonunda aktivitesinde azalma görülmüştür ve  $Fe^{+2}$  iyonunun aktiviteyi %52,8 oranında azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.9). Çalışmada elde edilen veriler benzer şekilde *Aspergillus terreus* AF-98 ksilanazı, 5 mM  $Fe^{+2}$  varlığında aktivitesinin %57'sini koruyabilmiştir (Sorgatto et al., 2012). Bununla birlikte  $Fe^{+2}$ 'nin bazı ksilanaz enzimlerinde aktiviteyi artırıcı etkisi vardır. *Trichoderma viride* ksilanazının  $Fe^{+2}$ 'nin 5 mM konsantrasyonunda aktiviteyi %34 arttırdığı belirtilmiştir (Irfan and Syed, 2012).



Çalışmamızda elde ettiğimiz ksilanaz enzimi  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun 5 mM konsantrasyonu ile inkübe edildiğinde enzim aktivitesinde inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir ve %45,1 oranında aktiviteyi azalttığı bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.9). Literatüre bakıldığında genel olarak  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun ksilanaz aktivitesini arttırdığı bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun 5 mM konsantrasyonunda ksilanaz aktivitesini %35 oranında arttırdığı belirlenmiştir (Lee et al., 2009). Benzer bir şekilde *Trichoderma viride* ksilanazı  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesini % 29 oranında arttırdığı tespit edilmiştir (Irfan and Syed, 2012). Bu durum  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun, enzim ve substrat kompleksinin kararlılığına yardımcı olması ile açıklanabilmektedir (Juturu and Wu, 2012).  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun ksilanaz aktivitesi üzerindeki farklı etkileri, enzimlerin izole edildiği kaynakların farklı olmasından ileri geldiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda *T. pleuroticola* 08ÇK001 izolatından elde ettiğimiz ksilanaz enzimi  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  iyonlarının 5mM son konsantrasyonları ile inkübe edildiğinde enzim aktivitesinde inhibisyona sebep olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9).  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$  ve  $\text{Mn}^{+2}$  aktiviteyi sırasıyla %58,6, %38,4 ve %52,8 oranlarında azalttığı bulunmuştur. Bu iyonların ksilanaz enzimleri üzerindeki etkileri değişmektedir. *Laetiporus sulphureus* suşundan elde edilen ksilanazın  $\text{Co}^{+2}$  iyonunun 5 mM konsantrasyonunda enzim aktivitesini % 98.4 koruduğu, aynı konsantrasyonda  $\text{Zn}^{+2}$  iyonunun ksilanaz aktivitesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı ve  $\text{Mn}^{+2}$  iyonunun ise enzim aktivitesini %22,5 oranında azalttığı bildirilmiştir (Lee et al., 2009). *Aspergillus ficuum* AF-98 suşundan elde edilen ksilanaz enzimi  $\text{Co}^{+2}$  ve  $\text{Zn}^{+2}$  iyonlarının 5 mM konsantrasyonlarında aktivitesini koruduğu,  $\text{Mn}^{+2}$  iyonunda ise %26,6 oranında aktivitesini kaybettiği belirtilmiştir (Lu et al, 2008).

$\text{Cu}^{+2}$  ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonlarının 5 mM son konsantrasyonlarında enzim aktivitesinde inhibisyon gözlemlenmiştir ve enzim aktivitelerini sırasıyla %31,9 ve %15,6 oranlarında azalttığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9). Literatüre bakıldığında bu iyonların ksilanaz enzimleri üzerine etkileri değişkenlik göstermektedir. *Aspergillus ficuum* AF-98 suşundan elde edilen ksilanaz enziminin  $\text{Cu}^{+2}$  iyonunun 5 mM konsantrasyonunda aktivitesini %15,8 arttırdığı ve aynı konsantrasyonda  $\text{Mg}^{+2}$  iyonu varlığında aktivitesinde bir değişim olmadığı belirtilmiştir (Lu et al, 2008). Lee ve arkadaşları (2009) *Laetiporus sulphureus* suşundan etmiş oldukları ksilanazın  $\text{Cu}^{+2}$  iyonu varlığında (5 mM) aktivitesinin %87,3'ünü ve  $\text{Mg}^{+2}$  iyonu varlığında (5 mM) aktivitesinin %91,2'sini koruduğunu belirtmişlerdir (Lee et al., 2009).

K<sup>+</sup> iyonunun 5 mM son konsantrasyonunda enzim aktivitesi indüklenmiş, aktivitede %27,7 oranında artış gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.9). Ba<sup>+2</sup> ve Na<sup>+</sup> iyonlarının 5 mM son konsantrasyonları ise enzim aktivitesinde aktivasyona neden olmuştur ve aktivasyon oranları sırasıyla %6,9 ve %4,5 olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara paralel olarak *Aspergillus terreus* AF-98 suşundan elde edilmiş ksilanaz enzimi K<sup>+</sup> iyonunun 5 mM konsantrasyonunda aktivitesini yaklaşık olarak %34 arttırdığı bulunmuştur (Sorgatto et al., 2012). Bununla birlikte, Lu ve arkadaşları (2008) Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> iyonlarının varlığında (5 mM) enzim aktivitesinde bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir.

Sonuç olarak tez çalışmamızda, denizel türevli *T. pleuroticola* 08ÇK001 fungus izolatından elde ettiğimiz ksilanaz enzimi amonyum sülfat tuzu kullanılarak %40,3 verimle 2,3 kat saflaştırılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda enzimin optimum pH ve optimum sıcaklığı sırasıyla, 5.0 ve 50°C olarak belirlenmiştir. Hayvan yem endüstrisinde kullanılan ksilanazların esas kaynağının *Aspergillus* ve *Trichoderma* gibi fungal olduğu ve en çok bu türlerden elde edilen ksilanazların kullanıldığı bilinmektedir (Aehle, 2004). Bununla birlikte yem endüstrisinde kullanılan ksilanaz enziminin pH değerinin 4.8 olduğunun bilinmesi tez çalışmamızda elde ettiğimiz ksilanaz enziminin bu endüstride kullanılabileceğini göstermektedir. Gıda endüstrisinde ise ksilanaz enzimlerinde asidik pH'da stabil ve optimum aktivite göstermesi gibi özellikler aranmaktadır (Polizeli, 2005). Dolayısıyla tez çalışmamızda elde ettiğimiz ksilanaz enzimi aynı zamanda gıda endüstrisinde kullanılabilir nitelikte olduğu görülmektedir. Bundan sonra ksilanaz üretimi ucuz ve farklı substratların kullanılabilirliğinin araştırılması ve farklı substratlarda üretimin optimizasyonu çalışmalarının yapılması planlanmaktadır.



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Aachary, A. A. and Prapulla, S. G.,** 2011, Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2-16.
- Abe, F., Minegishi, H., Miura, T., Nagahama, T., Usami, R., and Horikoshi, K.,** 2006, Characterization of cold-and high-pressure-active polygalacturonases from a deep-sea yeast, *Cryptococcus liquefaciens* strain N6, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(1), 296-299.
- Abe, F., Miura, T., Nagahama, T., Inoue, A., Usami, R., and Horikoshi, K.,** 2001, Isolation of a highly copper-tolerant yeast, *Cryptococcus* sp. from the Japan Trench and the induction of superoxide dismutase activity by  $\text{Cu}^{2+}$ , *Biotechnology Letters*, 23(24), 2027-2034.
- Aehle, W.,** 2004, *Enzymes in Industry; Production and Applications*. Wiley-Vch Verlag GwBH and Co. KgaA, Weinheim, 484, Netherlands.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M.,** 1996, *Introductory Mycology*, IV edition, John Wiley and Sons, New York: 1-868.
- Alker, A. P., Smith, G. W., and Kim, K.,** 2001, Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals, *Hydrobiologia*, 460(1-3), 105-111.
- Bansod, S. M., Dutta-Choudhary, M., Srinivasan, M. C., and Rele, M. V.,** 1993, Xylanase active at high pH from an alkalotolerant *Cephalosporium* species, *Biotechnology letters*, 15(9), 965-970.
- Barr, D. J.,** 1992, Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist, *Mycologia*, 84, 1-11.
- Bartnicki-Garcia, S.,** 1987, The cell wall: a crucial structure in fungal evolution, *Evolutionary Biology of the Fungi*, 389, 403.
- Bass, D., Howe, A., Brown, N., Barton, H., Demidova, M., Michelle, H., Richards, T. A.,** 2007, Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274(1629), 3069-3077.
- Beever, R. E. and Bollard, E. G.,** 1970, The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract, *Journal of General Microbiology*, 60(2), 273-279.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G. S.,** 2001, Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 326-338.
- Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Díaz, R., Steiner, J., Eyzaguirre, J.,** 1995, *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes, *Journal of Biotechnology*, 41(1), 71-79.
- Bhat, M. K.,** 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 18(5), 355-383.
- Biely, P.,** 1991, Biotechnological potential and production of xylanolytic systems free of cellulases, In *ACS Symp. Ser.*, Vol. 460, pp. 408-416.
- Bonugli-Santos, R. C., dos Santos Vasconcelos, M. R., Passarini, M. R., Vieira, G. A., Lopes, V. C., Mainardi, P. H., and Feitosa, V. A.,** 2015, Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications, *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Booth, T., and Kenkel, N.,** 1986, 25 Ecological studies of lignicolous marine fungi: a distribution model based on ordination and classification, *The Biology of Marine Fungi*, 4, 297.
- Bradford, M.M.,** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- Bruns, T. D., White, T. J., and Taylor, J. W.,** 1991, Fungal molecular systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 525-564.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., and Sultan, M. T.,** 2008, Xylanases and their applications in baking industry, *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 22-31.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., and Gooday, G. W.,** 2001, *The fungi*. Gulf Professional Publishing.
- Castanares, A., Hay, A. J., Gordon, A. H., McCrae, S. I., and Wood, T. M.,** 1995, d-Xylan-degrading enzyme system from the fungus *Phanerochaete chrysosporium*, isolation and partial characterisation of an  $\alpha$ -(4-O-methyl)-d-glucuronidase, *Journal of biotechnology*, 43(3), 183-194.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Cathrine, S. J. And Raghukumar, C.,** 2009, Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India, *Mycological Research*, 113(1), 100-109.
- Chanwicha, N., Katekaew, S., Aimi, T. and Boonlue, S.,** 2015, Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation, *Mycoscience*, 56(3), 309-318.
- Chi, Z., Chi, Z., Zhang, T., Liu, G., Li, J., and Wang, X.,** 2009, Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications, *Biotechnology Advances*, 27(3), 236-255.
- Collins, T., Gerday, C., and Feller, G.,** 2005, Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.
- Damare S.,** 2007, Deep-sea fungi: occurrence and adaptations. PhD thesis, Goa University, India.
- Damare, S., Raghukumar, C., and Raghukumar, S.,** 2006, Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin, *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53(1), 14-27.
- Damare, S., Raghukumar, C., Muraleedharan, U. D., and Raghukumar, S.,** 2006, Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases, *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 172-181.
- Damare, S., Singh, P., and Raghukumar, S.,** 2012, Biotechnology of marine fungi, In *Biology of Marine Fungi* (pp. 277-297).
- De Segura, B. G. and Fevre, M.,** 1993, Purification and characterization of two 1, 4-beta-xylan endohydrolases from the rumen fungus *Neocallimastix frontalis*, *Applied and environmental microbiology*, 59(11), 3654-3660.
- De Souza-Cruz, P. B., Freer, J., Siika-Aho, M., and Ferraz, A.,** 2004, Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermisporea* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips, *Enzyme and Microbial Technology*, 34(3), 228-234.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Deesukon, W., Nishimura, Y., Harada, N., Sakamoto, T. and Sukhumsirichart, W.**, 2011, Purification, characterization and gene cloning of two forms of a thermostable endo-xylanase from *Streptomyces* sp. SWU10, *Process Biochemistry*, 46(12), 2255-2262.
- Del-Cid, A., Ubilla, P., Ravanal, M. C., Medina, E., Vaca, I., Levicán, G. and Chávez, R.**, 2014, Cold-active xylanase produced by fungi associated with Antarctic marine sponges, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(1), 524-532.
- Dimitrov, P. L., Kambourova, M. S., Mandeva, R. D., and Emanuilova, E. I.**, 1997, Isolation and characterization of xylan-degrading alkali-tolerant thermophiles, *FEMS Microbiology Letters*, 157(1), 27-30.
- Ebringerová, A. And Hromádková, Z.**, 1999, Xylans of industrial and biomedical importance, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 16(1), 325-346.
- Edgcomb, V. P., Kysela, D. T., Teske, A., de Vera Gomez, A., and Sogin, M. L.**, 2002, Benthic eukaryotic diversity in the Guaymas Basin hydrothermal vent environment, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11), 7658-7662.
- El-Nasser, N. H. A., Helmy, S. M., and El-Gammal, A. A.**, 1997, Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi, *Polymer Degradation and Stability*, 55(3), 249-255.
- Faulet, B. M., Niamké, S., Gonnety, J. T. and Kouamé, L. P.**, 2006, Purification and biochemical properties of a new thermostable xylanase from symbiotic fungus, *Termitomyces* sp., *African Journal of Biotechnology*, 5(3), 273-282.
- Fernández-Espinar, M. T., Ramón, D., Piñaga, F., and Vallés, S.**, 1992, Xylanase production by *Aspergillus nidulans*, *FEMS Microbiology Letters*, 91(2), 91-96.
- Fialho, M. B. and Carmona, E. C.**, 2004, Purification and characterization of xylanases from *Aspergillus giganteus*, *Folia Microbiologica*, 49(1), 13-18.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Frederick, M. M., Kiang, C. H., Frederick, J. R., and Reilly, P. J.,** 1985, Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I, Two isozymes active on xylan backbones near branch points, *Biotechnology and Bioengineering*, 27(4), 525-532.
- Frisvad, J. C. and Filtenborg, O.,** 1990, Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*, *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification* (pp. 373-384).
- Frisvad, J. C.,** 1994, Classification of organisms by secondary metabolites, *The Identification and Characterization of Pest Organisms*, 303-320.
- Fujimoto, H., Ooi, T., Wang, S. L., Takizawa, T., Hidaka, H., Murao, S., and Arai, M.,** 1995, Purification and properties of three xylanases from *Aspergillus aculeatus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59(3), 538-540.
- Gessner, R. V.,** 1980, Degradative enzyme production by salt-marsh fungi. *Botanica Marina*, 23(2), 133-139.
- Ghosh, M. and Nanda, G.,** 1994, Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49, *FEMS Microbiology Letters*, 117(2), 151-156.
- Gilbert, H. J. and Hazlewood, G. P.,** 1993, Bacterial cellulases and xylanases. *Microbiology*, 139(2), 187-194.
- Gomes, D., Cavalcanti, M. A. Q., Fernandes, M. J. S., Lima, D. M. M., and Passavante, J. Z. O.,** 2008, Filamentous fungi isolated from sand and water of " Bairro Novo" and " Casa Caiada" beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68(3), 577-582.
- Gräser, Y., El Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A. F. A., De Hoog, G. S., Presber, W., and Tietz, H. J.,** 1999, Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region, *Medical Mycology*, 37(2), 105-114.
- Guarro, J., Gené, J., and Stchigel, A. M.,** 1999, Developments in fungal taxonomy, *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), 454-500.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Guého, E., Improvisi, L., Hoog, G. D., and Dupont, B.,** 1994, Trichosporon on humans: a practical account, *Mycoses*, 37(1-2), 3-10.
- Hamilton, L. M., Kelly, C. T., and Fogarty, W. M.,** 1999, Purification and properties of the raw starch-degrading  $\alpha$ -amylase of *Bacillus* sp. IMD 434, *Biotechnology Letters*, 21(2), 111-115.
- Harris, A. D. and Ramalingam, C.,** 2010, Xylanases and its application in food industry: a review, *Journal of Experimental Sciences*, 1(7).
- Hawksworth, D. L.,** 1994, The identification and characterization of pest organisms: Proceedings of the Third Workshop on the Ecological Foundations of Sustainable Agriculture (WEFSA III), held at the International Mycological Institute, Egham, Surrey, England, 9-11 June, 1993. CAB INTERNATIONAL.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., and Lumbsch, H. T.,** 2007, A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(5), 509-547.
- Hou, Y. H., Wang, T. H., Long, H. And Zhu, H. Y.,** 2006, Novel Cold-adaptive Penicillium Strain FS010 Secreting Thermo-labile Xylanase Isolated from Yellow Sea, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(2), 142-149.
- Huang, Y., Busk, P. K. and Lange, L.,** 2015, Cellulose and hemicellulose-degrading enzymes in *Fusarium commune* transcriptome and functional characterization of three identified xylanases, *Enzyme and Microbial Technology*, 73, 9-19.
- Hyde, K. D., Jones, E. G., Leño, E., Pointing, S. B., Poonyth, A. D., and Vrijmoed, L. L.,** 1998, Role of fungi in marine ecosystems, *Biodiversity and Conservation*, 7(9), 1147-1161.
- Intriago, P.,** 2012, Marine Microorganisms: perspectives for getting involved in cellulosic ethanol, *AMB Express*, 2(46), 10-1186.
- Irfan, M. and Syed, Q.,** 2012, Partial purification and characterization of Xylanase from *Trichoderma viride* produced under SSF, *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 5(1), 7-11.
- Jones, E. B. G.,** 2000, Marine fungi: some factors influencing biodiversity, *Fungal Diversity*, 4(193), 53-73.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Jones, E. G.**, 2011, Fifty years of marine mycology, *Fungal diversity*, 50(1), 73-112.
- Jones, E.B.G., J. Sakayaroj, S. Suetrong, S. Somrithipol and K. L. Pang**, 2009, *Fungal Diversity*, 35, 1–187.
- Juturu, V. and Wu, J. C.**, 2012, Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications, *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219-1227.
- Kalim, B., Böhringer, N., Ali, N., and Schäberle, T. F.**, 2015, Xylanases—from Microbial Origin to Industrial Application, *British Biotechnology Journal*, 7(1), 1-20.
- Kang, M. K., Maeng, P. J., and Rhee, Y. H.**, 1996, Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *cephalosporium sp.* Strain RYM-202, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3480-3482.
- Kelly, C. T., O'Mahony, M. R., and Fogarty, W. M.**, 1989, Extracellular xylanolytic enzymes of *Paecilomyces varioti*, *Biotechnology Letters*, 11(12), 885-890.
- Kimura, I., Sasahara, H., and Tajima, S.**, 1995, Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(4), 334-339.
- Kirk, O., Borchert, T. V., and Fuglsang, C. C.**, 2002, Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Kis-Papo, T.**, 2005, Marine fungal communities, *Mycology Series*, 23, 61.
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H., and Proksch, P.**, 2010), Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products, *Nature Protocols*, 5(3), 479-490.
- Knob, A. and Carmona, E. C.**, 2010, Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 429-443.
- Kohlmeyer, J. and Kohlmeyer, E.**, 1979, Marine mycology, The higher marine fungi, Academic Press Inc., New York.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Kohlmeyer, J. and Volkmann-Kohlmeyer, B.**, 2003, Fungi from coral reefs: a commentary, *Mycological Research*, 107(04), 386-387.
- Kormelink, F. J. M., Searle-van Leeuwen, M. J. F., Wood, T. M., and Voragen, A. G. J.**, 1993, Purification and characterization of three endo-(1, 4)- $\beta$ -xylanases and one  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus awamori*, *Journal of Biotechnology*, 27(3), 249-265.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M.**, 1999, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), 411-456.
- Kurtzman, C. P.**, 1994, Molecular taxonomy of the yeasts, *Yeast*, 10(13), 1727-1740.
- L Hawksworth, D.**, 2001, The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited, *Mycological Research*, 105(12), 1422-1432.
- Lam, K. S.**, 2006, Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 245-251.
- Lebeda, A., Luhová, L., Sedlářová, M., and Jančová, D.**, 2001, The role of enzymes in plant-fungal pathogens interactions/Die Rolle der Enzyme in den Beziehungen zwischen Pflanzen und pilzlichen Erregern, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 89-111.
- Lee, J. W., Park, J. Y., Kwon, M. and Choi, I. G.**, 2009, Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(1), 33-37.
- Lee, K. C., Arai, T., Ibrahim, D., Prawitwong, P., Deng, L., Murata, Y., and Kosugi, A.**, 2015, Purification and characterization of a xylanase from the newly isolated *Penicillium rolfsii* c3-2 (1) IBRL, *BioResources*, 10(1), 1627-1643.
- Li, L., Tian, H., Cheng, Y., Jiang, Z., and Yang, S.**, 2006, Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces themophila*, *Enzyme and Microbial Technology*, 38(6), 780-787.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Lin, J., Ndlovu, L. M., Singh, S., and Pillay, B.,** 1999, Purification and biochemical characteristics of  $\beta$ -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30(1), 73-79.
- Liu, K. L., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R., Eichorst, S. A., and Xie, G.,** 2012, Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1523-1533.
- Lu, F., Lu, M., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H., and Wang, Y.,** 2008, Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98, *Bioresource Technology*, 99(13), 5938-5941.
- Maalej, I., Belhaj, I., Masmoudi, N. F., and Belghith, H.,** 2009, Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: purification and characterization, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 158(1), 200-212.
- Maalej-Achouri, I., Guerfali, M., Romdhane, I. B. B., Gargouri, A. and Belghith, H.,** 2012, The effect of *Talaromyces thermophilus* cellulase-free xylanase and commercial laccase on lignocellulosic components during the bleaching of kraft pulp, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 43-48.
- Madhu, K. M., Beena, P. S., and Chandrasekaran, M.,** 2009, Extracellular  $\beta$ -glucosidase production by a marine *Aspergillus sydowii* BTMFS 55 under solid state fermentation using statistical experimental design, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(4), 457-466.
- Mann, K. H.,** 1988, Production and use of detritus in various freshwater, estuarine, and coastal marine ecosystems, *Limnology and Oceanography*, 33(4part2), 910-930.
- Mayer, A., Rodríguez, A. D., Tagliatalata-Scafati, O. and Fusetani, N.,** 2013, Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action, *Marine drugs*, 11(7), 2510-2573.
- McLaughlin, D. J., McLaughlin, E. G., and Lemke, P. A.,** 2001, The Mycota. VII, Systematics and evolution, part B.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Miao, Y., Li, J., Xiao, Z., Shen, Q., and Zhang, R.,** 2015, Characterization and identification of the xylanolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* Z5, *BMC Microbiology*, 15(1), 126.
- Miller, G. L.,** 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Motta, F. L., Andrade, C. C. P., and Santana, M. H. A.,** 2013, A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications, *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization*.
- Nair, S. G. and Shashidhar, S.,** 2008, Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions, *African Journal of Microbiology Research*, 2(4), 82-86.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., Antranikian, G.,** 1999, Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, *Applied. Microbiology Biotechnology*, 51, 711–729.
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J. M., and Vilgalys, R.,** 2005, Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5544-5550.
- Osterhage, C.,** 2001, Isolation, Structure, Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites From Marine-Derived Fungi, Braunschweig: Technischen Universität Carolo-Wilhelmina.
- Palm, M. E. and Chapela, I. H. (Eds.),** 1997, *Mycology in sustainable development: expanding concepts, vanishing borders*, Parkway Publishers, Inc..
- Pang, K. L., Chow, R. K., Chan, C. W., and Vrijmoed, L. L.,** 2011, Diversity and physiology of marine lignicolous fungi in Arctic waters: a preliminary account, *Polar Research*, 30.
- Panno, L., Bruno, M., Voyron, S., Anastasi, A., Gnani, G., Miserere, L., and Varese, G. C.,** 2013, Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*, *New Biotechnology*, 30(6), 685-694.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Passarini, M. R., Santos, C., Lima, N., Berlinck, R. G., and Sette, L. D.,** 2013, Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dracmacidon reticulatum*, *Archives of Microbiology*, 195(2), 99-111.
- Phillips, N. W.,** 1984, Role of different microbes and substrates as potential suppliers of specific, essential nutrients to marine detritivores, *Bulletin of Marine Science*, 35(3), 283-298.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., and Amorim, D. S.,** 2005, Xylanases from fungi: properties and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591.
- Prade, R. A.,** 1996, Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1), 101-132.
- Prade, R.A.,** 1995, Xylanases: from biology to biotechnology, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13, 103–131.
- Querido, A. L. D. S., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F. D., and Chaves-Alves, V. M.,** 2006, Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3), 475-480.
- Raghukumar S.,** 2004, The role of fungi in marine detrital processes. In *Marine Microbiology: Facets and Opportunities*, ed. N Ramaiah, pp. 91–101. Goa, India: Natl. Inst. Oceanogr.
- Raghukumar, C., Muraleedharan, U., Gaud, V. R., and Mishra, R.,** 2004, Xylanases of marine fungi of potential use for biobleaching of paper pulp, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(9), 433-441.
- Raghukumar, C., Raghukumar, S., Chinnaraj, A., Chandramohan, D., D'souza, T. M., and Reddy, C. A.,** 1994, Laccase and other lignocellulose modifying enzymes of marine fungi isolated from the coast of India, *Botanica marina*, 37(6), 515-524.
- Rämä, T., Nordén, J., Davey, M. L., Mathiassen, G. H., Spatafora, J. W., and Kauserud, H.,** 2014, Fungi ahoy! Diversity on marine wooden substrata in the high North, *Fungal Ecology*, 8, 46-58.
- Rapp, M.,** 1974, Indikatorzusätze zur Keimdifferenzierung auf Wurze und Malzextrakt-Agar, *Milchwissenschaft*, 29; 341-344.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Richards, T. A., Jones, M. D., Leonard, G., and Bass, D.,** 2012, Marine fungi: their ecology and molecular diversity, *Annual Review of Marine Science*, 4, 495-522.
- Ritschkoff, A. C., Buchert, J., and Viikari, L.,** 1994, Purification and characterization of a thermophilic xylanase from the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*, *Journal of Biotechnology*, 32(1), 67-74.
- Rodionova, N. A., Dubovaya, N. V., Eneiskaya, E. V., Martinovich, L. I., Gracheva, I. M., and Bezborodov, A. M.,** 2000, Purification and Characterization of endo-(1→4)-β-xylanase from *Geotrichum candidum* 3C, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 36(5), 460-465.
- Ryan, S. E., Nolan, K., Thompson, R., Gubitz, G. M., Savage, A. V., and Tuohy, M. G.,** 2003, Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 33(6), 775-785.
- Saha, B.C.,** 2003, Hemicellulose bioconversion, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279- 291.
- Salama, M. A., Ismail, K. M. I., Amany, H. A., El-Lill, A., and Geweely, N. S. I.,** 2008, Biochemical studies of purified extracellular xylanases from *Aspergillus versicolor*, *International Journal of Botany*, 4(1), 41-48.
- Santos, E. D. O. and Martins, M. L. L.,** 2003, Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus* sp, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(1), 129-134.
- Seyis, I. and Aksoz, N.,** 2005, Xylanase production from *Trichoderma harzianum* 1073 D 3 with alternative carbon and nitrogen sources, *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 37-40.
- Seyis, I.,** 1997, Fungal kaynaklardan ksilanaz eldesi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara.
- Sharma M. and Kumar A.,** 2013, Xylanases: An overview, *British Biotechnology Journal*, 2013;3:1-28.
- Shinn, E. A., Smith, G. W., Prospero, J. M., Betzer, P., Hayes, M. L., Garrison, V., and Barber, R. T.,** 2000, African dust and the demise of Caribbean coral reefs, *Geophysical Research Letters*, 27(19), 3029-3032.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Smith, D. C., Bhat, K. M., and Wood, T. M.,** 1991, Xylan-hydrolysing enzymes from thermophilic and mesophilic fungi, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(4), 475-484.
- Smitha S. L., Neil S. C., and Rosamma P.,** 2014, Marine fungi as a potential source of enzymes and antibiotics, *International Journal of Research in Marine Sciences*, 3(1): 5-10
- Sorgatto, M., Guimarães, N. C. A., Zanoelo, F. F., Marques, M. R., Peixoto-Nogueira, S. C., and Giannesi, G. G.,** 2014, Purification and characterization of an extracellular xylanase produced by the endophytic fungus, *Aspergillus terreus*, grown in submerged fermentation, *African Journal of Biotechnology*, 11(32).
- Soroor, M. A. M., Ghazy, A. E. H. M., Mahdy, E. S. M. S., El-Badry, M. O., Shousha, W. G., and El-Khonezy, M. I.,** 2013, Purification and characterization of cellulase-poor xylanases from *Trichoderma reesei* F418 grown on rice straw by solid-state fermentation, *Journal of Applied Science Resource*, 9(3), 1702-1713.
- Sowell, S. M., Norbeck, A. D., Lipton, M. S., Nicora, C. D., Callister, S. J., Smith, R. D., and Giovannoni, S. J.,** 2008, Proteomic analysis of stationary phase in the marine bacterium “*Candidatus Pelagibacter ubique*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 4091-4100.
- Spooner, B. and Roberts, P.,** 2005, *Fungi*, Collins New Naturalist Library, London, U.K.
- Stach, J. E., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., and Bull, A. T.,** 2003, New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments, *Environmental Microbiology*, 5(10), 828-841.
- Subramaniyan, S. And Prema, P.,** 2002, Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application, *Critical reviews in Biotechnology*, 22(1), 33-64.
- Tan, L. U. L., Wong, K. K. Y., Yu, E. K. C., and Saddler, J. N.,** 1985, Purification and characterization of two D-xylanases from *Trichoderma harzianum*, *Enzyme and Microbial Technology*, 7(9), 425-430.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Thirunavukkarasu, N., Jahnes, B., Broadstock, A., Rajulu, M. G., Murali, T. S., Gopalan, V., and Suryanarayanan, T. S.,** 2015, Screening marine-derived endophytic fungi for xylan-degrading enzymes, *Current Science*, 109(1), 112.
- Timell, T. E.,** 1967, Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses, *Wood Science and Technology*, 1(1), 45-70.
- Torres, J. M. O. and dela Cruz, T. E. E.,** 2013, Production of xylanases by mangrove fungi from the Philippines and their application in enzymatic pretreatment of recycled paper pulps, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 645-655.
- Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., McConnell, M. F., and Pethick, D. W.,** 2003, The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility, *Animal Feed Science and Technology*, 108(1), 71-82.
- Velmurugan, N. and Lee, Y. S.,** 2012, Enzymes from marine fungi: current research and future prospects, *Marine Fungi and Fungal-like Organisms (Marine and Freshwater Botany)*, 441-474.
- Webster, J. and Weber, R.,** 2007, *Introduction to fungi*, Cambridge; Cambridge University Press, pp. 23-34.
- Wiseman, A.,** 1987, Handbook of enzyme biotechnology, Second Edition. Chapter 3, The application of enzymes in industry, pp .274-373.
- Wong, K. K., Tan, L. U., and Saddler, J. N.,** 1988, Multiplicity of beta-1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications, *Microbiological Reviews*, 52(3), 305.
- Woodward, J.,** 1984, Xylanases: functions, properties and applications, *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*.
- Yang, Y., Zhang, W., Huang, J., Lin, L., Lian, H., Lu, Y. P. and Wang, S. H.,** 2010, Purification and characterization of an extracellular xylanase from *Aspergillus niger* C3486, *African Journal of Microbiology Research.*, 4, 2249-2256.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Yoshioka, H., Chavanich, S., Nilubol, N., and Hayashida, S.,** 1981, Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50, *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(3), 579-586.

**Yoshioka, H., Nagato, N., Chavanich, S., Nilubol, N., and Hayashida, S.,** 1981, Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50, *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(11), 2425-2432.

**Zhang, C. and Kim, S. K.,** 2010, Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects, *Marine Drugs*, 8(6), 1920-1934.



## ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Melih Niyazi KORKMAZ
2. **Doğum Tarihi:** 10.09.1988
3. **Öğrenim Durumu:** Yüksek Lisans (devam etmekte)
4. **Yabancı Dili:** İngilizce (YDS 2014 Sonbahar döneminde-67,500)
5. **Ales-Say:** 2012 İlkbahar dönemi-66,542

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji/ Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı	Ege Üniversitesi	2007-2012
Yüksek Lisans	Biyoloji/Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Ege Üniversitesi	2013-devam etmekte

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ataç UZEL**

### 6. Akademik Unvanlar:

**Yardımcı Doçentlik Tarihi** : -  
**Doçentlik Tarihi** : -  
**Profesörlük Tarihi** : -

### 7. Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri

#### 7.1. Yüksek Lisans Tezleri

-

#### 7.2. Doktora Tezleri

-

### 8. ESERLER LİSTESİ

**A. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)**

**B. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler**

**C. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler**

**D. Yazılan uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler**

**E. Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler**

**F. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

## 9. Projeler

**1. Projenin Adı ve Numarası:** “Denizel Türevli Filamentöz Fungus Suşlarının Ksilanaz Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi”. Proje no: Ege-Fen-002 (**Yüksek lisans tez projesi**).

**Destekleyen Kuruluş:** Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi

**Görevi:** Araştırmacı

**Süresi:** 2015–2016

**2. Projenin Adı ve Numarası:** “Denizel Türevli Filamentöz Fungus Suşlarının Ksilanaz Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi”. Proje no: 1649B021404963 (**Yüksek lisans tez projesi**).

**Destekleyen Kuruluş:** TUBİTAK

**Görevi:** Araştırmacı

**Süresi:** 2013–2016

## 10. Katıldığı Kurslar, Seminerler ve Sertifikalar

**1. English Office Dil Kursu, İzmir, 08/2011-11/2011**

**2. Ege Üniversitesi, Uluslararası Katılımlı 17. Ege Onkoloji Günleri, Kanser Biyolojisi ve İmmünolojisi**

**3. İTÜ III. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi, İstanbul, 17-20 Ağustos 2009**

## 11. İş Tecrübesi

**1. Ege Üniversitesi Patoloji Laboratuvarı (05/2010-06/2010)**

**Pozisyon :** Stajyer - Tam zamanlı

**İş tanımı :** Patoloji laboratuvarında histopatoloji ve sitopatoloji tetkikleri

**2. İzmir Ege Doğumevi ve Kadın Hastalıkları ve Eğitim Araştırma Hastanesi, Tüp Bebek Laboratuvarı (07/2010-08/2010)**

**Pozisyon :** Stajyer - Tam zamanlı

**İş tanımı :** Androloji laboratuvarında spermiogram analizleri

**3. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi-Çocuk Hastanesi-Moleküler Tıp Laboratuvarı (07/2011-08/2011)**

**Pozisyon :** Stajyer - Tam zamanlı

**İş tanımı :** PCR ve genetik tanı testleri

**4. Glaxosmithkline-İzmir (02/2013-02/2014)**

**Pozisyon :** Medikal İletişim Sorumlusu - Yarı zamanlı

**İş Tanımı:** İlaç tanımı ve sunumu

**5. Türk Amerikan Derneği-İZMİR (05/2014-05/2015)**

**Pozisyon :** İngilizce Öğretmeni – Yarı zamanlı

**İş Tanımı:** A1, A2, B1 ve B2 seviyelerine İngilizce öğretmek

**6. American Life**

**Pozisyon :** İngilizce Öğretmeni – Yarı zamanlı

**İş tanımı :** A1, A2, B1 ve B2 seviyelerine İngilizce öğretmek