

**KİLİS 7 ARALIK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus* spp. SUŞLARINDAN KSİLANAZ ENZİMİNİN KİSMİ  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Gökhan SERTBAŞ**

**DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEMMUZ 2017**

**KİLİS**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI danışmanlığında, Gökhan SERTBAŞ tarafından hazırlanan “*Bacillus* sp. suşlarından ksilanaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı tez çalışması 26/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy ..... ile Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri Unvanı, Adı Soyadı**

**İmza**

**(Kurumu)**

**Başkan** Prof. Dr. Sadık DİNÇER

(Çukurova Üniversitesi Biyoloji ABD)

**Üye** Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI

(Kilis 7 Aralık Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD)

**Üye** Yrd. Doç. Dr. Ayşenur ÖZŞAVLI

(Kilis 7 Aralık Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD)

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ...../...../2017 tarih ve ...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

**Tez No:** .....

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### ***Bacillus* spp. SUŞLARINDAN KSİLANAZ ENZİMİNİN KISMI SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Gökhan SERTBAŞ

Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI

Yıl: 2017

Sayfa: 70

$\beta$ -1,4 bağılı ksilopiranozil rezidülerinden oluşan ksilanın  $\beta$ -1,4 glikozidik bağlarını yıkan ksilanaz, başta kağıt ve kağıt hamuru endüstrileri olmak üzere tekstil, yem, fırın ve biyoyakıt endüstrilerinde de geniş potansiyel uygulamalara sahip endüstriyel bir enzimdir. Bu çalışmada, Kilis 7 Aralık Üniversitesi merkez kampüs toprak örneğinden ksilanaz üretici *Bacillus* spp suşlarının izolasyonu ve saflaştırılan ksilanazın çeşitli endüstrilerdeki uygulanabilirliği araştırılmıştır. Ksilan içeren sıvı fermantasyon ortamında geliştirilen *Bacillus* spp suşundan hücre serbest elde edilen ham ksilanaz preparatına amonyum sülfat ve alkol çöktürme uygulanarak saflaştırılmıştır. En yüksek total ve spesifik enzim aktivitesi 723 U/L ve 64.81 U/mg olarak ham enzim preparatında saptanmıştır. Ksilanazın optimum aktivitesi 90°C ve pH 10.6'da belirlenmiştir. Enzimin 90°C sıcaklıkta 15 dakika ön inkübasyonu sonrası aktivitenin %167'e kadar arttığı saptanmıştır. Karakterizasyon çalışmalarındaki en yüksek aktivitesi 2935 U/L olarak hesaplanmıştır. SDS-PAGE ve zimogram analizlerinde, kısmi saflaştırılmış ekstraselüler ksilanaza ait ortalama 38.75 kDa moleküler ağırlığında tek protein bandı gözlenmiştir. Ksilanın ksilanaz enzimi ile hidrolizi sonucunda parçalama ürünleri olarak ksiloz ve ksilo-oligosakkaritler belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Bacillus* spp., ksilanaz, ksilan, kısmi saflaştırma, karakterizasyon

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### **PARTIAL PURIFICATION and CHARACTERIZATION OF XYLANASE ENZYME from *BACILLUS* spp. STRAINS**

Gökhan SERTBAŞ

Kilis 7 Aralık University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Asst. Prof. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI

Year: 2017

Page: 70

Xylanase that cleaves  $\beta$ -1,4-glycosidic linkages of xylan composed of  $\beta$ -1,4-linked xylopyranosyl residues, is an industrial enzyme, has widespread potential applications in the textile, feed, beverage and biofuel industries, especially the paper and pulp industry. In this study, we examined the isolation of *Bacillus* spp strains, produced extracellular xylanase, from Kilis 7 Aralık University central campus soil sample and the application in various industries of purified xylanase. The cell-free crude xylanase preparation obtained from *Bacillus* spp strain developed in a liquid fermentation medium including xylan was purified by using ammonium sulfate and alcohol precipitation. The highest total and specific enzyme activities were detected as 723 U/L and 64.81 U/mg in cell-free crude xylanase preparation. The optimum activity of xylanase was observed at 90°C and pH 10.6. After the pre-incubation of enzyme at 90°C for 15 min, its activity was detected to increase up to 167%. In characterization studies, the highest enzyme activity was calculated as 2935 U/L. In SDS-PAGE and zymogram analysis, a single protein band in 38.75 kDa molecular weight belonging to the partially purified extracellular xylanase was observed. Xylose and xylo-oligosaccharides were detected as the products by hydrolysis of xylan with xylanase.

**Keywords:** *Bacillus* spp., xylanase, xylan, partial purification, characterization

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilimsel desteğini ve öngörülerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. H. Aysun MERCİMEK TAKCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında desteğini görmüş olduğum Kilis 7 Aralık Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim elemanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Analitik analizler sırasında laboratuvar olanaklarından yararlanmamıza izin veren başta Yrd. Doç. Dr. Filiz UÇAN TÜRKMEN olmak üzere Kilis 7 Aralık Fen Edebiyat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim elemanlarına teşekkür ederim. Yrd. Doç. Dr. Melis SÜMENGEN ÖZDENEFE'ye tez yazımı sırasındaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tez yazımı ve laboratuvar çalışmaları sırasında bana yardımcı olan Hamza KAPAN Hülya BİLEKÇİ ve Tülay YELTEKİN'e teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere gelmemde büyük emeği olan, maddi manevi her zaman bütün imkânlarını benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu yüksek lisans tezinin kimyasal desteği "*Bacillus spp.* suşlarından ksilanaz enziminin kısmi saflaştırması ve plasmid profillerinin belirlenmesi" konulu proje kapsamında TÜBİTAK BİDEB 2209/A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı tarafından sağlanmıştır. Bu sebeple TÜBİTAK'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Gökhan SERTBAŞ

TEMMUZ, 2017

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Enzimler .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. Ksilan ve Ksilanazlar .....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Ksilanın kimyasal yapısı .....	3
1.2.2. Ksilanın enzimatik hidrolizi.....	5
1.2.3. Ksilanazlar .....	6
<b>1.3. Ksilanaz Üretici Mikroorganizmalar .....</b>	<b>8</b>
1.3.1. Bakteriyel ve mantar kaynaklı ksilanazların karşılaştırılması .....	10
<b>1.4. Ksilanazların Endüstriyel Kullanım Alanları .....</b>	<b>10</b>
1.4.1. Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisi .....	11
1.4.2. Hayvan yemi .....	12
1.4.3. Fırın endüstrisi .....	13
1.4.4. Biyoyakıt üretimi .....	13
1.4.5. Atık kâğıtlardan mürekkep arındırılması.....	14
1.4.6. İlaç sanayii .....	14
<b>1.5. Bacillus Cinsinin Genel Özellikleri .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6. Kaynak Özetleri.....</b>	<b>15</b>
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Materyal .....</b>	<b>17</b>
2.1.1. Kullanılan besiyerleri.....	17
2.1.1.1. Ksilanaz aktivite besiyeri .....	17
2.1.1.2. Nutrient agar besiyeri .....	17
2.1.1.3. Kongo kırmızı içeren sıvı besiyeri .....	18
2.1.1.4. Enzim fermantasyon ortamı .....	18
2.1.1.5. Leura-Bertani besiyeri.....	19
2.1.2. Kullanılan çözeltiler.....	19
2.1.2.1 Gram boyama için kullanılan çözeltiler .....	19
2.1.2.1.1. Kristal viyole .....	19
2.1.2.1.2. Sulu karbol fuksin (sulu fuksin) .....	19
2.1.2.1.3. Gramın iyodür çözeltisi .....	20
2.1.3. Enzim aktivite tayininde kullanılan çözeltiler .....	20
2.1.3.1. 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH:7.0).....	20
2.1.3.2. DNS Çözeltisi .....	20
2.1.3.3. Substrat çözeltisi .....	20
2.1.4. Katı besiyerinde ksilolitik aktivite için kullanılan ayıraçlar .....	20
2.1.4.1. Kongo kırmızısı ayırıcı içeriği.....	20

2.1.4.2. Yıkama çözeltisi(NaCl) .....	20
2.1.5. Protein miktarı analizinde kullanılan ayıraçlar .....	20
2.1.6. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan çözeltiler .....	21
2.1.6.1. Solüsyon A (monomer (akrilamid/bis) çözeltisi).....	21
2.1.6.2. Solüsyon B (4X).....	21
2.1.6.3. Solüsyon C (4X).....	21
2.1.6.4. %10 SDS .....	21
2.1.6.5. %10 Amonyum persülfat (AMPS).....	21
2.1.6.6. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine) .....	21
2.1.6.7. Örnek yükleme tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72 M 2-β-merkaptoetanol, %0,05 bromfenol mavisi).....	22
2.1.6.8. Yürütme tamponu (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)..	22
2.1.6.9. Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi .....	22
2.1.6.10. Yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma) çözeltisi .....	22
2.1.7. Diyaliz tüpü aktiveştirmek için tampon .....	22
2.1.8. SDS-PAGE'nde zimogram analizi için kullanılan çözeltiler .....	22
2.1.9. pH Aktivitesi için kullanılan tamponlar.....	23
2.1.9.1. Glisin HCl tamponu .....	23
2.1.9.2. Sitrat tamponu .....	23
2.1.9.3. Sitrat fosfat tamponu .....	24
2.1.9.4. Fosfat tamponu.....	24
2.1.9.5. Tris HCl tamponu .....	24
2.1.9.6. Karbonat bikarbonat tamponu.....	24
2.1.10. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) için kullanılan çözeltiler .....	25
<b>2.2. Yöntem .....</b>	<b>25</b>
2.2.1. Enzim üretici suşların izolasyonu için materyal toplama .....	25
2.2.2. <i>Bacillus spp.</i> izolasyonu .....	25
2.2.3. Gram boyama.....	25
2.2.4. Bakteri stoklanması.....	26
2.2.5. Ksilanaz üretici <i>Bacillus spp.</i> 'lerin belirlenmesi .....	26
2.2.6. Sıvı fermantasyon ortamında ksilanaz üretimi .....	26
2.2.7. Diyaliz tüplerinin aktiveştirilmesi .....	27
2.2.8. Ksilanazın kısmi saflaştırılması .....	27
2.2.9. Ksilanaz aktivitesi için kalibrasyon egrisinin belirlenmesi .....	28
2.2.10. Ekstraselüler ksilanaz aktivite tayini .....	28
2.2.11. Protein miktar tayini .....	29
2.2.12. Enzimin optimum pH değerlerinin belirlenmesi .....	30
2.2.13. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması .....	30
2.2.14. Enzimin termal stabilitesinin saptanması .....	30
2.2.15. SDS-PAGE yöntemi ile enzim moleküler ağırlıklarının saptanması.....	30
2.2.15.1. Ayrılma jelinin hazırlanması (%12'lik) .....	30
2.2.15.2. Yükleme jelinin hazırlanması (%5'lik).....	31
2.2.15.3. Örneğin ve standartın hazırlanması.....	31

2.2.15.4. Enzim örneklerinin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi .....	31
2.2.15.5. SDS-PAGE jelinin boyanması ve görüntülenmesi .....	31
2.2.16. SDS-PAGE jelinde zimogram analizi.....	32
2.2.17. Reaksiyon ürünlerinin belirlenmesi .....	32
<b>3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>34</b>
3.1. Ksilanaz Üretici <i>Bacillus</i> spp. Suşların İzolasyonu .....	34
3.2. Ksilanaz Preparatlarının Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	35
3.3. Ksilanazın Optimum pH Aralığı .....	37
3.4. Ksilanazın Optimum Sıcaklık Aralığı .....	39
3.5. Ksilanazın Termal Stabilitesine Ait Bulgular .....	41
3.6. Ksilanazın Moleküler Ağırlığının Tespiti.....	43
3.7. Reaksiyon Ürünlerinin TLC İle Belirlenmesi.....	44
<b>4. SONUÇ VE YORUM.....</b>	<b>48</b>
<b>5. KAYNAKLAR .....</b>	<b>52</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>58</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$  : Alfa

$\beta$  : Beta

g: Gram

dak.: Dakika

°C: Santigrat derece

$\mu$ M: Mikromolar

$\mu$ mol: Mikromol

AMPS: Amonyum persülfat

atm: Atmosfer

bis: N,N'-metilen-bis-akrilamid

CBB: Coomassie Brilliant Blue

Da: Dalton

EDTA: Etilendiaminotetra-asetik asit

EC: Enzim Komisyonu

rpm: Dakikada devir sayısı

Kb: Kilobaz

kDa: Kilodalton

mM: Milimolar

mU/ml: Milli units per milliliter

nm: Nanometre

PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

sp.: Species (tür, tekil)

spp.: Species (tür, çoğul)

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SDS-PAGE: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametil etilendiamin

UV: Ultraviyole

U/mg: Unit/miligram

U/LL: Units per liter

v/v: Hacim/Hacim (volume/volume)

w/v: Ağırlık/Hacim (weight/volume)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ksilanın yapısı, $\beta$ -1,4 bağlı ksilopiranozil rezidüleri (Butt ve ark., 2008) .....	5
Şekil 1.2. Ksilanın hidrolizini katalizleyen ksilanolitik enzimler (Sarı, 2016).....	8
Şekil 1.3. Ksilanazın kağıt hamuru üzerindeki etki mekanizması (Techapun ve ark., 2003).....	12
Şekil 2.1. Ksilanaz aktivite tayini için çizdirilen kalibrasyon eğri grafiği.....	28
Şekil 2.2. Protein miktar tayini için kalibrasyon eğri grafiği.....	30
Şekil 3.1. Ksilan içeren katı besiyerinde suşların ksilanaz aktivitesi .....	34
Şekil 3.2. Suşların sıvı besiyerinde renk değişimine dayalı ksilanaz aktivitesi .....	35
Şekil 3.3. Enzim preparatlarında septofotometrik ölçüm öncüsü renk değişimleri (sarı renkli kuvvetler kör; kırmızı renkliler ise örnekleri göstermektedir. ....	36
Şekil 3.4. Ekstraselüler ksilanazın optimum aktivite gösterdiği pH değeri.....	37
Şekil 3.5. Ekstraselüler ksilanazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık .....	39
Şekil 3.6. Ekstraselüler ksilanazın termal stabilitesi.....	42
Şekil 3.7. Ksilanaza ait SDS-PAGE bulguları (A: Ksilanazın SDS-PAGE’de zimogramı, B: Ham ksilanaz preparatının SDS-PAGE’i ve M: Protein marker).....	43
Şekil 3.8. %3’lük ksiloz (K), glikoz (G) ve maltoz (M) standartlarına ait lekelenmeler	45
Şekil 3.9. %3’lük standart ksilan (K) ve reaksiyon ürünlerine ait TLC plakalarındaki lekelenmeler.....	46

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1. 1.</b> Farklı mikroorganizmalardan üretilen bazı ksilanazların özellikleri (Butt ve ark., 2008; Ören 2014, Chakdar ve ark., 2016).....	9
<b>Çizelge 1. 2.</b> Ksilanazların kullanım alanları (Altun, 2012).....	10
<b>Çizelge 1. 3.</b> Farklı kaynaklardan ksilanazların eklenmesiyle nihai ekmek hacmindeki artış (Butt ve ark., 2008) .....	13
<b>Çizelge 2. 1.</b> Ksilanaz aktivite besiyeri içeriği .....	17
<b>Çizelge 2. 2.</b> Nutrient agar içeriği.....	17
<b>Çizelge 2. 3.</b> Kongo kırmızısı içeren sıvı besiyeri içeriği.....	18
<b>Çizelge 2. 4.</b> Enzim üretim ortamı içeriği.....	18
<b>Çizelge 2. 5.</b> LB besiyeri içeriği .....	19
<b>Çizelge 2. 6.</b> Glisin tamponun bileşenleri.....	23
<b>Çizelge 2. 7.</b> Sitrik asit tampon çözeltisinin bileşenleri.....	23
<b>Çizelge 2. 8.</b> Fosfat tamponu bileşenleri.....	24
<b>Çizelge 2. 9.</b> Fosfat tamponu bileşenleri.....	24
<b>Çizelge 2. 10.</b> Tris tampon çözeltisinin bileşenleri.....	24
<b>Çizelge 2. 11.</b> Karbonat-Bikarbonat tampon çözeltilerinin bileşenleri.....	25
<b>Çizelge 3. 1.</b> Ksilanaz enzim preparatlarının total ve spesifik aktivitesi.....	36

## 1. GİRİŞ

Ksilan, hem sert ağaçlarda hem de yıllık bitkilerde en çok bulunan selülozik olmayan polisakkarittir ve tropikal bitki biyokütlesindeki toplam kuru ağırlığın %20-35'ini oluşturmaktadır. Ilıman bölge bitkileri yumuşak ağaçlarda, ksilan miktarı az olup, toplam kuru ağırlığın yaklaşık %8'i kadardır. Ksilan bitki duvar yapısında lignin ve diğer polisakaritler arasında bir arayüzey oluşturduğu düşünülmektedir. Lignin fenolik rezidüleri ile kovalent olarak bağlı ksilan molekülü pektin ve glukan gibi polisakaritler ile etkileşime girmektedir (Kamble ve Jadhav, 2012). En basit formunda, ksilanlar,  $\beta$ -1-4-glikosil bağlarla bağlı D-ksiloz monomerlerini içeren lineer homopolimerlerdir. Kâğıt üretiminde kâğıt hamurunu ağartmak, kâğıt hamurunun parlaklığını arttırmak, hayvan yemlerinin sindirilebilirliğini arttırmak ve meyve sularının berraklaştırılmasında ksilanazlar, ksilanın hidrolitik yıkımın katalizleyen enzimlerdir (Kamble ve Jadhav, 2012). Çeşitli bakteri türleri ve fungusları içeren mikroorganizmalar zengin ksilanaz kaynaklarıdır. Ksilanazların bu mikroorganizmalarca ekstraselüler salgılanması düşük veya yüksek miktarda selülaz ile ilişkilendirilmektedir. Selülaz kâğıt hamurunun kalitesini olumsuz olarak etkileyebileceğinden, kâğıt hamuruna ksilanaz uygulanması selüloz içermeyen ksilanazların kullanımı ile mümkündür. Ksilanazın ağartma işleminde göze çarpan şekilde kullanılması, yüksek sıcaklık ve alkalın pH'da satbil olması ile mümkündür (Kamble ve Jadhav, 2012).

Ekmek yapımında enzimlerin kullanımı hamur ve ekmek kalitesini geliştirme, hamur esnekliğinin ve işlenebilirliğinin, stabilitesinin, somun hacminin ve kırıntı yapısının geliştirilmesine yol açmıştır. Proteazlar, ksilanazlar ve selülazlar gibi enzimler doğrudan veya dolaylı olarak gluten ağının sağlamlığını geliştirerek ekmeğin kalitesini iyileştirir. Ksilanlar, su emme kabiliyeti ve gluten ile etkileşiminden ötürü ekmek kalitesinde önemli bir role sahiptir. Ksilanazlar, hamurları farklı kalitede unlara ve işleme parametrelerindeki değişimlere karşı daha toleranslı olmasını sağlar. Ayrıca hamurları yumuşatırlar, diğer bir deyişle kaplama iş gereksinimini azaltır ve pişmiş ekmeğin hacmini önemli derecede artırır (Butt ve ark., 2008).

İkinci en çok bulunan doğal polisakkarit ksilanın enzimatik hidrolizi, bu polisakkaritin en önemli endüstriyel uygulamalarından da biridir. Ksilanın ana zinciri,  $\beta$ -ksilopiranoz rezidülerinden oluşmaktadır. Ve ksilanın tümüyle hidrolizi, molekülün

depolimerizasyonunda önemli endo-1,4- $\beta$ -D-ksilanaz (EC3.2.1.8)'ı içeren çeşitli enzimlerin aktivasyonunu gerektirmektedir (Motta ve ark., 2013). Odun, tahıl ve diğer bitki materyallarının hücre duvarlarından elde edilen ksilanın kimyasal yapısındaki çeşitlilikten dolayı, çeşitli hidrolitik aktiviteler, fizikokimyasal özellikler ve yapılaraya sahip ksilanazlar bilinmektedir. Ksilan türevleri de, katı-faz veya batık fermantasyon uygulamalarında mikroorganizmaların ksilanaz üretimini indüklemek için sıklıkla kullanılmaktadır. Ksilanazlar ve üretici mikroorganizmalar, atık yönetiminde, ksilanı yenilenebilir yakıtlara ve kimyasallara indirgemek için ve ek olarak gıda, tarımsal lif ve kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrilerinde de kullanım alanı bulmaktadır. Ksilanazların katalitik aktiviteleri sonucu üretilen oligosakkaritler, fonksiyonel gıda katkı maddeleri veya faydalı alternatif tatlandırıcılar olarak değerlendirilmektedir (Motta ve ark., 2013). Ksilanolitik enzimler aynı zamanda kahve, bitki yağları ve nişasta özütü elde etmek için meyve suları ve şarapları berraklaştırmak, tarımsal silajın ve tahıl yeminin besleyici özelliklerini geliştirmek için kullanılmaktadır. Ksiloz, ksilobioz, ve ksilooligomerler gibi şekerler ksilanın enzimatik hidrolize ile hazırlanabilmektedir. Lignoselülozların fermente şekerlere biyolojik dönüşümü büyük bir ekonomik öneme sahiptir (Butt ve ark., 2008). Pek çok yabancı tip ksilanaz, pH stabilitesi, yüksek aktivite ve termostabilite gibi istenilen karakteristikliklere sahipken, bireysel ksilanazlar yem ve gıda endüstrilerinin tüm gereksinimlerini karşılayamaz. Dahası, bir endüstriyel uygulama ucuz ürün gereksiniminden dolayı, ksilanazın ekspresyon seviyeleri ve etkili sekresyon proseslerinin uygulanabilirliği genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojileri ile sağlanmaktadır (Motta ve ark., 2013).

### **1.1. Enzimler**

DNA replikasyonu, transkripsiyonu, protein sentezi, metabolizma ve sinyal iletimi vb. gibi tüm metabolik süreçlerde yer alan biyolojik katalizörlerdir. Çok özel kimyasal dönüşümleri gerçekleştirme yetenekleri, onları endüstriyel süreçlerde giderek önemli bir hale getirmiştir. Enzim mühendisliği stratejileri, organik sentezdeki biyokatalizör, biyoyakıt üretimi ve biyolojik işlemlerin seçilmiş yönleri ile ilgili çeşitli konularda sayısız derlemeler yayınlanmış olup, endüstriyel enzim uygulamalarının teknolojik ve ekonomik perspektifleri ile tartışılmıştır. Yem endüstrisi, gıda işleme ve kozmetik

alanlarında temsili enzim uygulamaları, modern endüstrisinde enzim etkisini anlamayı amaçlamaktadır (Li ve ark., 2012).

Enzimler, teknik kullanımı, gıda üretimi, hayvan beslenme, kozmetik, ilaç üretimi ve araştırma ve geliştirme için aygıt üretimi gibi çeşitli alanlarda uygulanmaktadır. Günümüzde yaklaşık 4000 enzim bilinmekte olup, bunlardan 200 civarında mikroorganizma kökenli enzim ticari olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sadece 20 kadar enzim gerçekten endüstriyel ölçekte üretilmektedir. Enzim üretim biyokimyası, fermantasyon prosesleri ve geri kazanım yöntemlerinin daha iyi anlaşılması ile artan sayıda endüstriyel enzim öngörülebilmektedir. Dünya enzim talebi yaklaşık 12 büyük üretici ve 400 küçük tedarikçi tarafından karşılanmaktadır. Avusturya Federal Çevre Ajansı tarafından yapılan bir araştırmaya göre, gıda endüstrisinde 158, teknik uygulamada 64 ve yem sanayiinde 57 enzim, bunlardan 24 enzimde her üç endüstriyel sektöre kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerin %75'ini hemen hemen hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Teknik enzimler tipik olarak deterjanlar, tekstil, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrileri, organik sentez ve biyoyakıt endüstrisinde kullanılırlar. Bu alanlarda ticari olarak temin edilebilen enzimler amilazlar, lipazlar, selülozlar, ksilanazlar ve katalazlardır (Li ve ark., 2012).

## **1.2. Ksilan ve Ksilanazlar**

### **1.2.1. Ksilanın kimyasal yapısı**

Selüloz, hemiselüloz ve lignin lignoselülozik substratları oluşturan üç temel bileşiktir. Hemiselülozler ksilan, ksiloglukan, glukomannan, galaktoglukomannan, arabinogalaktan ve diğer heteropolimerlerin kompleks karışımlarından oluşmaktadır. Ksilanazın substratı, ksilan, dünyada ki yenilenebilir organik karbonun hemen hemen üçte birini oluşturmaktadır. Ksilan, ksiloglukan (D-ksiloz ve D-glukoz'un heteropolimeri), glukomannan (D-glukoz ve D-mannoz'un heteropolimeri), galaktoglukomannan (D- galaktoz, D-glukoz ve D-mannoz'un heteropolimeri) ve arabinogalaktan (D-galaktoz ve arabinoz'un polimeri) içeren polimerik karbohidratların bir kompleksi, hemiselülozun başlıca bileşenini oluşturmaktadır (Motta ve ark., 2013). (Şekil 1.1)

Ksilan, selüloz (1,4- $\beta$ -glukan) ve lignin (kompleks bir polifenolik bileşik) ile birlikte bitki hücre duvarlarının temel polimerik bileşenlerini oluşturmaktadır. Hücre duvar yapısı ile, bu üç bileşik kovalent veya kovalent olmayan bağlar ile etkileşime girmektedir. Ksilan lignin ve selüloz arasındaki arayüzde bulunmaktadır. Bu etkileşim lif birleşimi ve bitki hücre duvarı bütünlüğü için önemlidir (Motta ve ark., 2013). Yüksek oranda dallanmış heteropolisakarit bir kompleks olan ksilan farklı bitki türlerinde yapısal olarak çeşitlilik göstermektedir. 1,4-bağlı  $\beta$ -D-ksilopiranozil ünitelerinin homopolimerik omurga zincirleri, glukuronopiranozil, 4-O-metil-D-glukuronopiranozil,  $\alpha$ -L-arabinofuranozil, asetil, feruloil veya p-kumaroil yan zincirler ile farklı derecelerde kompleks oluşturabilmektedir (Motta ve ark., 2013). Ksilan, yıllık bitkilerin yanı sıra, kapalı tohumlulardan (hücre duvar içeriğinin %15-30) sert ağaçlarda (meşe gibi) ve açık tohumlulardan (%7-10) yumuşak ağaçlarda büyük miktarlarda çeşitli doku ve hücre tiplerinde bulunmaktadır. Çim ve yıllık bitkilerde tipik olarak arabinoksilanlar olarak bulunan ksilan sert ağaçlarda O-asetil-4-O-metilglukuronoksilan; yumuşak ağaçlarda ise arabino-4-O-metilglukuronoksilan olarak mevcuttur (Motta ve ark., 2013).

Ayrıca hasır otu, tütün ve bazı deniz alglerinde hem 1,3- $\beta$  hem de 1,4- $\beta$  bağlı ksilopiranosil rezidüleri içeren lineer ksilanlar rapor edilmiştir. Bitki orjinlerinin diğer polisakaritlerine benzer, ksilan polimolekülerite ve poliçeşitliliğe sahiptir. Ksilanlarda polimerizasyon derecesi, örneğin sırasıyla 150-200 ve 70-130  $\beta$ -ksilopiranoz rezidüleri içeren sert ve yumuşak ağaçlarda değişkenlik göstermektedir (Motta ve ark., 2013).

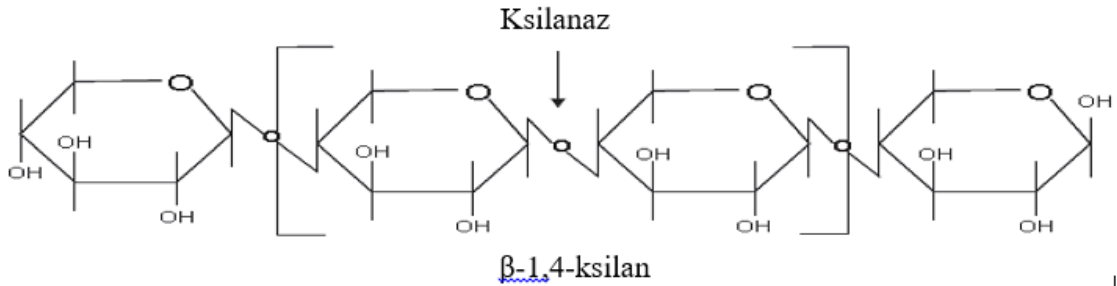
Omurgada bulunan genel yer değiştiricilere bağlı olarak, ksilanlar doğrusal homoksilan, arabinoksilan, glukuronoksilan veya glukuronoarabinoksilan olarak kategorize edilmektedir. Sadece ksilozil rezidülerini içeren homoksilanlar, doğada yaygın olmamakla birlikte, hasırotu, tütün sapları ve guar tohum kabuğu gibi sınırlı kaynaklardan izole edilebilmektedir. Bununla birlikte, içeriğinin doğasına bağlı olarak ksilan molekülleri arasında geniş bir ayırım yapılabilmektedir. Ksilanların dört temel ailesi öngörülmektedir (Motta ve ark., 2013).

1. Sadece tek bir terminal birim  $\alpha$ -L-arabinofuranozil yan zincirlerine sahip olan arabinoksilanlar. Tahılların özel durumlarında, **arabinoksilanlar** ya 2-O- ya da 3-O-mono-veya çift (2-O, 3-O-) ksilozil rezidüleri ile arabinosil içerik derecesinde değişkenlik gösterir.



2. **Glukuronoksilanlar**,  $\alpha$ -D-glukuronik asit veya bunun 4-O-metil eter türevi içeren tek bileşeni temsil eder.
3. **Glukuronoarabinoksilanda**,  $\alpha$ -D-glukuronik (ve 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukuronik) asit ve  $\alpha$ -L-arabinozun her ikisi de mevcuttur.
4. Ksilanların kompleks oligosakkarit yan zincirlerinde terminal  $\beta$ -D-galaktopiranozil rezidülerinin varlığı ile karakterize edilen **galaktoglukuronoarabinoksilanlar** ise, genellikle çok yıllık bitkilerde bulunur.

Her bir kategoride, bağların derecesi ve doğası bakımından mikroheterojenite mevcuttur. Yan zincirler, çözünürlük, fiziksel konformasyon ve diğer hemiselülozik bileşenlerle ksilan molekülünün reaktivitesini belirler ve dolayısıyla enzimatik yıkımda etkilemektedir (Motta ve ark., 2013).



**Şekil 1.1.** Ksilanın yapısı,  $\beta$ -1,4 bağlı ksilopiranozil rezidüleri (Butt ve ark., 2008).

#### 1.2.2. Ksilanın enzimatik hidrolizi

Bitki ksilanın heterojen ve karmaşık bir kimyasal yapısından dolayı, farklı özellikte ve aktivitede çeşitli hidrolitik enzimlerin kompleksi ile tamamen yıkım söz konusudur. Ksilanolitik enzim sistemi, endoksilanaz (endo-1,4  $\beta$ -ksilanaz, E.C.3.2.1.8),  $\beta$ -ksilozidaz (ksilan-1,4  $\beta$ -ksilozidaz, E.C.3.2.1.37),  $\alpha$ -glukuronidaz (E.C.3.2.1.139),  $\alpha$ -arabinofuranozidaz ( $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz, E.C.3.2.1.55), ve asetilksilan esteraz (E.C.3.1.1.72) enzimlerinden oluşmaktadır. Bu enzimlerin hepsi ksilanı oluşturan şekerlere dönüştürmek için işbirliği ile aktivite gösterir (Motta ve ark., 2013). (Şekil 1.2).

Ksilanazlar arasındaki en önemli enzim, glikozidik bağlar ile direkt etkileşime giren endoksilanazlar olup, kısa ksilooligosakkaritleri serbest bırakırlar. Büyük moleküler ağırlığa sahip ksilan, hücre duvarına nüfus edemez. Bu sebeple, ksilanaz biyosentezinin regülasyonundaki anahtar nokta, düşük moleküler ağırlıktaki ksilan fragmentelerinin

varlığıdır. Bu fragmentler ksiloz, ksilobioz, ksilooligosakkaritler, ksilozun heterodisakkaritleri ve glukozu içermektedir (Motta ve ark., 2013). Ksilanazlar, ksilanın ksilooligosakkaritlere rastgele hidrolizini katalize eder; buna karşın  $\beta$ -ksilodaz, ksilooligosakkaritlerin indirgenmeyen uçlarından ksiloz rezidülerini serbest bırakır. Bununla birlikte, tam bir bozunma, ksilanın  $\beta$ -1,4-bağlı D-ksiloz omurgasından asetil gruplarını kaldırmak için asetil esterazın sinerjik etkisini gerektirir (Motta ve ark., 2013).

### 1.2.3. Ksilanazlar

Glikozid hidrolaz üyeleri olan ksilanazlar, ksilozidlerin ( $\beta$ -1,4) glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyerek, bir şeker hemiasetal ve serbest aglikon (bir hidrojen atomu ile glikozidin yer değiştirmesinde sonra kalan şekerleşmiş bileşik) oluşumuna yol açan enzimlerdir. Ksilanazlar moleküler ağırlık ve izoelektrik nokta (pI), kristal yapı ve kinetik özellikler veya substrat özgüllüğü ve ürün profili temeline dayanarak en az üç şekilde sınıflandırılmıştır (Motta ve ark., 2013). Ksilanazlar tek zincirli glikoproteinler olup, genel olarak moleküler ağırlığı 6-80 kDa olup 40 ve 60°C sıcaklıklarda; pH 4.5-6.5 arasında aktivite gösteren enzimlerdir (Butt ve ark., 2008).

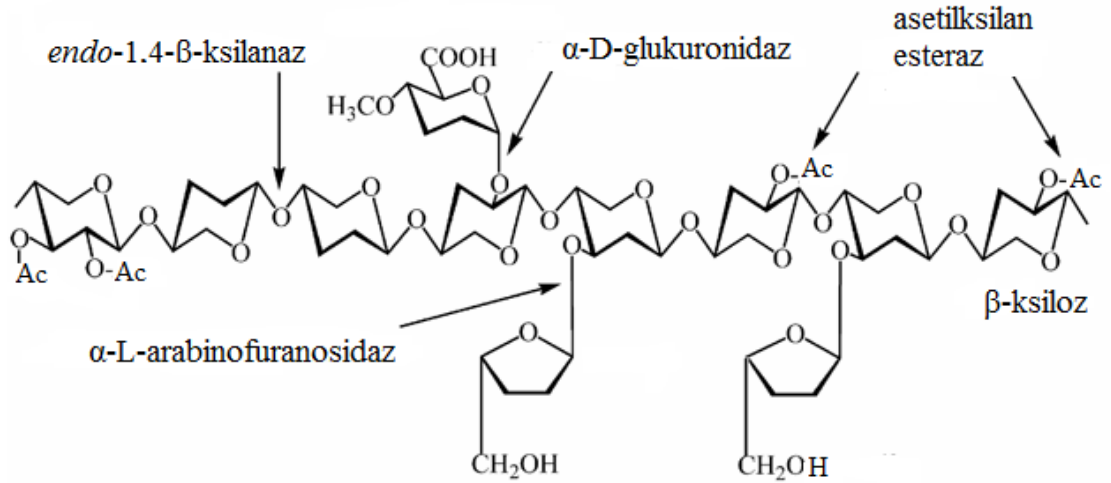
Tüm ksilanazları tanımlamada ilk sınıflandırma yeterli olmadığından, birkaç istisna tanımlanmıştır. Çünkü tüm ksilanazlar yüksek molekül ağırlığa (30 kDa'nın üstünde) ve düşük pI veya düşük moleküler kütlesi (30 kDa 'dan az) ve yüksek pI'ye sahip değildir. Bu nedenle, birincil yapı ve katalitik alanların karşılaştırılmasına dayalı sistem, hem yapısal hem de mekaniksel özellikleri analiz edebilmektedir (Motta ve ark., 2013).

Glikozid hidrolaz temelli sekans sınıflandırılması, ksilanazı GH10 ve GH11 olmak üzere iki aileye yerleştirmektedir. Fakat ksilanazlar, GH5, 7, 8 ve 43 gibi diğer glikozid hidrolaz ailelerinde yer alabilmektedir. Bitki, mantar ve bakteriyel enzimler GH10 ailesini oluşturmakta, oysaki GH11 ailesi yapısal olarak ilgisiz yalnızca mantar ve bakteriyel enzimleri içermektedir (Chakdar ve ark., 2016). GH10 ailesi hem endo-1,4- $\beta$ -ksilanazlardan hem de endo-1,3- $\beta$ -ksilanazlardan oluşmaktadır (çoğunlukla endo-1,4- $\beta$ -ksilanazlardan; az miktarda endo-1,3- $\beta$ -ksilanazlar). Karışık zincirli ksilanda, GH10 ksilanazlar, öncelikle  $\beta$ -1,4 bağlarına hücum eder ancak takip eden  $\beta$ -1,3 bağlarına hemen etki edemez. GH10 ksilanazlar,  $\beta$ -1,4 bağları ile her iki bölgede çevrelenen  $\beta$ -1,3 bağlarına saldırabilir. Ksilanazların bu ailesi bir veya iki ardışık ksiloz rezidülerinin

substrattaki glikoz rezidüleri ile yer değiştirilmesini tolere edebilir. Bu ailenin üyeleri, aglikonik bağda ksil-ksilotrioz'un aril  $\beta$ -glikozidlerini hdirolize edebilmektedir. Ayrıca bu enzimler, kısa ksilooligosakkaritler üzerinde yüksek aktivite göstermezi, küçük substrat bağlanma bölgelerine işaret etmektedir. Kristal yapının analizleri, ksilooligosakkaritler üzerindeki katalitik aktivite ve son ürünler GH10 ksilanazların tipi olarak dört veya beş substrat bağlanma bölgeleri sahip olduğunu göstermektedir (Chakdar ve ark., 2016).

GH10 ksilanazların çoğu tipik olarak yüksek moleküler ağırlıkta ve düşük izoelektrik noktasına sahiptir. GH11 üyeleri monospesifiktir, sadece iç  $\beta$ -1,4-ksilozidik bağları parçalayan gerçek endo- $\beta$ -1,4-ksilanazlardan oluşur. Katalitik yönlülüğü, GH10 üyelerinden daha düşüktür ve aktivitelerinin ürünleri GH10 enzimleri tarafından hidrolize edilebilir. Bunlar, D-ksiloz içeren substratlara karşı özel aktiviteleri nedeniyle "gerçek ksilanazlar" olarak ifade edilmektedir. Bu ailenin üyeleri düşük moleküler ağırlık, yüksek izoelektrik nokta ve 2'den 11'e kadar değişen geniş pH aralığı ile karakterize edilmektedir (Chakdar ve ark., 2016).

GH10 ksilanazlar gibi, bu enzimler aglikonik bağda ksilobiyoz ve ksilotriozun aril  $\beta$ -glikozidlerini hidrolize edebilir, ancak GH10'un tersine selüloz veya aril  $\beta$ -D-selobiozidleri parçalayamazlar. GH11, tercihen dallanmış ksilozun yanındaki indirgeyici olmayan uca doğru ksilozidik bağa saldırıramaz, tercihen omurganın selülozik bölgelerine etki eder. Öbakteriler ve diğer domianlar arasında evrimleşme öncesinde GH11 ksilanaz ailesinin olası bir duplikasyonu anlamını taşımaktadır. GH10 ve GH11 ksilanaz aileleri lignoselülozik fibrillerde glukoronoksilanların depolimerizasyonu boyunca aktivite göstermektedir (Chakdar ve ark., 2016).



Şekil 1.2. Ksilanın hidrolizini katalizleyen ksilanolitik enzimler (Sarı, 2016).

### 1.3. Ksilanaz Üretici Mikroorganizmalar

Ksilanazlar mantar, bakteri, maya, deniz algleri, protozoa, salyangoz, kabuklular, böcek ve btiki tohumlarından üretilmektedir. Ksilanaz üretici bakteriyel genuslar: *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* ve *Rhodothermus* olarak rapor edilmiştir *Actinomycetes*'ler arasında *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nonomuraea*'larda ksilanaz üreticisidir (Chakdar ve ark., 2016).

Mikrobiyal ksilanazlar, yüksek özgünlükleri, hafif reaksiyon koşulları, önemsiz substrat kaybı ve yan ürün üretimi nedeniyle ksilan hidrolizi için tercih edilen katalizörlerdir. Termostabil, soğuk adaptasyonu veya alkali kararlılıkta ksilanazlar çoğu bakteri gruplarında karakterize edilmiştir (Motta ve ark., 2013; Chakdar ve ark., 2016). Bakteriler arasında, *Bacillus*'lar potansiyel ksilanaz üreticisi olarak belirlenmiştir: *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, ve *B. halodurans*'ın ksilanolitik aktiviteleri rapor edilmiştir. 60-70°C kadar yüksek sıcaklıklarda aktif termostabil ksilanazlar, *Bacillus* spp., *Stenotrophomonas maltophila*, *Rhodothermus marinus*, *Thermotoga* spp., *Clostridium thermocellum* ve *Streptomyces* spp.'den rapor edilmiştir. *Geobacillus thermoleovorans*, *Streptomyces* spp., *Actinomadura* spp., ve *Saccharopolyspora patunthaniensis*, organizmaları 65-90°C arasında aktivite gösteren ksilanazlar üretmektedir. *Thermotoga* spp. tarafından üretilen ksilanaz 100 ile 105°C arasında aktivite göstermektedir. Bakteriler, ksilanaz üretimi için mantarlara göre avantajlıdır, çünkü bakteri ksilanazları için optimum pH nötral veya

alkali aralıkta, fungal ksilanazlar için asidik aralıktadır. Mantarların gelişim için düşük pH gereksinimi ve fungal ksilanazların üretiminin ek basamaklar gerektirmesi, fungal ksilanazların daha az aktif olduğuna işaret etmektedir (Chakdar ve ark., 2016).

**Çizelge 1.1.** Farklı mikroorganizmalardan üretilen bazı ksilanazların özellikleri (Butt ve ark., 2008; Ören 2014, Chakdar ve ark., 2016).

Mikroorganizma	Moleküler kütle /kDa	Optimum pH	Optimum Sıcaklık/°C	Referans
<i>Acrophialophora nainiana</i>	22	7.0	55	(M.A. Martínez ve ark., 1998)
<i>Aspergillus awamori</i>	39	5.5-6.0	40-55	(R.J. Ridgwell ve ark., 2001)
<i>Aspergillus nidulans</i>	34	6.0	56	(B.C. Salles ve ark., 2001)
<i>Aspergillus nidulans</i>	39	8.0	55	(F.J.M.Kormelink ve ark., 1993)
<i>Bacillus sp. TAR-1</i>	35	9.0	80	(M.T.Fernández ve ark., 1994)
<i>Bacillus sp. NG-27</i>	32	8.5	70	(K. Taneja ve ark., 2002)
<i>Bacillus sp. 42 M1</i>	38	9.0	80	(N. Kitamoto ve ark., 1999)
<i>Bacillus sp. AR 009</i>	42	10.0	90	(I. Kimura ve ark., 1995)
<i>Bacillus sp. SN5</i>	44	7.0	40	(Bai ve ark., 2012 )
<i>Bacillus sp. SV</i>	53	6.5	50	(Mittal ve ark., 2012 )
<i>Bacillus sp. GRE7</i>	50	7.0	70	(Kiddinamoorthy ve ark., 2008 )
<i>Bacillus sp.</i>	36	9.0	45	(Annamalai ve ark., 2009 )
<i>Myceliophthora sp.</i>	53	6.0	70	(N.B. Ghanen ve ark., 2000)
<i>Penicillium capsulatum</i>	22	6.0-7.0	48	(M. Ghareib ve ark., 1992)
<i>Streptomyces sp.</i>	24.5	6.0-8.0	55-60	(B.S. Chadha ve ark., 2004)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	24	6.0-6.5	70	(S.E. Ryan ve ark., 2003)
<i>Trichoderma harzianum</i>	37	5.0-6.0	45	(J. Georis ve ark., 2000)
<i>Trichoderma viride</i>	22	5.0	53	(S. Singh ve ark., 2000)

### 1.3.1. Bakteriyel ve mantar kaynaklı ksilanazların karşılaştırılması

Bakteriyel ksilanazlarının çoğu GH10 ailesine aitken, fungal ksilanazlar büyük oranda GH11 ailesinin üyesidir. Bakteri ve mantarlardan elde edilen endoksilanazlar, 8.5 ve 85 kDa arasında değişen molekül ağırlığı ve 4.0 ve 10.3 arasında değişen izoelektrik noktası (pI) ile tek altbirimli protein yapıları göstermektedir. Bakteri ve fungal ksilanazların yapısal karşılaştırıldığında, ikincil yapılarındaki özellikle ilmek bölgesinde farklılık belirlenmiştir. *Bacillus circulans* ve *B. subtilis* esas olarak  $\beta$ -tabaka ikincil yapısına sahipken fungal ksilanaz, özellikle *Aspergillus niger*, alfa heliks sahiptir ve her ikisi de sınıf GH11'e ait olmasına rağmen çeşitli döngü bölgelerinde farklılık gösterirler (Chakdar ve ark., 2016).

Hem fungal hem de bakteriyel ksilanazlarda bulunan ortak nokta, pozisyonların değişebilmesine rağmen nükleofil ve proton vericinin daima glutamik asit olmasıdır. Fungal ksilanazlar, selülaazla eşzamanlı olarak üretilir ve ticari proses zamanında uzamaya sebep olurken, bakterilerde ksilanaz çoğunlukla tek başına üretilir ve böylece işlem süresi azalır. Mantarların gelişmesi ve selülaaz üretimi için düşük pH ihtiyacı, ticari fungal ksilanazların eldesinde ek basamakların gereksinimine neden olmaktadır. Mantar kaynaklı ksilanazların 50°C ve pH 4-6 arasında aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Chakdar ve ark., 2016).

### 1.4. Ksilanazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Bakteriyel ksilanazlarının çoğu alkali ve/veya termostabil olup selülaaz aktivitesinden yoksundur. Bu özellikler onları endüstriyel uygulamalar için ideal bir aday yapmaktadır. Üretim teknolojilerinin içeren bakteriyel ksilanazlar, çeşitli uygulamalar için patentlenmiştir ve dünya çapında çok sayıda ticari uygulama için pazarlanmaktadır (Chakdar ve ark., 2016). Çizelge 1.2'de ksilanazların kullanım alanları verilmiştir.

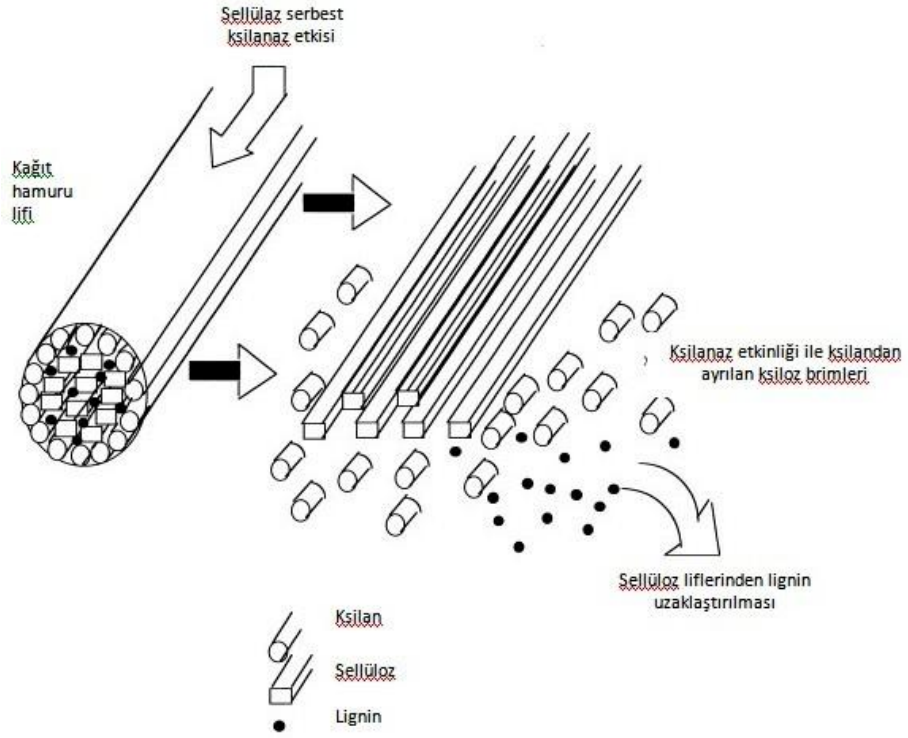
**Çizelge 1.2.** Ksilanazların kullanım alanları (Altun, 2012).

FONKSİYONU	KULLANIM ALANI	ENDÜSTRİSİ
Kâğıt imalatı esnasında klorin ve toksik disakkaritlerin kullanımlarının azaltılması	Kâğıt hamurunun ağartılması	Kâğıt ve kâğıt hamuru üretimi
Enzimatik yüzey düzleştirimi	Keten, kendir, jüt ve rami işlenmesi	Tekstil
Meyve suları viskozitesini	Meyve ve sebze suyu,	Meyva ve sebze işleme

azaltıcı etkisi yanında yumuşatma özelliği ile kaliteyi artırır.	Nektar ve pürele eldesi ile bitkisel yağ, şarap imalatı	süreçleri, demleme, şarap imalatı
Hamur elastikiyetini ve dayanıklılığını artırır.	Hamur ve pastacılık ürünleri	Fırıncılık
Çöp arıtımı, fermente edilebilen ürünlerin üretimi, yenilenebilir bioetanol ve zararsız kimyasalların üretimi	Tarımsal, evsel ve endüstriyel atıkların çevreye zararsızlaştırılması	Biyodönüşüm
Alkali kullanımının azaltılması	Ligninden ve ekstrakt maddelerden kaynaklanan biyolekelerin yok edilmesi	Kağıt ve kağıt hamuru üretimi
Gluten topaklanması işlemi	Nişasta gluten ayırımı	Nişasta

#### 1.4.1. Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisi

Selüloz fibrillerini korumak için selülozik enzimler içermeyen, hamurların biyolojik ağartılması için, yüksek sıcaklıklarda ve alkalın pH'da aktif bakteriyel ksilanazlar kullanılmaktadır. Herhangi bir selülaz aktivitesi, selüloz kaybı, bozulmuş hamur kalitesi ve artmış atık arıtım maliyeti açısından ciddi ekonomik etkilere sebep olmaktadır. Birçok bakteriyel ksilanaz hem selüloz hem de çözünmez ksilana bağlanır, ancak enzim sadece ksilana karşı aktivite gösterir. Dolayısıyla mantar kökenli ksilanazlar, bakteriyel enzimlere kıyasla belirli bir yük için daha az hemiselüloz giderme etkinliğine sahiptir. Ksilanazın kullanımı, hamurun ağartılması için önemli ölçüde klor miktarını azaltmaktadır. *B. pumilus* ASH5'den elde edilen ksilanaz kullanarak ökaliptüs ambalaj hamurunun biyolojik ağartılmasında klor ve klor dioksit içeriğinde %10-20 arasında azalma kaydedilmiştir (Chakdar ve ark., 2016).



**Şekil 1.3.** Ksilanazın kağıt hamuru üzerindeki etki mekanizması (Techapun ve ark., 2003).

#### 1.4.2. Hayvan yemi

Ksilanazlar, hayvan yemlerinin sindirilebilirliğini artırmak için kullanılır. Mısır ve sorgum gibi bazı tahıllardaki düşük viskozite yem olarak verilen kullanılamaz arabinoksilan içeriğe katkı sağlamaktadır. Yemlere ksilanaz eklenmesi, daha iyi enerji kullanımı ile sonuçlanan besinlerin sindirim sisteminin ilk bölümünde sindirimi kolaylaştırır. *Acidothermus cellulolyticus*'dan elde edilen endoksilanazlar kullanılarak yem dönüşüm oranının (FCR) azaltılması ile kanatlı hayvanlar için hububat yemlerinin daha iyi sindirildiği rapor edilmiştir. Genel olarak, hayvan yemlerinin farklı enzimlerin kombinasyonu ile muamelesi olumlu sonuçlara yol açmaktadır. Fitaz, ksilanaz ve  $\beta$ -glukanazın kombinasyonu takviye edilen buğday diyetleri etđi civcivlerin performansını geliştirdiği belirlenmiştir. Geliştirilmiş performans, sindirim viskozitesinin azaltılması, metabolik enerjinin artması, göreceli ağırlığın azaltılması ve ince bağırsağın uzunluğu ile ilişkilendirilmiştir (Chakdar ve ark., 2016).



#### 1.4.3. Fırın endüstrisi

Arabinoksilanlar gibi hemiselülozlerin buğdayda bulunması, fırın endüstrisinin ana hammaddesi olması, kaliteli hamur yapımında ciddi kısıtlamalar getirmektedir. Ksilanazların, ekstrakte edilemeyen arabinoksilanları suda çözebilme kabiliyeti ve çözülmüş arabinoksilan üzerinde düşük aktivitesi, ekmek yapımında daha iyi bir performans ile sonuçlanmaktadır. Bakteriye ksilanazların bu aktivitesi, özellikle hamurun viskozitesini artırır ve gluten aglomerasyonunda olumsuz bir etkiye sebep olur. Ksilanaz suda çözünmeyen hemiselülozu hamurda suya bağlayan çözünür forma dönüştürür, bu nedenle hamur sıkılığını azaltır, hacim artar ve daha ince ve daha düzgün kırıntılar yaratır (Butt ve ark., 2008).

**Çizelge 1.5.** Farklı kaynaklardan ksilanazların eklenmesiyle nihai ekmek hacmindeki artış (Butt ve ark., 2008).

<b>Mikroorganizma/Kaynak</b>	<b>%Artırmak</b>	<b>Dozaj</b>
<i>Bacillus circulans</i> W-12	55	12000 U/kg un
<i>Bacillus polymyxa</i> CECT 153	33	500 U/kg un
<i>Bacillus spp.</i> NG-27	40	25 ppm
<i>Commercial preparation</i>	29	14600 U/kg
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	41.1	40 ppm
<i>Thermotoga maritima</i>	40.3	120 ppm

#### 1.4.4. Biyoyakıt üretimi

Bol miktarda lignoselülozik bitki biyokütlesinin biyoyakıtlara dönüştürülmesi, enerji güvenliğini artırmak ve sera emisyonlarını azaltmak için uygun bir seçenek sunmaktadır. En büyük kısıtlamalardan biri, çoğunlukla lignin, selüloz ve hemiselülozlar gibi lignoselülozik materyallerden oluşan bitki hücresi duvarının inatçı doğasıdır. Ksilanazlar, selülaz ve lakkazlar gibi diğer hidrolitik enzimlerle birlikte, lignoselülozik biyokütleden etanol gibi biyoyakıtların üretilmesi için kullanılabilir. Bakteriler, termostabil ksilanazların zengin bir kaynağıdır ve lignoselüloz hidrolizi için genellikle tercih edilirler. Bakteriye ksilanazların termostabilitesi, lignoselülozun fermente edilebilir ürünlere dekonstrüksiyon sırasında gerekli olan sert işleme koşulları için uygun hale getirir. Enzimatik sakarifikasyon sırasında ksilanazların takviyesi, yüksek biyoetanol üretimi ile sonuçlanan indirgen şekerlerin mevcudiyetini arttırmaktadır (Chakdar ve ark., 2016).

#### 1.4.5. Atık kâğıtlardan mürekkep arındırılması

Atık kağıdın geri dönüştürülmesindeki önemli adımlardan biri, mürekkep parçacıklarının kâğıttan çıkarılmasını içeren proseslerdir. Geleneksel olarak, büyük miktarda klor, klor bazlı türevleri, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, sodyum silikat, hidrojen peroksit, hipokloritler ve şelatlama ajanları kullanılmaktadır ve bu da çevereye tehlikeli atıkların atılması problemine neden olmaktadır. Son zamanlarda, ksilanaz ve lakkaz enzimlerinin, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi kaynaklı atıklardan mürekkebi kaldırmak için kullanıldığı rapor edilmiştir. Kombine işlem sonucunda parlaklık (%11.8), beyazlık (%39) ve kırılma uzunluğu (%34.8), patlama faktörü (%2.77) gibi fiziksel özelliklerde artma gösterilmiştir. Ksilanaz ve lakkaz arasındaki sinerji, fiziksel özelliklerini olumlu yönde etkilemektedir; buna karşın kimyasal işlem, geri dönüştürülmüş kağıdın sertlik ve serbestliğini düşürmektedir (Chakdar ve ark., 2016).

#### 1.4.6. İlaç sanayii

Ksilooligosakkaritler olarak bilinen ksilanın hidrolitik ürünleri,  $\beta$ -1,4 ksiloz rezidüleri tarafından oluşturulan oligosakaridlerin karışımlarıdır. Ksiloz rezidülerinin sayısına dayanarak, bunlar ksilobioz, ksilotiroz, ksilotetroz ve diğerleri olarak bilinirler. Ksilobioz, probiyotik olarak gıda uygulaması için ideal ksilooligosakkarittir. Ksilooligosakkaritlerin üretimi için enzim kompleksinin, ksilooligosakkaritlerin üretimi üzerinde engelleyici etkilere sahip yüksek miktarda ksiloz üretimini önlemek için düşük eksoksilanaz veya  $\beta$ -ksilosidaz etkinliği olmalıdır (Chakdar ve ark., 2016).

### 1.5. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikleri

Çomak şekilli endospor oluşturan *Bacillus*'lar olup düşük GC içerikli Gr pozitif bakteriler olan Firmicutes'leri üyesidir. *Bacillus* cinsleri ilk olarak Ferdinand Cohn tarafından 1872'de tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Büyük bir genetik çeşitlilikle birlikte çoğunun patojenik olmadığı düşünülen 60'dan fazla tür ile temsil edilmektedir. *Bacillus* türleri 16S rRNA filogenisi veya fenotipik özelliklere göre beş veya altı gruba ayrılabilir. *Bacillus* cinsleri bilim dünyasının ilgisini çeken tür çeşitlerini içermektedir. Bu ya (1) biyoteknolojik ürünlerin (böcek toksinleri, peptit antibiyotikler, deterjanlar için enzimler) yapımı gibi endüstriyel uygulamalar, ya da (2) bakteriyel hücresel farklılıkların çalışılması için model bir sistem olarak spor gelişimi ve

dekontamine ajanlar veya muamelelere karşı direnç, (3) belli türlerin insan patojeni olmasından ileri gelmektedir (Weidmann ve Zhang, 2011). Optimum gelişim sıcaklıklarına bakıldığında, cinsin üyeleri -5°C'den 75°C'ye kadar geniş sıcaklıklarda; 2-11 gibi geniş bir pH aralığında gelişimlerini sürdürmektedir (Lin, 1997). Çevre koşullarına karşı geniş tolerans ile endüstriyel değere sahip biyoteknolojik ürünlerin eldesinde bilim insanlarının en çok çalışma yaptığı türleri içermektedir.

Bu sebeple çalışmamızda, ksilanaz üretici yabani tip *Bacillus* spp. suşlarının izolasyonu, sıvı fermantasyon ortamından ekstraselüler enzim saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

### 1.6. Kaynak Özetleri

Gupta ve Kar (2009), termofilik bir *Bacillus* suşu kullanarak ksilozun, ksilanaz üretimi üzerindeki etkileri karbon kaynağı olarak mısır koçanı ve buğday kepeği içeren kat faz fermantasyonu ve batık kültür fermentasyonunda incelenmiştir. Fermentasyon ortamı ya maya özütü yada mineral tuz çözeltisi ile desteklenmiştir. Katı faz fermantasyon koşullarında mineral tuz çözeltisi ile desteklenmiş buğday kepeği içeren ortamda ksilozun %44.01 oranında ksilanaz sentezini uyardığı belirlenmiştir. Ancak maya özütü desteklenmiş aynı koşullarda ise enzim aktivitesinin %12.89 azaldığı saptanmıştır. Hem maya özütü hem de mineral tuz çözeltisi ile desteklenen batık kültür fermantasyon koşullarında ise sırasıyla enzim üretimi %41.38 ve % 27.47 arttırıldığı ortaya konmuştur.

Roy ve Rowshanul (2009), Rajshahi Üniversitesi kampüsünün farklı alanlarından aldıkları toprak numunelerinden 12 *Bacillus* spp. izole etmiş ve suşların ksilanaz aktivitelerini araştırmışlardır. *Bacillus cereus* olarak tiplendirilen suşdan elde edilen kültür süpernatantını kullanarak amonyum sülfat presipitasyonu, DEAE-sefaroze, Fenil-5PW ve Hidroksiyapatit kolon kromatografisi kombinasyonu ile ksilanaz saflaştırılmıştır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 40°C ve 6.0 olarak belirlenmiştir. Ksilanazın ortalama moleküler ağırlığı 32 kDa olan tek bir band ile karakterize edilmiştir.

Bajaj ve Manhas (2012), karbon ve nitrojen kaynağı olarak tarımsal atıkları kullanarak *Bacillus licheniformis* P11(C) bakteriyel izolattan amonyum sülfat presipitasyonu ve DEAE-sefaroze kromatografisi kullanılarak saflaştırdıkları ksilanaz enziminin, pH 5-11

ve 40-100°C aralığında aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. SDS-PAGE ve zimogram analizlerinde 17.5 ve 23 kDa ağırlığında ksilanaza ait iki protein bandı saptanmıştır.

Kamble ve Jadhaw (2012), *Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 suşuna benzer yeni termoalkalofilik *Bacillus* türünden, karbon kaynağı olarak buğday kepeği kullanarak katı faz fermantasyon koşullarında ekstraselüler ksilanaz üretimini amaçlamıştır. Amonyum sülfat saflaştırılması ve iyon değişim kromatografisi kullanarak saflaştırdıkları ksilanazın, ortalama moleküler ağırlığı 29.8 kDa olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla, 50°C ve 8.0 olarak belirlenmiştir.

Maity ve ark. (2012), enzim temelli teknolojiler ile kağıt atıklarının geri dönüşümü prosesleri için, *Bacillus* sp. CKBx1D suşundan saflaştırılan ksilanaz enzimini kullanmayı amaçlamışlardır. Batık kültür fermantasyon koşullarında, 36 saatlik inkübasyon sonunda 480 U/mL aktivite belirlemişlerdir. 35.28, 28.63 ve 18.94 kDa ağırlığında üç izomerden oluşan ksilanaz sistemini saptamışlardır. Çalkalamalı koşullarda 35°C ve pH 6.8'de, 47.2 saatlik inkübasyonda en iyi mürekkep giderme aktivitesini gösterdiği ortaya konmuştur.

Ho ve Heng (2015) tarafından *B. subtilis* ATCC 6633 suşu buğday kepeği, pirinç kepeği, hurma çekirdeği, arpa kabuğu, mısır koçanı, talaş ve ananas kabuğu içeren karbon kaynağı olarak tarımsal özütler ile desteklenmiş optimize gelişim koşullarında, en yüksek ksilanaz aktivite, buğday kepeği ve soya kabuğu varlığında 48 saatlik inkübasyonu takiben  $11.968 \pm 1.419$  U/mL olarak hesaplanmıştır.

Irfan ve ark. (2016), batık fermantasyon prosesleri kullanarak sürecinde *Bacillus* türlerinden ksilanaz üretimi için kültürel ve beslenme koşullarını optimize etmişlerdir. 250 mL'lik şişelerde ve çalkalamalı koşullarda (140 rpm) sürdürülen başlangıç pH'sı 8, %2 inokülüm ve substrat konsantrasyonunda 35 C'de 48 saatlik fermantasyon sonucu *Bacillus subtilis*'ten en yüksek ksilanaz üretimini gerçekleştirmişlerdir. Sükroz,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ve peptonun bir karbon ve azot kaynağı olarak eklenmesi ile de enzim üretiminin arttığını rapor etmişlerdir. *Bacillus megaterium* suşu için ise, aynı başlangıç pH'da %1,5 inokülüm ve substrat konsantrasyonunda 40 C'de 72 saatlik fermantasyon sonucu en yüksek ksilanaz üretimi saptanmıştır.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. Materyal

Bu çalışmada ksilanaz üretici *Bacillus* cinsi bakteriler aseptik koşullarda alınan Kilis toprak örneklerinden izole edilmiştir. Bu tezde enzim üreten suşlarının belirlenmesi, izolasyonu, tanımlanması, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmalarında, çeşitli besiyerleri, tampon çözeltiler, ve pH metre (Starter 3000), steril kabin (Class 2), su banyosu (JSWB-22T), yağ banyosu, UV/VIS spektrofotometre (TETRA) otoklav (JSAC-40), etüv (JSOF-050), çalkalamalı inkübatör (JSSI-200C), santrifüj (MİKRO 220R), ışık mikroskobu (Leica), SDS-PAGE (CLEAVER-CVS10) cihazı ile temel laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

#### 2.1.1. Kullanılan besiyerleri

##### 2.1.1.1. Ksilanaz aktivite besiyeri

Katı besiyerinde ksilanaz aktivitesi gösteren mikroorganizmaların belirlenmesi için kullanılmıştır (Mahilrajan ve ark., 2012).

#### **Çizelge 2.1.** Ksilanaz aktivite besiyeri içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
Nutrient agar	28
Ksilan	20

Yukarıda belirtilen besiyeri bileşimi distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.0 ayarlanıp otoklavda 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edilmiştir.

##### 2.1.1.2. Nutrient agar besiyeri

*Bacillus* suşlarının izolasyonu ve ksilanaz aktivitesi gösteren mikroorganizmanın stoklanması için kullanılmıştır.

#### **Çizelge 2.2.** Nutrient agar içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
Et peptonu	5
Et özütü	3
Agar	15

Yukarıda verilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı  $7.0 \pm 0.2$ 'ye ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### 2.1.1.3. Kongo kırmızı içeren sıvı besiyeri

Sıvı besi ortamında bakterilerin ksilanaz aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır (İnce, 2006).

**Çizelge 2.3.** Kongo kırmızısı içeren sıvı besiyeri içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
NaCl	5
Maya özütü	5
Tripton	5
Ksilan	5
Kongo kırmızısı	0.125-0.150

Yukarıda belirtilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.0'a ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### 2.1.1.4. Enzim fermantasyon ortamı

Sıvı besi ortamında ksilanaz üretimi için kullanılmıştır (Mahilrajan ve ark., 2012).

**Çizelge 2.4.** Enzim üretim ortamı içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1
NaCl	0.1
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{FeCl}_3$	0.005
Maya özütü	2.5
Pepton	2
Ksilan	20

Yukarıda belirtilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı 7.0'a ayarlanıp otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### 2.1.1.5. Leura-Bertani besiyeri

Stok kültürlerin hazırlanması aşamasında mikroorganizmanın aktifleştirilmesi için ve enzim üretim proseslerinde ön üretim ortamı olarak kullanılmıştır.

#### **Çizelge 2.5.** LB besiyeri içeriği

<b>Besiyeri içeriği (g/L)</b>	
NaCl	10
Maya özütü	5
Tripton	5
Agar	15

Yukarıda verilen besiyeri içeriği distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'sı  $7.5 \pm 0.22$ 'ye ayarlanıp otoklavda  $121^\circ\text{C}$ 'de 1.2 atm basınçta 15 dak steril edildikten sonra kullanılmıştır.

#### 2.1.2. Kullanılan çözeltiler

##### 2.1.2.1 Gram boyama için kullanılan çözeltiler

###### 2.1.2.1.1. Kristal viyole

Kristal viyole	0.5 g
Damıtık su	100 mL

###### 2.1.2.1.2. Sulu karbol fuksin (sulu fuksin)

Bazik fuksin	1 g
Saf su	1000 mL

Bu çözeltinin 10 mL'si 100 mL saf su ile sulandırılarak sulu fuksin hazırlanmıştır.

###### 2.1.2.1.3. Gramın iyodür çözeltisi

İyot	1 g
KI	2 g
Saf su	300 mL

#### 2.1.3. Enzim aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

##### 2.1.3.1. 0.2 M sodyum fosfat tamponu (pH:7.0)

0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltileri ayrı ayrı hazırlanarak sırasıyla 39 ve 61 mL karıştırılmış ve tamponun pH'sı 7.0'a ayarlanarak kullanılmıştır.

#### 2.1.3.2. DNS Çözeltisi

Reaksiyon ortamında oluşan indirgen şeker miktarı ile ölçülen enzim aktivitesi, tayininde kullanılan bu çözelti, 0.3 g DNS 15 mL saf suda çözünerek, üzerine öncelikle 9 g sodyum potasyum tartarat tetrahidrat yavaş yavaş ilave edilmiş, 6 mL 2N NaOH ve 9 mL saf su eklenmiştir. +4°C'de muhafaza edilen bu çözelti en çok 2 hafta saklanarak kullanılmıştır (Miller, 1959; İnce, 2006; Şentürk, 2013).

#### 2.1.3.3. Substrat çözeltisi

%1'lik olacak şekilde ksilan 0.2 M sodyum fosfat (pH 7.0) tamponunda çözündürülerek ısıtılmış, 2-3 dakika kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıyla karıştırılarak elde edilmiştir. Bu çözelti 4°C'da kullanılabilecek kadar depolanmıştır (İnce, 2006).

#### 2.1.4. Katı besiyerinde ksilanolitik aktivite için kullanılan ayıraçlar

##### 2.1.4.1. Kongo kırmızısı ayırıcı içeriği

1 g Kongo kırmızı 100 mL distile su içerisinde çözündürülerek kullanılmıştır (Sarı, 2016).

##### 2.1.4.2. Yıkama çözeltisi(NaCl)

1 g NaCl 100 mL distile su içerisinde çözündürülerek kullanılmıştır (Sarı, 2016).

#### 2.1.5. Protein miktarı analizinde kullanılan ayıraçlar

Total protein miktarı analizlerinde kullanılan ayıraçlar Lowry ve ark. (1951)'e göre hazırlanmıştır.

**Ayraç A:** 2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartılarak 0,1 N NaOH içinde çözünmesi ile %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlanmıştır.

**Ayraç B1:** 1 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O'ın 100 mL saf suda çözünmesi ile % 1'lik CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi hazırlanmıştır.



**Ayraç B2:** 2 g Na-K-Tartarat 100 mL saf suda çözünmesi ile % 2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlanmıştır.

**Ayraç C:** Kullanılmadan önce 50 hacim ayraç A+1 hacim eşit oranda karıştırılan ayraç B1 ve B2'nin karıştırılması ile hazırlanmıştır.

**Folin-Ciocalteu Çözeltisi:** 1'e 1,5 oranında saf su ile seyreltilerek kullanılmasından hemen önce hazırlanmıştır.

#### 2.1.6. SDS-PAGE elektroforez için kullanılan çözeltiler

##### 2.1.6.1. Solüsyon A (monomer (akrilamid/bis) çözeltisi)

29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid bir miktar distile suda çözündükten sonra son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Buzdolabında 4°C'de koyu renkli/kahverengi şişede saklanmıştır. Akrilamid nörotoksik bir madde olduğundan kullanırken eldiven ve maske takılmalıdır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

##### 2.1.6.2. Solüsyon B (4X)

75 mL 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 4 mL %10'luk SDS ve 21 mL distile su karışımından oluşur. Buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

##### 2.1.6.3. Solüsyon C (4X)

50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS ve 46 mL distile su karışımından oluşur. Buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

##### 2.1.6.4. %10 SDS

10 g SDS distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

##### 2.1.6.5. %10 Amonyum persülfat (AMPS)

SDS-PAGE jellerinin hazırlanmasında polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılmıştır. 0,5 g Amonyum Persülfat distile su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti kullanımdan hemen önce hazırlanmalıdır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

#### 2.1.6.6. TEMED (N, N, N', N'-tetramethylene-ethylenediamine)

Polimerizasyonun gerçekleşmesi için katalizör olarak kullanılmıştır.

#### 2.1.6.7. Örnek yükleme tamponu (62,5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %10 gliserol, 0,72 M 2-β-merkaptolanol, %0,05 bromfenol mavisi)

0,075 g Tris 5 mL distile suda çözüldükten sonra HCl ile pH 6.8'e ayarlanmış ve 0,2 g SDS, 1 mL gliserol, 0,0855 mL 2-β-merkaptolanol, 0,005 g bromfenol mavisi eklendikten sonra distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Kullanılacak hacimlere bölünerek derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

#### 2.1.6.8. Yürütme tamponu (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH 8.3)

3 g Tris, 14,4 g glisin, 1 g SDS tartıldıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Buzdolabında 4°C'de saklanmıştır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

#### 2.1.6.9. Coomassie Brilliant Blue R-250 boyama çözeltisi

SDS-PAGE jelinin elektroforez işleminden sonra boyanması ve protein bantlarının görünür hale gelmesi amacı ile kullanılmıştır. 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250 boyası 500 mL metanolde çözüldürüldükten sonra 100 mL asetik asit (glasiyel) eklenerek çözelti distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında (6 ay) saklanabilir (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

#### 2.1.5.10. Yıkama (bağlanmamış boyayı uzaklaştırma) çözeltisi

SDS-PAGE jelinin Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandıktan sonra jeldeki boya fazlalığının geri alınarak bantların netleşmesi amacı ile kullanılmıştır. 125 mL metanol, 175 mL asetik asit ve 2200 mL distile su karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 1 ay saklanabilir (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

#### 2.1.6. Diyaliz tüpü aktifleştirmek için tampon

%2 NaHCO<sub>3</sub> ve %0,5'lik EDTA içeren aktifleştirme tamponu diyaliz tüplerini aktifleştirmede kullanılmıştır. Aktifleştirilen tüpler %20'lik etenolde +4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

### 2.1.7. SDS-PAGE’nde zimogram analizi için kullanılan çözeltiler

**Renatürasyon Solüsyonu-1 (pH 7.5):** 10mM Tris, 5mM  $\beta$ -Merkaptoetanol ve %20 izopropanol karıştırılarak hazırlanmıştır.

**Renatürasyon Solüsyonu-2 (pH 7.5):** 50mM Tris, 5mM  $\beta$ -Merkaptoetanol ve 1mM EDTA karıştırılarak hazırlanmıştır.

**Renatürasyon Solüsyonu-3 (pH 6.8):** 50mM sodyum fosfat tamponu (Aygan, 2008).

### 2.1.8. pH Aktivitesi için kullanılan tamponlar

#### 2.1.8.1. Glisin HCl tamponu

Ksilanazın pH 2.4-2.8’deki aktivitesini saptamak amacıyla hazırlanmıştır. Tampon hazırlanmasında 0,2 M glisin çözeltisi(15.01 g/L), 0,2 M HCl çözeltisi ve distile su ile istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

**Çizelge 2.6.** Glisin tamponun bileşenleri

pH	0.2 M Glisin (mL)
2.4	16.2
2.8	8.4

#### 2.1.8.2. Sitrat tamponu

Ksilanazın pH 3.0-5.8 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,1 M sitrik asit çözeltisi (21,01 g/L), 0,1 M sodyum sitrat çözeltisi (29,41 g/L  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) ve distile su istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karşılaştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

**Çizelge 2.7.** Sitrik asit tampon çözeltisinin bileşenleri

pH	0.1 M Sitrik asit (mL)	0.1 M Sodyum sitrat (mL)
3.0	46.5	3.5
3.4	40	10
3.8	30	15
4.2	31.5	18.5
4.6	25.5	24.5
5.0	20.5	29.5
5.4	16	34
5.8	11.8	38.2

#### 2.1.8.3. Sitrat fosfat tamponu

Ksilanazın pH 6.2-6.6 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tampon hazırlanmasında 0,2 M sitrik asit (19.21 g/L), 0,2 M dibazik sodyum fosfat (53.65 g/L) çözeltisi ve distile su ile istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

**Çizelge 2.8.** Fosfat tamponu bileşenleri

pH	0,2 M Sitrik asit (mL)	0,2 M Dibazik sodyum fosfat (mL)
6.2	16.9	33.1
6.6	13.6	36.4

#### 2.1.8.4. Fosfat tamponu

Ksilanazın pH 7.0'daki aktivitesini saptamak amacıyla hazırlanmıştır. Tampon hazırlanmasında 0,2 M monobazik sodyum fosfat (27.8 g/L), dibazik sodyum fosfat çözeltisi (53.65 g/L) ve distile su ile istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

**Çizelge 2.9.** Fosfat tamponu bileşenleri.

pH	0,2 M Monobazik sodyum fosfat (mL)	0,2 M Dibazik sodyum fosfat (mL)
7.0	19.5	30.5

#### 2.1.8.5. Tris HCl tamponu

Ksilanazın pH 7.6-9.0 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,2 M Tris çözeltisi (24,2 g/L), 0,2 M HCl çözeltisi ve distile su ile istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda 2004).

**Çizelge 2.8.** Tris tampon çözeltisinin bileşenleri.

pH	0.2 M Tris (mL)
7.4	20.7
7.8	16.25
8.2	10.95
8.6	6.1
9.0	2.5

#### 2.1.8.6. Karbonat bikarbonat tamponu

Ksilanazın pH 9.2-10.7 aralığındaki aktivitesini saptamak amacıyla kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0,2 M susuz sodyum karbonat çözeltisi (21,01 g/L), 0,2 M sodyum bikarbonat çözeltisi (29,41 g/L) ve distile su istenilen pH değeri için aşağıda verilen oranlarda karıştırılarak tampon hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

**Çizelge 2.9.** Karbonat-Bikarbonat tampon çözeltilerinin bileşenleri

pH	0.2 M Susuz Sodyum Karbonat (mL)	0.2 M Sodyum Bikarbonat (mL)
9.4	4.75	20.25
9.8	21	14
10.2	16.5	8.5
10.6	21.25	3.75

#### 2.1.9. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) için kullanılan çözeltiler

Yürütücü sistem olarak n-butanol; etanol; distile su (5:3:2) (v/v/v)'dan oluşan tampon kullanılmış olup, TLC plakalarının boyanması için etanol içerisinde çözdürülmüş %50'lik sülfirik asit çözeltisi kullanılmıştır (Kamble ve Jadhav, 2012).

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Enzim üretici suşların izolasyonu için materyal toplama

Kilis 7 Aralık Üniversitesi kampüs çevresi toprağının üst yüzeyi temizlendikten sonra steril bir spatula ile yaklaşık 5 cm derinlikten 10'ar gram olacak şekilde toprak örneği alınmıştır. Alınan örnekler kullanılıncaya kadar +4°C'de cam steril şişerlerde muhafaza edilmiştir ve *Bacillus* spp. izolasyonu için materyal olarak değerlendirilmiştir.

### 2.2.2. *Bacillus* spp. izolasyonu

Toprak örneklerinden *Bacillus* spp. izole etmek için 1'er gr tartılarak, 9 ml steril saf suda çözünmesi sağlanmıştır. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında yaklaşık 5 dakika bekletilmiştir. Süspansiyon 65 °C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir. Seri dilüsyonlar hazırlanmış ve 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-5</sup> ve 10<sup>-8</sup> sulandırma katsayılarından 100 µL alınıp nutrient agar besiyerine yayma preparasyon şeklinde inoküle edilmiştir. 24-48 saat 37°C'de inkübe edilen petri plaklarından seçilen izolatlar Gr boyanma karakterleri yönünden test edilmiştir.

### 2.2.3. Gram boyama

1. Lamin her iki yüzeyi bunzen beki alevinden geçirilerek steril edilmiştir.
2. 24 saatlik taze bakteri kültüründen öze ile örnek alınarak bir damla saf su ile lam üzerine yayılan bakteri kültürünün havada kuruması sağlanmıştır. Örnek lamin üst yüzeyinde kalacak şekilde, lam 3 defa alevden geçirilerek fiziksel tesbit yapılmıştır.
3. Lam boya kabına konarak, kristal viyole ile 1 dakika boyanmıştır. Ve saf su ile yıkanmıştır.
5. Lam üzerinde kalan boya üzerine lugol (Gr iyodür) ilavesi yapılmış ve 1 dakika bekletilmiştir.
6. % 95' lik etil alkol ve saf su ile boya akmayıncaya kadar yıkama işlemi yapılmıştır.
7. Bu işlemden sonra lam üzerine zıt boya (sulu fuksin) dökülerek 30-60 saniye kadar bekletilmiştir. Boya dökülüp, lam yıkanarak kurulanır. Bir damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük yaş objektifte incelenmiştir.

### 2.2.4 Bakteri stoklanması

Gr boyanma karakteri açısından *Bacillus* spp. olduğu belirlenen suşlar enzim üretim çalışmalarında kullanılmak amacıyla muhafaza edilmiştir. LB brothda 37°C'de geliştirilmiş 1 gecelik taze kültürlerden örnek alınarak, toplam hacmin %30'u steril gliserol olan steril ependorf tüplerine eklenip -20°C'de saklanmıştır. Yanısıra suşlar Nutrient Agar içeren tüplere eğik katı şeklinde hazırlanmış kültürlerle her 6 ayda bir pasajlama yapılarak da stoklanmıştır.

### 2.2.5. Ksilanaz üretici *Bacillus* spp.'lerin belirlenmesi

Gr pozitif olduğu belirlenen izolatlar, Çizelge 2.1'de belirtilen besiyerine nokta ekim şeklinde inoküle edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyonu takiben plaklar kongo kırmızısı ayırıcı eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kongo kırmızısı ayırıcı dökülerek 1 M'luk NaCl çözeltisi ile 5 dakika yıkanan petri plaklarında ksilanaz üretici bakterilerin izolasyonu için, kolonilerin etrafında şeffaf zonların varlığı incelenmiştir (Attri ve Garg, 2014). Şeffaf zon gösteren suşlar nutrient agarda stoklanarak, Çizelge 2.3'de belirtilen sıvı fermantasyon ortamına ksilanaz aktivite taraması için inoküle edilmiştir. 37°C'de 24-48 saatlik inkübasyon süresince kültürlerde kırmızıdan sarıya renk değişimleri test edilmiştir (İnce 2006).

#### 2.2.6. Sıvı fermantasyon ortamında ksilanaz üretimi

Ksilanaz üretici izolat taramalarında, kolonilerinin etrafında şeffaf zon gözlenen ve sıvı besiyerinde renk değişimi gözlenen suşlardan enzim üretim için, içerisinde Çizelge 2.4'de belirtilen 5 mL sıvı fermantasyon ortamı bulunan tüplere inoküle edilerek 37°C'de 24 saat 180 rpm'de çalkalamalı koşullarda ön inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben, 95 mL aynı besiyeri içeren 500 mL'lik burgulu kapaklı şişelere 5 mL'lik kültür aktarılarak 37°C'de 180 rpm çalkalama hızında 24-48 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kısım 2.2.5' de belirtilen saflaştırma basamakları uygulanmıştır.

#### 2.2.7. Diyaliz tüplerinin aktifleştirilmesi

Aktifleştirme tamponu içerisindeki diyaliz tüpleri su banyosunda 10 dak. kaynatılmıştır. Diyaliz tüplerinin tampondan arındırılması için 2 kez saf su içerisinde kaynatıldıktan sonra setril koşullarda alınarak, saklama solüsyonu içerisinde kullanılabilecek kadar +4°C'de saklanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

#### 2.2.8. Ksilanazın kısmi saflaştırılması

Çalkalamalı koşullarda 24-48 saatlik inkübasyonu takiben kültür, steril falkon tüplere alınarak 5500 rpm'de +4°C'de 20 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme sonrasında pelletten ayrılan hücre serbest süpernatant steril falkon tüplerine aktarılarak ham enzim preparatı olarak değerlendirilmiştir.

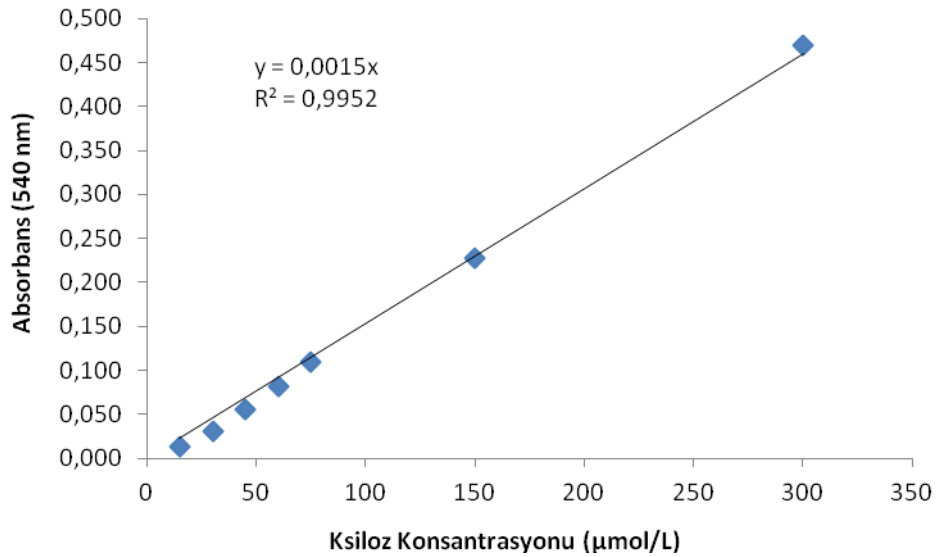
Alkol presipitasyonu için, süpernatant %96'lık soğuk etanol ile toplam hacim 50 mL olacak şekilde 1:9 oranında karıştırılarak 1 gece -20°C'de bekletilmiştir. Alkol süspansiyonu 5500 rpm de +4°C'de 30 dak santrifüj edildikten sonra pellet halinde konsantre edilmiş enzim 0.2 M Na-fosfat tamponunda (pH 7.0) çözünerek aktivite analizlerinde kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

Santrifüjleme ile elde edilen süpernatanttaki ksilanazın, tuz çöktürülmesi için susuz son hacim %70-80 olacak şekilde amonyum sülfat kullanılmıştır. Süpernatanta yavaş yavaş eklenen amonyum sülfat süpernatant içinde tamamen çözüldükten sonra 4°C'de 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak, proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Karışım 4 °C'de, 5500 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek elde edilen pellet, 0,2 M Na-fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde çözdürülmüştür. Ortamdaki amonyum sülfat tuzunun uzaklaştırmak

için aktifleştirilmiş diyaz tüplerine alınan süspansiyon, diyaliz tamponu birer saat aralıklarla değiştirilerek +4°C’de aynı tampon çözeltiye karşı 24 saat diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası tüp içerisindeki süspansiyon aktivite tayininde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

#### 2.2.9. Ksilanaz aktivitesi için kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi

Ksilanaz aktivitesi, enzim ve substrat reaksiyonu sonunda ortaya çıkan ürün miktarı cinsinden çizdirilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim değeri ile hesaplanmıştır. 15-300 µmol/L konsantrasyon aralığında standart ksiloz çözeltileri kullanarak enzim aktivite tayininde belirtilen prosedüre göre kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. Hazırlanmış konsantrasyonların absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki Şekil 2.1’de verilmiştir.



Şekil 2.1. Ksilanaz aktivite tayini için çizdirilen kalibrasyon eğri grafiği

#### 2.2.10. Ekstraselüler ksilanaz aktivite tayini

Ham enzim preparatının 0.5 mL’si 0.5 mL substrat ile karıştırıldıktan sonra 60°C’de 4 dak. bekletilmiştir. Karışıma 1 mL DNS çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve kaynar su banyosunda 5 dak. bekletilen tüpler soğuk su banyosunda soğutulmuş ve 5 mL saf su ilavesini takiben 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı ölçülmüştür (İnce, 2006). Bu yöntem süpernatant, alkol preisipasyonu ve tuz çöktürme ile elde edilen tüm enzim preparatları için uygulanmıştır.



1 U (ünite) ksilanaz aktivitesi; optimal koşullar altında, 1 dakikada substratın (ksilan) hidrolizi ile  $\mu\text{mol}$  cinsinden indirgen şekerin açığa çıkması için gerekli enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Silva ve ark., 2005). Ve aşağıdaki formüle göre aktivite hesabı yapılmıştır.

**Aktivite hesabı:  $W \cdot V \cdot \text{Seyreltme faktörü} / \text{VE} \cdot T$**

W: Açığa çıkan ksiloz miktarı (OD540/ Standart grafikten elde edilen eğim)

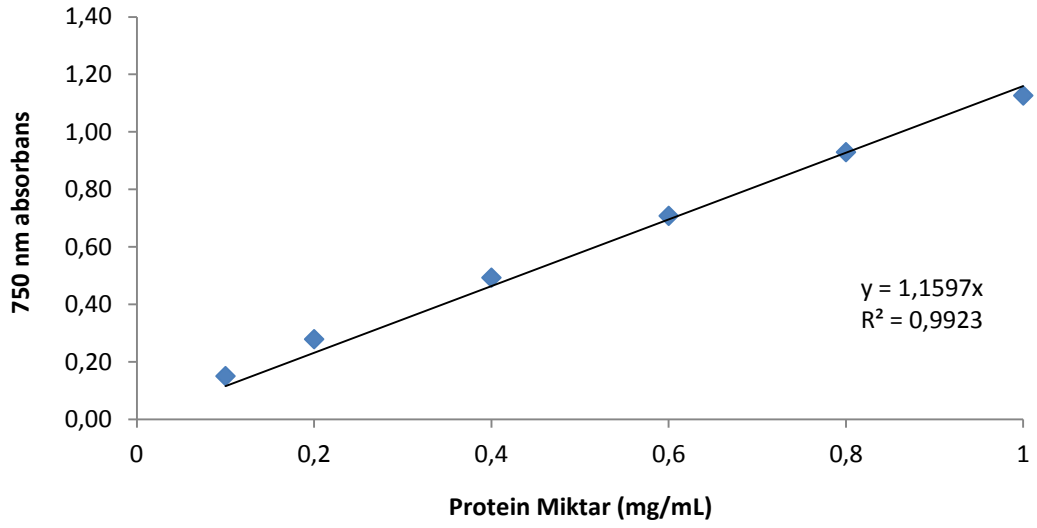
VE: Enzim hacmi

V: Reaksiyon çözeltisi hacmi

t: Reaksiyon süresi

#### 2.2.11. Protein miktar tayini

Enzim preparatlarındaki protein miktarları Lowry ve ark. (1951) tarafından bildirilen metoda göre yapılmıştır. Bu metoda göre sığır serum albüminin saf suda 100-200-400-600-800-1000  $\mu\text{g/mL}$  olacak konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanmıştır. Standart çözeltilerden ve örneklerden 0.3 mL alınarak 3 mL ayıraç C ile karıştırılmıştır. Ve 15 dak oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Renklendirme çözeltisi olarak inkübasyon süresini takiben karışama 0.3 mL Folin-Ciocalteu ayıracı eklenerek, 30 dak. bekletilen örnekler protein içermeyen köre karşı 750 nm absorbansta okutulmuştur. Standart çözeltideki protein miktarlarına karşılık okunan absorbans değerleri arasındaki doğrusal ilişki Şekil 2.2'de verilmiştir. Elde edilen eğim değerinden enzim örneklerindeki total protein miktarı hesaplanmıştır.



**Şekil 2.2** Protein miktar tayini için kalibrasyon eğri grafiği

#### 2.2.12. Enzimin optimum pH değerlerinin belirlenmesi

Kısmi saflaştırma yöntemi ile elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği optimum pH değerinin saptanması için hazırlanmış olduğumuz Sitrata (pH 3.0-5.8), Glisin (pH 2.4-2.8), Tris-HCl (pH 7.4-9.0), Sitrata fosfat (pH 6.2-6.6), Fosfat (pH 7.0) ve Karbonat bikarbonat (pH 9.4-10.6) tamponları kullanılmıştır. farklı pH değerlerindeki tampon içerisinde %1'lik (w/v) ksilan substrat çözeltisi hazırlanarak aktivite analizlerine belirtilen tayin metoduyla aktivite belirlenmiştir.

#### 2.2.13. Enzimin optimum sıcaklık değerinin saptanması

En yüksek aktivitenin hesaplandığı pH değerindeki tamponda hazırlanmış substrat çözeltisi ile enzim, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, 110°C, 120°C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben aktivite tayini yapılmıştır. Optimum sıcaklık saptanması için 20°C-80°C aralığındaki sıcaklıkların inkübasyonu için su banyosu, 90°C-120°C aralığındaki sıcaklıklar içinde yağ banyosunda yapılmıştır.

#### 2.2.14. Enzimin termal stabilitesinin saptanması

Termal stabilitesinin saptanması için optimum sıcaklığın belirlendiği sıcaklıkta 0-5-10-15-20-25-30 dakika enzim ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyonu takiben optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde hazırlanmış substrat ve enzim

karıştırılarak optimum aktivitenin belirlendiği sıcaklık değerinde aktivite analizi uygulanmıştır.

#### 2.2.15. SDS-PAGE yöntemi ile enzim moleküler ağırlıklarının saptanması

Laemmli (1970), tarafından bildirilen yöntem esas alınarak SDS-PAGE analizleri ile ksilanazın moleküler ağırlığı belirlenmiştir.

##### 2.2.15.1. Ayrılma jelinin hazırlanması (%12'lik)

Ayrılma jeli, solüsyon A tamponundan 5 mL, Sol B tamponundan 8 mL ve 7 mL saf su eklenerek karışım 5 dakika degaz işlemi yapılarak oksijen uzaklaştırılmıştır. Karışıma TEMED (15 µL) ve %10'luk AMPS'den (60 µL) eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan jel enjektör yardımıyla jel kasetlerine yeterli miktarda eklenmiştir. Jelin üst yüzeyi atmosferik oksijenin jele difüzyonunu engellemek ve düzgün bir yüzey elde etmek için ince bir saf su tabakası ile kapatılmış ve oda sıcaklığında 30 ile 60 dakika polimerizasyon için beklenmiştir (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011)

##### 2.2.15.2. Yükleme jelinin hazırlanması (%5'lik)

Solüsyon A tamponundan 1.5 mL, Sol B tamponundan 2.25 mL ve 5.25 mL saf su, TEMED (10 µL) ve %10'luk AMPS'den (30 µL) eklenerek hazırlanan yükleme jeli, polimerize ayrılma jelinin üzerine enjektör yardımı ile dökülmüştür. Yükleme kuyucuklarının oluşması için tarak eklenmiş ve jelin donması için oda sıcaklığında 30-60 dakika bekletilmiştir. Polimerizasyon süresi tamamlandıktan sonra tarak kuyucukların bozulmamasına dikkat edilerek yavaşça bir taraftan başlayarak kaldırılmıştır (Bollag ve ark, 1996; Sümengen, 2011).

##### 2.2.15.3. Örneğin ve standartın hazırlanması

Saflaştırılmış enzim ve örnek yükleme tamponuna eşit hacimde ependorf tüpü içerisinde karıştırıldıktan sonra 5 dakika 95°C'de kaynar su banyosunda bekletilerek denatüre edilen proteinler jele yüklenmeye hazır hale getirilmiştir (Sümengen, 2011).

#### 2.2.15.4. Enzim örneklerinin SDS-PAGE jeline yüklenmesi ve yürütülmesi

Saflaştırılmış protein örneği 20 µL, marker protein 5 µL alınarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir. 10.5-75 kDa arasındaki ağırlıkta protein molekül içeren Opti-Protein (Cat G252) marker olarak kullanılmıştır. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra kaset elektroforez tankına yerleştirilmiştir. İşaretli yere kadar yürütme tamponu doldurulmuş elektroforez sistemi güç kaynağına bağlanarak ilk yarım saat 90 V sonra 120 V akımda yaklaşık 6 saat kadar yürütülmüştür.

#### 2.2.15.5. SDS-PAGE jelinin boyanması ve görüntülenmesi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra dikkatlice çıkarılan jel ve CBB R-250 ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı üstünde boyanma işlemi yapılmıştır. Boyanın fazlasının alınması için boyayı geri alma çözeltisine alınarak çalkalayıcı üzerinde 1 gece kadar bekletilmiştir. Net bir görüntü alabilmek için %10 gliserollü su içinde 3 saat bekletilerek saydamlaştırılmıştır. Protein örneklerine bağlanan boya ve jelin diğer bölgelerindeki boyanın uzaklaştırılması ile bantların çıplak gözle görünmesi sağlanmıştır (Sümengen, 2011).

#### 2.2.16. SDS-PAGE jeline zimogram analizi

SDS-PAGE jeline enzimin aktivasyonun belirlenmesi için uygulanan zimogram analizi, elektroforez sonlandırılmasını takiben protein bantlarının boyanması prosesi yerine, jelde moleküler ağırlıkların göre ayrılmış ve denatüre edilmiş proteinlerin renatürasyonu temel almaktadır. Renatürasyon çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilen SDS'nin uzaklaştırılması için; jel öncelikle solüsyon 1'de 1 saat (50 rpm), solüsyon 2'de bir gece +4°C'de bekletilir. Ve solüsyon 3'te inkübasyona bırakılır. Renatürasyon işleminden sonra, jel enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklıkta ksilan içeren çözeltide 6 saat inkübe edilir. Ksilanazın aktivasyon zonlarının belirlenmesi için %1'lik kongo kırmızısı içerisinde jel, 30 dak. boyanır. Ve 1M NaCl çözeltisi kullanarak 15 dak. fazla boyanın geri alınması gerçekleştirilir. Sarı zonlar, enzimin aktivite gösterdiği bölgeler olarak karakterize edilir (Aygan, 2008).

### 2.2.17. Reaksiyon ürünlerinin belirlenmesi

Enzim-substrat reaksiyon ürünlerinin belirlenmesi için TLC analizleri yapılmıştır. Analiz için UV absorbansına sahip silika jel ile kaplı 5x10 cm uzunluğunda hazır cam plakalar (silica gel 60 F<sub>254</sub>) kullanılmıştır. Optimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık ve pH değerlerinde reaksiyon 15, 30, 60 ve 24 saat sürdürülmüş olup, elde edilen örnekler +4°C’de bekletilmiştir. Standart olarak olası parçalama ürünleri olarak %3’lük glukoz, maltoz ve ksiloz kullanılmıştır. Standart ve örnekler plakanın alt ucundan kapiller cam borular yardımı ile silika jele emdirilerek ince tabaka kromatografisine yüklenmiştir. Tabakaya uygun kromatografi tankı 2 cm yüksekliği geçmeyecek şekilde yürütücü faz ile doyurulmuştur. Tanka yatay olarak yerleştirilen tabakada hareketli fazın yükselmesi takip edilmiştir. Yükselen çözücü üst uca 1 cm yaklaşınca tabaka tanktan çıkarılmıştır.

İnce tabaka kromatografisinde örneklerin belirli bir yürütücü faz içerisinde plakalar üzerinde katettiği mesafe olarak tanımlanan alıkonma faktörü (Rf) numune uygulama noktası ve yükselmiş leke merkezi arasındaki uzaklığın, çözücü yükselmesinin ve numune uygulama çizgisi arasındaki uzaklığa oranlanması ile hesaplanmıştır.

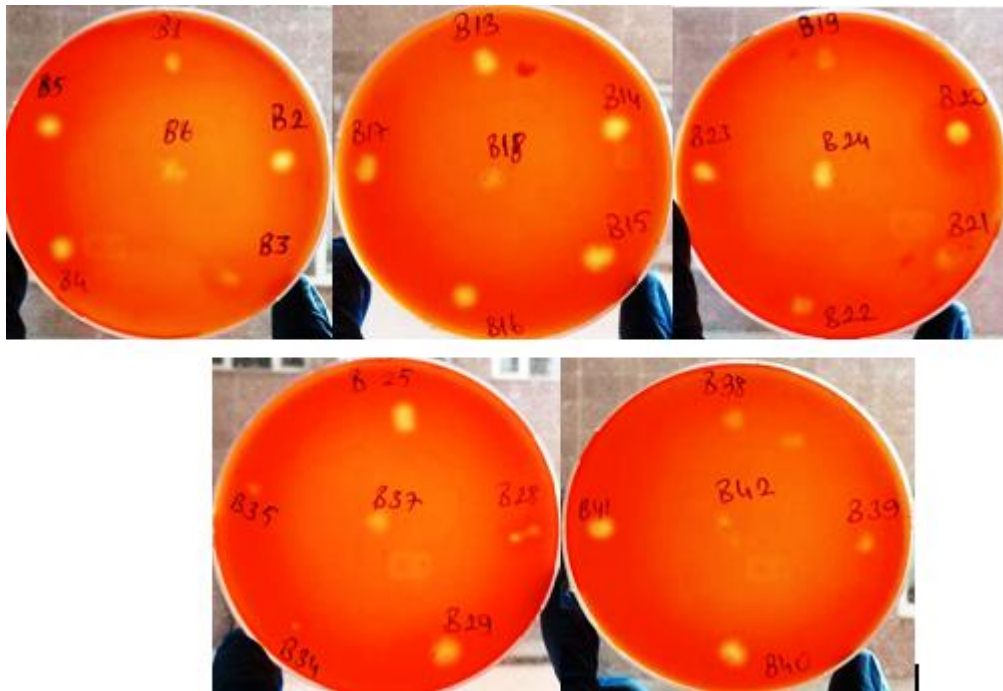
Rf değerlerinin hesaplanması için püskürtülen %50’lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> plakalar 150°C’de 5 dakika inkübe edilerek standart ve örneklere ait lekelenmelerin belirginleşmesi sağlanmıştır (Kamble ve Jadhav, 2012).

Standart ürünlerin oluşturduğu lekelenmelerin Rf değerleri reaksiyon ürünlerine ait lekelenmelerin Rf değerleri karşılaştırılarak parçalanma ürünleri tanımlanmıştır.

### 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

#### 3.1. Ksilanaz Üretici *Bacillus* spp. Suşların İzolasyonu

Kilis 7 Aralık Üniversitesi Merkez Kampüsünden alınan toprak örneklerinden, tek düşmüş kolonilerin Gram boyanma karakterleri incelenmiş ve 42 adet *Bacillus* spp. izole edilmiştir. İzole edilen suşlar Çizelge 2.1’de belirtilen besi ortamında inkübasyonu takiben, koloniler kongo kırmızısı ile boyanmıştır. Kolonilerin etrafındaki şeffaf zonlar suşların ksilanaz aktivitesine işaret etmektedir (Şekil 3.1). Buna göre 29 adet suşun ksilanaz aktivitesi belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Ksilan içeren katı besiyerinde suşların ksilanaz aktivitesi

Helianti ve ark (2016), rekombinant *Bacillus subtilis* DB104 ksilan içeren LB agarda; Rathore ve ark. (2014), CMC/ksilan içeren besi ortamında pek çok bakteriyel ve mantar türlerinin 7-8 günlük; Kalim ve Nazish (2016), ise topraktan izole ettikleri bakteri ve mantar türlerini %0.1 ksilan içeren ortamda 72 saatlik inkübasyonu takiben kolonilerin etrafında şeffaf zonlar esas alınarak ksilanaz üretici suşlar olarak belirlenmiştir.

Agar ortamında seçilen bu suşlar, ksilanaz kültür taraması için kongo kırmızısı içeren sıvı besiyerine inoküle edilmiştir. İnkübasyonu takiben sıvı besi ortamındaki kırmızıdan sarıya renk değişimi takip edilmiştir. İnce (2006), petrol sanayi toprak ve su örneklerinden (Raman) izole edilen mikroorganizmalardan ksilanaz üretici olup

olmadığını belirlemek için plaklarda şeffaf zon gözlenen bakterilerden, kongo kırmızısı içeren sıvı besiyerinde renk değişimini esas alarak iki termofilik bakteriyel türün (2P ve 5P) türünün ksilanaz üreticisi olduğunu saptamıştır.

Buna göre 29 adet suşdan sıvı fermantasyon ortamında sadece 3 adet suşun ksilanaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. Bu suşlar B28, B34 ve B35 olarak belirlenmiştir.



**Şekil 3.2.** Suşların sıvı besiyerinde renk değişimine dayalı ksilanaz aktivitesi

B28, B34 ve B35 suşlarının enzim aktivitesi belirlenmiş ve en yüksek aktivite gösteren *Bacillus* spp. suşu ile enzim saflaştırma proseslerine devam edilmiştir. Sırasıyla 552 U/L, 723 U/L ve 479 U/L olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde enzim çalışmaları için B34 suşunun kullanılmasına karar verilmiştir.

### **3.2. Ksilanaz Preparatlarının Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi**

24-48 saatlik inkübasyonu takiben santrifüjleme, alkol ve amonyum sülfat presipitasyonu ile kısmi olarak saflaştırılmış ksilanaz preparatlarının total ve spesifik aktiviteleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Ksilanaz enzim preparatlarının total ve spesifik aktivitesi

Örnek	Total Aktivite (U)	Total Protein miktarı (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
<b>Ham enzim</b>	70	1.08	64.81	100	1
<b>Alkol Presipitasyonu</b>	10.5	0.44	23.86	15	0.37
<b>Amonyum Sülfat Presipitasyonu</b>	0.6	0.35	1.714	0.86	0.026

Bu aktivite sonuçlarına göre hücre kültürlerinin santrifujlenmesi ile elde edilen hücre serbest ham enzim preparatının total aktivitesinin (70 U), alkol ve amonyum sülfat presipitasyonu ile elde edilen preparata oranla (10.5 ve 0.6 U) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Preparatlardaki total protein miktarları incelendiğinde, ham enzim preparatındaki protein miktarının (1.08 mg/mL) diğer preparatlara karşın, daha yüksek olduğu saptanmıştır. Saflaştırma verimine göre, alkol ve amonyum sülfat presipitasyonun ksilanaz enziminin kısmi saflaştırılması için uygun bir yöntem olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, karakterizasyon çalışmalarına ham enzim preparatı ile devam edilmiştir. Şekil 3.3’de enzim preparatlarının septrofotometrik ölçüm öncesi renk değişimleri verilmiştir.



**Şekil 3.3.** Enzim preparatlarında septrofotometrik ölçüm öncesi renk değişimleri (sarı renkli küvetler kör; kırmızı renkliler ise örnekleri göstermektedir).



Tamariz-Angeles ve ark. (2014), Peru'dan izole ettikleri 8 adet termofilik bakteri türünden ksilanaz enzimi saflaştırmış ve en yüksek enzim aktivitesini *B. licheniformis* IHB2 517 suşunda 517 U/L olarak belirtmişlerdir. Karakterizasyon çalışmaları öncesinde B34 suşundan elde edilen enzim aktivitesi 723 U/L iken, optimal koşullarda elde edilen en yüksek aktivite 2935 U/L olarak belirlenmiştir.

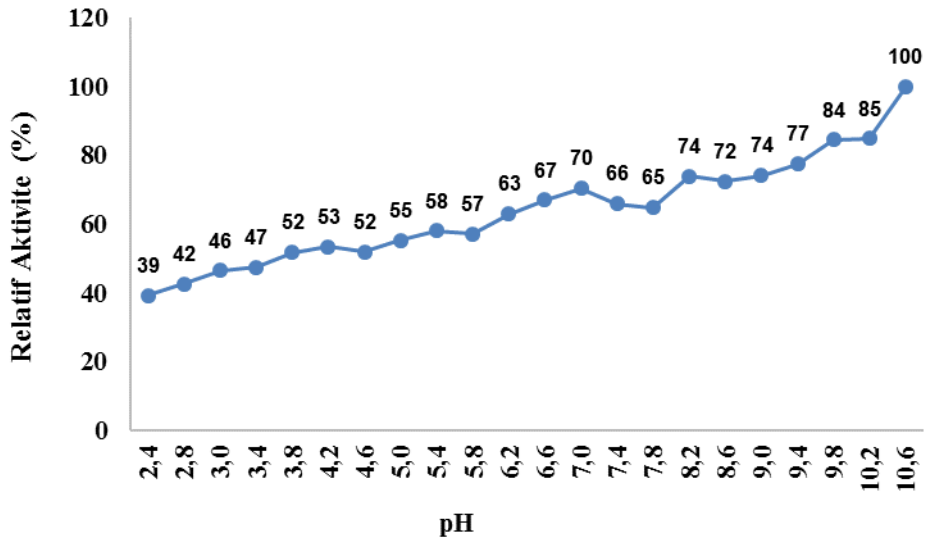
Kalim ve Nazish (2016), optimize ettikleri kültür koşullarında geliştirdikleri *Bacillus pumilus* ve *Bacillus safensis*'den saflaştırdıkları ksilanazların spesifik aktivitelerini sırasıyla, 388.82 U/mg ve 385.26 U/mg olarak saptamışlardır. Zambare ve ark. (2011), ise ksilan ile zenginleştirdikleri bahçe atıklarından izole ettikleri bakteriyel suşlardan saflaştırdıkları ksilanaz için spesifik aktiviteyi 2.09 U/mg olarak saptamıştır.

Optimize edilmeyen kültür koşullarında uygulanan çalışmamızda elde edilen en yüksek spesifik aktivite 64.81 U/mg ile hücre serbest enzim ekstraktında ortaya konmuştur.

### **3.3. Ksilanazın Optimum pH Aralığı**

B34 suşundan elde edilen ham enzim preparatı kullanılarak Glisin (pH 2.4-2.8), Sitrat (pH 3.0-5.8), Sitrat fosfat (pH 6.2-6.6), Fosfat (pH 7.0), Tris-HCl (pH 7.4-9.0) ve Karbonat bikarbonat (pH 9.4-10.6) tampon sistemleri kullanılarak aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Farklı pH aralıklarında elde edilen relatif enzim aktivitesi (%) olarak Şekil 3.4'de verilmiştir.

Çalışmamızda B34 suşundan elde edilen ekstraselüler ksilanazın en yüksek aktivitesi pH 10.6'da belirlenmiştir. Bu pH aralığındaki enzim aktivitesi ise 1001 U/L olarak hesaplanmıştır. Literatür kaynaklarında da belirtildiği gibi, bakteriyel ksilanazların mantarlara göre en önemli avantajları, bakteri ksilanazlarının optimum pH değerlerinin nötral veya alkali aralıkta olmasıdır (Chakdar ve ark., 2016). Şekil 3.4'deki grafikte görüldüğü gibi B34 suşundan elde edilen ksilanazın nötral ve alkali pH'larda yüksek aktiviteye sahip olduğu, ancak asidik pH'larda da aktivasyonunu sürdürdüğü gözlenmektedir. nötral pH'ya kadar en yüksek asidik aktivite pH 6.6'da 465 U/L olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 3.4.** Ekstraselüler ksilanazın optimum aktivite gösterdiği pH değeri

Ksilanazın pH 2.4-2.8 aralığında ortalama %40.83 aktiviteden; pH 3.0-5.8 aralığında ortalamasının %52.1'e kadar yükseldiği saptanmıştır. Analizlerinin sürdürüldüğü pH değerinin nötrale yaklaşmasıyla (6.2-6.6), enzimin ortalama aktivitesinin %64.2'ye kadar arttığı ve pH 7'den 10.6'ya kadar ki ortalama aktivite ise %74.23 olarak belirlenmiştir.

B34 suşundan elde edilen ekstraselüler enzimin en yüksek aktivitesini pH 10.6'da gösterdiği ve bununla birlikte, pH 9.8 ve 10.2'de de aktivitesini %84 ve 85 koruduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak analiz edilen pH değerlerinde, ksilanazın alkali çözücülerde hazırlanmış substrat çözetilerinde maksimum aktivite gösterdiği söylenebilmektedir. Alkali koşullardaki enzim stabilitesi amino asit rezidülerinin yüklenmesi ile karakterize edilmektedir.

Bernier ve ark. (1983), *Bacillus subtilis*'den saflaştırdıkları ekstraselüler ksilanazın en yüksek aktivitesi pH 5.0'da gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Duarte ve ark. (2000), *Bacillus pumilus*'un dört farklı suşu ile çalışmış olup, suş 13<sub>a</sub>'nın optimum aktivitesini pH 9.0'da; 5<sub>2</sub>, 5<sub>14</sub>, ve 4<sub>a</sub> suşlarının ise pH 8.0'de gösterdiğini saptamışlardır.

Hong (2009), topraktan izole ettiği *Bacillus subtilis* AMX-4 suşunun ksilanazı kodlayan geni *Escherichia coli*'ye klonlamıştır. Rekombinant suşdan elde edilen hücre serbest ekstraktan ksilanaz saflaştırılmıştır. Enzimin optimum aktivitesi pH 6.0-7.0 aralığında saptanmıştır.

Monisha ve ark. (2009), *Bacillus pumilus* olarak tanımladıkları izolattan ürettikleri ksilanaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değerini 7.0 olarak belirlemişlerdir. Menon ve ark. (2010), haloalkaliteolerant ksilanaz üretici *Bacillus pumilus* GESF1 suşunun pH 8.0'da optimum aktivite gösterdiğini, ortalama olarak %50 ve 30 relatif aktivitenin pH 6.0 ve 10.0'da korunduğunu saptamışlardır.

Kamble ve Jadhav, (2012) *Bacillus arseniciselenatis* DSM-15340 suşunun tek karbon kaynağı olarak buğday kepeği kullanarak ürettikleri ksilanaz enziminin en yüksek aktivitesini pH 8.0'da rapor etmişlerdir.

Hiremath ve Patil, (2013) Bidarın farklı bölgelerinden izole edilen *Bacillus* suşlarından ksilanaz üretimi ve karakterizasyonu çalışmalarında, saflaştırılan enzimin en yüksek aktivitesini pH>10'nun üzerinde belirlemişlerdir.

Irfan ve ark. (2016), optimize kültür koşullarında en yüksek enzim üretimi *B. subtilis* BS04 ve *B. megaterium* BM07 suşlarının her ikisi için de pH 8.0'da belirlenirken, saflaştırılan ksilanaz enziminin en yüksek aktivitesi sırasıyla, pH 5.0 ve 5.5'te belirlenmiştir.

Güncel kaynaklardan elde edilen bu veriler doğrultusunda pek çok farklı *Bacillus* spp.'den, hatta türlere ait farklı suşlardan saflaştırılan ksilanazların en yüksek aktiviteyi pH 5.0'dan pH 10.0'ın üzerindeki aralıkta gösterdikleri gözlenmektedir.

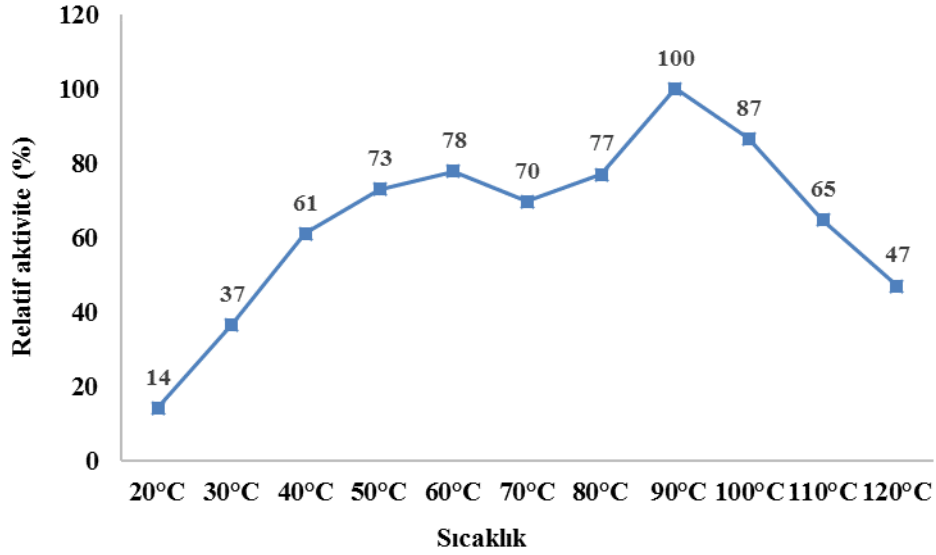
### **3.4. Ksilanazın Optimum Sıcaklık Aralığı**

B34 suşundan elde edilen ham enzim preparatının optimum aktivite gösterdiği pH 10.6'daki karbonat-bikarbonat tamponunda hazırlanmış substrat çözeltisi kullanılarak, aktivite analizleri 20-120°C sıcaklık aralığında sürdürülmüştür. Elde edilen relatif enzim aktivite (%) sonuçları Şekil 3.5'te grafiğe edilmiştir.

Şekil 3.5'te verilen sonuçlara göre, *Bacillus* spp.'den ekstraselüler ksilanazın enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 90°C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklıkta hesaplanan enzim aktivitesi ise, 1758 U/L olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarının destekler nitelikte, bakteriyel ksilanaza ait literatür incelemelerinde 65-90°C sıcaklık aralığında en yüksek aktivitenin gözlemlendiği rapor edilmiştir (Chakdar ve ark., 2016).

En düşük aktivite 20°C'de gözlenmiş olup, 249 U/L olarak belirlenmiştir. 30-60°C sıcaklık aralığında aktivitenin dereceli olarak arttığı gözlenmiş olup, ortalama aktivite

%62.14 olarak belirlenmiştir. 80°C’de tekrar aktivitenin arttığı (%77) ve en yüksek aktivite gösterdiği 90°C’yi takiben uygulanan sıcaklıklarda aktivitenin ortalama %66’ya kadar azaldığı tespit edilmiştir. Enzimin aktivitesini geniş bir sıcaklık aralığında (40-110°C) kaydedeğer şekilde sürdürdüğü tespit edilmiştir. Tüm sıcaklık değerleri incelendiğinde ise, ortalama %63.68 aktivite elde edilmiştir.



**Şekil 3.5.** Ekstraselüler ksilanazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık

Sharma ve ark. (2011), *Bacillus* sp.’den elde ettikleri ksilanaz enzimin aktivitesi üzerinde sıcaklık etkisini incelemişlerdir. 30-80°C aralığında sürdürülen çalışmada en yüksek aktivite 55°C’de belirlenmiş olup, 70°C’de aktivitenin yalnızca %15 kaldığı ve 80°C’de aktivite görülmediği rapor edilmiştir. Enzimin 50-60°C aralığında da yüksek aktiviteler gösterdiği tespit edilmiştir.

Menon ve ark. (2010) deniz bakterisi *Bacillus pumilus* GESF-1 suşundan saflaştırılan ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı 40°C olarak tespit ederken, Zambare ve ark. (2011) termofilik bakteri konsorsiyumundan saflaştırdıkları ksilanaz enziminin en yüksek aktivitesini 70°C’de saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise, Mittal ve ark. (2012), *Bacillus* sp. KS09 suşundan elde ettikleri ksilanazın geniş sıcaklık aralığında aktivitesini sürdürdüğünü ancak en yüksek aktiviteye 50°C’de sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızda mezofilik özellik taşıyan yabancı tip *Bacillus* spp.’den saflaştırılan ksilanazın, 90°C’de en yüksek aktivitesini gösterdiği gözlenmiştir. Çalışmamızı destekler nitelikte Cordeiro ve ark. (2002), *Bacillus caldoolyolyticus* ve *Bacillus* AK1

suşu ile ilişkili yabancı tip *Bacillus* sp.'den saflaştırılan ksilanaz enziminin aktivite analizleri 30-100°C aralığında sürdürülmüş ve enzimin en yüksek aktivitesinin 90°C olduğu saptanmıştır.

Diğer bir çalışmada ise Bajaj ve Manhas (2012), *Bacillus licheniformis* P11(C) suşundan elde edilen ksilanazın aktivite analizlerini 40-100°C sıcaklıkta test etmişlerdir. En yüksek aktiviteyi 60°C'de belirlemişlerdir.

Termofilik *Bacillus* sp.'nin kültür filtratından saflaştırdıkları ekstraselüler ksilanazın en yüksek aktivitesini 50°C'de gösterdiği Sapre ve ark. (2005) tarafından rapor edilmiştir. Benzer sonuçlar Poorna (2011), alkalifilik *Bacillus pumilus*'dan elde edilen selüloz serbest ekstraselüler ksilanaz enzimi içinde belirlenmiş olup, en yüksek aktivite 50°C'de gözlenmiştir. Yin ve ark. (2010) tarafından *Bacillus* sp. YJ6'den saflaştırılan ksilanaz için de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

*Bacillus thermantarcticus*'dan saflaştırılan termostabil ksilanazın en yüksek aktiviteyi 80°C'de gösterdiği Lama ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada belirtilmiştir. Blanco ve Pastor (1993) ise, 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben *Bacillus* sp.'den elde edilen ksilanaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını 45-50°C olarak tespit etmişlerdir.

Sonuçlarımızı destekler nitelikte, yapılan çalışmalar *Bacillus* spp., suşlarından elde edilen ksilanazın geniş sıcaklık aralıklarında aktivitesini koruduğunu göstermektedir.

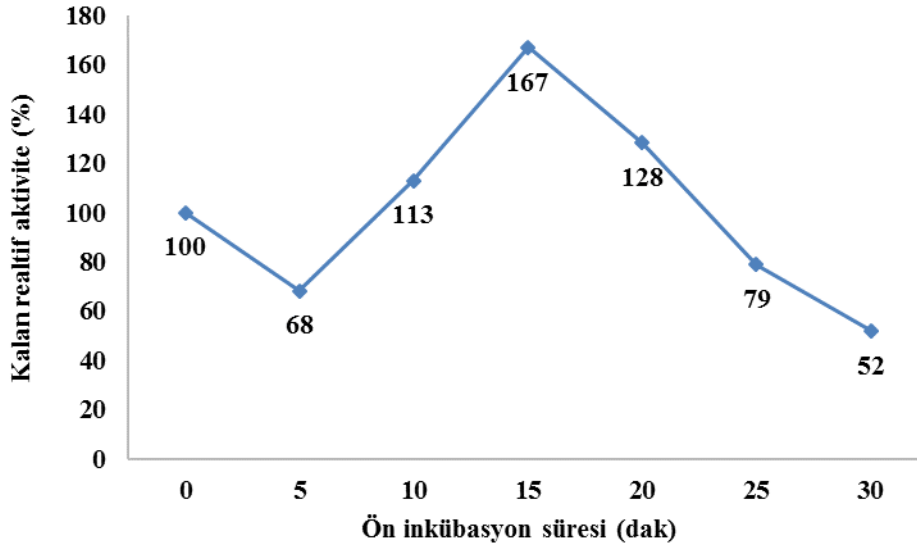
### **3.5. Ksilanazın Termal Stabilitesine Ait Bulgular**

B34 suşundan elde edilen ham enzimin aktivitesini koruduğu termal stabilitenin belirlenmesi için, enzimin optimum aktivite gösterdiği 90°C sıcaklıkta 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika ön inkübasyona tabii tutularak, optimum aktivite gösterdiği pH 10.6'daki karbonat-bikarbonat tamponunda hazırlanmış substrat çözeltisi ile aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar kalan relatif enzim aktivitesi olarak Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

Enzimin ilk 5 dakikalık ön inkübasyonu takiben aktivitesinde %32'lik bir azalma gözlenirken, inkübasyon süresinin artmasını takiben 0. dakikaya göre sırasıyla 10 ve 15 dakikalık ön inkübasyonla aktivitede, sırasıyla %13 ve 67 artış kaydedilmiştir. En yüksek aktivitenin gözlemlendiği 15 dakikalık ön inkübasyonda hesaplanan enzim aktivitesi 2935 U/L'dir. İnkübasyonun 20. dakikasında ise ilk aktiviteye göre %28 artma

gözlensede 15. dakikada belirlenen en yüksek aktiviteye kıyasla %39 azalma belirlenmiştir. 25 ve 30 dakikalık ön inkübasyon sürecinde enzimin aktivitesinde dereceli düşüş gözlensede, %79 ve 52 oranında aktivitenin korunduğu saptanmıştır.

B34 suşundan elde edilen ekstraselüler ksilanaz enziminin en düşük aktivitesi 30 dakikalık inkübasyonu süreci sonunda kaydedilmiş olup, aktivitenin %50'sinden fazlasının korunduğu gözlenmektedir. Bu sonuçlara göre söz konusu enzimin inkübasyon sürelerinde termostabilitesini yüksek oranda koruduğu ve ilk aktiviteye göre artışın 10, 15 ve 20. dakikalardaki ön inkübasyon sonucu belirlendiği ortaya konmuştur. Bu sonuçlara göre B34 suşundan elde edilen ekstraselüler ksilanazın termostabil bir enzim olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 3.6. Ekstraselüler ksilanazın termal stabilitesi

Abo-State ve ark. (2013), tarımsal atıklardan izole ettikleri iki *Bacillus* sp'den (MAM-29 ve MAM-38) saflaştırdıkları ksilanaz enziminin 60, 70 ve 80°C'lerde stabilitesini koruduğunu belirlemişlerdir. MAM-29 izolatından elde edilen ksilanazın 80°C'de sürdürülen termostabilite çalışmalarında 60 dakikalık inkübasyon süresince aktivitesinin %99'unu; MAM-38 ksilanazın ise %98'ini koruduğu rapor edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise Cordeiro ve ark. (2002), yabani tip *Bacillus* sp'den ürettiği ksilanazın 30-50°C'lerde 2 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini %100 koruduğunu; 60, 70 ve 100°C'lerde ise orijinal aktivitenin sırasıyla %11, 12 ve 29 oranında azaldığını bildirmişlerdir.

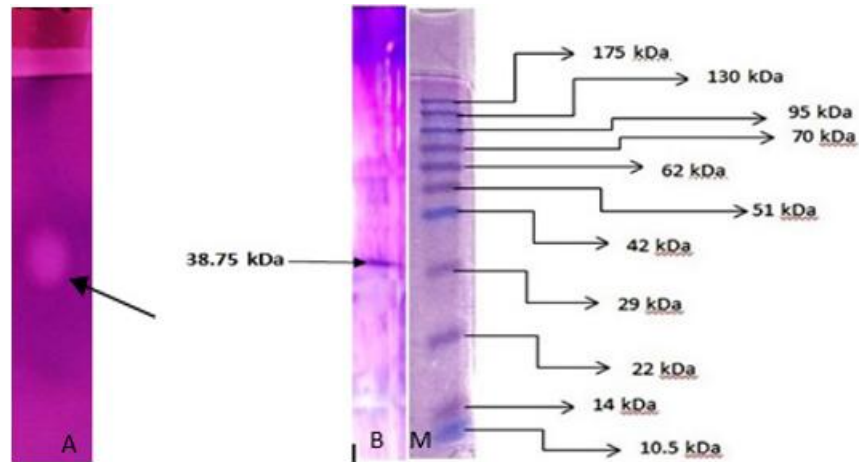
50, 55 ve 60°C sıcaklıklarda 1 saatlik inkübasyonu takiben, ksilanazın termal stabilitesini sırasıyla %75, 70 ve 60 oranında koruduğuna dair benzer sonuçlar, Mittal ve ark. (2012), tarafından *Bacillus* sp. KS09 suşundan saflaştırılan ksilanaz için tespit edilmiştir.

Alkalifilik *Bacillus* sp. AR-009 suşundan izole ettikleri ksilanaz enziminin en yüksek aktivitesinin saptandığı 55 ve 60°C’lerde 2.5 saatlik inkübasyon süresince sürdürülen stabilite çalışmalarında, orjinal aktivitenin sırasıyla %80’nin üzerinde ve %63 korunduğu, Gessesse ve Gashe (1997) tarafından rapor edilmiştir.

Gupta ve ark. (1992) alkalifilik *Bacillus* sp. NG-27’de saflaştırılan ksilanaz enziminin 40-90°C’lerde aktivitesini koruduğu, en yüksek aktivitesini 70°C’de gösterdiği saptanmıştır. Enzimin yarı ömrünü söz konusu sıcaklıkta 75 dakika olarak rapor etmişlerdir.

### 3.6. Ksilanazın Moleküler Ağırlığının Tespiti

B34 suşundan kısmi olarak saflaştırılan ksilanaz enziminin moleküler ağırlığı %12’lik homojen SDS-PAGE sistemi kullanılarak belirlenmiş olup enzime ilişkin protein bandı Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Ksilanaz enzimine ait 38.75 kDa moleküler ağırlığında tek protein bandı elde edilmiştir.



Şekil 3.7. Ksilanaza ait SDS-PAGE bulguları (A: Ksilanazın SDS-PAGE’de zimogramı, B: Ham ksilanaz preparatının SDS-PAGE’i ve M: Protein marker)

Nakamura ve ark. (1993) toprak izolatı *Bacillus* sp. 41M-1 suşundan elde edilen ekstraselüler ksilanazın ortalama molekül ağırlığı 36 kDa, Ratanakhanokchai ve ark. (1999) ise alkalifilik bakteri *Bacillus* sp. K-1 suşundan saflaştırılan ksilanolitik enzimin

ortalama moleküler ağırlığını 23 kDa olarak saptamışlardır. Poorna (2011) tarafından alkalifilik bakteri *B. pumilis*'den saflaştırılan hücre serbest ksilanaza ait ortalama moleküler ağırlıkları 14, 35 ve 60 kDa olan 3 protein bandı belirlenmiştir.

*Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 benzer termoalkalifilik yeni bir *Bacillus* türünden üretilen ekstraselüler ksilanazın ortalama moleküler ağırlığı 29.8 kDa olarak hesaplanmıştır (Kamble ve Jadhav, 2012).

*Bacillus licheniformis* SC'den saflaştırılan ksilanazın ortalama moleküler ağırlığı 24.6 kDa olarak ortaya konmuştur (Chaturvedi ve Khurana, 2016). Pithadiya ve Thakkar (2016), *Bacillus circulans*'dan saflaştırılan ekstraselüler ksilanazın ortalama moleküler ağırlığını 20 kDa; Kapilan (2015), *Bacillus subtilis* BS166 suşundan elde edilen enzimin moleküler ağırlığını 66.42 kDa; Shrinivas ve ark. (2010), *Bacillus* sp. JB 99'dan saflaştırılan termostabil alkalik ksilanazın moleküler ağırlığı 20 kDa olarak rapor etmişlerdir. Roy ve Rowshanul (2009), ise *Bacillus cereus*'dan saflaştırılan enzime ait 32 kDa ağırlığında tek protein bandı rapor etmişlerdir. Lama ve ark. (2004), termofilik *Bacillus thermantarcticus*'dan 45 kDa moleküler ağırlıkta ksilanazın saflaştırıldığını bildirmişlerdir.

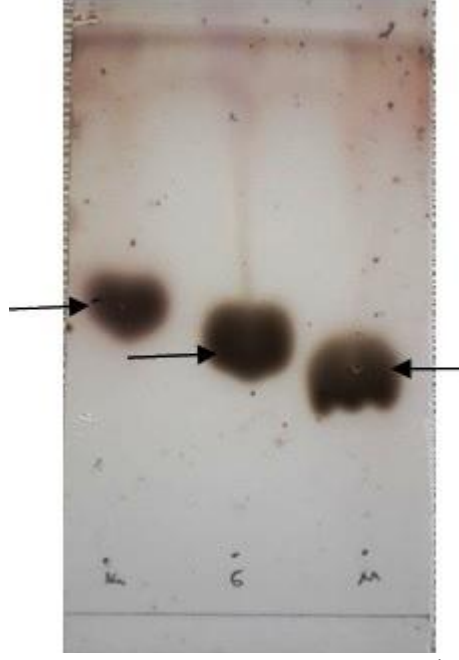
Hong (2009), toprak izolatu *Bacillus subtilis* AMX-4'den ksilanazı kodlayan gen bölgesinin *E. coli*'de klonlanması sonucu saflaştırılan ksilanazın moleküler ağırlığı 23 kDa olarak tespit edilmiştir. Farklı bir klonlama çalışmasında, *Bacillus brevis*'den izole edilen ksilanaz geninin *E. coli* BL21 ifade edilmesi sonucu saflaştırılan ksilanazın moleküler ağırlığı 23 kDa olarak bildirilmiştir. (Goswami ve ark., 2014).

Bakteri ve mantarlardan elde edilen ksilanazlar, 8.5 ve 85 kDa arasında değişen moleküler ağırlığı ile tek altbirimli protein yapıları gösterdiğine dair (Chakdar ve ark., 2016) literatür bilgisi ksilanaza ait moleküler ağırlıklarının türe bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ifade etmektedir. Çalışmamızda elde edilen enziminin moleküler ağırlığına (38.75 kDa) dair sonuçlarımız literatür bilgisi ile desteklenmektedir.

### **3.7. Reaksiyon Ürünlerinin TLC İle Belirlenmesi**

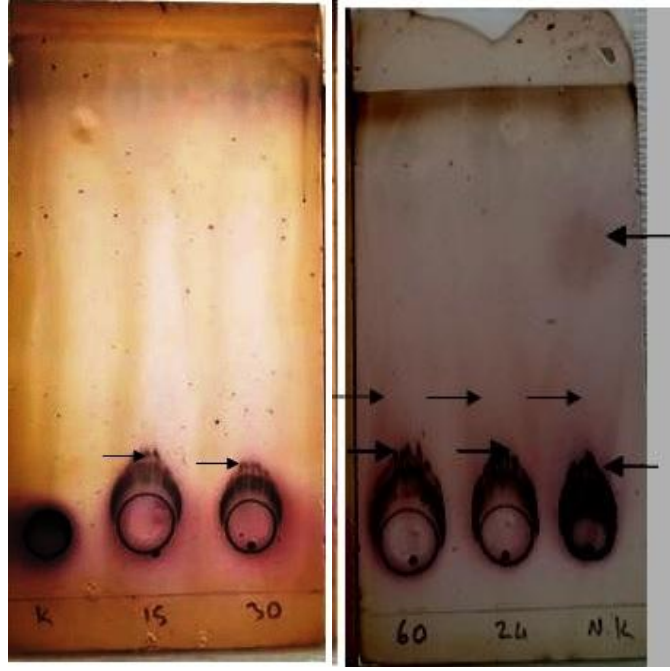
Enzim substrat reaksiyon ürünlerinin belirlenmesi için TLC analizleri yapılmıştır. %3'lük standart ksiloz, glikoz ve maltoz için Rf değerleri sırasıyla, 0.53; 0.42 ve 0.35 olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.8).





**Şekil 3.8.** %3'lük ksiloz (K), glikoz (G) ve maltoz (M) standartlarına ait lekelenmeler

Optimum aktivitenin gözleendiği sıcaklık ve pH değerlerinde reaksiyon 15, 30, 60 ve 24 saat sürdürülmüş olup, elde edilen örnekler +4°C'de bekletilmiştir. Bu proses sonucunda elde ürünlerin lekelenmeleri Şekil 3.9'da verilmiştir. K olarak ifade edilen standart ksilan çözeltisinin söz konusu yürütücü faz içerisinde aktif bir fragment gösteremediği belirlenmiştir. 90°C ve pH 10.6'da sürdürülen reaksiyonun 15, 30, 60 ve 24. saatlerinde; 60°C ve pH 7.0'daki enzim aktivasyonu sonucu alınan örneklerin (N.K.) TLC sistemindeki lekelenmelerin Rf değerlerine bakıldığında, reaksiyon sonucu aynı ürünün ortaya çıktığı söylenebilmektedir.



**Şekil 3.9.** %3'lük standart ksilan (K) ve reaksiyon ürünlerine ait TLC plakalarındaki lekelenmeler

Lekelenmenin Rf değerleri ortalama 0.15-0.25 değerleri arasındadır. Standartlar ile karşılaştırıldığında, bu lekelenmelerin standart parçalama ürünlerine ait olmadığı ortaya konmaktadır. Ancak diğer örneklerde gözlenmeyen 60°C ve pH 7.0'daki enzim aktivasyonu sonucu gözlenen lekelenmenin Rf değeri 0.58 olarak belirlenmiştir. Standartlar ile karşılaştırıldığında kromatografik analizlerdeki sapmalar göz önünde bulundurulduğunda, bu lekelenmenin en yakın Rf değerine sahip ksiloza ait olduğu söylenebilmektedir.

TLC analizleri sonucunda ksilanın ksilanaz enzimi ile hidrolizi sonucunda ksiloz ve ksilo-oligosakkaritlerin varlığı belirlenmiştir. Ancak 15, 30, 60 ve 24 saat sürdürülen hidrolitik reaksiyonlarda ksiloz birikimi gözlenmeyip, ksilo-oligosakkaritlerin varlığı belirlenmiştir. Bu sonuç, enzimin ksiloz oluşturmak için oligosakkaritler üzerinde etkili endoksilanaz aktivitesi göstermediğine işaret etmektedir.

Pratumteep ve ark. (2010), *B. subtilis* GN156 suşundan saflaştırılan ksilanazın ksilan üzerindeki hidrolitik aktivitesini incelemiş olup, ksilanaz aktivitesi sonucunda parçalanma ürünleri olarak ksiloz ve 3 farklı ksilo-oligosakkarit belirlemişlerdir.

*Bacillus* sp. NCIM 59 suşundan elde edilen ksilanazın, ksilanın hidrolizi sonucu ksiloz, ksilobioz, ksilotrioz ve yüksek miktarda ksilo-oligosakkaritler gözlenmiştir (Dey ve ark., 1992).

*Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340'dan saflaştırılan ksilanazın ksilan substratı ile 1 saatlik inkübasyonu takiben, TLC plakalarında az miktarda ksilobioz birikimi ile birlikte asıl hidrolitik ürünler olarak ksilotrioz ve ksilotetraoz tespit edilmiştir (Kamble ve Jadhav, 2012).

#### 4. SONUÇ VE YORUM

Çevre dostu endüstriyel uygulamalarda, kimyasal proseslerin yerini biyo-proseslere bırakması ile biyolojik katalizörler olarak enzimlerin potansiyel uygulama alanları giderek artmaktadır. Atıksu arıtımı, gıda, deri, deterjan, tarım, tekstil, boya, yem, kağıt, biyoyakıt, sağlık ve yenilenebilir enerji kaynaklarının üretimi gibi çeşitli endüstriyel alanlarda enzim uygulamalarına olan ilginin artışı ile birlikte, stabil ve kararlı biyokatalizörlerin üretimi için bitkisel, hayvansal dokular ve mikroorganizmalar gibi farklı biyolojik kaynaklar proses tasarımcıları ve genetik mühendislerinin ilgi odağı haline gelmiştir.

Günümüzde, çeşitli biyo-proseslerde termostabil, asit ve alkali toleranslı, çeşitli metallere ve bileşiklerin varlığında aktivitesini koruma, toksik yan ürün oluşturmama gibi özelliklere sahip endüstriyel alanda önemli yüksek saflıktaki enzimler mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Dünya pazarındaki yerine bakıldığında, endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %75'ini mikroorganizmalardan elde edilen hidrolitik enzimler oluşturmakta olup, karbohidratları parçalayan enzim grupları proteolitik enzim gruplarından sonra ikinci sırada bulunmaktadır (Korkmaz, 2016). Glikozidik bağları yıkan karbohidrat parçalayıcı enzimlerden ksilanaz, selüloz ve pektinaz ile birlikte enzim piyasasının %20'sini kapsamaktadır.

Ksilanaz enzimi, selüloz (1,4- $\beta$ -glukan) ve lignin (kompleks bir polifenolik bileşik) ile birlikte bitki hücre duvarlarının temel polimerik bileşenlerini oluşturan ve yüksek oranda dallanmış heteropolisakkarit bir kompleks olan ksilanın 1,4-bağlı  $\beta$ -D-ksilopiranozil ünitelerinin homopolimerik omurga zincirini hidrolize eden bir enzimdir (Motta ve ark., 2013). Ksilanaz enzimi, kâğıt hamurunun ağartılması, keten, kendir, jüt ve rami işlenmesi, nektar ve pürele eldesi ile bitkisel yağ ve şarap imalatı, meyve sularının berraklaştırılması, tarımsal, evsel ve endüstriyel atıkların arıtılması, ligninden ve ekstrakt maddelerden kaynaklanan biyolekelerin arıtılması ve hayvan yem katkısı ve frıncılık gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılmaktadır.

Çalışmamızda Kilis 7 Aralık Üniversitesi merkez kampüs toprak örneğinden ksilanaz üretici *Bacillus* spp. izolasyonu ve kısmi saflaştırılan ksilanazın endüstriyel uygulanabilirliğinin araştırılması için karakterizasyon analizleri hedeflenmiştir. Ksilanaz üretici 42 adet *Bacillus* spp. izole edilmiş olup, sıvı fermantasyon ortamındaki tarama testleri sonucunda B28, B34 ve B35 olarak isimlendirilen 3 adet suş ile

çalışmaya devam edilmiştir. Suşlardan elde edilen hücre serbest ksilanaz preparatlarının enzim aktiviteleri sırasıyla, 552 U/L, 723 U/L ve 479 U/L olarak belirlenmiştir. En yüksek enzim aktivitesi gösteren B34 suşu ile saflaştırma prosesleri sürdürülmüştür.

B34 suşundan elde edilen hücre serbest ksilanaz preparatı, alkol ve amonyum sülfat presipitasyonu uygulamaları ile saflaştırılmış olup, her preparatın enzim aktivitesi analiz edilmiştir. Preparatlardaki en yüksek total ve spesifik aktivite, 70 U ve 64.81 mg/mL olarak ham enzim preparatında belirlenmiştir. Bu preparat kullanılarak ekstraselüler ksilanazın karakterizasyon çalışmaları sürdürülmüştür.

Glisin (pH 2.4-2.8), Sitrat (pH 3.0-5.8), Sitrat fosfat (pH 6.2-6.6), Fosfat (pH 7.0) , Tris-HCl (pH 7.4-9.0) ve Karbonat bikarbonat (pH 9.4-10.6) tampon sistemleri kullanılarak pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Farklı pH aralıklarında elde edilen en yüksek relatif enzim aktivitesi pH 10.6'da, 1001 U/L olarak hesaplanmıştır.

pH 10.6'daki karbonat-bikarbonat tamponunda hazırlanmış substrat çözeltisi kullanılarak, 20-120°C sıcaklık aralığında sürdürülen aktivite analizlerinde en yüksek relatif aktivite 90°C'de 1758 U/L olarak belirlenmiştir. 90°C sıcaklıkta 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 dakika ön inkübasyona tabii tutulan ksilanazın aktivitesini, 15 dakikalık ön inkübasyonda %167'e kadar arttığı saptanmıştır. Bu sürede hesaplanan enzim aktivitesi 2935 U/L'dir.

Aktivitenin %50'sinden fazlasının korunduğu 30 dakikalık inkübasyon sonunda en düşük enzim aktivitesi kaydedilmiş olup, söz konusu enzimin inkübasyon sürelerinde termostabilitesini yüksek oranda koruduğu ortaya konmuştur. Karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına dayanarak, B34 suşundan elde edilen ekstraselüler ksilanazın alkalifilik termostabil enzim olduğu söylenebilmektedir.

B34 suşundan kısmi olarak saflaştırılan ksilanaz enziminin moleküler ağırlığı %12'lik homojen SDS-PAGE ve zimogram kullanılarak belirlenmiş olup, enzime ait ortalama 38.75 kDa moleküler ağırlığında tek protein bandı elde edilmiştir.

Optimum aktivitenin gözlendiği 90°C ve pH 10.6'da 15, 30, 60 ve 24 saat sürdürülen hidroliz reaksiyonu sonucu TLC plakalarında reaksiyon ürünü olarak standart ürünlerden farklı olarak ksilo-oligosakkaritlerin varlığı belirlenmiştir. 60°C ve pH 7.0'daki enzim aktivasyonu sonucu alınan örneklerin TLC analizleri sonucunda ise reaksiyon karışımında ksiloz ve ksilo-oligosakkaritlerin birikimi tespit edilmiştir.

Selüloz fibrillerini korumak için, hamurların biyolojik ağartılmasında, yüksek sıcaklıklarda ve alkalın pH'da aktif ksilanazların tercih edilmesinden dolayı çalışmamızda *Bacillus* spp. suşundan kısmi saflaştırılan ksilanazın, alkalifilik ve termostabil aktivitesi ile kağıt endüstrisinde kullanılabilir nitelikte olduğu öngörülmektedir.

Gıda endüstrisinde ise, ksilanazların özellikle fırın ürünleri sektöründeki hamur yoğrulması ve işlenmesi uygulamaları için 35°C'nin altındaki sıcaklıklarda stabil enzim tercih edilmektedir (Yeğin ve Büyükkilleci, 2015). Bu bağlamda 40°C'nin altındaki test edilen 20 ve 30°C'de relatif aktivite %14 ve 37 olarak belirlenmiş olup, söz konusu ksilanaz bu sektördeki uygulamalar için yeterli nitelikte değildir.

Kanatlı hayvanların beslenmesinde en önemli enerji kaynağı karbohidratlar olup, buğday, arpa, yulaf ve çavdar gibi buğdaygil daneleri yem olarak kullanılmaktadır. Bitkisel yem kaynaklarındaki karbohidratlar basit şekerler, depo polisakkaritleri ve hücre duvarı polisakkaritleri şeklinde ayrılmaktadır. Hücre duvarı polisakkaritleri, nişasta tabiatında olmayan polisakkaritler (NOP: selüloz, hemiselüloz, pektinler, ksilan ve oligasakkaritler) olarak da bilinmektedir. Kanatlı hayvanlar sindirim sistemlerinde NOP'leri parçalayan enzimlerden yoksun oldukları için bu besinler antibesinsel faktör olarak kabul edilmektedir (Kırkpınar ve Açıkgöz, 2003). Ksilanın da yer aldığı NOP'ler etlik piliç üretiminde kullanıldığında, su bağlama kapasitesi yüksek olduğundan bağırsak viskozitesini arttırmakta olup, ince bağırsaktaki besin maddelerinin sindirimini ve emilimini azaltmaktadır. (Sargın ve Öngen, 2003). Kısacası, yemlerin sindirim kanalında kalma süresini kısaltıp, hayvanın besin maddelerinden yararlanmasını engellemektedir. Mikrobiyal fermantasyona uğrayan içerik, bağırsak mikroflorasındaki bakteri kompozisyonunu da değiştirmektedir (Kırkpınar ve Açıkgöz, 2003).

Yüksek viskozite, yapışkan dışkı miktarının artmasına ve beraberinde ıslak altlık problemine neden olmaktadır (Sargın ve Öngen, 2003). Yapışkan dışkı sorunu ile yumurtaların yüzeyleri değişen bağırsak mikroflorası ile kontamine olmaktadır. Kontaminant, yumurtadan elde edilen mayonez gibi salata sosları ile geniş kitlelere taşınarak gıda kaynaklı hastalıklara sebep olmaktadır.

Sindirilebilirlik farklılıklarını minimize edip, sindirim organlarındaki mikrobiyal dengenin korunabilmesi, karma yemlerdeki NOP'lerin yıkımı için ksilanaz gibi

enzimlerin yeme katkı maddesi olarak kullanımı ile sağlanmaktadır (Kırkpınar ve Açıkgöz, 2003).

Yem endüstrisinde 70-90°C’de gerçekleştirilen pelet oluşturma (Yeğın ve Büyükkilleci, 2015) işlemleri sırasında termostabil NOP yıkıcı enzim ihtiyacı, tez çalışmamızda elde ettiğimiz termostabil ksilanazın yem endüstrisinde potansiyel uygulanabilirliğini ifade etmektedir. Ekonomisi büyük ölçüde hayvancılığa bağlı ülkemiz için, çalışmamızda elde ettiğimiz ksilanaz düşük değerli tarımsal yan ürünlerin hayvan yemi olarak kullanılabilirliğine olanak sağlayabilecektir.

İleriki çalışmalarımızda, B34 suşundan elde edilen ekstraselüler ksilanaz enziminin başta yem endüstrisi olmak üzere, çeşitli endüstriyel biyo-proseslerde kullanılabilirliğini arttıracak, düşük değerli tarımsal yan ürünleri substrat olarak kullanıp üretim ortamının optimizasyon çalışmalarına yön verilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

- Abo-State, M.A.M., Fadel, M. , Abdellah, E.M., Ghaly, M.F., 2013. Studying the Stability of Cellulases and Xylanase Produced by Thermophilic and Alkaliphilic Bacterial Strains Isolated from Agricultural Wastes. *American-Eurasian J. Agric. & Environ* 13 (11): 1568-1575.
- Altun, H., 2012. Ksilanaz Enzimi ksilan-7'nin Enzimatik Özelliklerinin Belirlenmesi Ve Kağıt Hamuru Ağartma Endüstrisi'nde Kullanımı. KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Yüksek lisans Tezi.
- Annamalai N, Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T., Deniz ortamından izole edilen *Bacillus subtilis*'in ısıya dayanıklı ve alkalın toleranslı ksilanaz üretimi. *Hint J Biyoteknolojisi*. 2009; 8: 291-297.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus spp.* İzolasyonu, Amilaz, Selüla ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. FBE. Doktora Tezi.
- Bai W, Xue Y, Zhou C, Ma Y (2012) Cloning, expression and characterization of a novel salt tolerant xylanase from *Bacillus spp.* SN5. *Biotechnol Lett* 34:2093–2099.
- B.C. Salles, R.B. Cunha, W. Fontes, M.V. Sousa, E.X.F. Filho, Purification and characterization of a new xylanase from *Acrophialophora nainiana*, *J. Biotechnol.* 81 (2001) 199–204.
- B.S. Chadha, B.K. Ajay, F. Mellon, M.K. Bhat, Two endoxylanases active and stable at alkaline pH from the newly isolated thermophilic fungus, *Myceliophthora spp.* IMI 387099, *J. Biotechnol.* 109 (2004) 227–237.
- Bajaj, B.K., Manhas, K., 2012. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1(4) 330-337.
- Blanco, A., Pastor, F.I.J, 1993. Characterization of cellulase-free xylanases from the newly isolated *Bacillus spp.* strain BP-23. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(12) 1162-1166
- Bollag,. D.M, Rozycki, S.J., Edelstein,1996. *Protein Methods* (2nd Edt). Viley-Liss Press, USA. 414s.
- Butt, M.S., Nadeem, M.T., Ahmad, Z., Sultan, M.T., 2008. Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *National Institute of Food Science and Technology, University of Agriculture* 46 (1) 22–31.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap1, P.L., Srivastava, A.K., 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. This article is published with open access at Springerlink DOI 10.1007/s13205-016-0457-z.
- CHATURVEDI,S., SPAUL KHURANA, S.M., 2016. Partial Purification And Characterization Of Cellulase-Free Xylanase Production From *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 7(4), 144 – 149.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L., Luciano, A.B., Silva, R.F., 2002. Production and Properties of Xylanase From Thermophilic *Bacillus spp.* *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal* 45(4), 413-418.



- Duarte1, M.C.T., Pellegrino, A.C.A., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Franco, T.T., 2000. Characterization Of Alkaline Xylanases From *Bacillus pumilus*. M.C.T. Brazilian Journal of Microbiology 31:90-94.
- Gessesse, A., Gashe, B.A., 1997. Production of alkaline xylanase by an alkaliphilic *Bacillus spp.* Isolated from an alkaline soda lake. Journal of Applied Microbiology 83, 402-406.
- Georis, J., Giannotta, F., de Buyl, E., Granier, B., Frere, J.M. Purification and properties of three endo-b-1,4-xylanases produced by *Streptomyces spp.* strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulp, Enzyme Microb. Technol. 26 (2000) 178–186.
- Goswami, G.K., Krishnamohan, M., Nain, V., Aggarwal, C., Ramesh, B., 2014. Cloning and heterologous expression of cellulose free thermostable xylanase from *Bacillus brevis*. Goswami et al. SpringerPlus 3,20.
- Gupta, N., Vohra, R.M. , Hoondal, G.S., 1992. Thermostable Extracellular Xylanase from Alkalophilic *Bacillus spp.* NG-27. Biotechnology Letters, 4 (11), 1045-1045.
- Gupta, U., Kar, R., 2009. Xylanase Production by a Thermo-tolerant *Bacillus spp.* under Solid-state and Submerged Fermentation. Brazilian Archives Of Biology And Technology 6, 1363-1371.
- Helianti, İ., Ulfah, M., Nurhayati, N., Suhendar, D., Finalissari, A.K., Wardani, A.K., 2016. Production of Xylanase by Recombinant *Bacillus subtilis* DB104 Cultivated in Agroindustrial Waste Medium. Hayati Journal of Biosciences 23, 125-131.
- Hiremath, K.S., Patil, C.S., 2011. Isolation, Production And Characterization Of Alkalo Thermostable Xylanase From Newly Isolated *Bacillus Spp.* International Journal of Biotechnology Applications 3(1), 48-51.
- Ho, H., Heng, K.L., 2015 Xylanase Production by *Bacillus subtilis* in Cost-Effective Medium Using Soybean Hull as Part of Medium Composition under Submerged Fermentation (SmF) and Solid State Fermentation (SsF). J Biodivers Biopros Dev 2: 143. doi:10.4172/2376-0214.1000143.
- Irfan, M., Asghar, U., Nadeem, M., Nelofer, R., Syed, Q., 2016. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus spp.* in submerged fermentation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences 9, 139-147.
- İnce, E., 2006. Ksilanaz Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin İzolasyonları Ve Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi.
- Kalim, B., Nazish , M.A., 2016. Optimization of fermentation media and growth conditions for microbial xylanase production. This article is published with open access at Springerlink 6:122 DOI 10.1007/s13205-016-0445-3.
- Kamble RD, Jadhav AR (2012) Xylanase production under solid-state and submerged fermentation conditions by bacterial strains. African Journal of Microbiology Research 6: 4292-4297.
- Kapilan, R., 2015. Purification Of Xylanase From *Bacillus subtilis* Bs166. Journal of Science 5(7), 2277 – 3290.
- Kırkpınar, F., Açıkgöz, Z., 2003. Kanatlı Hayvanlarda Nişasta Tabiyatında Olmayan Polisakkaritlerin Sindirim Sistemi Mikroflorası Üzerine Etkileri. Hayvansal Üretim 44(2): 20-28.
- Kiddinamoorthy J, Anceno AJ, Haki GD, Rakshit SK. *Bacillus spp.* Üretimi, saflaştırılması ve karakterizasyonu. Okalıptüs kraft hamuru biyoblokajda GRE7

- xylanase ve uygulaması. Dünya J Microb Biyoteknolojisi. 2008; 24: 605-612. Doi: 10.1007 / s11274-007-9516-2.
- Ki-Hong, Y., 2009. Cloning of the *Bacillus subtilis* AMX-4 Xylanase Gene and Characterization of the Gene Product. J. Microbiol. Biotechnol 19(12), 1514–1519.
- Kimura, H., Sasahara, S., Tajima, Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*, J. Ferment. Bioeng. 80 (1995) 334–339.
- Korkmaz, M.N., 2016. Denizel Türevli Filamentöz Fungus Suşlarının Ksilanaz Üretim Kapasitelerinin Belirlenmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. P:88
- Kormelink, F.J.M., Searle-van Leeuwen, M.J.F., Wood, T.M., Voragen, A.G. J., Purification and characterization of three endo-(1,4)-b-xylanases and one b-xylosidase from *Aspergillus awamori*, J. Biotechnol. 27 (1993) 249–265.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A. and Nicolaus, B. 2004. Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. Research in Microbiology, 155; 283-289.
- Lin, S., “Identification of Contamination Sources of *Bacillus cereus* in Pasteurized Milk”, Masters Thesis, The University of Guelph, 1997.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- M. Ghareib, M.M.N. El Dein, Purification and general properties of xylanase from *Aspergillus terreus*, Zbl. Mikrobiol. 147 (1992) 569–576.
- Martinez-Anaya, M.A., Jimenez T., Physical properties of enzyme supplemented doughs and relationship with bread quality parameters, Z. Lebensm. Unters. Forsch A, 206 (1998) 134–142.
- M.T. Fernandez-Espinar, F. Pinaga, L.H. de Graaff, J. Visser, D. Ramon, S. Valles, Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase, Appl. Microbiol. Biotechnol. 42 (1994) 555–562.
- Mahilrajana, S., Balakumar, S., Arasaratnam, V., 2012. Effect of Xylan on Xylanase Production by *Bacillus pumilus* Under Submerged Fermentation. Ving. Journal of Science 11(1), 12-18.
- Maity, C., Ghosh, K., Halder, S.K., Jana, A., Adak, A., Mohapatra, P.K.D., Pati, B.R., Mondal, K.C., 2012. Xylanase Isozymes from the Newly Isolated *Bacillus spp.* CKBx1D and Optimization of its Deinking Potentiality. Appl Biochem Biotechnol 167:1208–1219.
- Menon, G., Mody, K., Keshri, J., Jha, B., 2010. Isolation, Purification, and Characterization of Haloalkaline Xylanase from a Marine *Bacillus pumilus* Strain, GESF-1. Biotechnology and Bioprocess Engineering 15: 998-1005.
- Miller GL (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Mittal, A., Nagar, S., Simran Jot Kaur, K., Kumar Gupta, V., 2012. Isolation, Purification and Characterization of Alkali and Thermo Stable Xylanase From *Bacillus spp.* International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences 1(2), 63-68.

- Monisha, R., Uma, M.V., Krishna Murthy, V., 2009. Partial Purification and Characterization of *Bacillus pumilus* Xylanase From Soil Source. Kathmandu University Journal Of Science, Engineering And Technology 5(2), 137- 148.
- Motta, F. L., Andrade, C. C. P., Santana, M. H. A., 2013. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. Additional information is available at the end of the chapter DOI: 10.5772/53544.
- N. Kitamoto, S. Yoshino, K. Ohmiya, N. Tsukagoshi, Purification and characterization of the overexpressed *Aspergillus oryzae* xylanase, XynF1, Biosci. Biotechnol. Biochem. 63 (1999) 1791–1794.
- N.B. Ghanen, H.H. Yusef, H.K. Mahrouse, Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements, Bioresour. Technol. 73 (2000)113–121.
- Nakamura S., Wakabayashi K., Nakai R., Aono R., Horikoshi K. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus spp.* strain 41M-1. Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59, 2311–2316.
- Pithadiya, D., Nandha, D., Thakkar, A., 2016. Partial purification and optimization of xylanase from *Bacillus circulans*. Scholars Research Library 8 (2):1-10.
- Poorna, C, A., 2011. Purification and Biochemical Characterization of Xylanases from *Bacillus pumilus* and their Potential for Hydrolysis of Polysaccharides. Fermentation Technology <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7972.1000101>.
- Pratumteep, J., Sansernsuk, J., Nitisinprasert, S., Apiraksakorn, J., 2010. Production, characterization and hydrolysis products of xylanase from *Bacillus subtilis* GN156. International Conference for Value Added Agricultural Products 15(5), 2553.
- R. Bernier, M. Desrochers, L. Jurasek, and M. G. Paice, “Isolation and characterization of a xylanase from *Bacillus subtilis*,” Applied and Environmental Microbiology, vol. 46, no.2, pp. 511–514, 1983.
- R.J. Ridgwell, J.H. de Michieli, M. Fischer, S. Reymond, P. Nicolas, D. Sievert, Xylanase induced changes to water- and alkali-extractable arabinoxylans in wheat flour: Their role in lowering batter viscosity, J. Cereal Sci. 33 (2001) 83–96.
- Ratanakhanokchai K., Kyu K.L., Tanticharoenm M. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus spp.* strain K-1. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65, 694–697.
- Rathore, S.S., Mannivannan A., Narendhirakannan, R.T., 2014. Screening Of Cellulase Producing Microorganisms From Lake Area Containing Water Hyacinth For Enzymatic Hydrolysis Of Cellulose. Journal of Advanced Scientific Research 5(3): 23-30.
- Roy, N., and Rowshanul, M., 2009. Isolation and characterization of Xylanase producing strain of *Bacillus cereus* from soil. Iranian Journal of Microbiology 2, 49-53.
- Sargin, S., Öngen G., 2003. Kanatlı Yemi Katkısı Olarak Kullanılan Ksilanaz Enziminin Katı Kültür Fermantasyon Yöntemi ile Üretiminde Ölçek Büyütme Çalışmaları, Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 40 (3):145-152
- S. Singh, P. Reddy, J. Haarhoff, P. Biely, B. Janse, B. Pillay, D. Pillay, B.A. Prior, Relatedness of *Thermomyces lanuginosus* strains producing a thermostable xylanase, J. Biotechnol. 81(2000) 119–128.

- S.E. Ryan, K. Nolan, R. Thompson, G.M. Gubitz, A.V. Savage, M.G. Tuohy, Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsularium*, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 775–785.
- Sapre, M., Jha, H. and Patil, M. 2005. Purification and characterization of a thermoalkalophilic xylanase from *Bacillus spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 21 (5): 649-654.
- Sarı, B., 2016. Rize Ayder Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Ksilanaz Enziminin *Geobacillus galactosidasius* Bs61 Bakterisinden Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Sharma, S.C.D., Shovon, M.S., Asaduzzaman, A.K.M., Sarowar Jahan, M.G., Yeasmin, T., Roy, N., 2011. Optimization Of Alkali-Thermostable And Cellulase-Free Xylanase Production From *Bacillus spp.* *J. bio-sci.* 19, 7-14.
- Shrinivas, D., Savitha, G., Raviranjana, K., 2010 A Highly Thermostable Alkaline Cellulase-Free Xylanase from Thermoalkalophilic *Bacillus spp.* *JB 99 Suitable for Paper and Pulp Industry: Purification and Characterization et al. Appl Biochem Biotechnol* 162: 2049-2057.
- SILVA, L.G., TRUGO, L.C., TERZİ, S.C., and COURİ, S., 2005. Low phytate lupin flour based biomass obtained by fermentation with a mutant of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 40, 951–954.
- Sümengen, M., 2011. Laktik Asit Bakterilerinden Fitaz Üretimi Ve Endüstriyel Kullanım Olanakları. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ.
- Şentürk, S.B., 2013. Endüstriyel Kullanım Amaçlı Ksilanaz Enziminin Rekombinant Olarak Üretilmesi, Saflaştırılması Ve Karakterizasyonu. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- Taneja K., Gupta, S., Kuhad, R.C, Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99, *Bioresour. Technol.* 85 (2002) 39–42.
- Tamariz-Angeles, C., Olivera-Gonzales, P., Villena, G.K., Gutierrez-Correa, M., 2014. Isolation and Identification of Cellulolytic and Xylanolytic Bacteria from Huancarhuaz Hot Spring, Peru. *Annual Research & Review in Biology* 4(19): 2920-2930.
- Techapun C., Poosaran N., Watanabe M., Sasaki K., 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocess: a review. *Process Biochemistry*, 38:1327-1340.
- TEMİZKAN, G. ve ARDA, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İst.345s.
- Weidmann M., Zhang, W., 2011. *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens.* ISBN: 978-1-4419-7685-7. 524 p.
- Yeğin, S., Büyükkilleci, A.O., 2015. Mikrobiyal Ksilanazlar ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları. *Akademik Gıda* 13(4) 317-326.
- Yin L, Lin H, Chiang Y, Jiang S (2010) Bioproperties and Purification of Xylanase from *Bacillus spp.* *YJ6. J Agric Food Chem* 58: 557-562.
- Zambare, V., Zambare, A., Muthukumarappan, K., Christopher, L.P., 2011. Biochemical characterization of thermophilic lignocellulose degrading enzymes

and their potential for biomass bioprocessing. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENERGY AND ENVIRONMENT 2(1), 99-112.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Gökhan SERTBAŞ

**Doğum Yeri:** İSLAHİYE

**Doğum Tarihi:** 01.05.1987

**E posta:** gkhnsertbas@gmail.com

**Yabancı Dili:** İNGİLİZCE

**Eğitim Durumu (Okul, başlama ve mezuniyet yılı, şehir) :**

**Lisans:** Kilis 7 Aralık Üniversitesi, 2009-2013, KİLİS

**Yüksek Lisans:** Kilis 7 Aralık Üniversitesi, 2015-2017, KİLİS

