



***Aspergillus terreus* NRRL 1960 KSİLANAZİNİN
SAFLAŞTIRILMASI, KRİSTALİZASYONU VE BİYOKÜTLE
HİDROLİZ BAŞARIMININ BELİRLENMESİ**

**Nurunnisa Atçeken
Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ
Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ
Ekim, 2016**

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aspergillus terreus NRRL 1960 KSİLANAZININ SAFLAŞTIRILMASI,
KRİSTALİZASYONU VE BİYOKÜTLE HİDROLİZ BAŞARIMININ
BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurunnisa Atçeken

Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK

Programı : BİYOMÜHENDİSLİK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

KARAMAN-2016

TEZ ONAYI

Nurunnisa Atçeken tarafından hazırlanan “*Aspergillus terreus* Ksilanazının Safılaştırılması, Kristalizasyonu ve Biyokütle Hidroliz Başarımının Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Eş Danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Juri yeleri

İmza:

Prof. Dr. Ufuk BAKIR BÖLÜKBAŐ

Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

Tez Savunma Tarihi: 10/10/2016

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Nurunnisa Atçeken

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Aspergillus terreus* NRRL 1960 KSİLANAZININ SAFLAŞTIRILMASI, KRİSTALİZASYONU VE BİYOKÜTLE HİDROLİZ BAŞARIMININ BELİRLENMESİ**

Nurunnisa Atçeken

**Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı**

Danışman: Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Eş danışman: Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ

Ekim, 2016, 88 sayfa

Bu çalışmanın amacı, *Aspergillus terreus* NRRL 1960 ksilanazının saflaştırılması ve X-ışını difraksiyonu tekniği ile üç boyutlu yapı analizi için enzim kristallerinin üretilmesidir. Bu amaçla, enzim üretimi, saflaştırılması ve kristalizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Enzim üretimi, batık kültür fermantasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma süreci sırasıyla amonyum sülfatla çöktürme, hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi ve ultrafiltrasyon aşamalarından oluşmaktadır. Sonuç olarak ksilanaz, %10 verimle 256-kat saflaştırılmış ve kristalizasyon çalışmaları için kullanılmıştır. Enzimin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 18 kDa olarak belirlenmiştir.

Enzim kristalizasyonu asılı ve oturan damla buhar difüzyonu teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Kristal üretimi için dört farklı ticari kit kullanılarak kristalizasyon koşul taraması yapılmış ve dört ayrı başlangıç kristalizasyon koşulu belirlenmiştir. Elde edilen kristallerin kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla koşullar optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda, X-ışını difraksiyonu için en uygun kristaller, 1,5 M amonyum sülfat, 0,1 M Tris (pH 8,5), %12 (h/h) gliserol içeren çöktürme reaktifi kullanılarak 18°C sıcaklıkta, asılı damla buhar difüzyonu tekniğiyle elde edilmiştir.

Ksilanazın farklı lignoselülozik materyaller üzerindeki hidrolitik etkisinin belirlenmesi amacıyla mısır koçanı, buğday kepeği ve ticari ksilan hidrolize edilmiştir. Yapılan hidroliz tepkimeleri sonucu yüksek konsantrasyonda indirgen şeker elde edilmiştir. Böylece, ksilanazın kullanılan kaynaklar üzerinde hidrolitik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus terreus*, Ksilanaz, Hidrofobik Etkileşimli Kolon Kromatografisi, Enzim Saflaştırma, Enzim Kristalizasyonu, Biyokütle Hidrolizi.

ABSTRACT

Ms Thesis

PURIFICATION AND CRYSTALLIZATION OF *Aspergillus terreus* NRRL 1960 XYLANASE AND DETERMINATION OF ITS BIOMASS HYDROLYSIS PERFORMANCE

Nurunnisa Atçeken

**Karamanoglu Mehmetbey University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Co-supervisor: Asst. Prof. Dr. Aytaç KOCABAŞ

October, 2016, 88 pages

The purpose of this study was purification of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 xylanase and production of enzyme crystals for three dimensional structure analysis by X-ray diffraction technique. For this aim, enzyme production, purification and crystallization were performed.

Enzyme production was carried out by using submerged fermentation technique. The purification process consisted of ammonium sulphate precipitation, hydrophobic interaction column chromatography and ultrafiltration steps, sequentially. As a result, xylanase was purified 256-fold with 10% yield and was further used for crystallization studies. The molecular weight of enzyme was determined as 18 kDa by SDS-PAGE.

Enzyme crystallization was performed by using hanging and sitting drop vapor diffusion techniques. For crystal production, screening of crystallization conditions by using four different commercial kits was done and four different initial crystallization conditions were determined. To enhance the quality of obtained crystals, conditions were optimized. In consequence of optimization, the most suitable crystals for the X-ray diffraction were obtained by using a precipitation reagent containing 1.5 M ammonium sulphate, 0.1 M Tris (pH 8.5), 12% (v/v) glycerol, at 18°C with hanging drop vapor diffusion technique.

In order to determine the hydrolytic effect of xylanase at lignocellulosic resources, corn cob, wheat bran and commercial xylan were hydrolyzed. As a result of hydrolysis reactions, reducing sugars at high concentrations were obtained. Therefore, it was concluded that xylanase has hydrolytic effect on the utilized lignocellulosic sources.

Key words: *Aspergillus terreus*, Xylanase, Hydrophobic Interaction Column Chromatography, Enzyme Purification, Enzyme Crystallization, Biomass Hydrolysis.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Proteinler.....	4
2.2. Enzimler.....	5
2.2.1. Enzimlerin Sınıflandırması.....	7
2.2.2. Ksilanazlar ve Ksilanolitik Enzim Sistemi.....	7
2.2.3.Ksilanazın Kullanım Alanları.....	8
2.3. Mikroorganizmalar.....	10
2.3.1. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar.....	11
2.3.2. <i>Aspergillus terreus</i>	11
2.4. Enzim Üretimi.....	12
2.5. Lignoselülozik Materyaller.....	12
2.5.1. Ksilan.....	14
2.5.2. Enzimatik Hidroliz ve İndirgen Şeker Üretimi.....	15
2.6. Enzim Saflaştırma.....	16
2.6.1. Proteinlerin Tuz ile Çöktürülmesi.....	17
2.6.2. Kromatografik Yöntemler.....	18
2.6.3. Hidrofobik Etkileşimli Kolon Kromatografisi.....	18
2.6.4. Ultrafiltrasyon.....	20
2.7. Proteinlerin Üç Boyutlu Yapısının Belirlenmesi.....	21
2.7.1. Kristal Sistemleri.....	22
2.7.2. Kristalizasyon İçin Örnek Hazırlama (Ön Kristalizasyon).....	23
2.7.3. Protein Kristalizasyonu ve Kristalizasyonda Kullanılan Teknikler.....	24
2.7.4. İlk Kristal Koşullarının Belirlenmesi.....	26
2.7.5. Kristalizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	27

2.8. Proteinlerin Kristal Yapılarının Analizi İçin Kullanılan Teknikler.....	28
2.8.1. Elektron Mikroskopisi.....	28
2.8.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi.....	29
2.8.3. X-Işını Difraksiyonu.....	29
3. MATERYAL VE METOT.....	32
3.1. Mikroorganizma ve Fermantasyon Koşulları.....	32
3.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32
3.3. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	33
3.4. Enzim Saflaştırma Çalışmaları.....	34
3.4.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme.....	34
3.4.2. Hidrofobik Etkileşimli Kolon Kromatografisi.....	34
3.4.3. Ultrafiltrasyon ve Konsantrasyon.....	35
3.4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Saf Enzimin Görüntülenmesi.....	35
3.5. Protein Kristalizasyon Çalışmaları.....	36
3.5.1. Ön Kristalizasyon İşlemleri.....	36
3.5.2. Kristal Oluşumu İçin Uygun Koşulların Taranması.....	38
3.5.3. Kristallerin Protein Yapıda Olduğunun Gösterilmesi.....	39
3.5.4. Kristalizasyon Koşullarının Optimizasyonu.....	39
3.5.5. Tohumlama Tekniği.....	40
3.6. Enzimatik Teknikle Ksilanın Hidrolizi.....	40
3.6.1. Hemiselüloz Özütleme.....	41
3.6.2. Enzimatik Hidroliz.....	41
3.6.3. Hidroliz Sonucu Oluşan İndirgen Şeker Miktarının Belirlenmesi.....	42
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	43
4.1. Ksilanın Saflaştırılması.....	43
4.1.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme Sonuçları.....	43
4.1.2. Hidrofobik Etkileşimli Kolon Kromatografisi.....	44
4.1.3. Ultrafiltrasyon ve Konsantrasyon.....	45
4.1.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforez Görüntüleri.....	48
4.2. Ksilanın Kristalizasyonu.....	50
4.2.1. Ön Kristalizasyon Sonuçları.....	51
4.2.2. Kristal Oluşumu İçin Uygun Koşulların Taranması ile Elde Edilen Sonuçlar....	52
4.2.3. Kristallerin Protein Yapıda Olduğunun Gösterilmesi.....	52

4.2.4. Kristalizasyon Koşullarının Optimizasyonu ile Elde Edilen Sonuçlar.....	55
4.2.5. Tohumlama Tekniği ile Elde Edilen Sonuçlar.....	64
4.3. Enzimatik Teknikle Ksilanın Hidrolizi Sonuçları.....	65
4.3.1. Hemiselüloz Özütleme Sonuçları.....	65
4.3.2. Enzimatik Hidroliz Performansının Belirlenmesi.....	66
5. SONUÇ	69
KAYNAKLAR	71
EKLER	79
EK 1 Kültür Ortam Bileşenleri.....	79
EK 2 DNS Metodu.....	80
EK 3 Ksiloz Standart Eğrisi.....	81
EK 4 Bradford Metodu ile Protein Miktarının Belirlenmesi.....	82
EK 5 Hidrofobik Etkileşimli Kolon Özellikleri.....	83
EK 6 SDS-PAGE İçin Kullanılan Reaktifler ve Jellerin Hazırlanması	84
EK 7 Commassie Boyama Yöntemi.....	86
EK 8 Örnek Bir Optimizasyon Plakası.....	87
ÖZGEÇMİŞ	88

ÖNSÖZ

Öncelikle, tez konumla araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, çalışma disipliniyle bana örnek oluşturan danışmanım Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ'a, yine tecrübeleriyle bana yol gösteren, bursiyer olarak çalıştığım TÜBİTAK araştırma projesinin yürütücüsü ve eş danışmanım Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a teşekkür ederim. Deneyler esnasında benden yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Eren TUR'a teşekkür ederim. Bu çalışma için 212T143 kodlu proje kapsamında destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam boyunca laboratuvarlarını benimle paylaşan Gıda Mühendisliği Bölümü ve Biyomühendislik Bölümü'ne gösterdikleri destek ve anlayıştan dolayı teşekkür ederim.

Son olarak teşekkürden çok daha fazlasını borçlu olduğum, desteklerini her zaman arkamda hissettiğim annem Ayşe ATÇEKEN, babam Hüseyin ATÇEKEN ve ablam Aynur CAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Enzim grupları ve katalizledikleri reaksiyonlar.....	7
Çizelge 3.1. Ön kristalizasyon aşamalarında kullanılan reaktiflerin formülasyonları...37	
Çizelge 3.2. Ön kristalizasyon sonuçları ve öneriler.....	37
Çizelge 3.3. Kristalizasyon denemelerinde gözlemlenebilecek tipik oluşumlara ait kodlar ve resimlendirmeleri.....	39
Çizelge 4.1. Farklı oranlarda yapılan amonyum sülfat çöktürme sonuçları.....	44
Çizelge 4.2. Ksilanazın saflaştırmasına ait saflaştırma tablosu.....	46
Çizelge 4.3. Literatürde bulunan <i>Aspergillus terreus</i> ksilanazı saflaştırma çalışmaları.....	47
Çizelge 4.4. Kristal tarama işlemleri sonucu optimizasyon için seçilen kristaller ve bu kristallere ait başlangıç koşulları.....	56
Çizelge 4.5. Optimizasyon denemelerine ait çalışma aralıkları.....	58
Çizelge 4.6. Optimizasyon işlemleri sonucu elde edilen kristaller.....	59
Çizelge 4.7. Tohumlama sonucu gözlemlenen görüntüler.....	64
Çizelge 4.8. Mısır koçanının enzimatik hidrolizi sonucu oluşan indirgen şeker miktarı.....	66
Çizelge 4.9. Buğday kepeğinin enzimatik hidrolizi sonucu oluşan indirgen şeker miktarı.....	67
Çizelge 4.10. Ticari ksilanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan indirgen şeker miktarı.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. İki aminoasitli bir proteinin kimyasal yapısı.....	4
Şekil 2.2. Aminoasitlerin farklı pH'lardaki elektriksel yüklerinin gösterimi.....	5
Şekil 2.3. Selülozun yapısı.....	13
Şekil 2.4. Hemiselülozun yapısı.....	14
Şekil 2.5. Ksilanın yapısı ve ksilanın tam hidrolizinden sorumlu enzimlerin etki ettikleri bölgeler.....	15
Şekil 2.6. Protein üretim ve saflaştırılmada genel olarak izlenen yol.....	17
Şekil 2.7. Amonyum sülfat eklenmesiyle protein çöktürmesi.....	18
Şekil 2.8. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (a) hidrofobik etkileşimli kolonun temel yapısı (b) tuz eklenmesiyle hidrofobik etkileşim oluşturulmuş kolonun yapısı...	20
Şekil 2.9. Kristal sistemleri.....	23
Şekil 2.10. Üç boyutlu Bravais Lattice şekilleri.....	24
Şekil 2.11. Çözünürlük faz diyagramı.....	26
Şekil 2.12. Buhar difüzyon teknikleri, (a) asılı damla, (b) oturan damla, (c) sandviç damla.....	28
Şekil 2.13. Bragg Kanunu.....	31
Şekil 4.1. Hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisine ait kromatogram.....	45
Şekil 4.2. Saf ksilanazın SDS-PAGE görüntüsü.....	49

Şekil 4.3. Saf ksilanazın moleküler ağırlığının tayini grafiği.....	50
Şekil 4.4. Ön kristalizasyon kitiyle 0,5 mg/mL konsantrasyona sahip enzim örneği ile oluşturulan damlacık görüntüleri.....	51
Şekil 4.5. Kristal oluşumu için uygun koşulların taranması sonucu elde edilen görüntülere ait örnekler.....	53
Şekil 4.6. Izit testi öncesi ve sonrası gözlemlenen görüntüler.....	54



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

rpm

g

kDa

V

IU

nm

MPa

μ L

Açıklamalar

Revolutions per minute (dakikadaki dönüş hızı)

Yerçekimi ivmesi

Kilodalton (atomik kütle birimi)

Volt (potansiyel fark birimi)

International Unit (uluslararası enzim aktivitesi birimi)

Nanometre (dalga boyu ölçü birimi)

Megapaskal (basınç ölçü birimi)

Mikrolitre (hacim ölçü birimi)

Kısaltmalar

APS

BSA

DNS

NMR

PAGE

PDB

Rf

SDS

TEMED

Açıklamalar

Amonyum persülfat

Bovine serum albümin

Dinitro salisilik asit

Nükleer manyetik rezonans

Poliakrilamid jel elektroforez

Protein Data Bank (Protein veri bankası)

Sürüklenme faktörü

Sodyum dodesil sülfat

Tetra metilen etilendiamin

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda hassas koşullar altında gerçekleşen kimyasal reaksiyonları katalizleme yeteneğine sahip protein yapıda moleküllerdir. Enzimler, canlılar tarafından doğal olarak sentezlenirler ve protein zincirlerinin üç boyutlu yapıda katlanmasıyla oluşan aktif bölgeleri sayesinde etki edecekleri moleküllere bağlanırlar. Enzimlerin 4000'den fazla reaksiyonu katalizledikleri bilinmektedir (Wilson ve Walker, 2010).

Günümüzde enzimler birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır. İlaç, gıda, kağıt ve kağıt hamuru, hayvan yemi endüstrisi bu alanlardan bazılarıdır. Bunların yanı sıra atık değerlendirme ve yapı analizi amacıyla kullanıma da sıklıkla rastlanmaktadır. Endüstriyel enzimler için küresel piyasa hacmi 2012 yılında yaklaşık 4,5 milyar dolar, 2013 yılında 4,8 milyar dolardır ve 2018 yılına kadar 7,1 milyar dolara ulaşması beklenmektedir. Ksilanazın 2013'teki satış hacmi 92,3 milyon dolar iken 2014 yılında 110,9 milyon doları bulmuştur. Artan talepler doğrultusunda, 2020'ye kadar 177,2 milyon doları bulması beklenmektedir (Anonim, 2014).

Bu çalışmada kullanılan ksilanaz enziminin endüstrideki uygulama alanlarının başında kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi gelmektedir. Ksilanın lignini parçalama yeteneği sayesinde kağıt beyazlatmada kullanılan klor miktarı düşürülmüştür. Son zamanlarda ksilanaz hayvan yemi katkı maddesi olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Buğday unundan yapılan hamur özelliklerinin geliştirilmesinde ve fırın ürünlerinin kalitesinin artırılmasında, nişasta, kahve ve bitki yağlarının ekstrakte edilmesinde, tarımsal silaj ve yemlik tahıl maddelerinin besleyici özelliklerinin geliştirilmesinde, pektinaz ve selülozla kombine çalıştığında meyve sularının berraklaştırılmasında, hemiselülozlardan fermente şekerlerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Lama ve ark., 2004).

Ksilanaz hidrolaz grubuna ait bir enzimdir. Ksilanazlar birçok bakteri ve küf tarafından hücre dışı olarak üretilmektedir. Ksilanaz, hemiselüloz yapıyı oluşturan ksilana etki ederek heterotrof beslenmede doğrudan kullanılabilen ksilozun serbest hale geçmesini sağlamaktadır (Kulkarni ve ark., 1999). Ksilan heterojen ve karmaşık bir polimerdir. Bu yüzden ksilanın tamamen hidrolize edilmesinde birden çok enzim görev almaktadır.

Endo-1,4- β -D-ksilanaz (EC 3.2.1.8) ksilanın ana omurgadaki bağlarını rastgele parçalarken, β -D-ksilozidaz (EC 3.2.1.37) ksilooligosakkaritlerin indirgenmemiş uçlarından ksilozları ayırmaktadır. α -L-arabinofuranozidaz (EC 3.2.1.55) a-D-glukoronidaz (EC 3.2.1.139), asetilksilanesteraz (EC 3.1.1.72), ferulik asit esteraz (EC 3.1.1.73) ve p-kumarik asit esteraz enzimleri ise ksilanın yan bağlarının hidrolize edilmesi reaksiyonlarını katalizlemektedir (Collins ve ark., 2005).

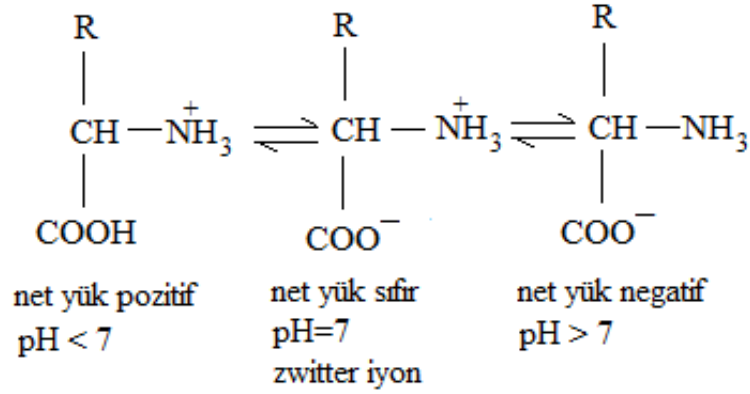
Lignoselülozik biyokütle, gıda olarak tüketilmeye müsait olmayan bitki materyallerinden oluşur. Lignoselülozik materyaller; ormansal, tarımsal ve kırsal atıklardan sağlanmaktadır ve içerik olarak kuru ağırlık açısından ortalama %40-55 selüloz, %24-40 hemiselüloz ve %25-36 lignin bileşenlerini içermektedir. Lignoselüloz içerisindeki ekstraktlar ve mineraller kuru biyokütlenin ağırlığının %10'u kadardır. Hemiselülozik bileşenin ana heteropolimerleri ksilan, mannan, galaktan ve arabinanlardır. D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz ve L-arabinoz ise bu heteropolimerlere tutunmuş halde bulunan şeker monomerleridir (Vazquez ve ark, 2000; Dhiman, 2008; Ayeni ve ark., 2015).

Canlı mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlere genellikle amaca yönelik saflaştırma işlemi uygulanmaktadır. İlk bakışta 10000-20000 farklı protein içeren bir hücre ya da homojenattan bir protein ya da enzimin ayrıştırılması zor bir iş olarak görülmekte fakat pratikte bu işlem ortalama 3-4 farklı adımda gerçekleştirilebilmektedir. Bu adımlar genellikle; süzme, santrifüjleme gibi ön ayırma işlemleri, tuz ile çöktürme ve kromatografik ayırma işlemleridir. Saflaştırma işlemi esnasında izlenen yol proteinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine, istenilen son saflık derecesine göre şekillendirilmektedir (Wilson ve Walker, 2010). Bu çalışmada saflaştırma işleminde tercih edilen kromatografik yöntem olan hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi, molekülleri yüzey hidrofobisitesi farklarından faydalanarak ayırmak üzere geliştirilmiştir. Bu ayırma işleminde protein üzerindeki hidrofobik kısımlar, kolondaki katı faz yüzeyinde bulunan hidrofilik moleküllerle etkileşime girmekte ve ayırma işlemi bu temelde gerçekleşmektedir (Jenissen, 2002). Saflaştırma sonucu elde edilen enzim solüsyonunun içerdiği bileşenlerin görüntülenmesi amacıyla poliakrilamid jel elektroforezi yapılmıştır. Böylece örneğin bir sonraki basamak olan kristalizasyon çalışmaları için uygunluğu kontrol edilmiştir.

Protein kristalizasyonu 19. yüzyılın ilk yarısında bazı amaçlar doğrultusunda proteinlerin yapısının görüntülenmesini sağlamak için geliştirilmiştir. Seçilen spesifik bir proteinin farklı moleküller içeren bir karışımdan saflaştırılması, saflaştırılan proteinin tanımlanması ve bilimsel merak duygusunun giderilmesi bu amaçların başında gelmektedir. İlk olarak 1830'da farklı kaynaklardan elde edilen hemoglobin kristalleri incelenmiştir. Biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu yapı analizi ile yaşayan tüm organizmaların ve ürettikleri materyallerin atomik ve moleküler düzeyde tanımlanabilmesi mümkün olmaktadır. Kristalografi çalışmalarıyla üç boyutlu yapının çözümlenmesi tıp, yeni ilaç geliştirilmesi ve tarımsal endüstri alanında da önemli gelişmelere olanak sağlamıştır. İlk enzim kristalizasyonu (ürez) James Sumner tarafından 1926 yılında rapor edilmiştir. Bu buluş 1946 yılında James Sumner, John Nortrop ve Wendell Stanley'e Nobel ödülü kazandırmıştır (McPherson, 2004; Jaskolski ve ark., 2014).

Protein, nükleik asit, virüs, ribozom gibi yapıları kapsayan makromoleküler kristalizasyon, uzun zamanlı çalışma gerektiren sistematik bir araştırma işidir. Kristal şekillenmesini etkileyen bir dizi parametrenin oluşturulması ve bunların optimize edilmesi sonucu iyi kalitede kristallerin elde edilmesi mümkün olmaktadır (McPherson, 2004; Gavira, 2016). Bu çalışmada öncelikle *Aspergillus terreus* küfünden elde edilen ksilanaza ait kristallerin eldesi için uygun koşullar taranmıştır. Tarama işlemi sonucunda elde edilen koşullar geniş bir aralıkta optimize edilerek X-ışını kristalografisi için en uygun kalitede kristallerin üretimi amaçlanmıştır. Daha önceden yapılmış kristalografi çalışmalarında, X-ışını yöntemiyle 226 farklı organizmadan elde edilen ksilanaz enzimine ait farklı yapıların görüntüleri elde edilmiştir. Bilgimiz dahilinde *Aspergillus terreus* ksilanazı için, literatürde ve Protein Veri Bankasında (PDB) bir kristalografi çalışması bulunmamaktadır (Anonim, 2016a).

Aminoasitler hem amino (NH₂) hem karboksil (COOH) grup bulundurdukları için, farklı pH değerlerinde iyonize hale geçerler. Nötr ortamlarda ise iç tuz oluştururlar, bu forma zwitter iyon denir. Şekil 2.2' aminoasitlerin farklı pH'larda aldığı yükler verilmiştir.



Şekil 2.2. Aminoasitlerin farklı pH'lardaki elektriksel yüklerinin gösterimi (Wilson ve Walker, 2010)

Hemen hemen tüm proteinler, ligand olarak isimlendirilen diğer moleküllere bağlanma yetenekleri sayesinde işlevlerini yerine getirebilmektedir. Proteinler işlevlerine göre farklı sınıflarda gruplandırılmaktadır. Bu gruplara örnek olarak, hücrenin şeklini ve hücre dışı ortamı belirleyen yapısal proteinler, iyonların ve moleküllerin hücre zarından geçişini sağlayan zar taşıma proteinleri, hormonları ve reseptörleri kapsayan sinyal proteinleri ve kimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimler verilebilir (Lodish, 2007).

2.2. Enzimler

Enzimler, spesifik kimyasal reaksiyonları hassas koşullar altında katalizleme yeteneğine sahip, büyük oranda proteinden oluşan biyolojik makromoleküllerdir. Tüm proteinler enzim değildir fakat enzimler proteinlerin büyük ve önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Enzimler, hücre içinde meydana gelen birçok tepkimenin mekanizmasını düzenlerler ancak reaksiyon süresince tüketilmezler. Aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonların hızını 10³ - 10⁸ kat artırır. Enzimlerin etkileşimde buldukları moleküllere substrat adı verilmektedir. Enzimler, etki edecekleri substratlar ve katalizledikleri reaksiyonlar açısından oldukça seçici moleküllerdir. Genellikle tek bir reaksiyonu ya da bu reaksiyonla yakından ilişkili bir başka reaksiyonu katalizlemektedirler. Her bir enzim molekülü tarafından saniye başına ürüne dönüştürülen substrat molekül sayısı o enzimin

k_{kat} değerini vermektedir. Bu değer genellikle 10^2 - 10^4 s^{-1} aralığında değişmekte ve enzimin katalitik aktivitesinin bir ölçüsü olarak bilinmektedir (Harvey ve Ferrier, 2011; Berg ve ark., 2012).

Enzimlerin katalitik olarak aktif olması ancak doğal üç boyutlu konformasyonlarının korunması durumunda mümkün olmaktadır. Enzimlerin üç boyutlu özđün katlanmasıyla oluşan ve aktif bölge olarak adlandırılan sınırlandırılmış kısım substrata tutunmasını sağlamaktadır. Aktif bölge proteinin küçük bir bölümünü oluştururken polipeptidin diğer bölgelerindeki katlanmalar aktif bölgenin kontrolünü ve proteinin diğer moleküllerle etkileşimini kontrol etmektedir. Eğer enzim sıcaklık, pH gibi nedenlerden dolayı denatüre olursa aktif bölge deformasyona uğradığından genellikle enzimin aktivitesi kaybolmaktadır (Lodish, 2007; Wilson ve Walker, 2010).

Bazı enzimler aktivite için aminoasit dışında başka kimyasal gruplara ihtiyaç duymazken, bazı enzimler reaksiyonları katalizleyebilmek için farklı gruplara ihtiyaç duymaktadır. Kofaktör olarak adlandırılan Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} veya Zn^{+2} gibi inorganik metal iyonları ve koenzim olarak adlandırılan kompleks organik moleküller bazı enzimlerin aktiviteleri için gerekli grupları oluşturmaktadır. Enzime çok sıkı bir şekilde hatta kovalent bir bağla bağlanan koenzim ya da kofaktör bileşeni prostetik grup olarak adlandırılmaktadır. Metal iyonları ya da koenzim varlığında aktivite gösterebilen enzimler holoenzim olarak adlandırılmaktadır (Nelson ve Cox, 2008).

Enzim ile substrat arasındaki etkileşimle ilgili iki model ileri sürülmüştür. Anahtar-kilit modeli 1894'te Emil Fischer tarafından ileri sürülmüştür. Bu model, substrat ile enzimin aktif bölgesi arasında yapısal olarak tıpkı anahtar ve kilit gibi birebir uyum olduğunu ileri sürmektedir. İndüklenmiş uyum modeli ise 1958 yılında Daniel E. Koshland tarafından ileri sürülmüştür (Koshland, 1958). Bu modele göre enzim substrat yokluğunda serbest halde bulunmakta, substrat varlığında ise enzimin aktif bölgesi substrata uyum sağlayacak şekilde konformasyonel değişime uğramaktadır. Böylece enzim substrat kompleksi oluşmakta ve ürün meydana gelmektedir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra enzim, sonraki reaksiyonlarda kullanılmak üzere eski formuna dönmektedir (Koshland, 1994).

2.2.1. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzim sınıflandırmasına tüm dünyada geçerli bir düzenleme yapılması amacıyla Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından Enzim Komisyonu oluşturulmuştur. Tüm enzimler katalizledikleri kimyasal tepkimeler göz önünde bulundurularak altı temel grupta sınıflandırmış ve bu gruplar kendi içinde alt gruplara ayrılmıştır (Berg ve ark., 2012).

Çizelge 2.1. Enzim grupları ve katalizledikleri reaksiyonlar (Wilson ve Walker, 2010)

Enzim grupları	Reaksiyon türü
Oksidoredüktazlar	Hidrojen, oksijen atomlarının ya da elektronların bir substrattan diğerine taşınmasını sağlamaktadır.
Transferazlar	Kimyasal grupların moleküller arası taşınmasını sağlamaktadır.
Hidrolazlar	Polimerlerin, hidrolize edilmesi reaksiyonlarını katalizleyen enzim grubudur.
Liyazlar	Çift bağa grup eklenmesi ya da molekülden grup ayrılması ile çift bağ oluşumu reaksiyonlarını katalizlemektedir.
İzomerazlar	Molekül içi grupların yer değiştirmesini sağlayarak izomer oluşumunda görev yapmaktadır.
Ligazlar	Karbon ile C, O, S, N arasında bağ oluşumunu katalizleyen enzim grubudur.

2.2.2. Ksilanazlar ve Ksilanolitik Enzim Sistemi

Ksilanaz enziminin substratı olan ksilan, bitki hücrelerinde bulunan yapısal bir polisakkarittir. Doğada en yaygın bulunan ikinci polisakkarittir ve dünyada bulunan tüm yenilenebilir organik karbon kaynağının üçte birini oluşturmaktadır (Chen, 2014). Ksilanın karmaşık ve heterojen yapısı nedeniyle, hidrolizinin tamamlanması geniş çeşitlilikte bir enzim grubunun sinerjik olarak etki etmesiyle mümkün olmaktadır. Endo-1,4- β -D-ksilanaz (EC 3.2.1.8) ksilanın ana omurgasına rastgele etki ederek bağları parçalarken, β -D-ksilozidaz (EC 3.2.1.37) ksilooligosakkaritlerin indirgenmemiş

uçlarından ksiloz ve ksilobiozların ayrılmasını sağlamaktadır. Yan grupların ayrılması reaksiyonları ise α -L-arabinofuranozidaz (EC 3.2.1.55), α -D-glukoronidaz (EC 3.2.1.139), asetilksilan esteraz (EC 3.11.72), ferulik asit esteraz (EC 3.1.1.73) enzimleri tarafından katalizlenmektedir (Collins ve ark., 2005). Ksilana etki ederek ksiloz, ksilobioz, ksilotrioz gibi alt ünitelere parçalanmasını sağlayan enzim grubuna ksilanolitik enzim sistemi adı verilmektedir. Ksilanazlar ksilanın yaygın olarak bulunduğu ortamlarda yaşayan canlılar tarafından üretilmektedir. Bakteriler, küfler, algler, funguslar, protozoalar bu canlıların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bakterilerin bir çoğu ve funguslar hücre dışı olarak hemiselülozik yapıyı ksiloza kadar parçalayabilecek özellikte ksilanazı üretebilmektedir (Kulkarni ve ark., 1999).

Ksilanaz enziminin ilk olarak üretimi ve saflaştırılması yaklaşık 60 yıl önce *Aspergillus foetidus* kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Whistler ve Masak, 1955). Sonrasında farklı küf, bakteri ve maya ile ksilanaz üretilmiş ve saflaştırılmıştır. Ksilanaz üretimiyle ilgili en çok çalışılan mikroorganizma gruplarını *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Bacillus sp.*, *Trichoderma sp.* ve *Streptomyces sp.* oluşturmaktadır. Endüstriyel boyutta ksilanaz üretimi temel olarak *Aspergillus sp.* ve *Trichoderma sp.* kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Amir ve ark., 2013; Yeğin ve Büyükkileci, 2015).

2.2.3. Ksilanazların Kullanım Alanları

Hidrolazlar; proteazlar ve selülaz, amilaz, hemiselülazı içeren glikosidazlarla beraber endüstriyel enzim piyasasının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Ksilanazlar, hemiselülazların endüstrideki uygulama alanlarının büyük bir kısmını oluşturmakta ve endüstriyel proseslerde geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Ksilanazların uygulama alanları arasında kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi başta olmak üzere hayvan yemi, gıda ve meyve suyu, deterjan sanayisi ve çevresel atıkların geri kazanılması gibi alanlar bulunmaktadır (Collins ve ark., 2005).

Ksilanazlar, kağıt hamurunun işlenmeye hazır hale gelmesi için selülozun ayrıştırılması ve liflerin ağartılması işlemlerinde önemli rol oynamaktadır. Kağıt hamurunda hemiselüloz ve lignin bir arada bulunmaktadır. Lignin kağıt hamuruna karakteristik bir kahverengi görünüm katmaktadır. Ksilanaz, ksilan yüzeyinde bulunan lignini ekstrakte

ederek kağıt hamurunun ağarmasını sağlamaktadır. Böylece kağıt hamuru beyazlatmada kullanılan klor yerine doğal ve çevre dostu bir alternatif oluşturulmakta, aynı zamanda kimyasal işlem esnasında açığa çıkan zararlı atıkların oluşumu en aza indirgenmektedir (Viikari ve ark., 2001).

Fırıncılık uygulamalarında kullanılan ham maddelerin içeriğinde büyük miktarda hemiselüloz bulunması nedeniyle ksilanaz enzimi bu alanda sıkça kullanılmaktadır. Hamurda bulunan gluten bileşenine etki ederek ekmeğin dokusal özelliklerini iyileştirmektedir. Hamur viskozitesini düşürerek somun hacmini artırmakta ve ekmeğin raf ömrünü uzatmaktadır (Ahmad ve ark., 2013). Bunun yanı sıra ksilanazlar nişasta, kahve ve bitki yağlarının ekstrakte edilmesinde, hemiselülozlerden fermente edilebilir şekerlerin eldesinde ve çözünür kahve üretiminde kullanılmaktadır (Kulkarni ve ark., 1999).

Ksilanazlar, glukanaaz, pektinaz, selüloz ve amilaz gibi enzimlerle beraber hayvan yemi hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bu enzimler, besleyici özelliği bulunmayan bileşenleri (arabinoksilan vb.) parçalayarak atık materyalin viskozitesini düşürerek, hayvan yeminin sindirimini kolaylaştırmakta aynı zamanda besleyici özelliğini artırmaktadır (Polizeli ve ark., 2005).

Mannanaaz, ligninaaz, ksilozidaz, glukanaaz, glukozidaz gibi diğer enzimlerle birlikte ksilanazlar, lignoselülozik materyallerden etanol gibi biyolojik yakıtların üretimi için kullanılabilir. Etanol üretiminde kullanılacak serbest şekerlerin üretimi amacıyla, karbohidrat polimerlerinin depolimerizasyonunu takiben lignin, hemiselüloz ve selülozun ayrıştırılması ile delignifikasyon gerçekleştirilir (Dhiman ve ark., 2008).

Ksilanazlar, deterjanlara karıştırıldığında bitki bazlı lekelerin giderilmesinde etkili olmaktadır. Farmakolojik olarak aktif polisakkaritlerin üretiminde, antioksidan üretiminde yüzey aktif madde olarak kullanılan alkil glikozitlerin üretiminde, hassas cihazların ve yarı iletkenlerin temizlenmesinde kullanılmaktadır (Collins ve ark., 2005).

Ksilanazların bir diğer önemli kullanım alanı ksilooligosakkarit üretimidir. Ksilooligosakkaritler, bitki hücre duvarında bulunan ksilan bileşeninin hidrolize

edilmesiyle meydana gelen, ksiloz alt birimlerinin β -(1-4) ksilozidik bağlar ile bağlanarak oluşturdukları şeker oligomerleridir ve sahip oldukları prebiyotik özellik sayesinde gıda sektöründe katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Ksilooligosakkaritlerin üretimi kimyasal olarak bazı asitler, enzimatik olarak ise ksilanazlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Enzimatik hidroliz kimyasal yöntemle kıyasla daha ılımlı koşullarda gerçekleşmekte ve zararlı atık ürünler oluşmadığından çevresel sorun teşkil etmemektedir. Bu yüzden son yıllarda ksilanazların kullanımına öncelik verilmektedir (Vazquez et al., 2000; Akpınar ve ark., 2009; Samanta ve ark., 2014).

2.3. Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük, bakteriler, mayalar, küfler, algler ve protozoalar gibi tek hücreli canlılardır. Prokaryot ve ökaryot türleri bulunmaktadır. Bitki ve hayvanlardan milyarlarca yıl önce oluşmuşlardır, bu nedenle çeşitlilikleri bu canlılara göre çok daha fazladır. Dünyadaki yaşam döngüsünde ve tüm canlıların yaşamsal faaliyetlerinde önemli role sahiptirler. İnsan ve diğer canlıların metabolizmasında meydana gelen zatürre, verem, kolera ve tifüs gibi birçok hastalığa zararlı mikroorganizmalar sebep olmaktadır. Fakat bunun yanı sıra atmosferik azotu (N_2) bitkinin kullanabileceği forma (NH_3) dönüştürebilen azot bakterileri, hayvanların sindirim kanalında yaşayan ve selüloz bileşeninin hidrolizini sağlayan rumen bakterileri gibi mikroorganizmalar yaşamsal döngüde faydalı rollere sahip mikroorganizmalara verilecek önemli örneklerdendir (Brock ve ark., 2006).

Mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarında yerine getirdikleri görevlerin insanlar tarafından keşfedilmesiyle beraber, endüstriyel alanlarda mikrobiyal uygulamalara olan ilgi artmıştır. Geçmişte kimyasal yollarla üretilen önemli ürünlerin birçoğu, günümüzde mikroorganizmalar kullanılarak hem daha ekonomik hem de çevreyle uyum içerisinde ılımlı koşullar altında üretilebilmektedir (Waites ve ark., 2015).

2.3.1. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar

Bitki hücre duvarında bulunan ksilanı parçalama yeteneğine sahip ksilanaz enzimi, bitkilerin bulunduğu birçok yerde yaşayan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Ksilanazlar bakteriler, küfler, bitki ve hayvan hücrelerini kapsayan geniş aralıkta mikroorganizmalar tarafından salgılanmaktadır. Enzim salgısı doğal olarak hücre içi ya da hücre dışı formda gerçekleşmektedir.

Bakteriler ve mayalar arasında en yüksek seviyede ksilanaz üreten mikroorganizmalar olan filamentli küfler, mikrobiyal ksilanaz kaynakları arasında özel olarak ilgi çekmektedir. Ksilanazı hücre dışı olarak kültür çözeltileri içerisine salgırlar. Bakteriler ise nispeten düşük aktivitede ve hücre içi enzim üretimi yapmaktadırlar (Polizeli ve ark., 2005).

Ksilanazlar mezofilik ve termofilik mikroorganizmalar tarafından sentezlenirler. Mezofilik türler arasında *Aspergillus* ve *Trichoderma* önemli ksilanaz üreticileri olarak bilinmektedir (Smith ve ark., 1991).

2.3.2. *Aspergillus terreus*

Aspergillus cinsi canlılar doğada oldukça yaygın bulunan mezofilik küflerdir. Özellikle çürümüş bitki örtüsü ve bol miktarda organik bileşen içeren topraklardan izole edilebilmektedir. *Aspergillus* cinsinin 150'den fazla türü bulunmakta ancak bu türlerden sadece birkaçı insan ve hayvanlarda enfeksiyona sebep olmaktadır (Arabatzi ve Velegaki, 2013).

Aspergillus terreus için ılıman iklim toprakları, tarım arazileri ve ormanlar öncelikli yaşam alanları arasındadır. Asidik orman topraklarında ve soğuk bölgelerde ise nadiren yaşadığı bilinmektedir.

2.4. Enzim Üretimi

Enzimler doğal olarak mikroorganizmalar ve hücreler tarafından yaşamsal olayların sürdürülmesi amacıyla üretilmektedir. Laboratuvar koşullarında enzim üretimi ise batık ya da katı kültür ortamları hazırlanarak yapılmaktadır. Bu kültür ortamları mikroorganizmaların canlılıklarının devamı için gerekli olan hava, besin, sıcaklık gibi koşulların yapay olarak erlenler ya da petriyer içerisinde hazırlanmasıyla oluşturulmaktadır. Ticari olarak enzimler, ortama steril hava sağlayabilen ve karıştırıcıları derin tanklar içerisinde üretilmektedir. Tank içerisine gönderilen hava miktarı, gönderilen havanın bileşenler arası dağılımı (O_2/CO_2 oranı) ve karıştırma hızı tank için ayarlanabilir parametrelerdir. Sıcaklık ve pH da fermantasyon prosesinin optimize edilmesi için ayarlanmaktadır. En uygun enzim üretiminin sağlandığı koşullar bu parametreler yardımıyla ayarlanarak enzim üretim verimi artırılmaktadır (Renge ve ark., 2012).

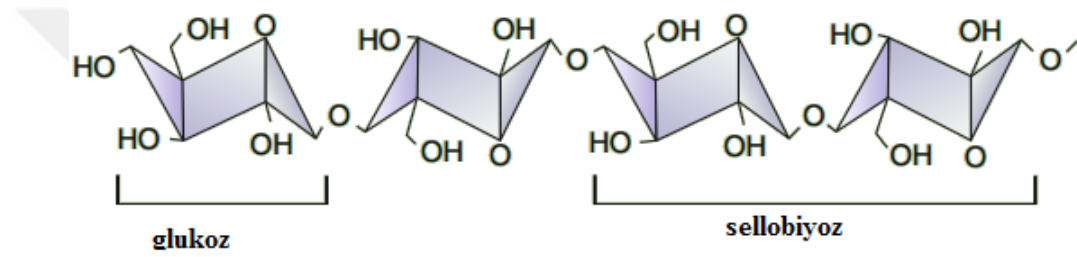
2.5. Lignoselülozik Materyaller

Lignoselüloz, bitki hücre duvarlarının içinde bulunan selüloz mikrofibrilleri, hemiselüloz, lignin, mineral ve diğer ekstrakte edilebilir maddelerden (reçine, vaks, tanen, şeker, nişasta, boya maddeleri, pektin eter, alkol, benzen) oluşan bir yapıdır. Tüm bitki ve bitki türevli materyaller lignoselülozik biyokütlede dahildir. Bitki materyalleri her bir kimyasal bileşikten değişik oranlarda içermektedir. Tipik olarak biyokütle, bitki türüne göre değişiklik göstermekle beraber %40-55 selüloz, %24-40 hemiselüloz ve %25-36 lignin içermektedir. Lignoselüloz içerisindeki ekstraktlar ve mineraller kuru biyokütlenin ağırlığının %10'u kadardır (Bridgewater, 1999; Walker, 2010; Ayeni ve ark., 2015).

Lignoselülozik biyokütlenin temel bileşeni olan selüloz, bitkiler tarafından sentezlenen temel karbonhidrattır. Bitki hücre duvarının temel bileşenidir ve destek materyal görevi görmektedir. Bitkiler dışında bazı bakteri, alg ve hayvanlar tarafından da üretilmektedir. Canlıda depo polimer görevindedir, glukozun depo polimeri olan nişastadan farklı olarak sadece yapısal göreve sahiptir. Gerilmeye karşı yüksek dayanıklılığa sahiptir böylece bitki hücrelerinin ozmotik basınca karşı dayanıklılığını sağlamaktadır.

Selülozun yapısında molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları ve van der Waals bağları bulunmaktadır, bu sebeple kararlı bir yapıya sahiptir (Walker, 2010; Chen, 2014).

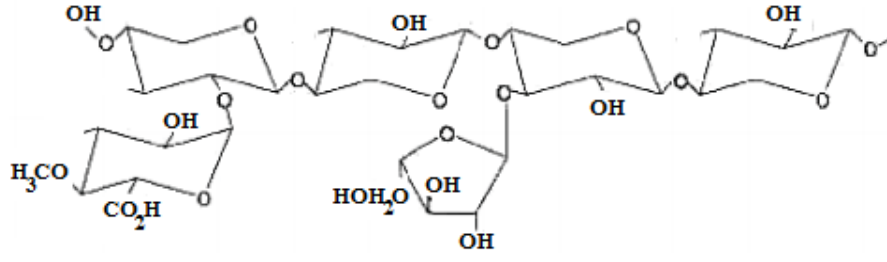
Selüloz, glukoz alt birim ünitelerinin, β -1,4 glikozidik bağlar ile bir araya gelerek oluşturdukları doğrusal yapıda bir polisakkarittir. Komşu glukoz üniteleri arasında 180° açı bulunmaktadır. Dolayısıyla iki glikoz monomerinden meydana gelen, sellobiyoz adı verilen yapı selülozun tekrarlayan alt ünitesini oluşturmaktadır (Şekil 2.3.) (Chen, 2014).



Şekil 2.3. Selülozun yapısı (Chen, 2014)

Selülozun yıkımından sorumlu enzimler; selüloz zincirindeki iç bağları rastgele kıran endo- β -1,4-glukanaz (E.C. 3.2.1.4), selüloz polimerinin ucundaki indirgen ya da indirgen olmayan kısımlara saldıran ekzo- β -1,4-glukanaz (E.C. 3.2.1.91) ve endo ve ekzo-glukanaz karışımının ana ürünü olan selülobiyozu glikoza dönüştüren β -glikosidaz (E.C. 3.2.1.21) olmak üzere üç sınıfta toplanmaktadır (Horn ve ark., 2012).

Hemiselüloz, bitki hücre duvarında selüloz, lignin, mineraller ve diğer ekstrakte edilebilir bileşenlerle birlikte hücre duvarını oluşturan, beş ve altı karbonlu şekerlerden oluşan bir heteropolisakkarittir. Hemiselülozların temel bileşeni ksilandır. Bunun yanı sıra D-ksiloz, D-galaktoz, D-mannoz ve L-arabinoz gibi şeker monomerlerini ve bu alt birimlerin farklı bağlar ile birleşerek oluşturdukları glukomannan, arabinogalaktan gibi yapıları içermektedir. Şekil 2.4'de hemiselülozun yapısı verilmiştir (Motta ve ark., 2013).



Şekil 2.4. Hemiselülozun yapısı (Walker, 2010)

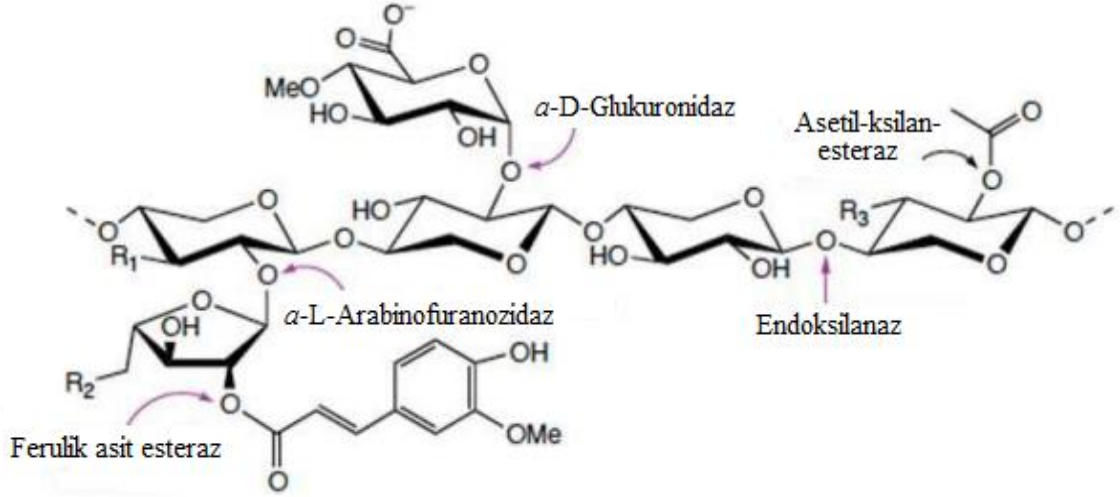
Lignin, bitki hücre duvarında selüloz ve hemiselüloz yapıdan sonra en yaygın bulunan bileşendir. Bitkilerin yapısının sağlamlaşmasına katkıda bulunur ve lif olarak adlandırdığımız yapıyı oluşturur. Görevi, bitkide sıvı taşınmasını düzenlemektir. Bunun yanında bitkilerin boyca uzamasında ve güneş ışığından korunmasında rolü vardır. Lignin, hemiselülozlara çeşitli yollarla bağlanmıştır. Aynı zamanda hücre duvarında bulunan bileşenler arasında hidrolize karşı en dirençli bileşendir, doğal yollarla parçalanması olması oldukça zordur. Tamamı karmaşık, amorf ve çoğunlukla fenil propan yapısı içeren üç boyutlu polimerlerdir (McCrary, 1991; Goyal ve ark.,2008).

2.5.1. Ksilan

Ksilan, selülozdan sonra doğada en yaygın bulunan polisakarittir ve dünyadaki yenilenebilir organik karbon miktarının üçte birini oluşturmaktadır. Ksilanın ana omurgası β -1,4-D-ksilopiranosil alt ünitelerinden oluşmakta ve zincir üzerinde glukopiranosil, 4-O-metil-D-glukoranopiranosil, α -L-arabinofuranosil, asetil, feruloil ya da *p*-kumaroil gibi yan grupların farklı dallanmaları oluşmaktadır. Dallanmanın türü ve derecesi ksilanın bulunduğu bitki türüne göre değişiklik göstermektedir. Şekil 2.5.'de tipik bir ksilan omurgası, olası dallanmalar ve bu yapıya etki eden ksilanolitik enzimler gösterilmiştir (Kulkarni ve ark., 1999).

Ksilan, farklı bitki türlerinde bulunan doku ve hücrelerde farklı oranlarda bulunmaktadır. Kuru ağırlık olarak, sert odun türlerinin hücre duvarlarında %15-30, yumuşak odun türlerinde %7-10, yıllık bitkilerde ise %30'dan az bir oranda bulunmaktadır. Odunsu bitkilerden sert odunlarda ksilan, O-asetil-4-O-metilglukuronoksilan halinde, yumuşak odunlarda arabino-4-O-metilglukuronoksilan halinde ve yıllık bitkilerde ise tipik arabinoksilan formunda bulunmaktadır. Sert odun

ksilanı 150-200 β -ksilopiranoz alt biriminden oluşurken, yumuşak odun ksilanı 70-130 β -ksilopiranoz alt biriminden oluşmaktadır (Motta ve ark., 2013).



Şekil 2.5. Ksilanın yapısı ve ksilanın tam hidrolizinden sorumlu enzimlerin etki ettikleri bölgeler (Shallom ve Shoham, 2003)

Ksilan, gıdaların kaplanmasında, paketlenme filmlerinde ve çeşitli biyomedikal ürünlerin üretilmesinde de kullanım alanı bulmuştur. Yapışkan özelliğinden dolayı mısır lifi sakızı olarak bilinmektedir. Yapıştırıcı, inceltici ve plastik madde üretiminde katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Plastiklerin elastikiyetini, kırılmaya karşı direncini ve biyobozunmaya duyarlılığını artırmaktadır. Böylece doğa dostu plastik atıkların üretilmesinde etkin olarak rol oynamaktadır. Diğer bir uygulamasına ise gıda endüstrisinde emülsifiye edici ve protein stabilizatörü olarak rastlanmaktadır. Tekstil ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımı da mevcuttur (Ebringerova, 2005; Ünlü ve ark., 2009; Silva ve ark., 2012).

2.5.2. Enzimatik Hidroliz ve İndirgen Şeker Üretimi

Biyokütle, herhangi bir organizmadan elde edilen işlenmeye müsait organik bir materyal olarak düşünülmektedir. Dünyada değerli biyolojik ürünlere dönüştürülmeye müsait geniş çeşitlilikte ve büyük miktarda biyokütle bulunmaktadır. Hemiselülozların farklı yöntemlerle hidrolizi sonucu ksiloz ve ksilitol gibi ürünlerin elde edilmesi, onları endüstriyel olarak dikkat çekici bir hammadde haline getirmiştir (Howard ve ark., 2003).

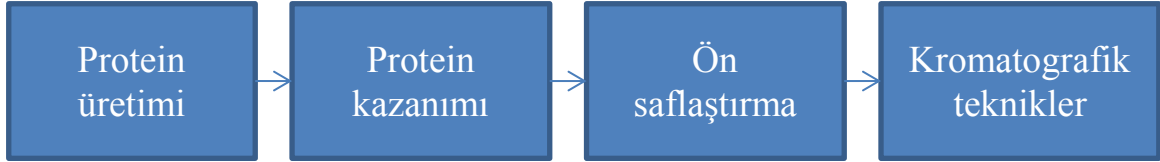
Başlangıçta yaygın olarak kullanılan kimyasal metotların çevreye verdiği zararın farkedilmesi ve kimyasal sarfiyatının azaltılması amaçlanarak, bitkisel atıkların biyodönüşüm metoduyla hidrolizi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, lignoselülozik materyaller uygun enzimler katalizör olarak kullanılarak bileşenlerine parçalanmıştır. Enzimatik hidroliz, kimyasal yöntemle kıyasla daha ılımlı koşullarda gerçekleşmekte ve zararlı atık ürünler oluşmadığından çevresel sorun teşkil etmemektedir. Hemiselülozların enzimatik hidrolizi ksilanazlarla gerçekleştirilmektedir. Ksilanolitik enzim sistemi, sinerjik olarak ksilana etki ederek ksiloz (indirgen şeker), ksilitol ve ksilooligosakkarit gibi endüstriyel değere sahip ürünlere dönüştürmektedir (Vazquez ve ark., 2000).

2.6. Enzim Saflaştırma

Enzimler, canlılar tarafından, doğrudan doğal ortama hücre içi ya da hücre dışı olarak salgılanmaktadır. Ancak enzimlerin bu formlarıyla endüstriyel ya da bilimsel inceleme amaçlı kullanılmaları mümkün olmamaktadır. Bu sebeple öncelikle safsızlıkların giderilmesi için kullanım alanına ve enzim özelliklerine göre farklılık gösteren saflaştırma işlemleri uygulanmaktadır. Endüstriyel amaçlı saflaştırmada, ilaç endüstrisi dışındaki alanlarda yüksek saflık beklenmezken yüksek miktarlarda üretim amaçlanır. Bunun yanında saflaştırma amacı araştırma ve yapı analizi ise, yüksek düzeyde saflık beklenmektedir (Wilson ve Walker, 2010).

Hücre içi yapılan enzim üretimi durumunda, enzimin saf olarak elde edilebilmesi için öncelikle hücre duvarı parçalanarak diğer doku ve organellerin ayrıştırılması gerekmektedir. Doğrudan kültür ortamına (hücre dışı) salgılanan enzimlerin saflaştırılması için ise ortamda bulunan yabancı maddelerin ve metabolik artıkların uzaklaştırılması gerekmektedir. Ayrıca mikroorganizma tarafından üretilen ya da canlı hücrenin sahip olduğu çok sayıda farklı protein çeşidi içerisinde seçilen proteinin ayrıştırılması çoğu zaman karmaşık görünse de genellikle dört ana işlem altında toplanabilmektedir. Bu işlemler ana başlıklar halinde sırasıyla Şekil 2.6'da verilmiştir. Saflaştırma yöntemi seçimi proteinin özelliğine ve saflaştırma amacına göre farklılık göstermektedir. Ön saflaştırma işlemi hemen her saflaştırma işleminde benzerlik göstermektedir. Bu kısım enzimlerin üretildikleri besi yerindeki maddelerden ve

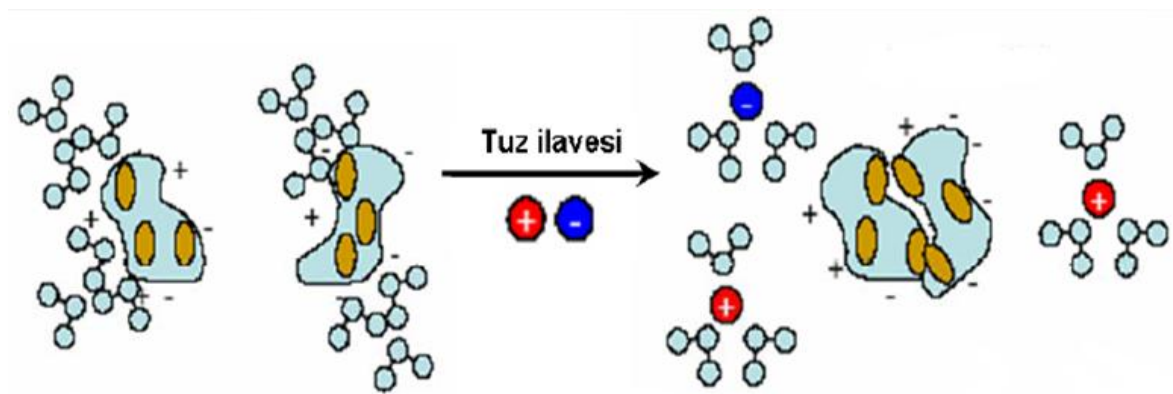
metabolik artıklardan kabaca ayrıldığı basamaktır. Sonrasında enzim genellikle kromatografik tekniklerle saflaştırılmaya tabi tutulmaktadır (Dennison, 2010; Errson ve ark., 2012).



Şekil 2.6. Protein üretim ve saflaştırılmada genel olarak izlenen yol

2.6.1. Proteinlerin Tuz ile Çöktürülmesi

Protein saflaştırmada, yaygın olarak kullanılan ilk adım, amonyum sülfat gibi yüksek çözünürlüklü bir tuz ile proteinlerin çöktürülmesidir. Bu işlem, çözeltiliye belirli miktarlarda amonyum sülfat tuzu eklenerek gerçekleştirilmektedir. Çözeltiye eklenen amonyum sülfat, proteinlerin yüzeyinde bulunan hidrofobik grupları saran su tabakasını uzaklaştırmaktadır. Böylece, protein-su etkileşimleri ortadan kalkmakta ve hidrofobik grupların etkileşmesi sonucunda çökeltme meydana gelmektedir (Tuncer, 2008). Şekil 2.7.'de ortama amonyum sülfat eklenmesi ile protein yüzeyinde bulunan gruplarda meydana gelen değişiklikler gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Amonyum sülfat eklenmesiyle protein çöktürmesi (Anonim, 2016b)

Kaynağından elde edilen proteinler ham halde kromatografi kolonuna yüklemek için uygun özellikte değildir. Santrifüj yöntemleri ise istenilen berraklıkta bir çözelti oluşturmakta yetersizdir. Tuz ile çöktürme işlemi sırasında çözeltinin konsantr

edilmesi ve safsızlıkların giderilmesi aynı anda gerçekleştirilir. İlk aşamada safsızlık kalıntıları çökeltilir, daha sonra ilgili protein süpernatant içerisinde çökertilir. Genel anlamda kısmi çöktürme ve saflaştırma işlemi olarak kromatografi öncesi yaygın olarak uygulanmaktadır (Errson ve ark., 2012).

2.6.2. Kromatografik Yöntemler

Yapılan ön saflaştırma sonucu istenen saflık derecesi elde edilemediği takdirde, hedef proteine yönelik daha seçici yöntemler araştırılır. Bu kısımda karşımıza kromatografik yöntemler çıkmaktadır. Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması temeline dayanan bir saflaştırma yöntemidir. Maddelerin hareketli veya sabit faz ile olan etkileşimindeki farklılık, sabit faz üzerinde farklı hızlarla hareket etmelerini sağlayarak ayırma işinin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Maddeler moleküler ağırlık, hidrofobisite, polarite, iyon yükü gibi özelliklerine göre farklı kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılabilmektedir (Scott, 2003; Dennison, 2010).

Kromatografinin ayırmada etkili bir yöntem olduğu tarihte ilk defa Rus botanikçi Micheal Tswett tarafından fark edilmiştir. Tswett, katı-sıvı kromatografisinin basit bir uygulamasıyla bir grup bitki pigmentini ayırmayı başarmıştır. Bu, bir çeşit renkle yazı yazma olarak adlandırılmıştır. Zamanla bu uygulama geliştirilerek bir çok organik ve inorganik maddenin tespitinde (karbonhidrat, lipit, yağ asitleri, aminoasitler, proteinler, vitaminler), doping testlerinde, kanda, alkol ve zehirli gazların tespitinde, sentezlenen veya ayrıştırılan maddelerin saflıklarının kontrolünde yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Çam ve Hışıl, 2008; Dennison, 2010)

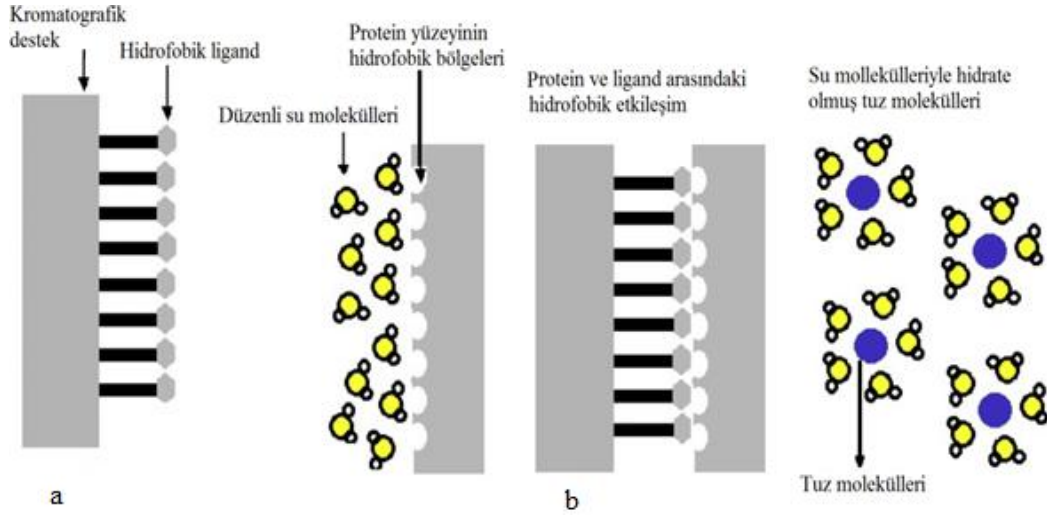
2.6.3. Hidrofobik Etkileşimli Kolon Kromatografisi

Hidrofobik etkileşim, polar olmayan maddelere su gibi polar ortamlar tarafından uygulanan itme kuvveti olarak tanımlanmıştır (Israelachvili, 1992). Hidrofobik etkileşim kromatografisi, moleküllerin yüzey hidrofobisitelerine göre ayrıştırıldığı bir yöntemdir, moleküllerin suya bağlanmaya karşı gösterdiği dirençten faydalanmaktadır.

Bu yöntemde proteinler, hidrofobik gruplardan oluşan apolar durgun katı faz tarafından adsorbe edilerek ayrıştırılmaktadır (Jenissen, 2002; Wilson ve Walker, 2010).

Proteinler, sulu bir çözelti halinde bulduklarında, hidrofobik uçları, daha önce çözelti içerisinde düzensiz halde bulunan su molekülleri tarafından sıralı ve düzenli bir şekilde çevrelenmektedir (Şekil 2.8-a). Ortama tuz eklendiğinde, serbest su molekülleri tuz moleküllerini çevrelemekte ve hidrofobik ligandlarla proteinlerin hidrofobik bölgelerin bir araya gelmektedir (Şekil 2.8-b). İlk durumda ortamın düzensizliği azaldığından sistem entropisi düşmektedir ($\Delta S < 0$). Bu durumun tam tersi düşünüldüğünde, bitişik iki hidrofobik bileşeni çevreleyen su molekülleri serbest hale geldiğinde, düzensizlik artmakta ve entropi artmaktadır. Hidrofobik etkileşimler ve proteinlerin hidrofobik yüzeyde tutunmaları genel olarak bakıldığında termodinamik yasalar çerçevesinde, entropi temelli gerçekleşen olaylardır (Shansky ve ark., 1990).

Hidrofobik etkileşimli kromatografi tekniğinde yaygın olarak tercih edilen destek materyalleri, hidrofobik etki kuvvetindeki artışa göre sırasıyla bütül, oktil veya fenil fonksiyonel gruplarını içeren çapraz bağlı agaroz ya da sentetik kopolimer malzemelerdir (Konak ve ark., 2014). Ayrıca, ortamda hidrofobik etkinin sağlanması için tuz moleküllerinin bulunması şarttır. Bu amaçla hareketli faz olarak hidrofobik etkiyi artırıcı özellikteki PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CH_3COO^- , NH_4^+ , Rb^+ , K^+ gibi iyonları içeren tampon çözeltiler tercih edilmektedir. Kolon içerisinde tutunmuş haldeki proteinlerin, hidrofobik ligandlardan ayrılarak elde edilmesi işlemine elüsyon adı verilmektedir. Bunun için ortamdaki tuz konsantrasyonu düzenli bir şekilde azaltılarak hidrofobik etki giderilmektedir. Böylece adsorbe edilen proteinler ayrıştırılmaktadır (Jenissen, 2000; Jenissen, 2002; Baca ve ark., 2016). Şekil 2.8.'de hidrofobik etkileşimli bir kolonda bulunan örnek ligand ve etkileşim mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Hidrofobik etkileşim kolon kromatografisi (a) hidrofobik etkileşimli kolonun temel yapısı (b) tuz eklenmesiyle hidrofobik etkileşim oluşturulmuş kolonun yapısı (Mirani ve Rahimpour, 2015)

2.6.4. Ultrafiltrasyon

Filtrasyon, bir sıvı akımının içerisinde bir veya daha fazla bileşenin boyut farkı temelinde ayrılması işlemidir. Yaygın olarak katı ve birbiriyle karışmayan partiküllerin sıvı ya da gaz akımı içerisinde ayrılmasında kullanılmaktadır. Membran filtrasyon tekniği bu uygulamayı gaz ya da sıvı karışımı akımlar içinde bulunan çözünmemiş katıların ayrıştırma işlemine kadar genişletmektedir. Membranın birincil görevi seçici bir bariyer oluşturmaktır. Bu membran bazı bileşenlerin geçmesine izin verirken, bazı bileşenleri yüzeyinde tutmalıdır (Cheryan, 1998).

Ultrafiltrasyonda ayırıcı kuvvet basınçtır, küçük boyutlu parçacıklar ve su molekülleri membrandan geçerken membran gözeneginden daha büyük boyutlu parçacıkların geçmesi engellenmektedir. Membranlar oluşumlarına göre doğal ve sentetik, membran yapısına göre gözenekli ve gözeneksiz, uygulama alanına göre gaz-gaz, gaz-sıvı, sıvı-sıvı ayırma, mekanizmasına göre adsorbatif, difüzyif, osmotik ve inert membranlar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Günümüzde membranlar üretilirken gözenek büyüklükleri belli moleküler ağırlığın altındaki parçacıkların geçmesine izin verecek şekilde ayarlanmaktadır. Böylece istenen aralıkta moleküler ağırlığa sahip olan parçacıkların filtrelenerek ayrılması mümkün olmaktadır (Cheryan, 1998).

2.7. Proteinlerin Üç Boyutlu Yapısının Belirlenmesi

Proteinlerin yapısının ve işlevlerinin anlaşılması için üç boyutlu yapılarının çözümlenmesi büyük önem taşımaktadır. Proteinler katlanarak üç boyutlu hale geldiğinde, proteinin belirli aminoasitleri aktif bölgeyi meydana getirmektedir. Enzimlerde olduğu gibi bu bölgeler biyokimyasal reaksiyonları katalizleyebilir veya antikorlarda olduğu gibi özgün bir bağlanma bölgesi oluşturabilmektedir. Yaşamsal süreçlerin moleküler seviyede nasıl işlediğini anlamak için bir proteinin yapısal detaylarının araştırılması büyük önem taşımaktadır, yapısal biyolojinin araştırma alanı budur (Blattmann ve Sticher, 2009).

Üç boyutlu yapı belirlemeye dair çalışmalara ilk kez Max Perutz tarafından 1937 yılında başlanmıştır. Perutz doktora konusunu at hemoglobinin yapısının X-ışını difraksiyonu ile çözümlenmesi olarak belirlemiş ve bu çalışma 22 senesine mal olmuştur. Bitiş çizgisinin çok yakınlarında, meslektaşı John Kendrew, Perutz'dan önce hemoglobine benzer fakat 4 katı kadar küçük bir yapı olan miyoglobinin üç boyutlu yapısını çözümlenmiştir (Kendrew ve ark., 1958). Hemoglobinin yapısal çözümlenmesi de çok geç kalmadan tamamlanmıştır. Bu gelişme hemoglobinin allosterik etkisinin anlaşılmasını sağlamıştır (Perutz ve ark., 1960; Jaskolski ve ark., 2014).

Geçmişten günümüze makromoleküllerin üç boyutlu yapı araştırmasında elde edilen başarılar önemli gelişmelere öncülük etmiştir. İnsan genom projesinin tamamlanması bazı genetik rahatsızlıklara ve bunların tedavi edilmesine yönelik çözümler üretmektedir. Proteinleri kodlayan genler tedavi amacıyla ilaçlar tarafından hedeflenmektedir. Bu proteinlerin fonksiyonları üç boyutlu yapıları tarafından belirlendiği için protein yapısının detaylı bir şekilde anlaşılması, teröpatik yaklaşımlar ve protein mühendisliğinin gelişmesi açısından oldukça önemlidir (Chayen, 2004; Lamb ve ark., 2015).

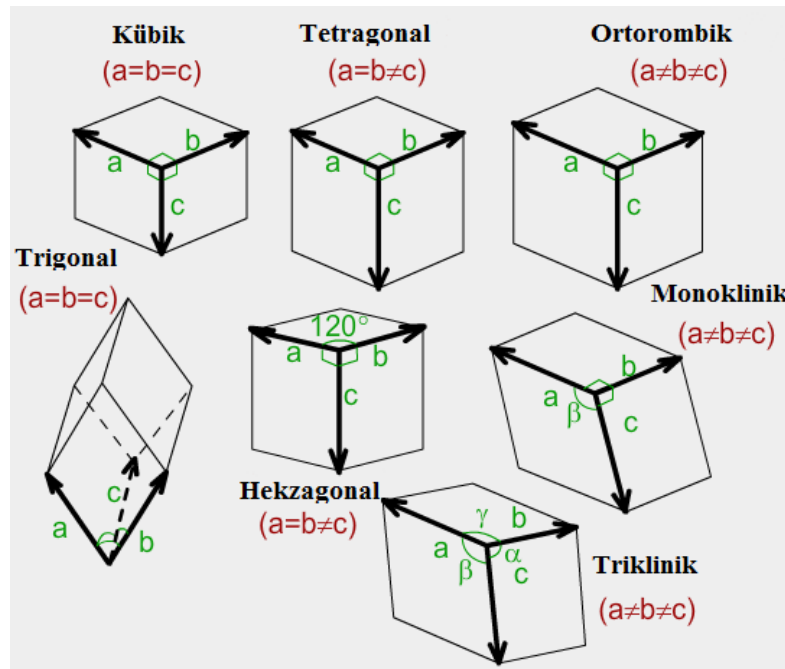
Üç boyutlu yapı araştırması amacıyla, öncelikli olarak proteinlerin, buldukları kaynaklardan elde edilerek çok iyi derecede saflaştırılması ve sonrasında kristalografi için her bir boyutu 0,1 mm'den büyük ve yüksek düzenli moleküler yapıya sahip kristallerin üretilmesi gerekmektedir (Whitford, 2005).

2.7.1.Kristal Sistemleri

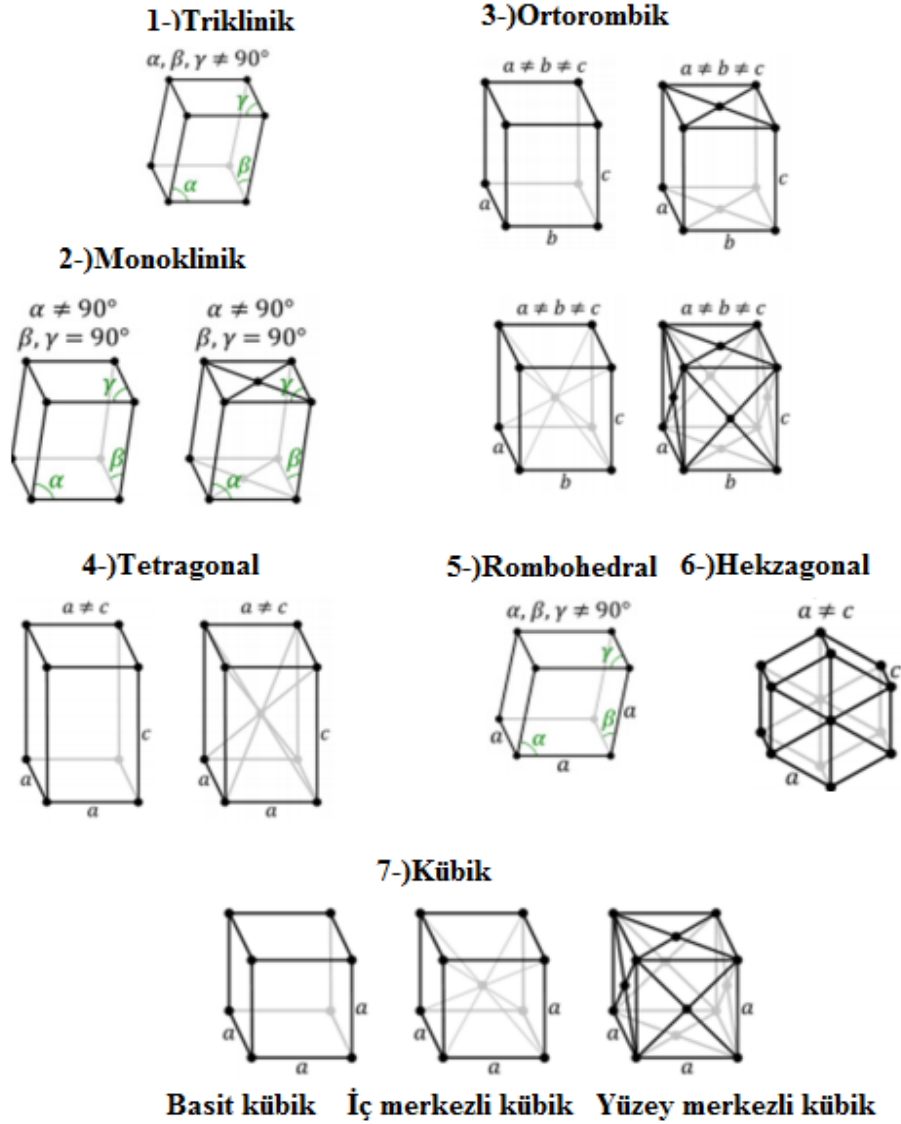
Kristal yapıdaki maddeler uzay boşluğunda düzenli ve sürekli tekrar eden birim hücrelerden oluşmaktadır. Birim hücrelerdeki atomların pozisyonları x, y ve z eksenleri kullanılarak gösterilmektedir. Birim hücrelerin uzayda farklı açılarda konumlanmasıyla oluşan düzenli yapılar ise kristal kafesi olarak adlandırılmaktadır. Kristal yapılar düzenli yapıya sahip üç boyutlu blokların sonsuz sayıda tekrarını içermektedir (Whitford, 2005).

Doğada yedi çeşit kristal sistemi mevcuttur. Bunlar; kübik, hekzagonal, rombohedral, tetragonal, ortorombik, monoklinik ve triklinik kristal sistemleridir (Şekil 2.9). Tüm sistemler a, b ve c vektöründeki parçacık konumlanmasına göre sınıflandırılmıştır. Hücreler vektörler arasındaki açıya göre de α , β , ve γ olarak tanımlanır (Burzloff ve Zimmermann, 2006) (Şekil 2.9).

19. yüzyılda Auguste Bravais birim hücrelerin üç boyutlu uzay boşluğunda farklı konumlanmalarını fark etmiştir. Sonradan “Bravais Lattice” olarak adlandırılan 40 farklı kafes şekli bulunmaktadır (Burzloff ve Zimmermann, 2006) (Şekil 2.10).



Şekil 2.9. Kristal sistemleri (Anonim, 2007)



Şekil 2.10. Üç boyutlu Bravais Lattice şekilleri (Rana, 2009)

2.7.2.Kristalizasyon İçin Örnek Hazırlama (Ön Kristalizasyon)

Kristalizasyon işlemine başlanmadan önce protein örneğinin kristalize olmaya uygun özellikte olup olmadığının anlaşılması için birtakım testler uygulanmaktadır. Protein örneğinin konsantrasyonu kristalizasyon için önemli bir parametredir. Örnek konsantrasyonu fazla yüksek olduğunda amorf çökelti oluşumuna, fazla düşük olduğunda ise şeffaf damla oluşumuna neden olmaktadır. Çökeltme ve boş damlacık görüntüsü kristal tarama işleminde oldukça sık karşılaşılan fakat istenmeyen sonuçlardır. Ön kristalizasyon testinin yapılma amacı; istenmeyen sonuçlarla karşılaşma

oranını azaltmak ve böylece mevcut protein örneğinden en verimli şekilde kristal elde edilmesini sağlamaktır (Anonim, 2016c).

Kristalizasyonda verimli sonuç alınabilmesi için konsantrasyonun yanı sıra proteinin saflığı da önemli bir parametredir. Kristalizasyon deneyine başlanmadan önce protein örneğinde bulunan toz, denatüre protein parçacıkları, kolondan gelen katı dolgu maddeleri gibi katı safsızlıkların giderilmesi gerekmektedir. Bunun için santrifüj ya da filtrasyon işlemleri uygulanmaktadır (Ducruix ve Giege, 1992).

2.7.3. Protein Kristalizasyonu ve Kristalizasyonda Kullanılan Teknikler

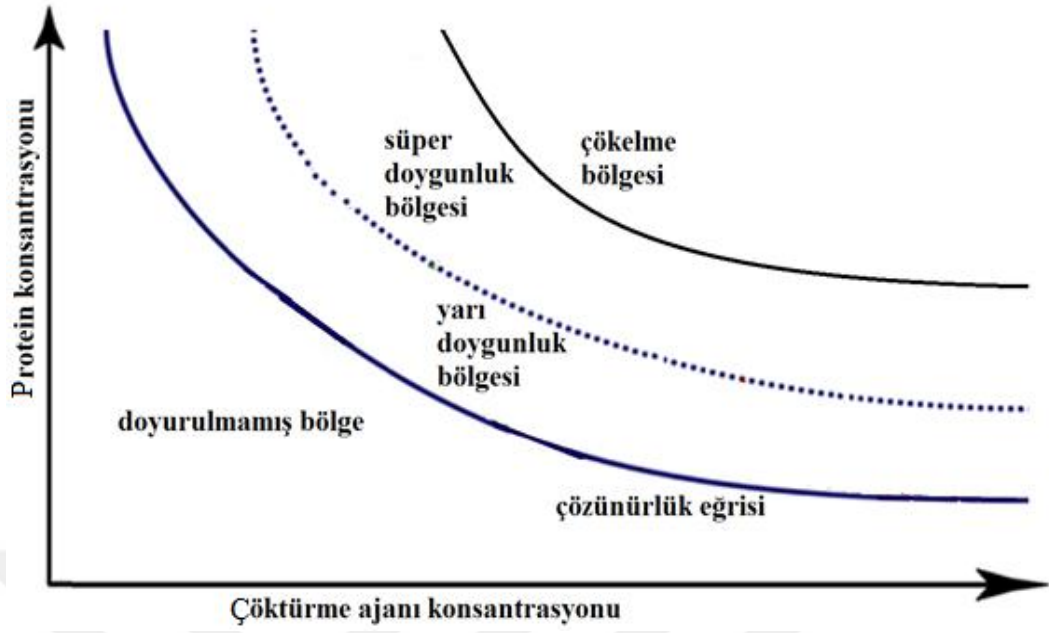
Kristalizasyon temelde bir faz geçişi olgusudur. Kristalografide en önemli teknik olan X ışını kristalografisi, tamamıyla yüksek düzende kristal ihtiyacına bağımlıdır. Ancak uygun kristallerin üretimi hala kristalografi için limitleyici basamak olarak görülmektedir. Bunun sebebi, çabaların büyük çoğunluğunun deneme yanılma yoluyla gerçekleşen kristal tarama işlemine kanalize edilmesidir. Esasen çalışmalar esnasında protein kristaline sıklıkta rastlanmaktadır. Esas sorun bunların kullanışlı kristallere dönüştürülmesidir. Bazı proteinler kolayca kristalize olurken bazılarının ısrarla kristal üretmeyi reddetmesinin sebebi halen tam olarak anlaşılmamaktadır. 20. yüzyılda biyokimyada meydana gelen önemli yeniliklerin birçoğu protein yapısının çözümlenmesine öncülük eden metotların gelişimiyle gerçekleşmiştir. 1980'lerde, araştırmacılar kristal oluşturma işini bilime dönüştürerek 'Kristalojenez' ismini vermişlerdir. Kristalizasyon işleminin temel prensibini anlamak ve kristal gelişimine dahil olan biyokimyasal ve fiziksel değişkenlerin kantitatif bir şekilde ölçülmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (Chayen, 2004).

İlk protein kristalizasyonu (ürez enzimi) James Sumner tarafından 1926 yılında rapor edilmiştir. Enzimlerin kristalize edilebileceğini kanıtlayan bu buluşu ona 1946 yılında Nobel kimya ödülünü kazandırmıştır. Bunu takiben 1930 yılında pepsin enzimi John Northrop tarafından kristalize edilmiştir (Whitford, 2005; Jaskolski ve ark., 2014).

Moleküllerin ya da protein içeren kimyasalların kristalize forma geçmesi birbirini takip eden iki farklı aşamada gerçekleşmektedir. Bu basamaklar çekirdeklenme ve kristal gelişimi olarak adlandırılmaktadır. Çekirdeklenme aşaması teorik ve deneysel açıdan en zor kısımdır çünkü moleküllerin düzensiz fazdan düzenli hale geçişi ilk olarak bu basamakta gerçekleşmektedir. Moleküllerin kristalize forma geçebilmesi için süper doygunluğa ulaşmış olmaları gerekmektedir. Süper doygunluğun sağlanması ise çözücünün yavaş bir şekilde buharlaşması ya da ortam parametrelerinin değiştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Öncelikle moleküller kısmen düzenli forma geçer (yarı kararlı bölge), tüm moleküllerin düzenli forma geçtiği durum ise kritik çekirdeklenme noktasıdır (McPherson, 2004). Rasyonel bir şekilde kristal gelişiminin sağlanabilmesi için çözünürlük faz diyagramının çözümlenmesi gerekmektedir. Çözünürlük faz diyagramının genel gösterimi Şekil 2.11’de verilmiştir (Ducruix ve Giege, 1992).

Makromoleküllerin kristal gelişim mekanizması çekirdeklenmeye göre daha anlaşılabilir bir mekanizmadır. Protein kristallerinin gelişimi, prensip olarak klasik dislokasyon mekanizmasıyla gerçekleşmektedir. Gelişim iki ya da nadiren üç boyutlu çekirdeklenmeyle olmaktadır. Kristalin gelişiminin devam etmesi için ortamın termodinamik olarak durgun olmayan bir halde olması gerekmektedir. Bunun yanı sıra makromolekülün çözünürlüğü de kristal gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Kristalizasyon çözücüsünün içindeki makromoleküllerin tükenmesi ya da ortam koşullarının bozulması kristal gelişiminin kesilmesine neden olmaktadır (McPherson, 2004).

Protein kristallerinin kristalografi için uygun şekilde üretilmesi iki basamakta gerçekleşen bir işlemdir. Bunlar ilk kristal koşullarının belirlenmesi ve bu koşulların optimizasyonudur.



Şekil 2.11. Çözünürlük faz diyagramı (Gavira, 2016, değiştirilmiştir.)

2.7.4. İlk Kristal Koşullarının Belirlenmesi

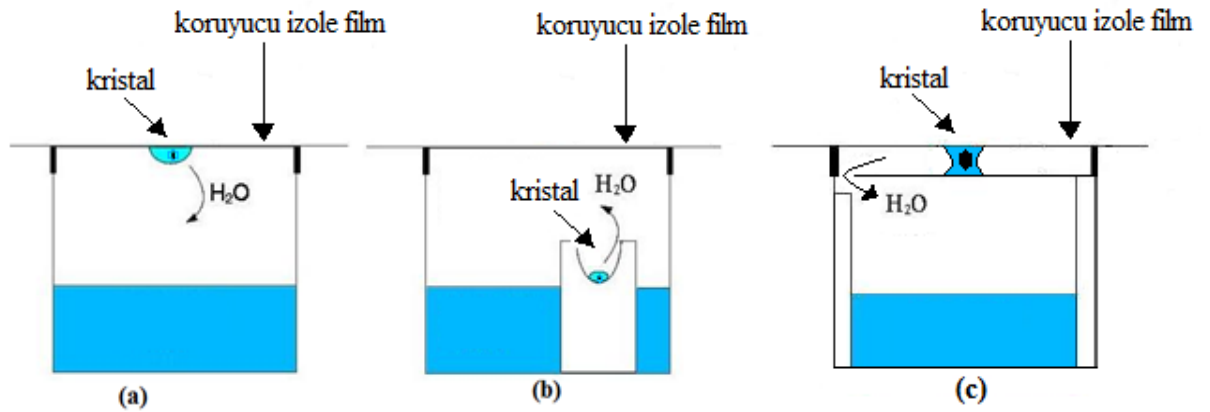
Kristal üretiminde ilk basamak kristal verimliliği sağlanan kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel başlangıç koşullarının belirlenmesidir. Bu amaçla organik çözücüler, tuzlar, pH ve sıcaklık gibi kristal şekillenmesini etkileyen fiziksel ve kimyasal koşullar geniş bir aralıkta değiştirilerek taranmaktadır. Bu işlemler ilk aşamada büyük risk oluşturmaktadır çünkü bazı proteinlerin kristal forma geçmesi uzun zaman ve uğraş gerektirmektedir (McPherson, 2004).

Kristalizasyon işlemi için yüksek saflıkta bir proteine ve uygun bir ana çözücüye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çözeltiler kristal oluşumu için gerekli tuz, tampon, organik çözücü gibi bir takım bileşenleri içermektedir ve kristallenme proteini ana çözeltinin birleşmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu noktada farklı kristal oluşturma teknikleri vardır. Bunlardan en yaygın kullanılanlar; kesik, sıvı-sıvı difüzyon, buhar difüzyonu yöntemleridir (Drenth, 1999; Rupp, 2015).

Bu çalışmada kristalizasyon için buhar difüzyonu yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde kristalize edilmesi amaçlanan makromolekülü içeren damlacık, damlacıktan

daha yüksek konsantrasyonda tampon, kristalizasyon ajanı ve katkı maddeleri içeren bir çözeltiye karşı buhar difüzyonu yöntemiyle dengelenmektedir. Dengelenme işi uçucu bileşenlerin boşlukta difüze olmasıyla gerçekleşmektedir ve rezervuar içerisindeki buhar basıncı her noktada eşit oluncaya kadar devam etmektedir. Damlacıkta bulunan bileşenlerin konsantrasyonu çözeltiye göre daha düşük olduğundan su moleküllerinin taşınımı damlacıktan rezervuara doğru olacaktır. Böylece damlacığın hacmi küçülecek, tüm bileşenlerin konsantrasyonu artacaktır. Süper doyumluğa ulaşılarak kristallenme için uygun koşullar oluşturulacaktır. Buhar basıncı sudan yüksek olan türden bir çözelti için ise su moleküllerinin taşınımı rezervuardan damlacığa doğru olacaktır. Bu tür ters taşınımlı sistemler yaygın kullanılmamaktadır (Gavira, 2016).

Buhar difüzyonu yönteminin üç farklı uygulaması bulunmaktadır. Bunlar; oturan damla, asılı damla ve sandviç damla buhar difüzyon yöntemleridir. Şekil 2.12’de bu yöntemlerin uygulanması gösterilmektedir.



Şekil 2.12. Buhar difüzyon teknikleri, (a) asılı damla, (b) oturan damla, (c) sandviç damla (Anonim, 2005)

2.7.5. Kristalizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Kristal verimliliği elde edilen koşul belirlendikten sonra optimizasyon işlemine geçilmektedir. Optimizasyon kristal üretim işinin ikinci basamağını oluşturmaktadır. Bu kısımda başlangıç koşulları üzerinde sistematik değişiklikler yapılarak daha fazla sayıda ve kristalografi için daha uygun kalitede kristaller elde edilmesi amaçlanmaktadır (McPherson, 2004).

Çekirdeklenmenin gerçekleştiği koşulların belirlenmesi deneysel olarak gerçekleştirilmektedir. Aynı koşulun tekrarlanması zor olduğundan daha önceden üretilmiş kristallerden tohumlama tekniğiyle yeni kristal üretimi yapılabilmektedir. Hazır bir kristalin parçalanmasıyla elde edilen kristal parçacıkları, taşıdıkları damlacık içerisinde bulunan serbest protein moleküllerinin bir araya gelmesini sağlayan bir model teşkil etmektedir. Böylece çekirdeklenme fazı atlanarak doğrudan kristal gelişim fazı gerçekleşmektedir (Ducruix ve Giegé, 1992).

2.8. Proteinlerin Kristal Yapılarının Analizi İçin Kullanılan Teknikler

Protein moleküllerinin atomik seviyede çözümlenmesi için karbon, azot ve oksijen gibi atomların birbirlerine göre pozisyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu dizilimlerin büyük bir çoğunluğunun belirlenmesiyle proteinlerin atomlardan oluşan kompleks bir fotoğrafı oluşturulmaktadır. Bu fotoğrafın oluşturulması amacıyla, elde edilen protein kristallerini analiz etmek için kullanılan üç temel teknik vardır. Bunlar elektron mikroskopisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını yöntemleridir (Whitford, 2005).

2.8.1. Elektron Mikroskopisi

Elektron mikroskopisi, biyolojik proseslerin anlaşılması ve makromoleküllerin yapılarının belirlenmesinde kullanılan metotlar arasında kullanım yaygınlığı açısından üçüncü sırada yer almaktadır. Bu yöntemde makromoleküllerin iki boyutlu görüntüleri elektron yoğunluğu sayesinde belirlenmektedir.

Elektron mikroskopuyla yapılan ilk çalışmalarda, moleküller ağır metaller içeren boyalarla boyanarak görüntülenmeye hazırlanmaktaydı ancak bu işlem biyomoleküllerin yapısına zarar vermekteydi. Taylor ve Glaeser 1974 yılında 100 K sıcaklıkta, hidrate katalaz enzimi kristalleri içeren dondurulmuş ince filmlerden elektron difraksiyon verileri elde etmişlerdir. Böylece kriyoelektron mikroskopisi diye adlandırılan biyolojik makromoleküllerin yapısının bozulmadan incelenebildiği alternatif bir yöntem geliştirilmiştir. Aynı zamanda küçük miktarda örnek hazırlanması

ve büyük makromoleküllerin incelenmesine olanak sağlaması bu yöntemin diğer avantajlarını oluşturmaktadır. Kriyoelektron mikroskopisiyle elde edilen görüntüler X-ışını difraksiyonu ya da nükleer manyetik rezonans ile elde edilen görüntülerle karşılaştırılmamaktadır. Ancak diğer yöntemlerle incelenemeyen makromoleküller için bu yöntem kullanılmaktadır (Whitford, 2005).

2.8.2. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

NMR spektroskopisi, protein yapısının belirlenmesinde X ışını kristalografisinden sonra en yaygın kullanılan metottur. Atom çekirdeğinin çevresi manyetik moment ve spinlerden oluşmaktadır. NMR spektroskopisinde, güçlü ve homojen yapıdaki manyetik bölgeye, çözülmüş halde örnekler yerleştirilerek manyetik sinyaller elde edilmektedir. Bu sinyaller süper iletken maddeler kullanılarak 4 kat güçlendirilmekte ve sistemden çıkan sinyaller dedektörle tespit edilmektedir. Zamanın bir fonksiyonu olarak elde edilen bu sinyaller Fourier dönüşümü yardımıyla frekans-genlik bağlantısına çevrilmektedir. Böylece moleküldeki atomlar arası mesafeler belirlenerek moleküllerin üç boyutlu yapısı çözümlenmektedir. Bu deneysel işlemler 3-4 gün süresince devam etmektedir. Bu yöntemin dezavantajı, proteinlerin bu süre içerisinde bozunarak stabilitesini kaybetmesidir. Ayrıca bu yöntemde moleküler ağırlığı 20 kDa'dan küçük olan moleküllerin yapısı analiz edilebilmekte, daha büyük moleküllerin analizi ise başka yöntemleri gerektirmektedir (Whitford, 2005; Schanda ve Ernst, 2016).

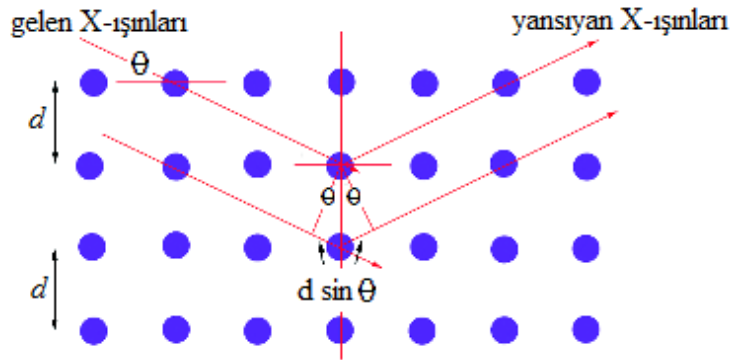
2.8.3. X-Işını Difraksiyonu

X-ışınları yüksek enerjili elektronların yavaşlatılması veya iç yörüngelerde gerçekleşen elektron geçişleriyle oluşan elektromanyetik dalgalardır ve dalga boyları 0,1-100 Å arasında değişmektedir. X-ışını difraksiyonu yöntemi, kristalize formdaki maddelerin kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak X-ışınlarını karakteristik bir şekilde yansıtması esasına dayanmaktadır. X-ışınları kristalin üzerine geldiğinde, molekülün yörüngelerinde bulunan elektronlar tarafından soğurulmaktadır. Enerjisi yükselen elektronlar yüksek enerji seviyesinden düşük enerji seviyesine taşınmakta ve bu esnada etrafa X-ışınları yayılmaktadır. Kristalden saçılan bu ışın demetlerinin açıları ve

genlikleri ölçülerek kristaldeki elektron yoğunluğunun üç boyutlu görüntüsü belirlenmektedir (Ducruix ve Giegé, 1992; Gandhi ve ark., 2013).

Tipik difraksiyon modelinde protein kristalinin monokromatik X-ışınlarıyla teması binlerce noktacı ya da yansımayla sonuçlanmaktadır. Bu noktalar kristalografinin ham datalarıdır ve hücre biriminde bulunan tüm atomlar tarafından oluşturulmaktadır. Difraksiyon modelinin tamamının analizi ile elektron yoğunluk haritası oluşturulmakta ve böylece atomların pozisyonları deşifre edilebilmektedir (Whitford, 2005).

X-ışınlarının kristal yapıdaki difraksiyonu kristalografinin erken tarihlerinde William Lawrence Bragg tarafından açıklanmış ve tarihe Bragg Kanunu olarak geçmiştir. Buna göre X-ışını difraksiyonu, X-ışını demetlerinin kristal kafesteki düzlemlerle kesiştiği noktalardan yansıması anlamına gelmektedir. Difrakte edilen ışının yönü kristal kafes düzlemi tarafından belirlenir yani yansıyan ışının yoğunluğu birim hücredeki atomik düzenlemeye bağlıdır. Bragg Kanunu'nun en basit matematiksel ifadesi $n\lambda=2\cdot d\cdot\sin\theta$ şeklindedir. Burada difraksiyon sabiti n , ışığın dalga boyu λ , düzlemler arası uzaklık d , kırılma açısı ise θ olarak ifade edilmiştir. Şekil 2.13'te X-ışını difraksiyonunun Bragg kanunlarına göre açıklaması gösterilmiştir (Bragg ve Bragg, 1913; Drenth, 2002).



Şekil 2.13. Bragg Kanunu (Whitford, 2005)

X-ışınlarının üretimi laboratuvar koşulları altında yapılabilmektedir. Katotla anot arasında uygulanan yüksek gerilim sayesinde anota gönderilen elektronlar hızlandırılarak X-ışınları üretilmektedir. Monokromatizasyon, radyasyonu absorbe etmiş ince metal bir folyo ya da grafit metali kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bunun yanı sıra anot olarak belirlenen metal levha kendi etrafında döndürülerek daha

parlak ışın kaynağı elde edebilmek mümkündür. Proteinlerle yapılan çalışmalarda genel olarak bakır kullanılmakta ve ışın dalga boyu ise 0,1542 nm olarak belirlenmektedir (Metzler ve Metzler, 2001; Whitford, 2005).

Bu yöntemlere ek olarak elektron demeti bir mıknatıs ile bükülerek alternatif bir X-ışını kaynağı üretilir. Sinkrotron radyasyon olarak bilinen bu yöntemde diğer yöntemlere kıyasla çok daha yoğun X-ışınları üretilmesi mümkündür. Üretilen ışınların dalga boyu spektrumu 0,05-0,3 nm aralığında devam etmektedir ve bu düşük dalga boyu kullanımı kristalin X-ışınlarıyla temas ömrünü uzatmaktadır (Whitford, 2005).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Mikroorganizma ve Fermantasyon Koşulları

Dr. Leo de Graaf (Wageningen Üniversitesi, Hollanda) tarafından sağlanan *Aspergillus terreus* NRRL 1960, patates-dekstroz agar ortamına ekilmiş ve petrilere 4 gün boyunca 35°C sıcaklıkta sporlandırılmıştır. Daha sonra %0,9 NaCl çözeltisi kullanılarak petrilere stok spor toplanmıştır.

Kullanılan ön kültür ortamı 25 g/L glukoz, 5 g/L MgSO₄.7H₂O, 0,4 g/L NaCl, 0,1 g/L KH₂PO₄, 2,0 g/L NH₄NO₃, 0,5 g/L mısır şurubu içeriğine sahiptir. Konsantrasyonu 10⁷ spor/mL olan stok spor çözeltisinden ön kültür ortamı içerisine ekilmiş ve kültür 24 saat boyunca 35°C sıcaklık ve 175 rpm çalkalama hızı koşullarında inkübe edilmiştir.

Ana kültür ortamı 0,5 g/L mısır şurubu, 5 g/L MgSO₄.7H₂O, 3 g/L NH₄NO₃, 0,4 g/L NaCl, 0,033 g/L ZnSO₄.H₂O, 0,5 g/L KH₂PO₄, 1 g/L CaCl₂.2H₂O, 0,06 g/L CuSO₄.5H₂O içeriğine sahiptir. Ana kültür içerisine daha önceden öğütülerek 2 mm'lik elekten geçirilmiş mısır koçanı (50 g mısır koçanı/L) karbon kaynağı olarak eklenmiştir. Ana ve ön kültür ortam bileşenleri Ek 1'de verilmiştir. Ön kültür çözeltisi, ana kültür içerisine hacimce %20 oranında inoküle edilmiştir. Ana kültür, 35°C sıcaklık ve 175 rpm çalkalama hızı koşulunda çalkalamalı inkübatörde inkübe edilerek enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzim aktivitesinin, fermantasyonun 7. gününde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür. Ana kültür, kaba filtre kağıdıyla süzülüş ve 5000 g'de santrifüj edilerek yabancı partiküller uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen süpernatant, ham enzim solüsyonu olarak çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi, dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemiyle belirlenmiştir (Miller, 1959). Enzim aktivitesi belirlenmesi için substrat olarak 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponuyla hazırlanan %1'lik (a/h) huş ağacı ksilanı kullanılmıştır (Bailey ve ark., 1992). Daha önceden termal dengeye gelmiş 40°C sıcaklıktaki 6 mL ksilan çözeltisi ile 600 µL enzim solüsyonu 40°C'ye ayarlanmış su banyosu içerisinde karıştırılmıştır.

Uygun zaman aralıklarında reaksiyon çözeltisinden 600 µL örnek alınmış ve 1,5 mL DNS çözeltisi ile karıştırılarak enzim aktivitesi durdurulmuştur. Örnekler 5 dakika kaynatılarak renk değişimi sağlanmıştır. Örneklerin absorbansı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Miller, 1959). DNS çözeltisinin içeriği Ek 2’de verilmiştir.

Ksiloz konsantrasyonu 40-160 µg/mL olan 150 µL hacimli ksiloz çözeltileri, 1,5 mL DNS çözeltisiyle karıştırılıp 5 dakika kaynatıldıktan sonra 540 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Konsantrasyon-absorbans eğrisi çizilerek ksiloz standardı oluşturulmuş (Ek 3) ve bu eğrinin eğimi kullanılarak Eşitlik 3.1 yardımıyla ksilanaz aktivitesi hesaplanmıştır.

$$\text{Ksilanaz Aktivitesi (IU/mL)} = \frac{\text{Ksilanaz aktivite grafiği eğimi (Abs/s)} \times 60 \times \text{Seyreltme faktörü} \times 11}{\text{Ksiloz standart grafiği eğimi (Abs/(\mu\text{g/mL}))} \times 150,13 \times (\mu\text{g}/\mu\text{mol})} \quad (3.1)$$

Eşitlikte;

IU: µmol ksiloz dakika⁻¹

60: Saniye/dakika çevirme faktörü (s/dakika)

Seyreltme faktörü: Enzimin seyreltilme oranı

11: enzimin reaksiyon karışımındaki (10 mL substrat + 1 mL enzim) seyrelme oranı

150,13: Ksilozun molekül ağırlığını (µg/µmol) ifade etmektedir.

3.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein konsantrasyonu belirlenirken Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976) (Ek 4). Sığır serum albümin standart olarak kullanılmıştır. Analizde kullanılacak Bradford reaktifi 0,1g/L Commassie Brilliant Blue G-250, %5 (h/h) etanol ve %10 (h/h) %85’lik fosforik asit içermektedir. Ölçüm yapılacak örneklerden tüp içerisine 50 µL hacminde konulmuş, üzerine 1,5 mL Bradford reaktifi eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Absorbans değerleri (595 nm) ölçülmüş ve standart eğri kullanılarak protein konsantrasyonu hesaplanmıştır. Protein miktarının belirlenmesinde uygulanan metot Ek 4’te ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

3.4. Enzim Saflaştırma Çalışmaları

Enzim saflaştırma çalışmaları üç aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 7 gün boyunca inkübe edilen sıvı kültür kaba filtre kağıdıyla süzölmüş ve elde edilen ham enzim solösyonuna amonyum sülfat eklenerek çöktürme işlemi yapılmıştır. Sonraki aşamada hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi uygulanmıştır. Son olarak ultrafiltrasyon ve konsantrasyon yapılarak saf ve konsantre ksilanaz elde edilmiştir.

3.4.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme

Çöktürme için uygun amonyum sülfat doygunluk oranının belirlenmesi amacıyla buz banyosunda %40-60 (a/h) aralığında amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Ham enzim solösyonuna amonyum sülfat tuzu yavaşça eklenmiş, 1 saat boyunca buz banyosu içerisinde çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çöktürme işlemi uygulanan enzim solösyonu 10,000 g'de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant kısmı atılırken, elde edilen çökelekler 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) çözölmerek sonraki saflaştırma aşamasına geçilmiştir.

3.4.2. Hidrofobik Kolon Kromatografisi

Enzim saflaştırma işlemi hızlı sıvı kromatografisi (FPLC) sistemi olan Äkta Prime (Amersham Biosciences, İsveç) kullanılarak hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma kolonu olarak HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance (Amersham Biosciences, İsveç) kolonu kullanılmıştır. Kolon özellikleri ek olarak verilmiştir (Ek 5). Kolon 50 mM sodyum fosfat tamponuyla (pH 7,0) 3 mL/dk akış hızıyla dengelenmiştir. Amonyum sülfat çöktürme işlemi sonucu elde edilen enzim sodyum fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde çözölmüş ve son konsantrasyonu 1 M olacak şekilde katı NaCl eklenerek 3 mL/dk akış hızıyla kolona yüklenmiştir. Enzim 300 mL sodyum fosfat (50 mM, pH 7,0) tamponu ile 300 mL elösyon (1-0 M) yapılarak 6 mL' lik fraksiyonlar halinde elde edilmiştir. Kolona yüklenecek tüm sıvılar safsızlıkların giderilmesi amacıyla 0,22 µm'lik membrandan geçirilmiştir.

3.4.3. Ultrafiltrasyon ve Konsantrasyon

Hidrofobik etkileşimli kolondan çıkan ve yüksek ksilanaz aktivitesine sahip olduğu belirlenen fraksiyonlar bir araya getirilerek ultrafiltrasyon aşamasına geçilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi 50 mL hacimli (Millipore-Amicon, ABD) karıştırıcı ultrafiltrasyon hücresinde gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon için 30 kDa'luk (Millipore-Amicon, ABD) ultrafiltrasyon membran diskleri kullanılmıştır. Birinci basamakta enzim solüsyonu 30 kDa geçirim sahip membrandan basınç yardımıyla filtre edilmiştir. Elde edilen filtrat 3 kDa geçirimli santrifüj konsantratör kullanılarak konsantrasyon işlemine devam edilmiştir. Bu iki aşamalı teknik sayesinde 3-30 kDa aralığında büyüklüğe sahip protein molekülleri ultrafiltrasyon hücresinde elde edilmiştir. Kristalizasyonda kullanılacak örneklerin son konsantrasyonları 500 µL hacimli ve 3 kDa geçirimli konsantratörlerle ayarlanmıştır.

Her bir saflaştırma adımından sonra verim, spesifik aktivite ve saflaştırma katı “Eşitlik 3.2, 3.3, 3.4” kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{Toplam enzim aktivitesi}}{\text{Başlangıçtaki toplam aktivite}} \times 100 \quad (3.2)$$

$$\text{Saflaştırma Oranı (Kat)} = \frac{\text{Spesifik enzim aktivitesi}}{\text{Başlangıçtaki spesifik enzim aktivitesi}} \quad (3.3)$$

$$\text{Spesifik Enzim Aktivitesi } \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right) = \frac{\text{Toplam enzim aktivitesi (IU)}}{\text{Toplam protein miktarı (mg)}} \quad (3.4)$$

3.4.4. Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Saf Enzimin Görüntülenmesi

Her saflaştırma aşamasında elde edilen enzimlerin içerdiği proteinlerin görüntülenmesi amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrofrez (SDS-PAGE) sistemi Laemmli (1970) metoduna göre çalışılmıştır. Elektrofrez işlemi Mini-Protean Tetra Cell (Biorad, Almanya) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Alt jel ve üst jel sırasıyla %12-14, %7 akrilamid/bisakrilamid konsantrasyonunda hazırlanmıştır (Ek 6).

Belirteç olarak molekül ağırlığı 1,7-40 kDa olan proteinler içeren, Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır.

Jel boyama işlemi için Coomassie Brilliant Blue G-250 %0,1 (a/h), %50 (h/h) metanol %12 (h/h) asetik asit içeriğine sahip bir boyama çözeltisi hazırlanmıştır. Jeller bu çözeltide yaklaşık 12 saat bekletilmiş, ardından %30 (h/h) metanol, %7 (h/h) asetik asit içeriğine sahip çözelti içerisinde boya giderme işlemi gerçekleştirilerek protein bantları görüntülenmiştir. R_f (sürüklenme faktörü) hesaplanarak enzimin molekül ağırlığı belirlenmiştir.

3.5. Protein Kristalizasyonu Çalışmaları

Kristalizasyon aşaması protein kristalografi çalışmaları için en önemli aşamalardan biridir. Bu aşamada, kristalografi çalışmalarında kullanılacak kalitede kristaller üretilmesi amaçlanmaktadır. Kristalizasyon işlemi üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar; ön kristalizasyon, kristal oluşumu için uygun koşulların taranması ve kristalizasyon koşullarının optimizasyonudur. Tüm aşamalarda kristal gözlemleri mikroskop Leica EC 3 (Leica, Almanya) mikroskop ile yapılmıştır. Kristallerin bilgisayar ortamında görüntülenmesi ve ölçeklendirilmesinde LAS EZ (Leica Microsystems Framework) programı kullanılmıştır. Kristal boyutlarına göre farklı oranlarda yakınlaştırma yapılmış ve kristal boyutları görüntüler üzerinde belirtilmiştir.

3.5.1. Ön Kristalizasyon İşlemleri

Ön kristalizasyon işlemi, protein örneğinin kristalizasyon için uygun saflık ve konsantrasyonda olup olmadığını anlamak için yapılmaktadır. Saflaştırma ve konsantrasyon işlemleri sonucu protein konsantrasyonu belirlenen ksilanaz enzimi ile ön kristalizasyon işlemi yapılmıştır. Bu aşamada Hampton Research (ABD) ön kristalizasyon test kiti kullanılmıştır. Yöntem olarak asılı damla buhar difüzyonu kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu 0,5 ve 1 mg/mL olarak ayarlanan enzim örnekleri kullanılmıştır. Ön kristalizasyon işlemi için, 22 mm çapında ve 3,5 mL hacminde 24 adet göze sahip şeffaf kristalizasyon plakaları ve asılı damlanın oluşturulacağı 22 mm çapta dairesel cam plakalar kullanılmıştır.

Kullanılan ön kristalizasyon test kiti, protein örneğinin kristalizasyon için uygun saflık ve konsantrasyonda olup olmadığını belirlemeyi sağlayan, tuz, alkol ve tampon gibi bileşenler içeren ve steril olarak filtrelenmiş reaktiflerden oluşmaktadır. A1, A2, B1 ve B2 olarak adlandırılmış 4 farklı reaktifin içeriği Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ön kristalizasyon aşamalarında kullanılan reaktiflerin formülasyonları

Reaktif	İçerik
A1	0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 2,0 M amonyum sülfat
A2	0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 1,0 M amonyum sülfat
B1	0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 0,2 M magnezyum klorür 6-hidrat; %30 (a/h) polietilen glikol 4000
B2	0,1 M Tris HCl pH 8,5; 0,2 M magnezyum klorür 6-hidrat; %15 (a/h) polietilen glikol 4000

Başlangıçta ön kristalizasyon işlemi A1 ve A2 kullanılarak gerçekleştirilir. İşlemin 30. dakikasında ve 24. saatinde mikroskopla yapılan gözlemlerde, örneğin konsantrasyonu 3 mg/mL’den düşük olmasına rağmen yoğun amorf çökelti ya da berrak damla gözlemlenirse aynı örnekle B1 ve B2 reaktifleri kullanılarak ön kristalizasyon işlemi tekrarlanmaktadır. Elde edilen görüntüler test kitinin kılavuzunda verilen öneriler (Çizelge 3.2) doğrultusunda yorumlanmıştır.

Çizelge 3.2. Ön kristalizasyon sonuçları ve öneriler

A1/B1 Reaktifi Sonuçları	A2/B2 Reaktifi Sonuçları	Öneri
Yoğun amorf çökelti	Yoğun amorf çökelti	Örnek 1:1 seyreltilip ön kristalizasyon işlemi yapılır
Berrak	Berrak	Örnek hacmi yarıya indirilecek şekilde konsantre edilip ön kristalizasyon işlemi yapılır
Hafif granüllü çökelti	Berrak	Kristalizasyon işlemine geçilebilir
Berrak	Hafif granüllü çökelti	Kristalizasyon işlemine geçilebilir
Yoğun amorf çökelti	Hafif granüllü çökelti	Kristalizasyon işlemine geçilebilir
Yoğun amorf çökelti	Berrak	B1 ve B2 reaktifleri ile ön kristalizasyon işlemi yapılır
Berrak	Yoğun amorf çökelti	B1 ve B2 reaktifleri ile ön kristalizasyon işlemi yapılır

Bu çalışmada da, öncelikle test kitinde bulunan A1 ve A2 kitleri kullanılmıştır. Test edilecek 1 µL protein örneği üzerine 1 µL reaktif eklenerek karıştırılmıştır. Rezervuarlara 1 mL reaktif konmuş, 24'lük plakalarda asılı damla buhar difüzyonu yöntemiyle ön kristalizasyon testi uygulanmıştır. Plakalar 18°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra mikroskop görüntüleri alınmıştır. Görüntüler Çizelge 3.2'de bulunan önerilere göre yorumlanmıştır. Bu önerilere uymayan bir durum gözlemlendiğinde B1 ve B2 kitleriyle kristalizasyon işlemi tekrarlanarak sonuçlar yorumlanmıştır. Yoğun amorf çökelti gözlemlendiğinde uygun oranda seyreltme yapılmıştır. Berrak damla gözlemlendiğinde ise uygun oranda konsantrasyon işlemi yapılarak bir sonraki aşamaya geçilmiştir.

3.5.2. Kristal Oluşumu İçin Uygun Koşulların Taranması

Bu aşamada kristallerin üretimi için uygun başlangıç koşullarının belirlenmesi amacıyla tarama işlemi yapılmıştır. Bunun için 4 ayrı kristalizasyon kiti kullanılmıştır. Bunlar; Hampton Research (ABD) firmasından temin edilen Index HT, Crystal Screen, PEG Rx ve Salt Rx isimli ticari kitlerdir. Her biri 96 farklı bileşime sahip (tampon, tuz, katkı maddesi) çöktürme reaktifi içermektedir.

Kristalizasyon işlemi oturan damla buhar difüzyon yöntemi ile yapılmış ve 96'lık mikropalakalar kullanılmıştır. Plakalarda, 96 rezervuar ve her rezervuarın yanında protein ve reaktifin karıştırılacağı kuyucuk bulunmaktadır. Rezervuarlara 75 µL çöktürme reaktifi eklenmiştir. Protein (0,5 mg/mL) ve reaktif ise rezervuarın kenardaki kuyucuğa 1'er µL eklenerek karıştırılmıştır. Plakanın üzeri yapışkanlı koruyucu bant ile kaplanarak rezervuarların birbiriyle ve hava ile teması kesilmiştir. Tarama plakaları 18°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Plakalar belli zaman aralıklarında mikroskopla gözlemlenerek kristal oluşumu takip edilmiştir. Oluşan kristaller şekillerine göre Çizelge 3.3'te verilen kod numaralarıyla sınıflandırılmıştır.

Çizelge 3.3. Kristalizasyon denemelerinde gözlemlenebilecek tipik oluşumlara ait kodlar ve isimlendirilmeleri

Kod numarası	İsimlendirme
1	Berrak damla
2	Gergin deri
3	Çökelti
4	Faz oluşumu
5	Kuazzi-kristaller
6	Mikrokristaller
7	İğne tipi kristaller
8	Plaka tipi kristaller
9	Çubuk kümesi tipi kristaller
10	Tekil kristaller

3.5.3. Kristallerin Protein Yapıda Olduğunun Gösterilmesi

Yapılan kristal tarama işlemleri sonucu gözlemlenen iğnesel, plaka tipinde, çubuk kümesi ya da tekli kristal yapılar Izit (Hampton Research, ABD) boyama testine tabi tutulmuştur. Izit boyası metilen mavisi ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) çözeltisinden oluşmaktadır. İşlem uygulanırken seçilen kristalin bulunduğu kuyucuğun üstünde bulunan yapışkan film kaldırılarak damlacığa küçük bir miktar (0,1 μ L) boya eklenmiştir. Boya ekleme öncesinde ve sonrasında 1. ve 24. saatlerde mikroskop görüntüleri alınarak kristallerin boyanıp boyanmadığı kontrol edilmiştir.

Protein, peptid ve nükleik asit varlığında kristaller boyayı 1-24 saat içinde absorblamaktadır. Boya damlacıkta bekledikçe kristal daha koyu bir mavi renk almaktadır. Fakat protein dışında mineral, tuz veya diğer inorganik bileşen kristalleri Izit'i absorbe etmediğinden kristaller koyu renk almamaktadır. Boyayı absorbe eden kristaller protein kristali olarak değerlendirilmektedir.

3.5.4. Kristalizasyon Koşullarının Optimizasyonu

Kristalizasyon için uygun başlangıç koşulları, tarama işlemiyle belirlendikten sonra bu koşullar geniş bir aralıkta çalışılarak optimum noktanın belirlenmesi hedeflenmiştir. Enzim konsantrasyonu, reaktiflerin içerdiği bileşen konsantrasyonları, bileşenlerin pH'sı, enzim/reaktif karışım oranları, inkübasyon sıcaklığı ve kristalizasyon yöntemi

değiştirilerek farklı plakalar oluşturulmuştur. Optimizasyon işlemi 24 rezervuarlı plakalarda asılı damla ve oturan damla buhar difüzyonu metodları kullanılarak yapılmıştır. Bu kısımda çöktürme reaktifleri laboratuvarında hazırlanmıştır. Çözeltiler hazırlanırken ultra saf su kullanılmış ve safsızlıkların giderilmesi amacıyla çözeltiler 0,45 µm filtrelerden geçirilmiştir.

Asılı damla buhar difüzyonu yönteminde rezervuarlara 1 mL çöktürme reaktifi eklenmiştir. Örnek protein çözeltisi ve reaktif dairesel cam plaka üzerine 1'er µL eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra bu plakalar ters çevrilip silikon kaplı rezervuarlar üzerine hava almayacak şekilde kapatılarak optimizasyon plakaları oluşturulmuştur. Plakalardaki kristal oluşumları mikroskopla ilk hafta her gün, ikinci haftadan itibaren haftada üç kere kontrol edilmiştir.

3.5.5. Tohumlama Tekniği

Çekirdeklenme koşullarını ve kristal büyümesini aynı anda optimize etmek mümkün olmazsa, yapı analizi için uygun kristallerin üretilmesinde sorun yaşanmaktadır. Bu gibi durumlarda tohumlama tekniği uygun bir alternatif olmaktadır. Bu çalışmada doğal fiber yapıya sahip kılcal bir aparat yardımıyla tohumlama işlemi yapılmıştır.

Optimizasyon aşamasında gözlemlenen düzgün yapılı kristaller tohumlama kaynağı olarak seçilmiştir. Fiber aparat yardımıyla bu kristaller mikroskop altında kırılarak kristal parçaları elde edilmiştir. Kristal parçacıklarını üzerinde bulunduran aparat, 1 µL protein örneği ve 1 µL çöktürme reaktifıyla oluşturulan damla içerisinde geçirilerek tohumların damlacığa aktarılması sağlanmıştır. Tohumlama plakaları asılı damla buhar difüzyonu tekniğiyle oluşturulmuştur. Plakalardaki kristal oluşumları mikroskopla belli zaman aralıklarında kontrol edilmiştir.

3.6. Enzimatik Teknikle Ksilanın Hidrolizi

A. *terreus* ksilanazının lignoselülozik kaynakları hidroliz etme potansiyeli araştırılmıştır. Fermantasyon ile elde edilen ham ve saf enzim, lignoselülozik

kaynakların enzimatik olarak hidrolizinde kullanılmıştır. Lignoselülozik kaynak olarak mısır koçanı ve buğday kepeği, ticari kaynak olarak huş ağacı ksilanı kullanılmıştır.

3.6.1. Hemiselüloz Özütleme

Hemiselüloz bileşeni, lignoselülozik biyokütle içerisinde lignin-ksilan kompleksi halinde bulunmaktadır. Ksilanın daha kolay hidrolize edilebilmesi için bazı kimyasal yöntemler kullanılarak ayrılması sağlanmaktadır. Bu yüzden ksilanın hidrolizi genellikle, lignoselülozik materyalden ksilan eldesi ve ksilanın hidrolizi olmak üzere iki basamakta gerçekleştirilmektedir (Akpınar ve ark., 2009). Ksilan-lignin kompleksinin kolayca ayrılması için asit ile hidroliz ve alkali özütleme etkili yöntemler arasındadır. Bu çalışmada alkali özütleme metodu tercih edilmiştir.

Alkali hemiselüloz özütlemesi Zilliox ve Debeire (1998) tarafından daha önce rapor edilmiş bir yöntem üzerinde modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Kocabaş ve Özben, 2014). Biyokütle çekiçli değirmende öğütülerek 2 mm'lik elekten geçirilmiştir. Sonrasında 10 g öğütülmüş biyokütle 250 mL distile su içerisinde 15 dakika bekletilip filtrelenmiştir. Islak biyokütle, hemiselüloz fraksiyonunun özütlenmesi için 85 mL % 24'lük (a/h) potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi eklenmiş ve 24 saat karıştırılmak üzere oda sıcaklığına bırakılmıştır.

24 saat sonunda karışım süzülüp sıvı kısım alınmıştır. Bu kısım alkali ortamda çözünmüş hemiselülozu içermektedir. Sıvı kısım 5 dakika boyunca 5000 g'de santrifüjlendikten sonra süpernatant kısmı alınıp üzerine 250 mL asetik asit-etanol (1:10, h/h) eklenmiş ve hemiselüloz fraksiyonu çöktürülmüştür. Çökelek, 20 mL su içerisinde kısmen çözdürülmüş ve 60 mL asetik asit-etanol (1:10, h/h) eklenerek tekrar çöktürülmüştür. Çökelti halindeki hemiselüloz filtrelenip oda sıcaklığında kurutulmuş ve enzimatik hidroliz çalışmalarında kullanılmıştır.

3.6.2. Enzimatik Hidroliz

Enzimatik hidroliz için ham ve saf ksilanaz olmak üzere iki farklı enzim kullanılmıştır. Ham enzim, *A. terreus* küfünün 7 günlük inkübasyonu sonucu ana kültürün

süzülmesiyle elde edilmiştir. Saf enzim ise ham enzime amonyum sülfat çöktürme, hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi ve ultrafiltrasyon uygulanarak elde edilmiştir. Lignoselülozik materyaller (öğütülerek 2 mm boyutuna getirilmiş mısır koçanı ve buğday kepeği) doğrudan ve hemiselüloz özütlemesi yapılarak iki ayrı şekilde enzim ile hidroliz edilmiştir. Ticari ksilan ise özütlemeye ihtiyaç duyulmadığından doğrudan hidroliz edilmiştir.

Özütlemeyle elde edilen hemiselülozun hidrolizinde, 10 mL toplam reaksiyon çözeltisi içerisine 0,1 g hemiselüloz konulmuş ve son aktivite 15 IU/mL olacak şekilde enzim eklenmiştir. Bu çalışmada hem ham hem de saf enzim ile deneme yapılmıştır. Lignoselülozik kaynakların doğrudan hidrolizi yapılırken öğütülerek 2 mm boyutuna getirilmiş 0,5 g biyokütle konulmuş ve son aktivite 15 IU/mL olacak şekilde enzim eklenmiş ve yine hem ham hem de saf enzim için deneme yapılmıştır. Reaksiyon çözeltileri 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0) kullanılarak hazırlanmış son hacim 10 mL olarak ayarlanmıştır. Reaksiyonlar 40°C sıcaklıkta çalkalamalı su banyosu içerisinde gerçekleştirilmiştir. 0, 2, 4 ve 6. saatlerde reaksiyon karışımlarından örnek alınarak indirgen şeker tayini yapılmış ve hidroliz performansı belirlenmiştir.

3.6.3. Hidroliz Sonucu Oluşan İndirgen Şeker Miktarının Belirlenmesi

İndirgen şeker tayini ksiloz standardı kullanılarak dinitrosalisilikasit (DNS) yöntemiyle yapılmıştır (Miller, 1959). Hidroliz reaksiyonu çözeltilerinden belirli zamanlarda 600 µL örnek alınarak üzerine 1,5 mL DNS çözeltisi koyulmuş, 5 dakika boyunca kaynatıldıktan sonra renk değişimi 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Ksiloz standart eğrisi kullanılarak indirgen şeker miktarı hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ksilanazın Saflaştırılması

Saflaştırma çalışmalarının ilk basamağını amonyum sülfatla çöktürme işlemi oluşturmaktadır. Öncelikle uygun amonyum sülfat çöktürme oranının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla ham enzime farklı amonyum sülfat oranlarında çöktürme işlemleri uygulanmıştır. En az miktarda amonyum sülfat kullanılarak en fazla proteinin çöktürüldüğü oran belirlenmiştir. Bu aşamada kısmen saflaştırılan enzime, bir sonraki adımda hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi tekniği uygulanmıştır. En yüksek enzim aktivitelerini içeren fraksiyonlar birleştirilerek ultrafiltrasyona tabi tutulmuş ve 30 kDa'dan büyük moleküller elimine edilmiştir. Son basamakta enzim solüsyonu 3 kDa'lık membran kullanılarak konsantre edilmiştir.

4.1.1. Amonyum Sülfat ile Çöktürme Sonuçları

Proteinlerin çöktürülmesi için öncelikle en az tuz konsantrasyonuyla en fazla protein çöktürmesinin gerçekleştirildiği amonyum sülfat doygunluk oranının belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için, ham enzime % 40, 50 ve 60 (a/h) amonyum sülfat doygunluk oranlarında çöktürme işlemleri uygulanmıştır. Farklı oranlarda yapılan çöktürmeler sonucu oluşan çökelti ve süpernatantların ksilanaz aktiviteleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Amonyum sülfat doygunluk oranı %50 (a/h) olan çöktürme işlemiyle elde edilen çökeltide ksilanaz aktivitesi en yüksek değere sahiptir. Bu oranda yapılan saflaştırmada toplam aktivitenin %63,1'i çökelekte toplanmıştır.

Bu sonuçlara bakılarak çöktürme için en uygun amonyum sülfat doygunluk oranının %50 (a/h) olduğu belirlenmiş ve çalışmalara bu oran kullanılarak devam edilmiştir. Literatürdeki ksilanaz saflaştırma çalışmaları incelendiğinde amonyum sülfat ile çöktürme yönteminin bir ön saflaştırma basamağı olarak yaygın şekilde kullanıldığı görülmektedir. *Aspergillus aculeatus* küfünden elde edilen ksilanaz %80 (a/h) amonyum sülfat çöktürme yöntemiyle %97,1 verimle 5 kat saflaştırılmıştır (Fujimoto ve ark., 1995). Yang ve ark. (2009) tarafından yapılan başka bir çalışmada *Aspergillus niger* ksilanazına %40 (a/h) doygunluk oranında amonyum sülfat çöktürme uygulanmış

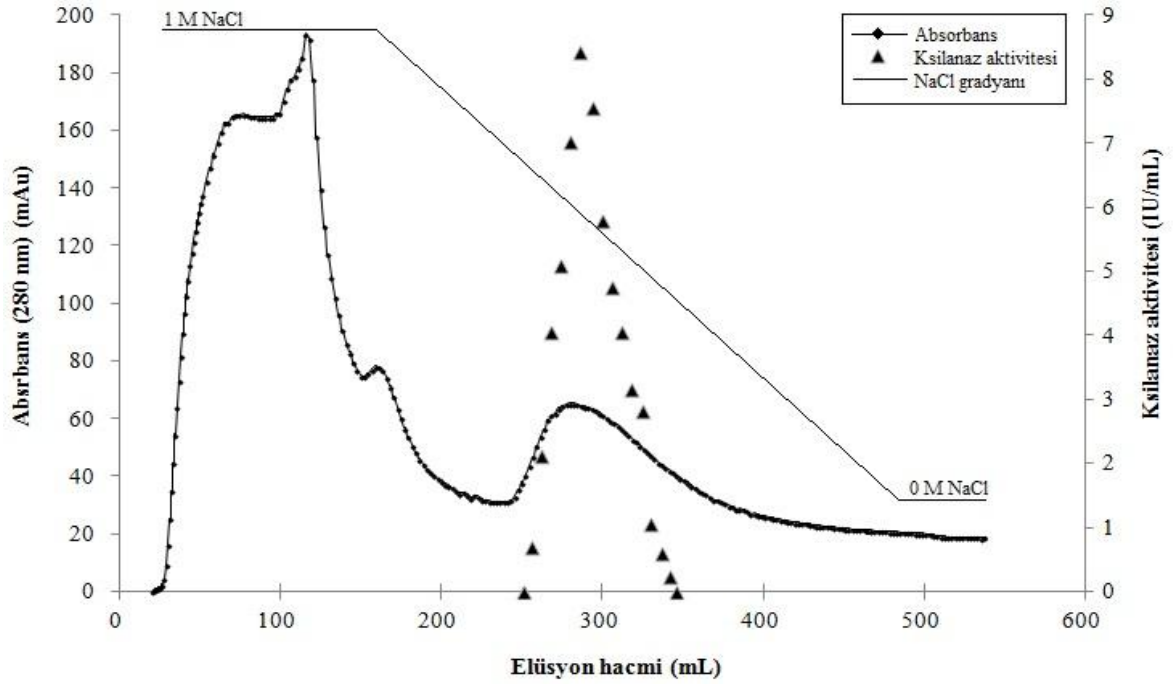
ve 3,08 kat saflaştırma %73,12 verimle gerçekleştirilmiştir. Verilen örneklerden anlaşıldığı üzere uygun amonyum sülfat çöktürme oranı ortam koşullarına ve protein örneğine göre farklılık göstermektedir. Uygun oran belirlenmesi farklı oranlarda çöktürme işlemi denenerek mümkün olmaktadır.

Çizelge 4.1. Farklı oranlarda yapılan amonyum sülfat çöktürme sonuçları

Ham Enzim Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)	Amonyum sülfat doygunluk oranı (%)	Süpernatant toplam ksilanaz aktivitesi (IU)	Çökeltide (pellet) toplam ksilanaz aktivitesi (IU)	Amonyum sülfat çöktürme verimi (%)
205,6	40	162,9	33,8	16,4
	50	16,8	129,7	63,1
	60	34,4	119,6	58,1

4.1.2. Hidrofobik Etkileşimli Kolon Kromatografisi

Bir önceki saflaştırma basamağı olan amonyum sülfatla çöktürme işleminden elde edilen enzim çözeltisine hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi uygulanmıştır. Enzim çözeltisine NaCl (1 M) eklenerek daha önceden 1 M NaCl içeren sodyum fosfat (50 mM, pH 7,0) tamponuyla dengelenen hidrofobik etkileşimli kolona yüklenmiştir. Enzim 300 mL sodyum fosfat (50 mM, pH 7,0) tamponu ile elüsyon (1-0 M NaCl) yapılarak 6 mL'lik fraksiyonlar halinde elde edilmiştir. Saflaştırma sonucuna ait kromatogram Şekil 4.1'de sunulmaktadır. Bu kromatogramda elüsyon esnasında gözlemlenen pikin bulunduğu bölgedeki fraksiyonların ksilanaz aktivitesi kontrol edilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesine sahip fraksiyonlar toplanarak ultrafiltrasyon aşamasına geçilmiştir.



Şekil 4.1. Hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisine ait kromatogram

4.1.3. Ultrafiltrasyon ve Konsantrasyon

Ultrafiltrasyon işlemi karıştırıcılı ultrafiltrasyon hücresinde (Millipore-Amicon, ABD) 30 kDa'luk ultrafiltrasyon membran diskleri (Millipore-Amicon, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon membranından geçen kısım alınmış ve 3 kDa'luk membran konsantratörler kullanılarak örnek hacmi 1 mililitreye düşürülmüştür. Uygulanan saflaştırma işlemleri sonunda *A. terreus* ksilanazı %10 verimle 256 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.2).

Başlangıçta elimizde bulunan ham enzim solüsyonunda ksilanaz da dahil olmak üzere farklı proteinler bulunmaktadır. Her saflaştırma adımında istenmeyen bazı proteinler elenmiş ve böylece ksilanaz enziminin toplam protein miktarına oranı artmıştır. Spesifik aktivite, mg protein başına düşen ksilanaz aktivitesini temsil ettiğinden yapılan her saflaştırma işleminden sonra yükselmiştir. Spesifik aktivitenin yüksek olması protein örneğinin ksilanazca zengin olduğu ve aynı zamanda saflık derecesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir.

Çizelge 4.2. Ksilanazın saflaştırmasına ait saflaştırma tablosu

Saflaştırma adımı	Hacim (mL)	Ksilanaz Aktivitesi (IU/mL)	Toplam Aktivite (IU)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Toplam Protein Miktarı (mg)	Spesifik Aktivite (IU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma katı
Ham enzim	945	12,8	12096,0	0,088	83,160	145,5	100	1
Amonyum Sülfat Çöktürme	80	87,9	7032,0	0,101	8,080	870,3	58	6
Hidrofobik Kolon Kromatografi	90	54,4	4896,0	0,011	0,990	4945,5	40	34
Ultrafiltrasyon (30 kDa) Konsantrasyon (3 kDa)	1	1193,7	1193,7	0,032	0,032	37303,1	10	256

Safılaştırma verimi her basamakta azalmış ve en son %10 oranına dūřmūřtur. Bunun sebebi safılaştırma işlemleri esnasında meydana gelen kayıplar ve safılaştırma sūrecinde proteinlerin aktif yapısının zarar gōrmūř olmasıdır. Literatūrde farklı yōntemler kullanılarak gerēekleřtirilmiř *A. terreus* ksilanazı safılaştırmaları bulunmaktadır. Bu alışmalar izelge 4.3'te ōzetlenmiřtir.

Çizelge 4.3. Literatūrde bulunan *Aspergillus terreus* ksilanazı safılaştırma çalışmaları

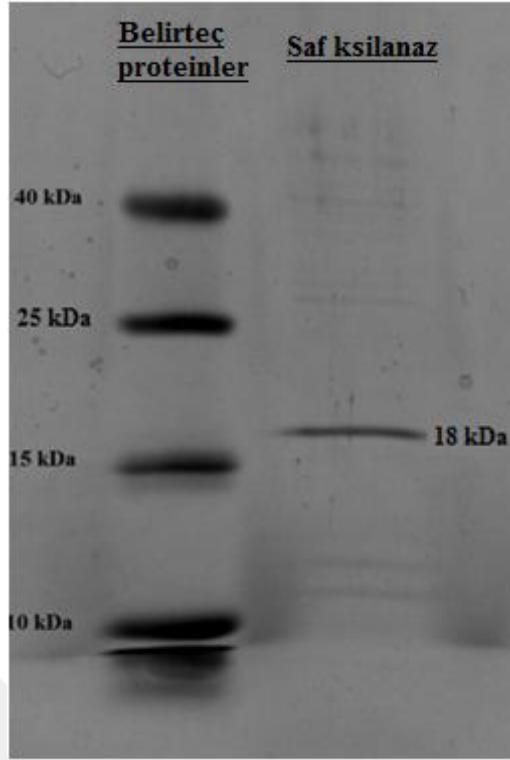
<i>Aspergillus terreus</i> suşu	Safılaştırma yōntemi	Safılaştırma katı	Safılaştırma verimi	Kaynak
A-07	Amonyum sūlfat ōktürme	5	79	Chen ve ark. (1986)
	Jel filtrasyon kromatografisi	16	35	
THOM	Diyaliz	1	88	Ghareib ve ark. (1992)
	Amonyum sūlfat ōktürme	1	67	
	Jel filtrasyon kromatografisi	11	42	
	Anyon değişim kromatografisi	25	23	
Yerel buğday tarlası toprağından izole edilmiş	Amonyum sūlfat ōktürme	1	34	Ghanem ve ark. (2000)
	Anyon değişim kromatografisi	2	33	
	Jel filtrasyon kromatografisi	4	31	
BCC129	Jel filtrasyon kromatografisi	1	84	Chantasingh ve ark. (2006)
S ₇	Amonyum sūlfat ōktürme	3	15	Pal ve ark. (2006)
	Diyaliz			
UL 4209	Konsantratör (10 kDa)	1	56	Chidi ve ark. (2008)
	Jel filtrasyon kromatografisi	0,3	0,6	

Çizelge 4.3. (devam) Literatürde bulunan *Aspergillus terreus* ksilanazı saflaştırma çalışmaları

Şeker kamışı küspesinden izole edilmiş	Amonyum sülfat çöktürme	2	81	Geweely (2011)
	Diyaliz	8	73	
	Jel filtrasyon kromatografisi	56	67	
	Jel filtrasyon kromatografisi	162	58	
	İyon değişim kromatografisi	516	31	
NRRL 1960	Hidrofobik etkileşim kromatografisi	19	61	Kocabaş ve ark. (2011)
<i>Memora peregrina</i> ' dan İzole edilmiş	İyon değişim kromatografisi	45	67	Sorgatto ve ark. (2012)
Doğal izole Edilmiş	Ultrafiltrasyon	2	45	Moreira ve ark. (2013)
	Jel filtrasyon kromatografisi	12	75	
	İyon değişim kromatografisi	6	75	
NRRL 1960	Amonyum sülfat çöktürme	6	58	Bu çalışma
	Hidrofobik kolon kromatografisi	34	40	
	Ultrafiltrasyon-konsantrasyon	256	10	

4.1.4. SDS Poliakrilamid Jel Elektroferez Görüntüleri

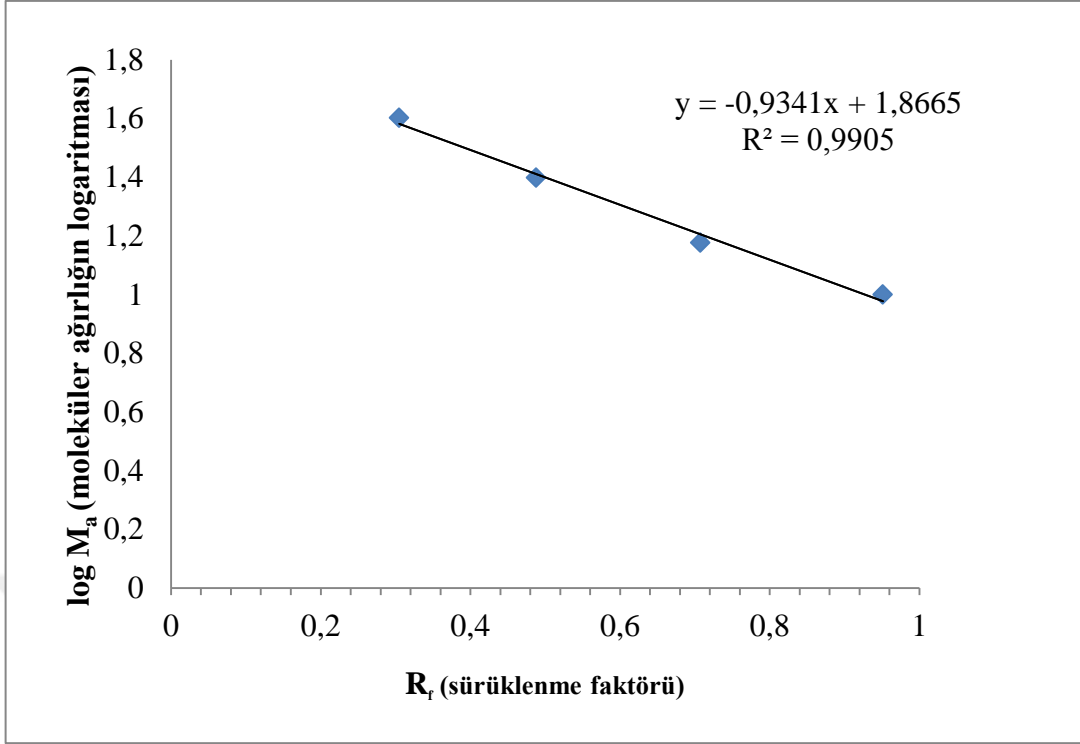
Yapılan saflaştırma işlemleri sonucu elde edilen enzim örneklerinin saflığının görüntülenmesi ve saf ksilanın molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla poliakrilamid jel elektroferezi yapılmıştır. Belirteç olarak molekül ağırlığı 1,7-40 kDa olan proteinler içeren, Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder (Termo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Yapılan jel elektroferez çalışmalarına ait görüntü Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Saf ksilanazın SDS-PAGE görüntüsü

Şekil 4.2’de verilen jel görüntüsü incelendiğinde, saf enzime ait belirgin tek bir bant gözlemlenmiştir. Böylece yapılan saflaştırma işleminin başarılı olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca jel görüntüleri doğrultusunda, moleküler ağırlığın logaritmasına karşı bağlı yürüme mesafesi (R_f) değerleri için çizilen grafik kullanılarak *A. terreus*’tan elde edilen saf ksilanaz enziminin moleküler ağırlığı yaklaşık 18 kDa olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). R_f değerinin hesaplanması ise Eşitlik 4.1’de verilmiştir.

$$R_f = \frac{\text{Örneğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün uygulama noktasından itibaren aldığı yol}} \quad (4.1)$$



Şekil 4.3. Saf ksilanazın moleküler ağırlığının tayini grafiği

Literatürde daha önce *Aspergillus terreus*'un ürettiği ksilanazlar ile yapılan moleküler ağırlık belirleme çalışmaları incelenmiştir. Moreira ve ark. (2013) tarafından yapılan çalışmada *Aspergillus terreus*'tan elde edilen iki farklı tür β -ksilanazın moleküler ağırlıkları SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmiş ve sırasıyla 24,3 ve 23,6 kDa olarak rapor edilmiştir. Yine ksilanaz enzimiyle yapılan başka bir saflaştırma çalışması sonucunda (Sorgatto ve ark., 2012) enzimin moleküler ağırlığı 23 kDa olarak bulunmuştur. Chidi ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada ksilanaz enziminin moleküler ağırlığı 22 kDa olarak belirlenmiştir. Çalışma grubumuz (2011) tarafından yapılan çalışmada ise hidrofobik etkileşimli kromatografi yöntemiyle saflaştırılan *Aspergillus terreus* ksilanazının moleküler ağırlığı 19 kDa olarak belirlenmiştir

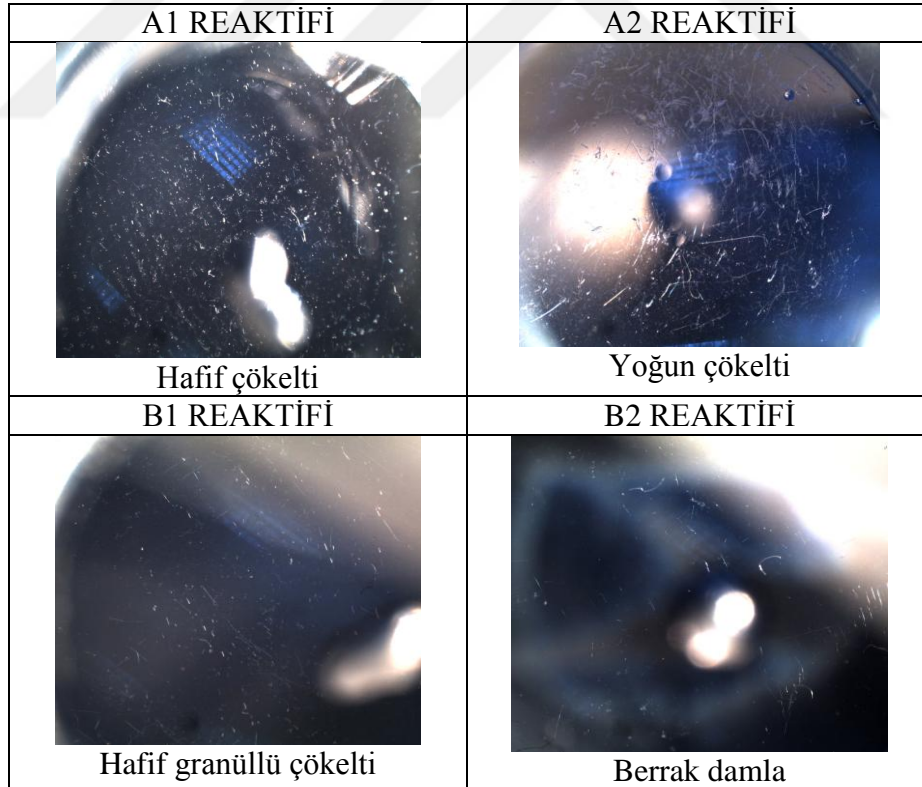
4.2. Ksilanazın Kristalizasyonu

Ksilanazın kristalizasyonu, tez çalışmasının ana hedefini oluşturmaktadır. Yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra elektroforezle saflığı kontrol edilen ve istenen konsantrasyona ayarlanan enzim, kristalizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

4.2.1. Ön Kristalizasyon Sonuçları

Bu aşamada Pre-Crystallization Test kiti (Hampton Research, ABD) kullanılmıştır. Kullanılan ön kristalizasyon test kiti, kullanılan protein konsantrasyonunun uygunluğunu kontrol eden, özel olarak formüle edilmiş ve steril olarak filtrelenmiş; A1, A2, B1 ve B2 olarak adlandırılmış 4 farklı reaktiften oluşmaktadır.

Çalışmalar asılı damla buhar difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak protein konsantrasyonu 0,5 ve 1 mg/mL olan enzim örnekleri kullanılmıştır. Örnekler öncelikle A1 ve A2 reaktifleriyle karıştırılmış ve plakalar 18°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyona başladıktan 24 saat sonra elde edilen damlacık görüntüleri Şekil 4.4’te verilmiştir. Her iki örnek için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak elde edilen saf enzim miktarı kısıtlı olduğundan, düşük olan konsantrasyonla (0,5 mg/mL) kristalizasyona devam edilmiştir.



Şekil 4.4. Ön kristalizasyon kitiyle 0,5 mg/mL konsantrasyona sahip enzim örneği ile oluşturulan damlacık görüntüleri

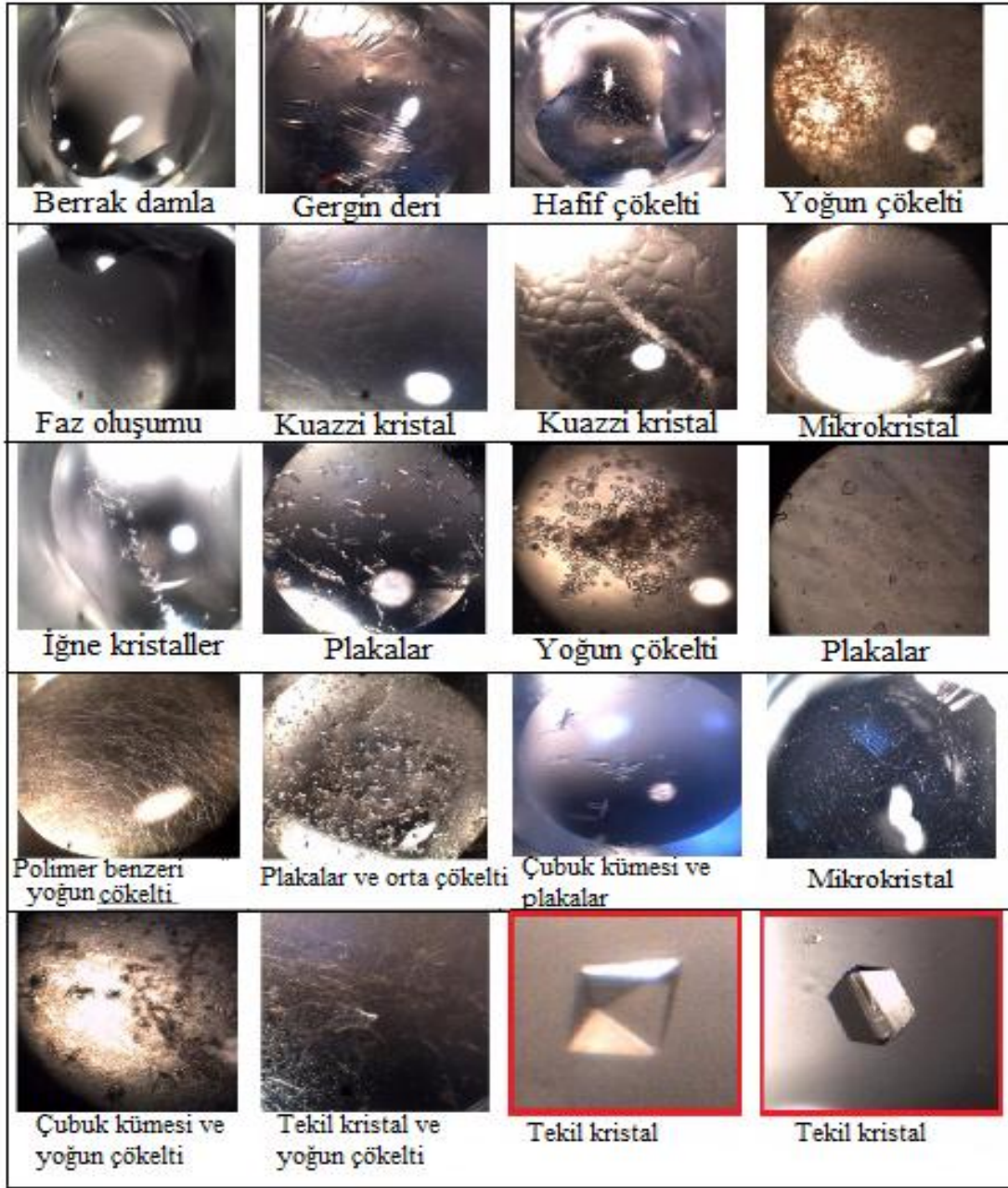
Bu görüntüler ön kristalizasyon kitinde bulunan önerilere bakılarak yorumlanmıştır. Protein konsantrasyonu tavsiye edilen değer olan 3 mg/mL'den düşük olduğu halde (0,5 mg/mL) A1 ve A2 reaktifi ile çökelti oluşturmuştur. Bu yüzden B1 ve B2 reaktifleriyle yeniden kristalizasyon yapılmıştır. B1 ile hafif granüle, B2 ile berrak damla gözlemlenmiştir. Test kitinde belirtilen öneriler ışığında, bu durumda kristal tarama işlemine konsantrasyon ya da seyreltme işlemi yapılmadan başlanabileceği görülmüştür. Böylece test edilen enzim örneğinin kristal tarama işlemi için uygun saflık ve konsantrasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Mevcut örnekle kristal oluşumu için uygun koşulların taranması işlemine geçilmiştir.

4.2.2. Kristal Oluşumu İçin Uygun Koşulların Taranması ile Elde Edilen Sonuçlar

Kristallerin üretimi için uygun başlangıç koşullarının belirlenmesi amacıyla tarama işlemi yapılmıştır. Bunun için ticari olarak temin edilen 4 farklı kristalizasyon kiti kullanılmıştır. Bunlar; Index HT, Crystal Screen, PEG Rx ve Salt Rx (Hampton Research, ABD) isimli kitlerdir. Her biri farklı bileşime sahip 96 çöktürme reaktifi içermektedir. Protein konsantrasyonu 0,5 mg/mL olan ve ön kristalizasyon işlemi sonucu tarama için uygun olduğu belirlenen enzim örnekleriyle tarama işlemine başlanmıştır. Tüm tarama işlemleri oturan damlacık buhar difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. Plakalar 18°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmış ve belli zaman aralıklarında mikroskopla gözlemlenmiştir. Şekil 4.5'te yapılan tarama işlemleri sonucunda elde edilen görüntüler ve sınıflandırılmalarına dair örnekler verilmiştir.

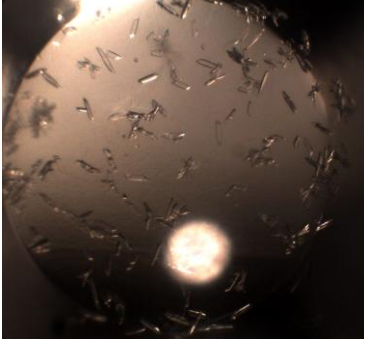
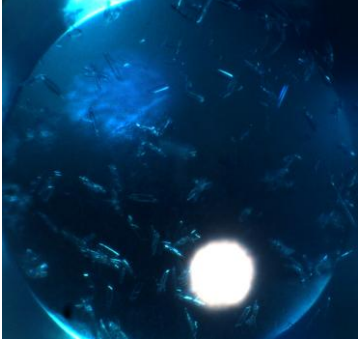
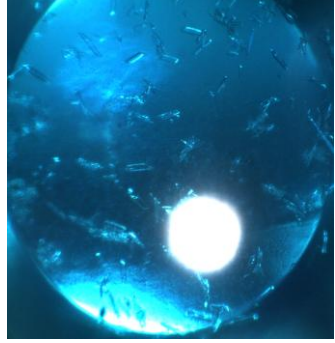
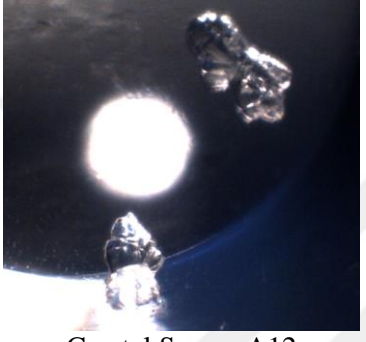
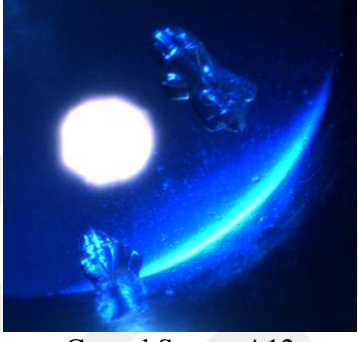
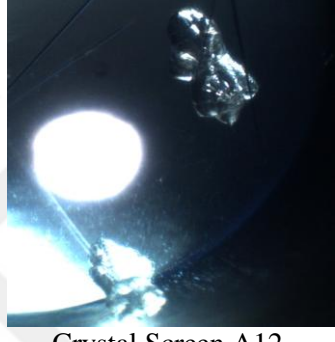


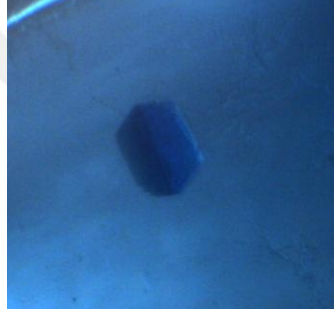

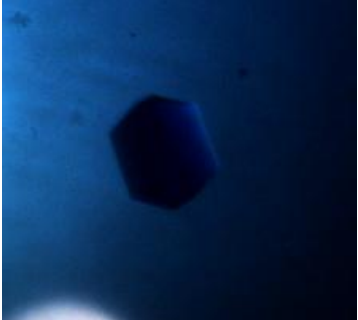
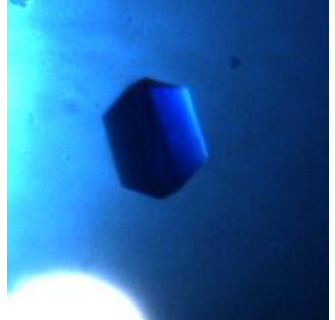
4.2.3. Kristallerin Protein Yapıda Olduğunun Gösterilmesi

Farklı kitlerle yapılan tarama işlemleri sonucunda protein kristali olabileceği tahmin edilen düzgün yapılı kristaller seçilmiştir. Bu kristallerin büyümesi takip edilerek boyutları ölçülmüştür. Büyümenin durduğu gözlemlendiğinde, kristallerin protein yapıda olup olmadıklarının anlaşılması için Izit (Hampton Research, ABD) boyama testi yapılmıştır.

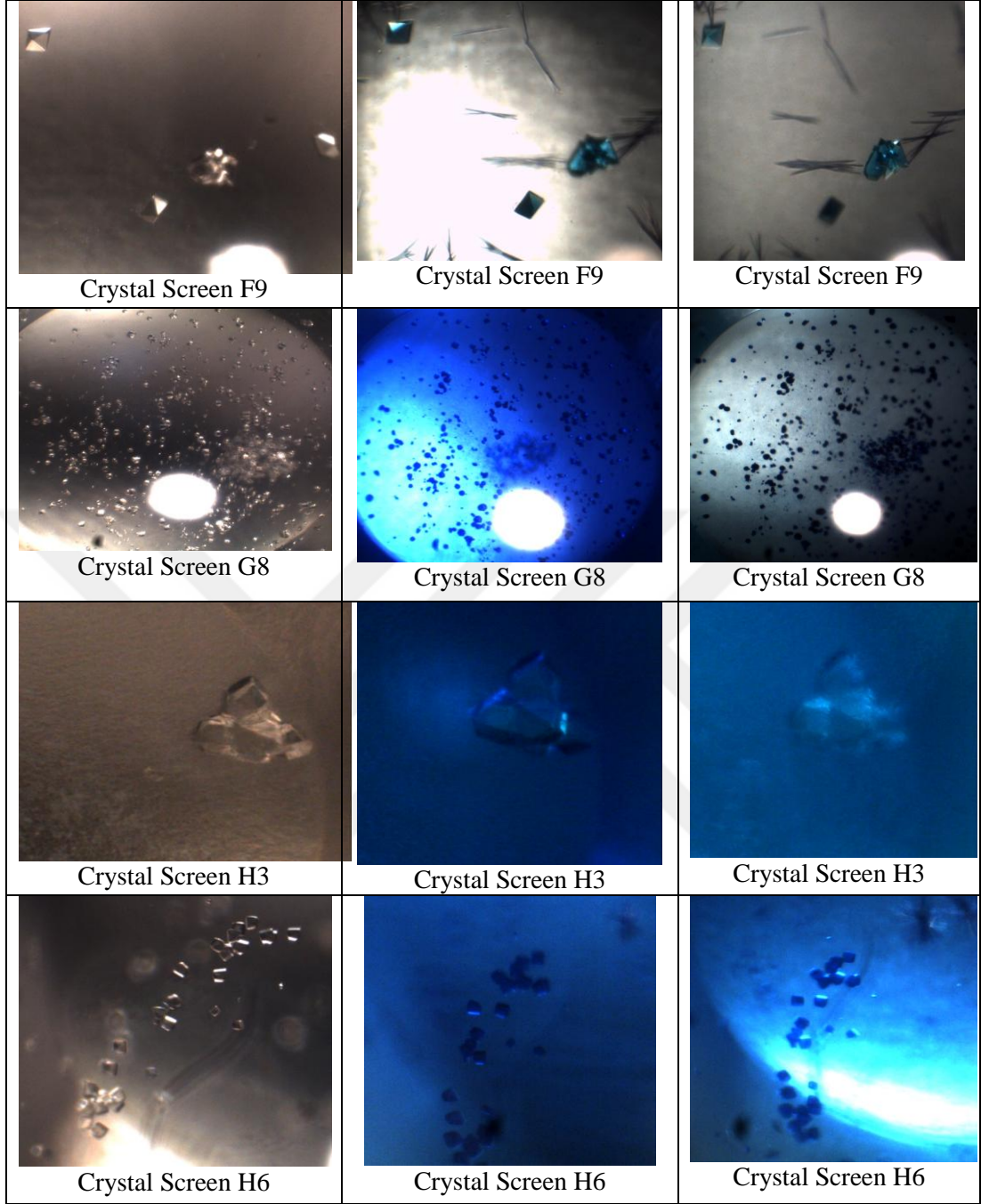


Şekil 4.5. Kristal oluşumu için uygun koşulların taranması sonucu elde edilen görüntülere ait örnekler

Şekil 4.6'da Izit boyama testi uygulanan kristallerin boyama öncesi ve sonrası görüntüleri verilmiştir Protein yapıda olan kristaller geniş solvent kanalları içerdiğinden boyayı absorblayarak kalıcı mavi renk almıştır. Böylece enzim kristalleri inorganik madde kristallerinden ayırt edilmiştir. Protein yapıda olup düzgün morfolojiye sahip olanlar ile optimizasyon aşamasına geçilmiştir. Bu koşullar; Crystal Screen H6, E8, F9 ve F4 koşullarıdır.

Izit boyama öncesi görüntü	Izit boyama sonrası (1 saat)	Izit boyama sonrası (24 saat)
 Crystal Screen A1	 Crystal Screen A1	 Crystal Screen A1
 Crystal Screen A12	 Crystal Screen A12	 Crystal Screen A12
 Crystal Screen E8	 Crystal Screen E8	 Crystal Screen E8
 Crystal Screen F4	 Crystal Screen F4	 Crystal Screen F4

Şekil 4.6. Izit testi öncesi ve sonrası gözlemlenen görüntüler




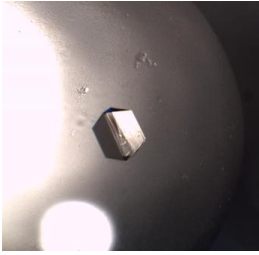


Şekil 4.6. (devam) Izit testi öncesi ve sonrası gözlemlenen görüntüler

4.2.4. Kristalizasyon Koşullarının Optimizasyonu ile Elde Edilen Sonuçlar

Izit boyama testinden pozitif sonuç alınan ve hepsi Crystal Screen kitine ait olan 4 koşul için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışılan koşullar, elde edilen kristallere ait görüntüler ve kristallerin büyüklükleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Kristal tarama işlemleri sonucu optimizasyon için seçilen kristaller ve bu kristallere ait başlangıç koşulları

Koşul adı	Kristal görüntüsü	Koşul	Gözlem günü
Crystal Screen H6		Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Enzim konsantrasyonu: 0,5 mg/mL İnkübasyon sıcaklığı: 18°C Kristal büyüklüğü: 35 µm	26
Crystal Screen E8		Reaktif içeriği: 1,5 M sodyum klorür 10% (h/h) etanol Enzim konsantrasyonu: 0,6 mg/mL İnkübasyon sıcaklığı: 18°C Kristal büyüklüğü: 140 µm	45
Crystal Screen F9		Reaktif içeriği: 0,1 M sodyum fosfat monobazik monohidrat 0,1 M potasyum fosfat monobazik 0,1 M MES monohidrat pH 6,5 2,0 M sodyum klorür Enzim konsantrasyonu: 0,5 mg/mL, İnkübasyon sıcaklığı: 18°C Kristal büyüklüğü: 80 µm	38
Crystal Screen F4		Reaktif içeriği: 0,5 M sodyum klorür 0,1 M sodyum sitrat tribazik dihidrat pH 5,6 2% (h/h) etilen imin polimer Enzim konsantrasyonu: 0,5 mg/mL İnkübasyon sıcaklığı: 18°C Kristal büyüklüğü: 180 µm	65

Uygun başlangıç koşulları tarama işlemiyle belirlendikten ve Izit testinden pozitif sonuç alındıktan sonra bu koşullar geniş bir aralıkta değiştirilerek optimizasyon plakaları oluşturulmuştur. Plakalar oluşturulurken, oturan damla buhar difüzyonu ve asılı damla buhar difüzyonu olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Enzim konsantrasyonu, 0,3-1,0 mg/mL aralığında değiştirilmiştir. Reaktiflerin içerdiği bileşen konsantrasyonları, bileşenlerin pH'sı, enzim/reaktif karışım oranları, inkübasyon

sıcaklığı ve kristalizasyon yöntemi değiştirilerek farklı optimizasyon plakaları oluşturulmuştur. Bu plakaların optimizasyon aralıkları Çizelge 4.5'te açıklanmıştır.

Yapılan optimizasyon işlemi sonucunda, üç boyutlu yapı analizi için uygun büyüklükte ve kalitede kristaller elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 68 adet 24 kuyucuklu optimizasyon plakası oluşturulmuştur. Ek 8'de örnek bir optimizasyon plakasının içeriği verilmiştir.

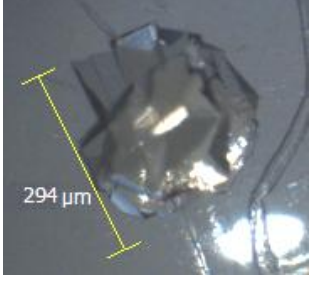
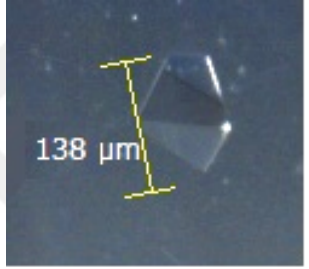

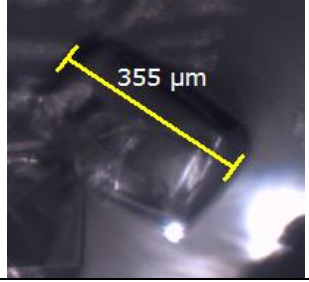

Optimizasyon plakaları oluşturulup inkübasyona bırakıldıktan sonra ilk hafta her gün 2. haftadan itibaren haftada 3 kez mikroskopla gözlemlenmiştir. Gözlem sonucu düzgün yapıda olduğu belirlenen kristallerin oluştuğu koşullar belirlenmiştir. Bu koşullar aynen tekrarlanmış ve bunun yanı sıra bu koşullarda küçük ölçekli değişiklikler yapılarak (reaktif konsantrasyonu, pH, enzim konsantrasyonu, protein/reaktif karışım oranı), kristal oluşumunun tekrarlanması ve kristallerin kristalografi için optimize edilmesi sağlanmıştır. Kristalografi için uygun bir kristalin tüm boyutlarının 0,1 mm'den uzun olması ve yüksek düzeyde moleküler bir dizilime sahip olması gerekmektedir. Ayrıca düzgün ve simetrik bir geometrik yapıda olması da üç boyutlu yapı analiz sonucunda elde edilen görüntünün kalitesini artırmaktadır (Whitford, 2005).

Her hafta önceden oluşturulmuş plakalardan elde edilen sonuçlara bakılarak optimizasyon işlemine yön verilmiştir. Optimize edilen 4 koşuldaki ikisinde (Crystal Screen E8 ve H6) istenen özellikte kristaller elde edilmiştir. Crystal Screen F4 ve F9'dan ise tekrarlanabilir sonuç elde edilememiştir. Çizelge 4.6'da optimizasyon plakalarının gözlenmesi sonucu elde edilen kristal görüntüleri ve ilgili koşullar verilmiştir.

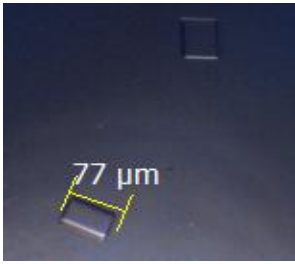
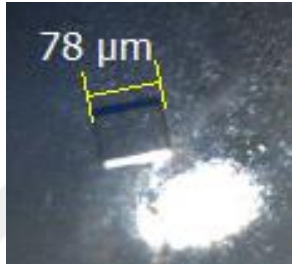
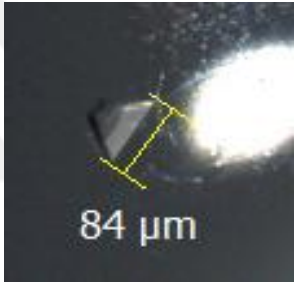
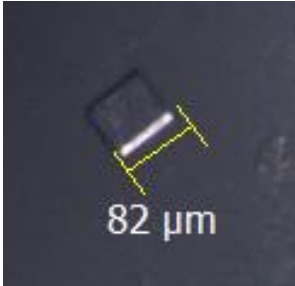
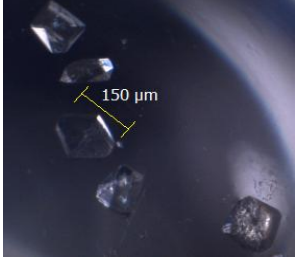
Çizelge 4.5. Optimizasyon denemelerine ait çalışma aralıkları.

Koşul Adı	Orijinal Koşul İçeriği	Bileşen Konsantrasyon Aralığı	Sıcaklık (°C)	Protein-Reaktif Karışım Oranı (µL: µL)
Crystal Screen H6	1,5 M amonyum sülfat, 0,1 M Tris (pH 8,5), %12 (h/h) gliserol	1,3-1,7 M amonyum sülfat 0,04-0,14M Tris (pH 8,3-8,7) %10-14 (h/h) gliserol	18 25	1:1 1:1,5 1,5:1
Crystal Screen E8	1,5 M NaCl, %10(h/h) etanol.	1,3-1,7 M NaCl %8-12 (h/h) etanol	18 25	1:1 1:1,5 1,5:1
Crystal Screen F9	0,1 M sodyum fosfat monobazik, 0,1 M MES monohidrat (pH 6,5), 2 M NaCl.	0,04-0,14 M sodyum fosfat monobazik 0,04-0,14 M MES monohidrat(pH 6,3-6,7) 1,4-2,4 M NaCl	18 25	1:1 1:1,5 1,5:1
Crystal Screen F4	0,5 M NaCl, 0,1 M sodyum sitrat tribazik dihidrat (pH 5,6), %2 (h/h) polietilenimin.	0,48-0,52 M NaCl 0,08-0,12 M sodyum sitrat tribazik dihidrat (pH 5,4-5,8) %2 (h/h) polietilenimin	18 25	1:1 1:1,5 1,5:1

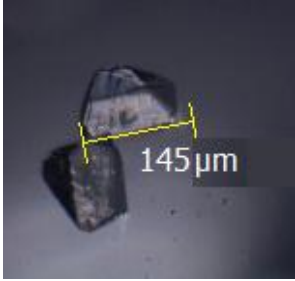
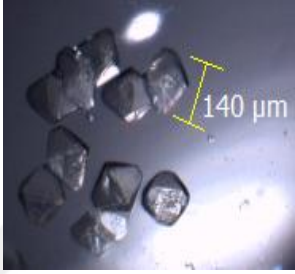
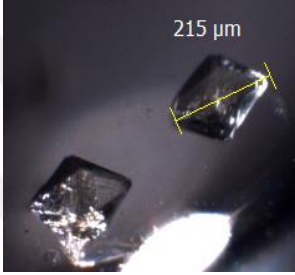

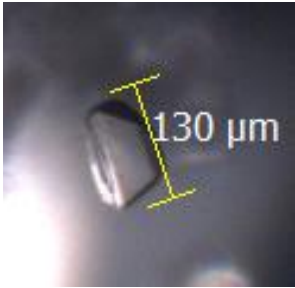
Çizelge 4.6. Optimizasyon işlemleri sonucu elde edilen kristaller

Orijinal Koşul Adı	Reaktif içeriği/ Karışım oranı	Enzim konsantrasyonu (mg/mL)	Gözlem günü	Görüntü
Crystal Screen E8	Reaktif içeriği: 1,5 M NaCl %10 (h/h) etanol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,5	10	
Crystal Screen E8	Reaktif içeriği: 1,5 M NaCl %10 (h/h) etanol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,5	10	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris pH 8,5 %12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	25	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris pH 8,5 %12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,3	53	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris pH 8,5 %12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1,5 µL protein	0,5	22	

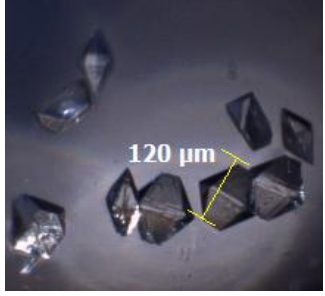
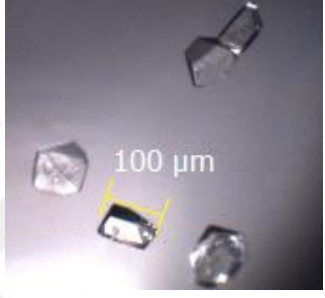

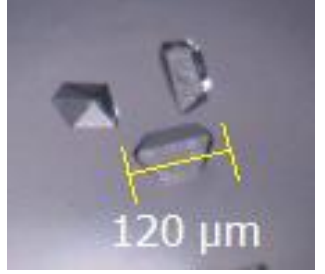
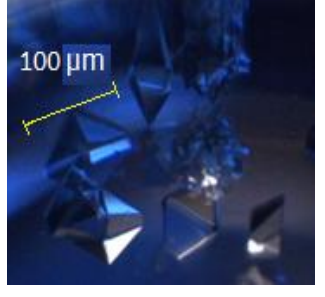
Çizelge 4.6. (devam) Optimizasyon işlemleri sonucu elde edilen kristaller

Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris pH 8,5 %12 h/h gliserol Karışım oranı: 1 μ L reaktif: 1,5 μ L protein	0,5	23	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1M Tris pH 8,5 %12 h/h gliserol Karışım oranı: 1,5 μ L reaktif: 1 μ L protein	0,5	25	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris pH 8,5 %12 h/h gliserol Karışım oranı: 1,5 μ L reaktif: 1 μ L protein	0,5	37	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris pH 8,5 %12 h/h gliserol Karışım oranı: 1 μ L reaktif: 1,5 μ L protein	0,4	23	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) %12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 μ L reaktif: 1 μ L protein	0,6	8	

Çizelge 4.6. (devam) Optimizasyon işlemleri sonucu elde edilen kristaller

Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	19	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	18	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	13	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	21	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	21	

Çizelge 4.6. (devam) Optimizasyon işlemleri sonucu elde edilen kristaller

Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	26	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	25	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	20	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	24	
Crystal Screen H6	Reaktif içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 µL reaktif: 1 µL protein	0,6	17	

Optimizasyon görüntüleri düzenli olarak gözlemlenirken, düzgün olarak nitelendirilebilecek üç boyutlu yapıdaki kristallerin oluştuğu koşullar birebir ve çeşitli varyasyonlar yapılarak tekrarlanmıştır. Tekrarlanan plakalardan bazılarında yeniden kristal oluşumu gözlenemezken bazılarında tekrarlanabilirlik sağlanmıştır. Optimizasyon esnasında ilk üç boyutlu kristaller, Crystal Screen E8 reaktifinin birebir laboratuvarda hazırlanmasıyla elde edilen reaktifle oluşturulan optimizasyon plakasında inkübasyonun 10. gününde gözlemlenmiştir. Sonraki haftalarda elde edilen saf enzimlerle Crystal Screen E8, H6, F4 ve F9 (optimizasyon için uygun bulunan kristallerin geliştiği koşullar) koşulları laboratuvar koşullarında hazırlanarak, Çizelge 4.5’de verilen varyasyonlar doğrultusunda optimizasyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen olumlu sonuçlara göre optimizasyon koşullarına yön verilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu Crystal Screen F4 ve F9 kiti için bir sonuç bulunamazken, en yüksek tekrarlanabilirlik ve kristalografye en uygun yapılar Crystal Screen H6 kitinden elde edilmiştir.

Başarılı bir yapı çözümü süreci için, difraksiyon kalitesinde, yani tekrarlanabilir şekilde üretimi yapılabilen, tüm kristal eksenlerinde düzenli şekilde dizilime sahip ve en az 3,5 Å çözünürlüğünde difraksiyon yapabilen kristaller üretilmelidir (Gorrec, 2014). Çalışmamız sonucunda, 1,5 M amonyum sülfat, 0,1 M Tris (pH 8,5) ve %12 (h/h) gliserol içeren kristalizasyon koşulunda tekrarlanabilir şekilde, ortalama 100-200 µm boyutlarında ve kristalin 3 ekseninde de orantılı bir dağılıma sahip geometride kristaller üretilmiştir. Bir sonraki aşama elde edilen kristallerin difraksiyon testlerinin yapılması olup, bu çalışmaların bir başka proje kapsamında gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.




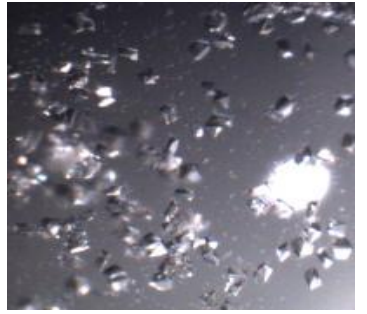
Literatürde *A. terreus* ksilanazının kristalografisi çalışmalarına dair bir bulguya rastlanmamıştır. Protein Veri Bankası (PDB) incelendiğinde, *A. terreus*’a ait 30 adet veri girişi yapıldığı görülmektedir. Liyazlar grubunda 11, transferazlar grubunda 10, hidrolazlar grubunda 6 ve oksidoredüktazlar grubunda 3 adet veri girişi bulunmaktadır. Ksilanazın ait olduğu hidrolazlar grubundaki 6 verinin tümü blastisidin-S-deaminaz enzimine ait olup, *A. terreus* ksilanazı ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu açıdan, proje sonucunda elde edilen kristalografisi koşulları literatüre katkı sağlayacak ve X-ışını difraksiyon çalışmaları için bir başlangıç noktası oluşturacaktır.

4.2.5. Tohumlama Tekniği ile Elde Edilen Sonuçlar

Optimizasyon aşamasında gözlemlenmiş düzgün yapıya sahip kristaller tohumlama işlemi için kaynak olarak seçilmiştir. Bu kristaller fiber aparatla parçalanmış ve elde edilen parçacıklar 1 μ L protein rneği ve 1 μ L ktrme reaktifile oluşturulan damla içerisine aktarılmıştır. Kristaller damlacıklar içerisine bir çizgi halinde taşınmıştır.

Tohumlama plakaları oluşturulurken, optimizasyon plakalarındaki gibi asılı damla buhar difüzyonu yöntemi kullanılmıştır. Oluşturulan plakalar gün aşırı gözlemlenmiştir. Gözlemler sonucu elde edilen görüntüler ve kristallerin oluşum koşulları izelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Tohumlama sonucu gözlemlenen görüntüler

Tohumlama kaynağı kuyu/ Orijinal koşul	Koşul içeriği/ Karışım oranı	Enzim konsan- trasyonu (mg/mL)	Görüntü
N17-D3 (Crystal screen E8) 	Koşul içeriği: 1,5 M NaCl % 10 (h/h) etanol Karışım oranı: 1 μ L reaktif: 1 μ L protein	0,6	
N55-B6 (Crystal screen H6) 	Koşul içeriği: 1,5 M amonyum sülfat 0,1 M Tris (pH 8,5) % 12 (h/h) gliserol Karışım oranı: 1 μ L reaktif: 1 μ L protein	0,6	

Tohumlama işlemi, kristalin çekirdeklenme fazını atlayarak doğrudan büyüme aşamasına geçilmesi ve bu sayede daha düzgün yapıda ve büyük kristaller elde edilmesini hedeflemektedir (Ducruix ve Giegé, 1992). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, damlacığa aktarılan tohumların mikrokristaller şeklinde geliştiği görülmüştür. Dolayısıyla, elde edilen sonucun ana kristale kıyasla herhangi bir avantajının olmadığı tespit edilmesi nedeniyle, tohumlama işlemi sonlandırılmıştır.

4.3. Enzimatik Teknikle Ksilanın Hidrolizi Sonuçları

4.3.1. Hemiselüloz Özütleme Sonuçları

Lignoselülozik kaynaklar olan mısır koçanı ve buğday kepeğinin özütlenmesi sonucu farklı verimlerde hemiselüloz elde edilmiştir. Elde edilen hemiselüloz miktarının işlem gören biyokütle miktarına oranı mısır koçanında %32 (a/a) buğday kepeğinde ise %14,4 (a/a) olarak bulunmuştur. Bu oran özütlenme verimi olarak adlandırılmaktadır. Literatürde daha önce rapor edilen ksilan özütlenme çalışmaları incelenmiştir. Yang ve ark. (2009) mısır koçanını seyreltik H₂SO₄ çözeltisi içerisinde 24 saat 50°C sıcaklıkta muamele etmiş, sonrasında su buharı uygulaması yapmıştır. Bu işlemler sonucu özütlenme verimini %29,1 olarak rapor etmişlerdir. Mikhopadhyay ve ark. (2013) tarafından buğday kepeği ve mısır koçanı kaynaklarından alkali özütlenme işlemi yapılmıştır. Lignoselülozik kaynaklar %10 NaOH (a/h) içerisinde 60°C sıcaklıkta 24 saat sabit hızda karıştırılmış, sonrasında 3 saat boyunca 100°C buhar uygulanmıştır. İşlemler sonucu mısır koçanı ve buğday kepeği özütlenme verimi sırasıyla; %40 ve %42 olarak hesaplanmıştır (Mukhopadhyay ve ark., 2013).

Daha önceden buğday kepeğiyle yapılan bir alkali özütlenme çalışmasında (1% (a/h) NaBH₄ içeren 24% KOH) ise ksilanın kuru ağırlığının, toplam atık materyale oranı %20,6 (a/a) olarak bulunmuştur (Akpınar ve ark., 2009). Grubumuz tarafından daha önce yapılan bir çalışmada ise buğday kepeği ve mısır koçanı hemiselüloz özütlenmesi %24 (a/h)'lük KOH çözeltisi kullanılarak yapılmıştır (24 saat, oda sıcaklığı). Ksilan özütlenme verimi mısır koçanı ve buğday kepeği için sırasıyla; %30,7 ve %26,6 olarak tespit edilmiştir (Kocabaş ve Özben, 2014). Literatürdeki çalışmalara bakıldığında buğday kepeği ve mısır koçanı ile yapılan hemiselüloz özütlenme çalışmaları sonucu

farklı oranlarda özütlenme verimine ulaşıldığı görülmektedir. Bunun sebeplerinden biri kullanılan lignoselülozik materyallerin farklı olmasıdır. Bunun yanı sıra özütlenme yapılırken kullanılan yöntemlerin farklılığı da bu orandaki değişimde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin buharla ön işlemden geçirilmiş bir biyokütlenin hemiselüloz özütlenmesi, ön işlemsiz yapılan özütlemeye göre daha yüksek verimle gerçekleşmektedir. Ayrıca kullanılan alkali çözeltinin konsantrasyonu (%24'lük KOH, %10 NaOH gibi), işlemin uygulanma sıcaklığı gibi parametreler de sonuçlar arasında farklılığa neden olabilmektedir (Yang ve ark., 2009, Kocabaş ve Özben, 2014).

4.3.2. Enzimatik Hidroliz Performansının Belirlenmesi

Mısır koçanı, buğday kepeği ve ticari ksilan kaynaklarına enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Belli zaman aralıklarında alınan örneklerin indirgen şeker konsantrasyonları DNS yöntemi ile belirlenerek hidroliz performansı ölçülmüştür (Miller, 1959). Çizelge 4.8'de mısır koçanına ve Çizelge 4.9'da buğday kepeğine doğrudan ve hemiselüloz özütlenmesi sonrasında uygulanan enzimatik hidroliz sonucu elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu değerleri verilmiştir. Çizelge 4.10'da ise ticari ksilana uygulanan hidroliz sonucu elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.8. Mısır koçanının enzimatik hidrolizi sonucu oluşan indirgen şeker miktarı

Örnek alma zamanı (saat)	HAM ENZİM		SAF ENZİM	
	İndirgen şeker konsantrasyonu (µg/mL)		İndirgen şeker konsantrasyonu (µg/mL)	
	Doğrudan hidroliz	Hemiselüloz hidrolizi	Doğrudan hidroliz	Hemiselüloz hidrolizi
0	758,0	379,0	427,2	255,8
2	1391,5	680,4	1107,6	271,9
4	1761,2	2172,3	1254,9	1194,6
6	2043,8	2385,3	1414,3	1459,8

Çizelge 4.9. Buğday kepeğinin enzimatik hidrolizi sonucu oluşan indirgen şeker miktarı

Örnek alma zamanı (saat)	HAM ENZİM		SAF ENZİM	
	İndirgen şeker konsantrasyonu (µg/mL)		İndirgen şeker konsantrasyonu (µg/mL)	
	Doğrudan hidroliz	Hemiselüloz hidrolizi	Doğrudan hidroliz	Hemiselüloz hidrolizi
0	526,3	313,4	248,6	249,1
2	1537,5	624,1	742,1	412,5
4	1616,5	2355,8	600,0	1165,2
6	2540,6	2426,8	545,0	1228,1

Çizelge 4.10. Ticari ksılanın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan indirgen şeker miktarı

Örnek alma zamanı (saat)	İndirgen şeker konsantrasyonu (µg/mL)	
	Ham enzim	Saf enzim
0	293,6	703,6
2	1452,9	1578,6
4	3872,1	3187,5
6	4150,7	3432,1

Çizelgelerdeki sonuçlar incelendiğinde, indirgen şeker konsantrasyonunun (buğday kepeğine doğrudan enzim uygulanması haricinde) reaksiyon süresince arttığı görülmektedir. Buradan anlaşıldığı üzere ksılanaz enzimi, ham ve saflaştırılmış formda, reaksiyon koşulları olan 40°C sıcaklıkta 6 saat boyunca aktivitesini koruyabilmektedir. Ayrıca ham enzimlerle yapılan hidroliz işlemleri sonucunda, saf enzim hidrolizlerine kıyasla daha yüksek konsantrasyonda indirgen şeker elde edilmiştir. Örneğin, mısır koçanı özütlemeye yapılmadan doğal formda doğrudan ham enzimle 6 saat hidroliz edildiğinde 2043,8 µg/mL indirgen şeker elde edilirken, aynı işlem saf enzimle yapıldığında ulaşılan indirgen şeker konsantrasyon değeri 1414,3 µg/mL'dir. Bunun sebebi ham enzim içerisinde lignoselülozik materyallerin hidrolize edilmesini sağlayan ksılanolitik sisteme ait enzimlerin bir arada bulunuyor olmasıdır. Lignoselülozik yapıda bulunan lignin ve selüloz gibi yapılar ham enzim içerisinde bulunan diğer enzimler sayesinde parçalanmaktadır. Böylece ksılan tabakasına ulaşılması daha kolay hale

gelmektedir. Bu yüzden aynı ksilanaz aktivitesine sahip ham enzim ve saf enzim kullanılsa bile, ham enzimle yapılan hidroliz performansı daha yüksek olmaktadır.

Ticari ksilan ise özütlenmiş ve kullanıma hazır şekilde satın alınmış ve hem ham enzimle hem de saf enzimle hidroliz edilmiştir. Ticari ksilan kullanıldığında da ham enzimle daha yüksek indirgen şeker üretildiği gözlenmiştir. Bunun nedeni, ham enzim solüsyonu içerisinde sinerjik çalışan ksilanaz grubu enzimlerinin bulunması olabilir. Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi, 2 saatlik hidroliz sonucunda saf enzimle elde edilen indirgen şeker konsantrasyonu yüksekken, hidroliz süresi uzadıkça ham enzimle elde edilen indirgen şeker miktarı öne geçmiştir. Bu durumda, 2 saatten sonra saf enzimin 40°C sıcaklıkta aktivitesini ham enzim solüsyonu kadar koruyamadığı ve aktivite kaybı yaşadığı da düşünülebilir.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *A. terreus* kullanılarak elde edilen ksilanaz enziminin öncelikle hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi yöntemiyle saflaştırılması ve ardından X-ışını difraksiyonu yöntemiyle üç boyutlu yapı analizinde kullanılmak üzere kristalizasyonu amaçlanmıştır. Çalışma sonunda ulaşılan sonuçlar ve ileri çalışmalar için tavsiyeler aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- Endüstriyel ve tarımsal bir atık olan mısır koçanı karbon kaynağı olarak kullanılarak *A. terreus* ile ksilanaz üretimi fermantasyon yöntemiyle laboratuvar koşullarında gerçekleştirilmiştir. Böylece, atık olarak görülen mısır koçanının yeniden kullanımı sağlanmıştır. Ayrıca geniş endüstriyel kullanım alanına sahip olan ksilanaz enzimi için ucuz ve alternatif bir üretim yöntemi önerilmiştir.
- Fermantasyon sonucu elde edilen ham enzim amonyum sülfat çöktürme, hidrofobik etkileşimli kolon kromatografisi ve ultrafiltrasyon yöntemleri kullanılarak %10 verimle 256 kat saflaştırılmıştır. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu saflıktaki bir enzimin kristalizasyon çalışmalarında olumlu sonuç verdiği gözlemlenmiştir.
- Saflaştırılan enzimin saflığı SDS-PAGE yöntemiyle belirlenmiş, sonuç olarak belirgin tek bir bant gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra üretilen ksilanaz enziminin molekül ağırlığı 18 kDa olarak belirlenmiştir.
- Saf ksilanaz enzimi için başlangıç kristalizasyon koşulları 4 farklı ticari kit kullanılarak taranmış ve sonrasında optimizasyon çalışması yapılmıştır. Sonuç olarak 1,5 M amonyum sülfat, 0,1 M Tris (pH 8,5), %12 (h/h) gliserol içeren çöktürme reaktifi kullanılarak 18°C sıcaklıkta, asılı damla buhar difüzyonu tekniğiyle istenen boyutta ve düzgün yapıda kristaller tekrarlanabilir bir şekilde üretilmiştir.
- *A. terreus*'dan elde edilen ksilanaz için literatürde daha önceden yapılmış üç boyutlu yapı analizi ve kristalizasyon çalışması bulunmamaktadır. Bu çalışmada

üç boyutlu yapı analizi için önemli bir basamak olan kristal üretimi tekrarlanabilir şekilde gerçekleştirilmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda üretilen kristallerle üç boyutlu yapı analizi yapılması mümkün olacaktır.

- Elde edilen ksilanaz enziminin farklı lignoselülozik materyaller üzerindeki hidroliz performansı belirlenmiştir. Mısır koçanı ve buğday kepeği lignoselülozik kaynak olarak seçilmiş, ek olarak ticari ksilan da hidrolize edilmiştir. Yapılan enzimatik hidrolizler sonucu yüksek konsantrasyonda indirgen şeker elde edilmiş ve böylece üretilen enzimin tüm kaynaklar üzerinde hidrolitik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Yüksek hidrolitik potansiyeli nedeniyle, *Aspergillus terreus* ksilanazının diğer tarımsal atıklar için de incelenebileceği, böylece atık değerlendirme konusunda yeni uygulama imkanları geliştirilebileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, Z., Ahmad, A. ve Khalid, N., 2013. Xylanolytic Modification in Wheat Flour and its Effect on Dough Rheological Characteristics and Bread Quality Attributes. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 56, 723–729.
- Akpınar, Ö., Erdogan, K. ve Bostancı, Ş., 2009. Production of Xylooligosaccharides by Controlled Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. *Carbohydrate Research*, 344, 660–666.
- Amir, A., Arif, M. ve Pande, V., 2013. Purification and Characterization of Xylanase from *Aspergillus fumigatus* Isolated from Soil. *African Journal of Biotechnology*, 12 (20), 3049-3057.
- Anonim, 2005. Methods of Protein Crystallization. University of Cambridge. <http://www-structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Crystals/Theory/methods.html>-(Erişim tarihi:16.08.2016).
- Anonim, 2007. Introduction to Crystallography. University of Liverpool. <http://www.materials.ac.uk/elearning/matter/crystallography/3dcrystallography/7crystalsystems.html>-(Erişim tarihi:16.08.2016).
- Anonim, 2014. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. BCC Research, <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>-(Erişim tarihi:16.08.2016).
- Anonim, 2016a. An Information Portal to Biological Macromolecular Structure. ProteinDataBank. <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?qrid=66AEAEF2&tabtoshow=Current>-(Erişim tarihi:24.07.2016).
- Anonim, 2016b. Enzim Saflaştırma. <http://w3.balikesir.edu.tr/~osinan/enzimsaf.html>-(Erişim tarihi:15.10.2015).
- Anonim, 2016c. Pre-Crystallization Test. Hampton Research. https://www.hamptonresearch.com/product_detail.aspx?cid=1&sid=29&pid=10-(Erişim tarihi:16.08.2016).
- Arabatzis, M. ve Velegraki, A., 2013. Sexual Reproduction in the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus terreus*. *Mycologia*, 105 (1), 71–79.
- Ayeni, A.O., Adeeyo1, O.A., Oresgun, O.M. ve Oladimeji, T.E., 2015. Compositional Analysis of Lignocellulosic Materials: Evaluation of an Economically Viable Method Suitable for Woody and Non-woody Biomass. *American Journal of Engineering Research*, 4 (4), 14-19.
- Baca, M., Vos, J.D., Bruylant, G., Bartik, K., Liu, X., Cook, K. ve Eeltink, S., 2016. A

- Comprehensive Study to Protein Retention in Hydrophobic Interaction Chromatography. *Journal of Chromatography B*, S1570-0232(16)30317-8.
- Bailey, M.J., Biely, P. ve Poutanen K., 1992. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto, G.J. ve Stryer, L., 2012. Biochemistry. W. H. Freeman and Company, Houndmills, 1080 p, İngiltere.
- Blattmann, B. ve Sticher, P., 2009. Growing Crystals from Protein. *Science in School*, 11, 30-36.
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bragg, W. L. ve Bragg, W. H., 1913. The Reflection of X-rays by Crystals. *Proceeding of the Philosophical Society*, 17 (1), 43.
- Bridgewater, A.V., 1999. Principles and Practises of Biomass Fast Pyrolysis Processes for Liquids. *Journal of Analytical And Applied Pyrolysis*, 51, 3-22.
- Brock T.D., Madigan, M.T. ve Martinko, J.M., 2006. Brock Biology of Microorganisms. *Pearson Prentice Hall*, 1056 p, ABD.
- Burzlaff, H. ve Zimmermann, H., 2006. Bases, Bravais Lattices and Other Classifications. International Tables for Crystallography, Hahn, T., *Springer*, Hollanda, 742-749.
- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P. ve Eurwilaichitr, L., 2006. Cloning, Expression, and Characterization of a Xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 46, 143-149.
- Chayen, N.E., 2004. Turning Protein Crystallisation from an Art into a Science. *Current Opinion in Structural Biology*, 14, 577-583.
- Chen, W.P., Matsuo, M. ve Yasui, T., 1986. Purification and Some Properties of β -1,3 Xylanase from *Aspergillus terreus* A-07. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50 (5), 1183- 1194.
- Chen, H., 2014. Biotechnology of Lignocellulose Theory and Practise. *Chemical Industry Press*, 25-69, Pekin, Çin.
- Cheryan, M., 1998. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. *CRC Press*, 552 p, ABD.
- Chidi, S.B., Godana, B., Ncube, I., Rensburg, E.J.V., Cronshaw, A. ve Abotsi, E.K.,

2008. Production, Purification and Characterization of Celullase-free Xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. *African Journal of Biotechnology*, 7 (21), 3939-3948.
- Collins, T., Gerday, C. ve Feller, G., 2005. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1), 3-23.
- Çam, M. ve Hışıl, Y., 2008. Kromatografi Tarihi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2, 19-27.
- Dennison, C., 2010. Protein Saflaştırma Rehberi. *Aktif yayınevi*, 196 s, Ankara.
- Dhiman, S.S., Sharma, J. ve Balton B., 2008. Industrial Applications and Future Prospects of Microbial Xylanases: A Review. *BioResources*, 3 (4), 1377-1402.
- Drenth, J., 1999. Principles of Protein X-Ray Crsytallography. *Springer*, 304 p, New York, ABD.
- Ducruix, A. ve Giegé, R., 1992. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, 1st Ed., *Oxford University Press*, 464 p, New York, USA.
- Ebringerová, A., 2005. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*, 232(1), 1-12.
- Errson, B., Ryden, L. ve Janson, J.C., 2012. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications. *John Wiley & Sons*, 532 p, ABD.
- Fujimoto, H., Ooi, T., Wang, S., Takizawa, T., Hidaka, H., Murao, S. ve Arai, M., 1995. Purification and Properties of Three Xylanases from *Aspergillus aculeatus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59 (3), 538-540.
- Gandhi,K., Kumar, A., Gosewade, S., Kaushik, R. ve Lal,D., 2013. X-Ray Crystallography and Its Applications in Dairy Science: A Review. *Research and Reviews: Journal of Dairy Science and Technology* , 2 (1), 2319-3409.
- Gavira, J.A., 2016. Current Trends in Protein Crystallization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 602, 3-11.
- Geweely, N.S., 2011. Purification and Characterization of Acido-Thermophilic Xylanase from *Aspergillus terrus*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5 (10), 214-219.
- Ghanem, N.B., Yusef, H.H. ve Mahrouse, H.K., 2000. Production of *Aspergillus terreus* Xylanase in Solid-State Cultures: Application of the Plackett-Burman Experimental Design to Evaluate Nutritional Requirements. *Bioresource Technology*,73, 113-121.
- Ghareib, M. ve Dein M.M.N.E., 1992. Purification and General Properties of Xylanase from *Aspergillus terreus*. *Zentralblatt fur Mikrobiologie*, 147, 569-576.

- Gorrec F. 2014. "Progress in Macromolecular Crystallography Depends on Further Miniaturization of Crystallization Experiments". *Drug Discovery Today*, 19, 1505-1507.
- Goyal, H.B., Saxena, R.C. ve Seal, D., 2008. Thermochemical Conversion of Biomass to Liquids and Gaseous Fuels. Handbook of Plant-Based Biofuels, Ashok Pandey. *CRC Press*, Londra, 29-43.
- Harvey R.A. ve Ferrier, D.R., 2011. Review: Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. *Lippincott Williams & Wilkins*, 520 p, ABD.
- Horn, S.J., Kolstad, G.V., Westereng, B. Ve Eijssink, V.G., 2012. Novel Enzymes for the Degradation of Cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5, 45.
- Howard, R.L., Abotsi, E., Rensburg E.L.J. ve Howard, S., 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. *African Journal of Biotechnology*, 2 (12), 602-619.
- Israelachvili, J.N., 1992. Intermolecular and Surface Forces. *Academic Press*, 676 p, Londra.
- Jaskolski, M., Dauter, Z. ve Wlodawer, A., 2014. A Brief History of Macromolecular Crystallography, Illustrated by a Family Tree and Its Nobel Fruits. *FEBS Journal*, 281, 3985–4009.
- Jennissen, H.P., 2000. Hydrophobic Interaction Chromatography: The Critical Hydrophobicity Approach. *International Journal of Bio-Chromatography*, 5, 131–163.
- Jennissen, H.P., 2002. Hydrophobic Interaction Chromatography. *Nature Encyclopedia of Life Science*, 9, 353-361.
- Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H. ve Phillips, D.C., 1958. A Three-dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-ray Analysis. *Nature*, 181, 662–666.
- Kocabaş, A., Kocabaş, D. ve Bölükbaşı, U., 2011. One-Step Purification and Characterization of a Low Molecular Weight Xylanase from *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *Journal of Applied Biological Sciences*, 5 (2), 61-65.
- Kocabaş, D. ve Özben, N., 2014. Co-Production of Xylanase and Xylooligosaccharides from Lignocellulosic Agricultural Wastes. *Royal Society of Chemistry*, 4, 26129-26139.
- Konak, İ., Turhan, İ. ve Certel, M., 2014. Proteinlerin Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması. *Academic Food Journal*, 12(2), 79-87.
- Koshland, D.E., 1958. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, 44, 98.

- Koshland, D.E., 1994. The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie International Edition*, 33, 2375-2378.
- Kulkarni, N., Shendye, A. ve Rao, M., 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4), 411-456.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lama, L., Calandrelli, V., Gambacorta, A. ve Nicolaus, B., 2004. Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Research in Microbiology*, 155, 283–289.
- Lamb, A.L., Kappock, T.J. ve Silvaggi, N.R., 2015. You Are Lost Without a Map: Navigating the Sea of Protein Structures. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1854, 258-268.
- Lodish, H., 2007. Molecular Cell Biology. *W. H. Freeman and Company*, 973 p, New York, ABD.
- McCrary, E., 1991. The Nature of Lignin. <http://cool.conservation-us.org/byorg/abbey/ap/ap04/ap04-4/ap04-402.html>-(Erişim tarihi:16.08.2016).
- McPherson, A., 2004. Introduction to Protein Crystallization. *Methods*, 34, 254-265.
- Metzler, D.E. ve Metzler, C.M., 2001. Biochemistry : The Chemical Reactions of Living Cells. *Academic Press*, 937 p, ABD.
- Meyer, T.S. ve Lamberts, B.L., 1965. Use of Coomassie Brilliant Blue R250 for the Electrophoresis of Microgram Quantities of Parotid Saliva Proteins on Acrylamide-Gel Strips. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 107 (1), 144-145.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-428.
- Mirani M.R. ve Rahimpour, F., 2015. Thermodynamic Modelling of Hydrophobic Interaction Chromatography of Biomolecules in the Presence of Salt. *Journal of Chromatography A*, 1422, 170–177.
- Moreira, L.R.S., Campos, M.C., Siqueira, P.H.M.V., Silva, L.P., Ricart, C.A.O., Martins, P.A., Queiroz, R.M.L. ve Filho, E.X.F., 2013. Two β -Xylanases From *Aspergillus terreus*: Characterization and Influence of Phenolic Compounds on Xylanase Activity. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 46–52.
- Motta, F.L., Andrade, C.C.P. ve Santana, M.H.A., 2013. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-

Techniques, Applications and Commercialization. Ed: Anuj Chandel. *Intech*, Brezilya, 251-274.

- Mukhopadhyay, S.K., Hauli, I., Sarkar, B., Mukherjee, T., Chattopadhyay, A. ve Kanti, S., 2013. Alkaline Extraction of Xylan from Agricultural Waste, for the Cost Effective Production of Xylooligosaccharides, Using Thermoalkaline Xylanase of Thermophilic *Anoxybacillus* sp. Ip-C. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 1 (6), 126-131.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M., 2008. Lehninger Biyokimyannın Temel İlkeleri. *Palme Yayıncılık*, 1180 s, Ankara.
- Pal, A., Ray, L. ve Chattopadhyay, P., 2006. Purification and Immobilization of an *Aspergillus terreus* Xylanase: Use of Continuous Fluidized Bed Column Reactor. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 163-168.
- Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis A.F., Muirhead H., Will G. ve North A.C.T., 1960. Structure of Hemoglobin: A Three-Dimensional Fourier Synthesis at 5.5-Å Resolution, Obtained by X-Ray Analysis. *Nature*, 185, 416-421.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. ve Amorim, D.S., 2005. Xylanases from Fungi: Properties and Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 577-591.
- Rana, F., 2009. Handout 4 Lattices in 1D, 2D, and 3D. University of Cornell. <https://courses.cit.cornell.edu/mse5470/handout4.pdf>-(Erişim tarihi:16.08.2016).
- Renge, V.C., Khedkar S. V. ve Nandurkar, N.R., 2012. Enzyme Synthesis By Fermentation Method: A Review. *Scientific Reviews & Chemical Communications*, 2 (4), 585-590.
- Rupp, B., 2015. Reviewing Biomolecular Crystallography Proposals: Time For a Paradigm Change. *Trends in Biochemical Sciences*, 40 (8), 419-421.
- Samanta, A.K., Jayapal, N., Jayaram, N., Roy, S., Kolte, A.P., Senani, S. ve Sridhar, M., 2014. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5, 62-71.
- Schanda, P. ve Ernst, M., 2016. Studying Dynamics by Magic-Angle Spinning Solid-State NMR Spectroscopy: Principles and Applications to Biomolecules. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 96, 1-46.
- Scott, R.P.W., 2003. Principles and Practice of Chromatography. *Reese-Scott Partnership*, 140 p, ABD.
- Shallom, D. ve Shoham, Y., 2003. Microbial Hemicellulases. Current Opinion in *Microbiology*, 6 (3), 219-228.

- Shansky, R.E., Wu, S.L., Figueiroa, A., Karger, B.L., 1990. Hydrophobic Interaction Chromatography of Biopolymers. Approaches to the Conformational Analysis of Biopharmaceuticals. Editors: Gooding, K.M., Regnier, F.E., Marcel Dekker. 95 p, New York.
- Silva, A.E., Marcelino, H.R., Gomes, M.C.S., Oliveira, E.E., Nagashima, T. ve Egitto, E.S.T., 2012. Xylan, a Promising Hemicellulose for Pharmaceutical Use. Products and Applications of Biopolymers, Ed: Dr. Johan Verbeek. *Intech*, Hırvatistan, 61-84.
- Smith, D.C., Bhat, K.M. ve Wood, T.M., 1991. Xylan-Hydrolysing Enzymes from Thermophilic and Mesophilic Fungi. *The World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, 475-484.
- Sorgatto, M., Guimarães, N.C.A., Zanoelo, F. F., Marques, M. R., Peixoto-Nogueira, S.C. ve Giannesi, G.G., 2012. Purification and Characterization of an Extracellular Xylanase Produced by the Endophytic Fungus, *Aspergillus terreus*, Grown in Submerged Fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 11 (32), 8076-8084.
- Tuncer, M., 2008. Protein Saflaştırma Kromatografik Teknikler. *Mersin Üniversitesi Yayınları*, 14, 285.
- Ünlü, C. H., Günister, E. ve Atıcı, O., 2009. Synthesis and Characterization of NaMt Biocomposites with Corn Cob Xylan in Aqueous Media. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 585-592.
- Vazquez, M.J., Dominguez J.L.A.H. ve Parajo J.C., 2000. Xylooligosaccharides: Manufacture and Applications. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 387-393.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundqvist, J., & Linko, M., 2001. Xylanases in Bleaching From an Idea to the Industry. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 335-350.
- Waites, M.J., Morgan N.L., Rockey J.S. ve Higton G., 2015. Endüstriyel Mikrobiyolojiye Giriş. *Palme yayıncılık*, 288 s, Ankara.
- Walker, G.M., 2010. Bioethanol: Science and Technology of Fuel Alcohol. *Bookboon.com*, İskoçya.
- Whistler, R.L., ve Masak, E., 1955. Enzymatic Hydrolysis of Xylan. *Journal of the American Chemical Society*. 77 (5), 1241-1243.
- Whitford, D., 2005. Proteins: Structure and Function. *John Wiley & Sons Ltd.*, West Sussex, İngiltere.
- Wilson, K. ve Walker J., 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. *Cambridge University Press*, 736 p, Cambridge, İngiltere.

- Yang, Y., Zhang, W., Huang, J., Lin, L., Lian, H., Lu, Y., Wu, J. ve Wang, S, 2009. Purification and Characterization of an Extracellular Xylanase from *Aspergillus niger* C3486. *African Journal of Microbiology Research*, 4 (21), 2249-2256.
- Yeğın, S. ve Büyükkileci, A.O., 2015. Mikrobiyal Ksilanazlar ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları. *Akademik Gıda*, 13 (4) , 317-326.
- Zilliox, C. ve Debeire, P., 1998. Hydrolysis of Wheat Straw by a Thermostable Endoxylanase: Adsorption and Kinetic Studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 58–63.



EK 1

KÜLTÜR ORTAM BİLEŞENLERİ

Ön Kültür Ortamı İçeriği

25 g/L glukoz

5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0,4 g/L NaCl

0,1 g/L KH_2PO_4

2,0 g/L NH_4NO_3

0,5 g/L mısır şurubu

Ana Kültür Ortamı İçeriği

0,5 g/L mısır şurubu

5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

3 g/L NH_4NO_3

0,4 g/L NaCl

0,033 g/L $ZnSO_4$

0,5 g/L KH_2PO_4

1 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

0,06 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

EK 2

DNS METODU İLE İNDİRGEN ŞEKER MİKTARI TAYİNİ

Ksilanaz aktivite analizinde indirgen şeker (ksiloz) miktarının saptanması için 3,5-dinitro salisilik asit (DNS) yöntemi kullanılmıştır.

Reaktifler

320 g/L sodyum potasyum tartarat

10 g/L sodyum hidroksit

10 g/L DNS (3,5-dinitro salisilik asit)

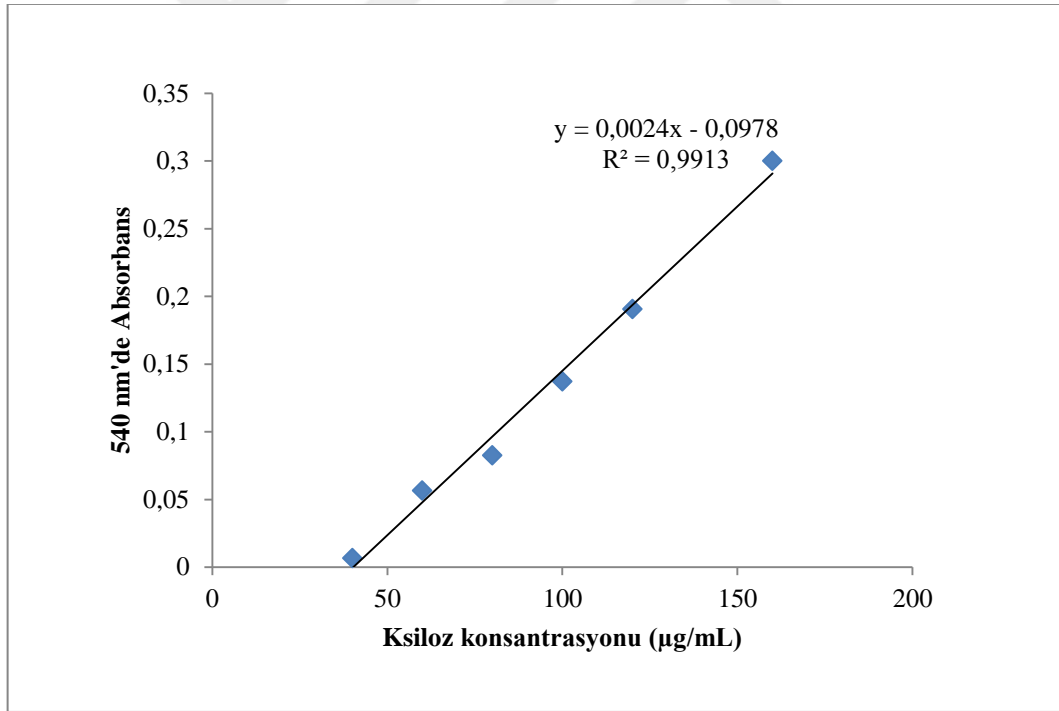
0,5 g/L sodyum sülfid (Na_2SO_3) (taze eklenir)

450 mL saf su içinde 320 g sodyum potasyum tartarat, 100 mL saf suda 10 g NaOH ve 200 mL saf suda 10 g DNS ayrı ayrı tamamen çözdürülmüştür. DNS çözeltilerinin içine yavaşça NaOH çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra bu çözelti tartarat çözeltisinin içine eklenerek birleştirilmiştir. Saf su ile 1000 mL hacmine tamamlanıp, bir gece karanlıkta bekletilmiştir. Bir gün sonunda çözelti, kaba filtre kağıdından süzülüp, karanlık şişe içerisinde oda sıcaklığında saklanmıştır. Her kullanım öncesi sodyum sülfid taze olarak eklenmiştir.

EK 3

KSİLOZ STANDART EĞRİSİ

Standart olarak kullanılan 1 mg/mL ksiloz çözeltisi saf su içinde hazırlanmış ve -20°C sıcaklıkta stok olarak saklanmıştır. Stok çözeltiden 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0) ile uygun şekilde seyreltme yapılarak 0-20-40-60-80-100-120-160 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Konsantrasyona bağlı şeker miktarı, 60°C sıcaklıkta 1 mL standart çözeltinin 1,5 mL DNS ile karıştırılmasıyla belirlenmiştir. Şeker miktarına bağlı renk oluşumu 5 dakika kaynatılarak gözlemlenmiştir. Renk oluşumu spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda ışıkla absorbanans değeri ölçülmüş ve standart ksiloz eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.1).

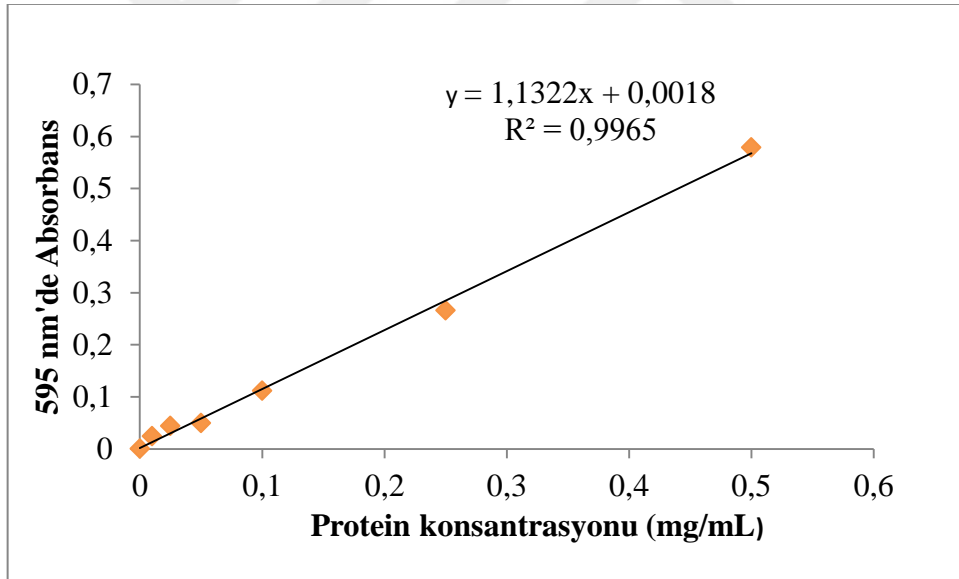


Şekil 3.1. Standart ksiloz eğrisi grafiği

EK 4

BRADFORD METODU İLE PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Protein miktarı, Bradford (1976) tarafından tarif edildiği gibi sığır serum albümin (BSA) standart protein olarak kullanılarak belirlenmiştir. 1 mg/mL stok BSA 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) çözdürülerek hazırlanmıştır. Stok çözelti yine aynı tampon ile uygun oranlarda seyreltilerek 0-1,0 mg/mL konsantrasyon aralığında standart protein çözeltileri hazırlanmıştır. Protein içeriğini ölçmek için bir cam test tüpün içerisinde 0,05 mL BSA çözeltisi ve 1,5 mL Bradford reaktifi karıştırılmıştır. 595 nm'deki absorbans değeri 30 dakika sonra spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve standart BSA eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bradford metodu için standart BSA eğrisi

EK 5

HİDROFOBİK ETKİLEŞİMLİ KOLON ÖZELLİKLERİ

Aspergillus terreus ksilanazının saflaştırılması için, kullanıma hazır HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance (Amersham Biosciences, İsveç) kolonu kullanılmıştır. Kolon verileri Çizelge 5.1’de sunulmuştur.

Çizelge 5.1. Hidrofobik etkileşimli kolon verileri

Matris	%6 çapraz bağlı küresel agaroz
Ortalama parçacık boyutu	34 µm (24-44 µm)
Ligand	Fenil
Ligand konsantrasyonu	25 µmol/mL
Bağlama kapasitesi	45 mg α-kimotripsinojen/mL
Kolon hacmi	20-22 Ml
Önerilen akış hızı	150 cm/sa’e kadar
Maksimum akış hızı	150 cm/sa (5 mL/min)
Çalışma boyunca kolon yatağı üzerindeki maksimum basınç	0,3 MPa, 3 bar, 42 psi
Donanım basınç sınırı	0,5 MPa, 5 bar, 73 psi
pH kararlılığı uzun süreli ve çalışma anında kısa süreli	3-13 2-14
Saklama	%20 etanol

EK 6

SDS-PAGE İÇİN KULLANILAN REAKTİFLER VE JELLERİN HAZIRLANMASI (LAEMMLI, 1970)

Stok Çözeltiler

- A. Akrilamid/bis (%30 T, %2,67 C)
- B. 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- C. 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- D. %10 SDS
- E. Örnek tamponu

Saf su	4,0 mL
0,5 M Tris-HCl, pH6,8	1,25 mL
Gliserol	2,5 mL
%10 SDS (a/h)	2,0 mL
%0,05 (a/h) bromfenol mavisi	0,2 mL

Örnek tamponu örnek ile karıştırılmadan önce 2-β-merkaptöetanol ile %5 (h/h) oranında karıştırılmıştır. Örnek, örnek tamponu ile en az 1:2 oranında karıştırılıp 5 dakika boyunca 95°C'de kaynatılmıştır.

- F. 5X elektrot (yürütücü) Tampon, pH 8,3

Tris baz 9,0 g

Glisin 42,3 g

SDS 3,0 g

- G. %10 Amonyum Persülfat (APS)

EK 6 (DEVAM)

SDS Jel Çözeltilerinin Hazırlanması

A. Alt (Separating) Jel

Monomer konsantrasyonu (%30 T, %2,67 C)	%12
Akrilamid/bis (%30 T, %2,67 C stok)	4,0 mL
Saf su	3,35 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,6	-
%10 SDS	100 µL
%10 Amonyum persülfat (taze hazırlanır)	50 µL
TEMED (<i>N,N</i> - tetrametilen etilendiamin)	5 µL

B. Üst (Stacking) Jel

Monomer konsantrasyonu (%30 T, %2,67 C)	%7
Akrilamid/bis (%30 T, %2,67 C stok)	2,3 mL
Saf su	5,1 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,6	2,5 mL
%10 SDS	100 µL
%10 Amonyum persülfat (taze hazırlanır)	50 µL
TEMED (<i>N,N</i> - tetrametilen etilendiamin)	10 µL

Mini-protean Tetra Cell (Biorad, Almanya) elektroforez düzeneğine ait cam plakalar ve aparatlar kullanılarak jel dökme düzeneği oluşturulmuştur. Önce alt jel çözeltisi dökülmüş, jel donduktan sonra üstüne üst jel çözeltisi dökülmüştür. Protein yükleme boşluklarının oluşmasını sağlayan tarak üst jel üzerine geçirilerek, jeller donmaya bırakılmıştır. Jeller donduktan sonra örnek tamponuyla karıştırılan proteinler jellere yüklenmiş ve elektroforez işlemi başlatılmıştır.

EK 7

COMMASSIE BOYAMA YÖNTEMİ

Boya çözeltilisi

Coomassie Brilliant Blue (G 250)	%0,1 (a/h)
Metanol	%50 (h/h)
Asetik asit	%12 (h/h)

Yıkama çözeltilisi

Metanol	%30 (h/h)
Asetik asit	%7 (h/h)

SDS-PAGE yöntemiyle protein yürümesi tamamlanan jeller Meyer ve Lamberts'in (1965) yöntemine göre Commassie boyama yöntemiyle boyanmıştır. Jeller boya çözeltilisi içerisinde 24 saat bekletilmiştir. Sonrasında yıkama çözeltilisi kullanılarak proteinlerin belirginleşmesi sağlanmıştır. Jeller, yıkama çözeltilisi içerisinde bekletilmiş, saat başı yıkama çözeltilisi yenilenerek yıkama gerçekleştirilmiştir.

EK 8

ÖRNEK BİR OPTİMİZASYON PLAKASI

	1	2	3	4	5	6
A	0,48 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,49 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,51 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,52 M N 0,1 M T %2(h/h) E
B	0,48 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,49 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,51 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,52 M N 0,1 M T %2(h/h) E
C	0,48 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,49 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,51 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,52 M N 0,1 M T %2(h/h) E
D	0,48 M N 0,1 M T %2(h/h)	0,49 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,50 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,51 M N 0,1 M T %2(h/h) E	0,52 M N 0,1 M T %2(h/h) E

Çizelge 9.1. Crystal Screen F4 koşulu için örnek bir optimizasyon plakası (N: sodyum klorid, T: sodyum sitrat tribazik dihidrat (pH 5,6), E: etilen imin polimer

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Nurunnisa Atçeken

Doğum Tarihi ve Yer : 23.04.1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Telefon : 05063002775

e-mail : nisa_148@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği bölümü	2012
Lise	Karaman Fen Lisesi	2006

Katılan Kongre/Çalıştaylar:

IV. KOP Bölgesel Kalkınma Sempozyumu. Karaman /Karamanoğlu Mehmetbey üniversitesi / 2016 / Poster sunumu: “*Aspergillus terreus* Ksilanazının Biyokütle Hidroliz Performansının Belirlenmesi”

International "Enzymes for Biocatalysis" Workshop. İstanbul /Arel Üniversitesi/ 2014

Ulusal Kimya Mühendisleri Öğrenci Platformu. İzmir / Ege Üniversitesi / 2010

Kariyerimin Kimyası. İstanbul / Yıldız Teknik Üniversitesi / 2009