

***SCYTALIDIUM THERMOPHILUM*'DAN  
KSİLANAZ ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU,  
ENDÜSTRİYEL UYGULAMALAR İÇİN  
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Neslihan ÖZBEN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Mikrobiyoloji**

**Yrd. Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ**

**Nisan-2014**

**T.C**  
**KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SCYTALIDIUM THERMOPHILUM*'DAN KSİLANAZ ÜRETİMİNİN**  
**OPTİMİZASYONU, ENDÜSTRİYEL UYGULAMALAR İÇİN**  
**SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**Neslihan ÖZBEN**

**Anabilim Dalı: Biyoloji**

**Programı: Mikrobiyoloji**

**Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ**

**KARAMAN-2014**

## TEZ ONAYI

Neslihan ÖZBEN tarafından hazırlanan “*Scytalidium thermophilum*’dan ksilanaz üretiminin optimizasyonu, endüstriyel uygulamalar için saflaştırılması ve karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Yrd.Doç.Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Jüri Üyeleri	Kurumu	Anabilim Dalı	İmza
Yrd.Doç.Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ	KMÜ- Mühendislik Fakültesi	GıdaMühendisliği	
Yrd.Doç.Dr. Gökhan SADI	KMÜ-Kamil Özdağ Fen Fakültesi	Biyoloji	
Yrd.Doç.Dr. Yakup ULUSU	KMÜ- Mühendislik Fakültesi	Biyomühendislik	

Tez Savunma Tarihi: 02/04/2014

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof.Dr.Fevzi KILIÇEL**  
**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 içerdiği 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.

**Neslihan ÖZBEN**

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## **SCY TALIDIUM THERMOPHILUM'DAN KSILANAZ ÜRETİMİNİN OPTİMİZASYONU, ENDÜSTRİYEL UYGULAMALAR İÇİN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**Neslihan ÖZBEN**

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

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ**

**Nisan, 2014, 63 sayfa**

Bu çalışmada, termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum*'dan ksilanaz üretim koşulları, Box-Behnken deney tasarım yöntemi kullanılarak Tepki Yüzey Metodolojisi ile istatistiksel olarak optimize edilmiştir. Beş bağımsız değişkenin; aşı oranı, sıcaklık, pH, karbon ve azot kaynağı konsantrasyonunun ksilanaz üretimine etkisi incelenmiş ve çalışılan aralıkta en uygun fermantasyon koşulu 1 mL aşı oranı, 50°C sıcaklık, 7,0 pH, 20 g/L mısır koçanı ve 5 g/L maya özütü olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda 134,09 IU/mL ksilanaz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu sonucun, geliştirilen model eşitliğinden hesaplanan 133,91 IU/mL değeriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda enzim üretimi, başlangıç seviyesinin yaklaşık 2 katına çıkarılmıştır.

Ksilanazın endüstriyel uygulamalar için kısmi olarak saflaştırılması amonyum sülfat ile çöktürme, sulu iki faz ayrıştırma ve ultrafiltrasyon yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfatla çöktürme sonucunda %52 verimle 2,5 kat saflaştırma elde edilirken, sulu iki faz ayrıştırma tekniğinde %79 verim ve 2,7, ultrafiltrasyon tekniğinde ise %25 verimle 4,3 kat saflaştırma elde edilmiştir.

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında ham ksilanaz aktivitesi ve dayanımına pH etkisi incelendiğinde, en yüksek bağıl aktivite pH 7-7,5 aralığında elde edilmiş ve enzim pH 7'de 4 saat inkübe edildiğinde aktivitesinin %70'ini korumuştur. Ksilanaz aktivitesi ve dayanımına sıcaklığın etkisi incelenmiş ve en yüksek aktivite 70°C sıcaklıkta tespit edilirken, enzim 50°C sıcaklıkta 1 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin %75'ini korumuştur. Ham enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1,93 mg/mL ve 347,1 U/mL olarak tespit edilmiştir. Substrat seçiciliği incelemesi sonucunda ksilanazın, denenen ticari ve lignoselülozik substratlar içinde en yüksek afiniteyi sırasıyla huş ağacı ksilanı ve buğday kepeğine karşı gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Scytalidium thermophilum*, ksilanaz, tepki yüzey metodolojisi, kısmi saflaştırma, karakterizasyon

## ABSTRACT

Ms Thesis

Neslihan ÖZBEN

### OPTIMIZATION OF XYLANASE PRODUCTION FROM *SCYTALIDIUM THERMOPHILUM*, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS

Karamanoğlu Mehmetbey University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ  
April, 2014, 63 pages

In this study, xylanase production conditions from a thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, were statistically optimized with Response Surface Methodology by using Box-Behnken experimental design method. Effect of five independent variables; inoculum level, temperature, pH, carbon and nitrogen source concentration, on xylanase production was investigated and optimum fermentation conditions were determined as 1 mL inoculum level, 50°C temperature, 7.0 pH, 20 g/L corn cob and 5 g/L yeast extract within the working range. As a result of the fermentation at optimum conditions, 134.09 IU/mL xylanase activity was observed. This result was in agreement with the calculated value of 133.91 IU/mL from the proposed model equation. As the result of the optimization studies, enzyme production was increased to 2 fold of the initial level.

Partial purification of xylanase for industrial applications was studied with ammonium sulphate precipitation, aqueous two phase separation, ultrafiltration, and after ammonium sulphate precipitation 2.5 fold purification with 52% yield, aqueous two phase separation 2.7 fold purification with 79% yield and ultrafiltration 4.3 fold purification with 25% yield was obtained.

In the scope of characterization studies, by investigating the effect of pH on xylanase activity and stability, maximum residual activity was observed in the range of pH 7-7.5 and enzyme retained 70% of its activity after 4 hours incubation at pH 7.0. Effect of temperature on xylanase activity and stability was studied and maximum activity was determined at 70°C, whereas enzyme retained 75% of its activity at 50°C after 1 hour incubation.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of crude enzyme was found as 1.93 mg/mL ve 347.1 U/mL, respectively. As the results of substrate specificity studies, it was determined that within the commercial substrates tested, xylanase showed highest affinity towards birchwood xylan and wheat bran, respectively.

**Keywords:** *Scytalidium thermophilum*, xylanase, response surface methodology, partial purification, characterization

## ÖN SÖZ

Tez çalışmalarında bana yol gösterip, beni yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ'a, mikrobiyoloji çalışmalarında destek veren Yrd. Doç. Dr. Aytaç KOCABAŞ'a, deney süreci boyunca ihtiyacımız olan her konuda imkan oluşturup, yardımcı olacak çözümler bulmamızı sağlayan başta Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdulvahit SAYASLAN ve Uzman Mehmet KOYUNCU olmak üzere tüm Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ve Biyoloji Bölümü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya 110M615 numaralı proje kapsamında destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca her an destekçim olan, vazgeçtiğim zamanlarda bana güç veren anneme, maddi destekleri ile manevi desteklerini birleştirerek devam edebilmemi sağlayan ve her zaman yanımda olan babama ve ağabeylerime sonsuz teşekkür ederim.

Neslihan ÖZBEN  
Nisan, 2014

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖN SÖZ</b> .....	iii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vi
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	viii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI</b> .....	5
2.1. Lignoselülozik Yapılar .....	5
2.1.1 Selüloz .....	6
2.1.2. Lignin.....	6
2.1.3. Hemiselüloz .....	7
2.1.3.1. Ksilan .....	8
2.1.3.2 Ksilanaz ve Endüstriyel Uygulama Alanları .....	8
2.2. Ksilanaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu.....	12
2.2.1. Tepki Yüzey Metodolojisi .....	12
2.3. Ksilanazın Kısmi Saflaştırılması .....	15
2.4. Ksilanazın Karakterizasyonu .....	18
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	21
3.1. Materyaller.....	21
3.2. Mikroorganizma ve Fermantasyon Koşulları .....	21
3.3. Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi .....	21
3.4. Protein Miktarının Belirlenmesi .....	22
3.5. Ksilanaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu.....	22
3.6. Kısmi Saflaştırma .....	23
3.6.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme .....	23
3.6.2 Sulu İki Faz Ayrıştırma.....	24
3.6.3. Ultrafiltrasyon ile Ayrıştırma .....	24



3.7. Karakterizasyon .....	25
3.7.1. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına pH Etkisi .....	25
3.7.2. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına Sıcaklık Etkisi .....	25
3.7.3. Kinetik Parametreler .....	26
3.7.4. Substrat Seçiciliği .....	26
<b>4. BULGULAR</b> .....	27
4.1. Ksilanaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu.....	27
4.2. Teorik Bulguların Doğrulanması .....	34
4.3. Kısmi Saflaştırma .....	35
4.3.1. Amonyum Sülfatla Çöktürme.....	35
4.3.2. Sulu İki Faz Ayrıştırma.....	36
4.3.3. Ultrafiltrasyon ile Ayrıştırma.....	37
4.4. Karakterizasyon .....	38
4.4.1. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına pH Etkisi .....	38
4.4.2. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına Sıcaklık Etkisi .....	39
4.4.3. Kinetik Parametreler .....	40
4.4.4. Substrat Seçiciliği .....	41
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	43
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	51
<b>EKLER</b> .....	57
EK.1 .....	58
EK.2 .....	59
EK.3. ....	60
EK.4. ....	61
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	63

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 3.1:</b> Box-Behnken deney tasarımı bağımsız değişken değerleri .....	23
<b>Çizelge 4.1:</b> Deneysel tasarım ve ksilanaz aktivitesi sonuçları .....	28
<b>Çizelge 4.2:</b> Ksilanaz aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları .....	30
<b>Çizelge 4.3:</b> Ksilanaz aktivitesi için varyans (ANOVA) analizi .....	32
<b>Çizelge 4.4:</b> %20-80 konsantrasyon aralığında amonyum sülfat ile çöktürme .....	35
<b>Çizelge 4.5:</b> %30-60 konsantrasyon aralığında amonyum sülfat ile çöktürme .....	35
<b>Çizelge 4.6:</b> %50 amonyum sülfat konsantrasyonu için saflaştırma tablosu .....	36
<b>Çizelge 4.7:</b> %2-20 TX-114 konsantrasyonu aralığında sulu iki faz ayrıştırma .....	36
<b>Çizelge 4.8:</b> %7 TX-114 konsantrasyonunda 24 saatlik sulu iki faz ayrıştırma .....	37
<b>Çizelge 4.9:</b> Üç aşamalı ultrafiltrasyon tekniği ile saflaştırma tablosu .....	37
<b>Çizelge 4.10:</b> Ön saflaştırma tekniklerine ait özet sonuçlar .....	38
<b>Çizelge 4.11:</b> Ham ksilanazın substrat seçiciliği .....	42

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Genel lignoselülozik yapılar .....	5
Şekil 2.2: Selülozun kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3: Ligninin kimyasal yapısı .....	7
Şekil 2.4: Hemiselülozun kimyasal yapısı .....	7
Şekil 2.5: Ksilanın ve ksilanaz ile hidrolizi sonucu elde edilen ksilozun yapısı.....	8
Şekil 2.6: Ksilanın hidrolizini gerçekleştiren enzimler .....	10
Şekil 4.1: Residülerin dağılım grafikleri .....	33
Şekil 4.2: Bağımsız değişkenler ve aralarındaki etkileşimlere göre çizilmiş kontur plotlar .....	33
Şekil 4.3: Ham ksilanazın aktivitesi ve dayanımına pH etkisi .....	39
Şekil 4.4: Ham ksilanazın aktivitesi ve dayanımına sıcaklığın etkisi .....	40
Şekil 4.5: Ham enzimin; a) Michaelis-Menten, b) Lineweaver-Burk grafikleri .....	41

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$b_0$	Kesişim noktası
$b_i$	Lineer kat sayılar
$b_{ii}$	Üstel katsayılar
$b_{ij}$	Etkileşim katsayıları
$h$	Hacim
IU	International unit (Uluslar arası birim)
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis Menten Sabiti
MW	Molecular weight (Molekül ağırlığı)
nm	Nanometre
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki dönüş sayısı)
[S]	Substrat konsantrasyonu
$V_{max}$	En yüksek tepkime hızı
Y	Tepki
$X_1$	Aşı oranı
$X_2$	Sıcaklık
$X_3$	pH
$X_4$	Karbon kaynağı konsantrasyonu
$X_5$	Azot kaynağı konsantrasyonu

**Kısaltmalar****Açıklama**

<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CMC</b>	Carboxymethyl cellulose (Karboksimetil selüloz)
<b>DNSA</b>	Dinitrosalisilikasit
<b>RSM</b>	Response Surface Methodology (Tepki yüzey metodolojisi)
<b>EC</b>	Enzyme Commission (Enzim Komisyonu)
<b>PEG</b>	Poli Etilen Glikol

## 1. GİRİŞ

Teknolojide meydana gelen gelişmeler, kaynakların geri dönüşümlü kullanılma ihtiyacı, kimyasal atıkların oluşturduğu kirliliğin engellenmek istenmesi gibi ihtiyaçlara paralel olarak enzimlerin de teknolojideki yeri ve önemi artmıştır. Enzimler, teknolojideki gelişmelerle yeni kullanım alanlarının bulunması ile dünyada yayılmış bir pazar haline gelmiştir.

Enzimlerin endüstriyel süreçlerde kullanımının yaygınlaşması sonucunda bu konuda yapılan çalışmalar da hız kazanmıştır. Üretim ortamı optimizasyonu ile uygun çalışma şartları tespit edilmeye ve ürün verimi arttırılmaya çalışılmaktadır. Böylelikle enzimlere kolay ulaşılabilmesinin yanı sıra, ekonomik ve çevreci üretim koşulları sağlanması hedeflenmiştir. Endüstriyel süreçler için enzim saflaştırılması önemli bir süreç basamağıdır. Saflaştırma işlemi hem zaman alıcı hem de maliyeti yüksek bir adımdır. Bu nedenle, üretim koşullarının optimize edilerek uygun saflaştırma tekniklerinin geliştirilmesi endüstriye büyük destek sağlamaktadır.

Günümüzde dünya nüfusunun artmasıyla birlikte hammadde ihtiyacı da artmaktadır. Ayrıca nüfus artışına paralel olarak erişebilir gıda kaynakları da kısıtlı hale gelmektedir. Bu sebeple, endüstriyel üretim süreçlerinde gıda kaynaklarının kullanılmaması daha doğru bir yaklaşımdır. Dolayısıyla “atık” olarak sınıflandırılan maddelerin endüstriyel süreçlerde kullanılarak katma değerli son ürünlere dönüştürülmesi önem kazanmaktadır. Bu noktada, endüstriyel mikrobiyal üretim süreçlerinde kullanılan ve gıda olarak da değeri olan karbon kaynakları yerine “atık” karbon kaynaklarının değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Atık karbon kaynakları olarak her yıl milyonlarca ton üretilen ve ekonomik açıdan değeri olmayan (veya çok az olan) lignoselülozik kaynakların (mısır koçanı, ayçiçek sapı, pamuk sapı vb.) kullanılması sayesinde gıda kaynaklarından tasarruf edilebilecektir. Ayrıca, bu tip “yenilenebilir” kaynakların kullanımı sayesinde hem çevre açısından hem de maliyet açısından avantajlı endüstriyel süreçlerin uygulanması mümkün olacaktır.

Türkiye'nin toplam arazisi 26.500 hektardır. Bunların %38,4'ü ekili, %44,1'i orman arazisi, %10,4'ü nadasa bırakılmış halde ve %7,1'i meyve ve sebze ekili halde bulunmaktadır. Ülkemizde yetiştirilen ürünlerin tarımsal atıklarının yıllık 50-65 ton olduğu bilinirken, mısır atıkları bunların içerisinde üçüncü sırada yer almaktadır. Mısır atıklarının hayvan altlığı ve hayvan yem katkı maddesi olarak kullanıldığı bilinmektedir. Mısır atıklarının yılda 2 milyon tondan fazla üretildiği göz önüne alındığında, sadece belirtilen alanlarda kullanılarak tükenmediği ve başka şekillerde geri dönüşümü olmadığından atık olarak kaldığı görülmektedir. (Öztürk ve Başçetinçelik, 2006).

Tarım ve ormancılıkta üretilen lignoselülozik maddelerin (özellikle atıkların) biyolojik dönüşümü için ksilanazların kullanılması gündemdedir (Haltrich ve ark., 1996). Son zamanlarda çalışmaların yoğunlaştığı enzimlerden biri olan ksilanaz; 1980'lerde hayvan yemi hazırlanmasında, daha sonra gıda, tekstil ve kağıt sanayisinde kullanılmaya başlamıştır. Özellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen bu enzimler, polisakkaritleri hidroliz edecek olan diğer enzimlerle birlikte, hücre duvarında bulunan ksilanın parçalanmasında görev alırlar (Polizeli ve ark, 2005).

Ksilanazlar, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde önemli uygulama alanı bulduğundan dolayı, hızla endüstriyel enzimlerin önemli bir grubu haline gelmektedir. Ksilanazlar, ksilanın hidrolizi ile kağıt hamurundan ligninin salınımını kolaylaştırır ve böylece beyazlatma ajanı olarak klorun kullanımını azaltır. Bu yönüyle kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde önem taşımaktadır (Subramaniyan ve Prema, 2002).

Bitkilerde hücre duvarı, hücre koruyucu ve sertlik verici görevlere sahiptir. Fiziksel olarak korumayı sağlar, bitki patojenlerinin saldırısına karşı bariyer görevi görür ve doğadaki bağlı karbonun en önemli kaynağı olduğu kabul edilmektedir. Yapının ana bileşenleri olan selüloz, lignin ve hemiselüloz, kovalent ve kovalent olmayan bağlarla birbirlerini etkilemektedir (Collins ve ark., 2005). Ksilanlar, hemiselülozların ana yapısını meydana getiren temel polisakkaritlerdir. Doğada

yaygın olarak bulunan ksilanlar, genel olarak bitkilerde toplam kuru ağırlığın %30-35'ini oluşturmaktadırlar (Kulkarni ve ark., 1999).

Bu enzimi üreten organizmalar arasında filamentli küfler öne çıkmaktadır. Mikroorganizmalar enzimin hücre dışına salınımını gerçekleştirdikleri için hücre parçalanması ihtiyacı ortadan kaldırmakta, bu sayede endüstriyel üretim süreçlerinde ayrı bir önem kazanmaktadır. Ayrıca, filamentli küflerin ksilanaz üretim seviyesi bakteri ve mantarlara göre daha yüksektir (Haltrich ve ark., 1996).

Enzim üretiminde en düşük maliyet ve en kısa zamanda en yüksek verimin elde edilebilmesi için fermantasyonda “sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, çoğaltma zamanı ve havalandırma” gibi belirli parametrelerin optimize edilmesi gerekmektedir (Bocchini ve ark., 2002). Optimizasyonun gerçekleştirilmesinde iki farklı yaklaşım söz konusu olmaktadır. Birinci yol olan klasik yöntem, “tek faktör-tek zaman” (one-factor-at a time) metodudur. Burada bir değişken değiştirilirken, diğer değişkenler sabit tutulur. Bu yöntem değişken sayısının az olduğu durumlarda uygulamada zorluk çıkartmamakla birlikte, değişken sayısı arttıkça uygulama zorlaşmaktadır. Değişkenlerin tek tek değiştirilmesi hem zaman kaybına yol açmakta ve deney set sayısını arttırmakta hem de uzayan zamana paralel olarak sonuçlarda güvensizliklere neden olabilmektedir. İkinci yol ise; en az sayıda deney yapılması ve en yüksek verime ulaşılması esasına dayanır (Yin Li ve ark., 2007). Bu çalışmada optimizasyon deneylerinin gerçekleştirilmesi için istatistiksel bir yöntem olan Tepki Yüzey Yöntemi (RSM: Response Surface Methodology), Box-Behnken deney tasarım metoduyla (Box ve Behnken, 1960) değişkenler arasında (aşı oranı, sıcaklık, pH, karbon kaynağı ve azot kaynağı) matematiksel bir ilişki geliştirmek için kullanılmıştır.

Bu noktalardan hareketle, bu çalışmada, filamentli ve termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum*, ksilanaz üretimi amacıyla kullanılmış, karbon kaynağı olarak kültür ortamına mısır koçanları eklenmiştir. Bu sayede ülkemizde üretilen ve çok kısıtlı kullanım alanı haricinde atık olarak kalan mısır koçanlarının kullanımı ile geri dönüşümünün sağlanması ve ekonomiye kazandırılması amaçlanmıştır.



*Scytalidium thermophilum*'dan ksilanaz üretiminin optimizasyonu için beş seviyeli Box-Behnken (Box ve Behnken, 1960) deneysel tasarım yöntemiyle Tepki Yüzey Metodolojisine göre gerçekleştirilen deneylerde elde edilen sonuçlar Minitab 14 istatistik programıyla (ABD) analiz edilmiştir.

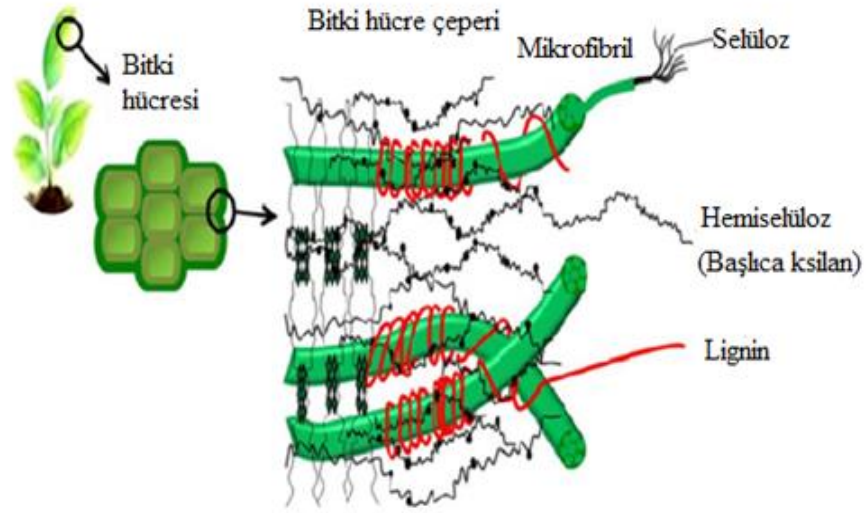
Optimize edilmiş koşullarda üretilen ksilanaz, endüstriyel süreçlere uygun olarak amonyum sülfatla çöktürme, sulu iki faz ayrıştırma ve ultrafiltrasyon yöntemleri ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Enzim, optimum pH ve sıcaklık çalışma koşulları, pH ve sıcaklık dayanımı, kinetik parametreler ve substrat seçiciliği açısından incelenerek karakterize edilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1 Lignoselülozik Yapılar

Önemli enerji kaynaklarından olan biyokütle, ışığın kimyasal enerji şeklinde depolandığı organik bir yapıdır (Demirbaş, 2008). Tarım atıkları, orman atıkları, özel biyoenerji bitkileri, endüstriyel ve evsel katı atıklar lignoselüloz içeren biyokütle olarak sayılabilmektedir (Sathitsuksanoh ve ark., 2010).

Hücre duvarlarını oluşturan ve hücreye sertlik veren lignoselülozik yapı; %30-50 selüloz, %15-35 hemiselüloz, %10-30 lignin ve diğer (protein, çözünür şeker, mineraller gibi) küçük bileşenlerinden meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (Pauly ve Keestra, 2010).

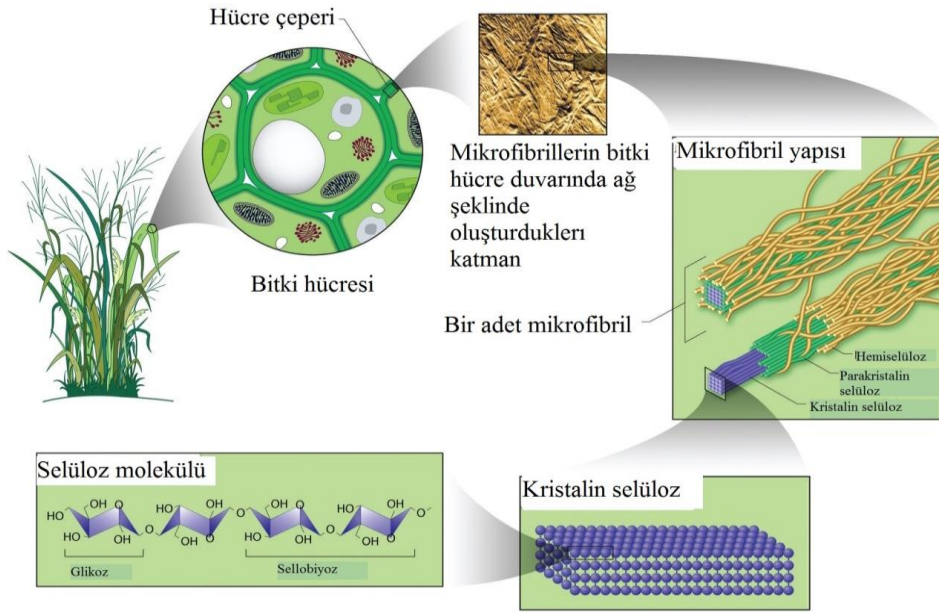


Şekil 2.1. Genel lignoselülozik yapılar (Uyarılama: Ratanakhanokchai ve ark., 2013)

### 2.1.1 Selüloz

Selüloz, bugün için dünyada en bol bulunan yenilenebilir polimer kaynaktır (Klemm ve ark., 2005). Bitki hücre duvarının temel bileşeni olan selüloz; glukoz zincirlerinin,  $\beta$ -1,4-glikozidik bağlarla birbirlerine bağlanmasıyla oluşmuş bir polisakarittir. Selüloz zincirleri, lifli yapıyı oluşturmak için, mikrofibriller üzerine kümelenmiştir (Şekil 2.2) (Ratanakhanokchai, ve ark., 2013).

Selüloz bitkide yapısal bütünlüğü korumasının yanı sıra, otçul canlılara besin kaynağı olarak da görev yapar. Bunun dışında, gıda, kağıt ve kağıt hamuru ve tekstil endüstrisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Kulkarni ve ark., 1999).

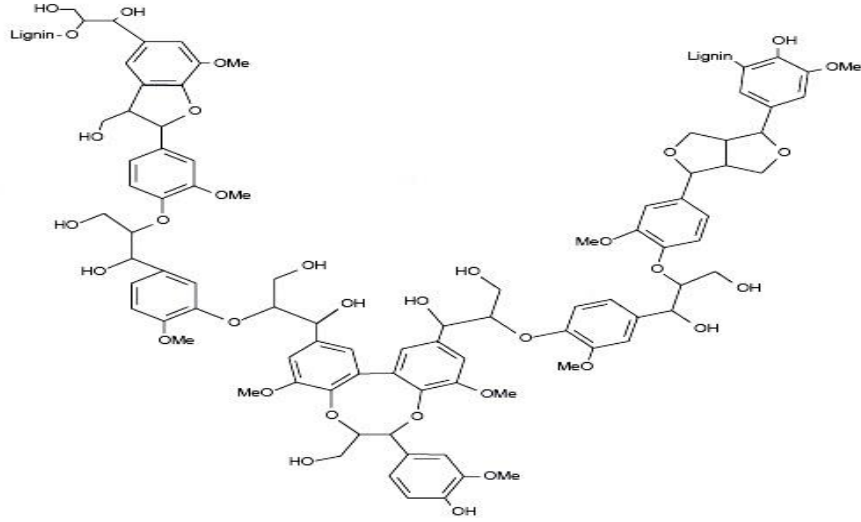


Şekil 2.2 Selülozun kimyasal yapısı (Uyarılama: Quiroz ve Mallol, 2013).

### 2.1.2 Lignin

Lignin doğada en çok bulunan üçüncü polimerdir. Hücre duvarında bulunan lignin sayesinde hücre su geçirmez ve sert bir yapı kazanır. Ayrıca mikrobiyal saldırı ve oksidatif strese dayanıklı hal almasını da sağlar. Ligninler 4-O-metil-Dglukuronik asit

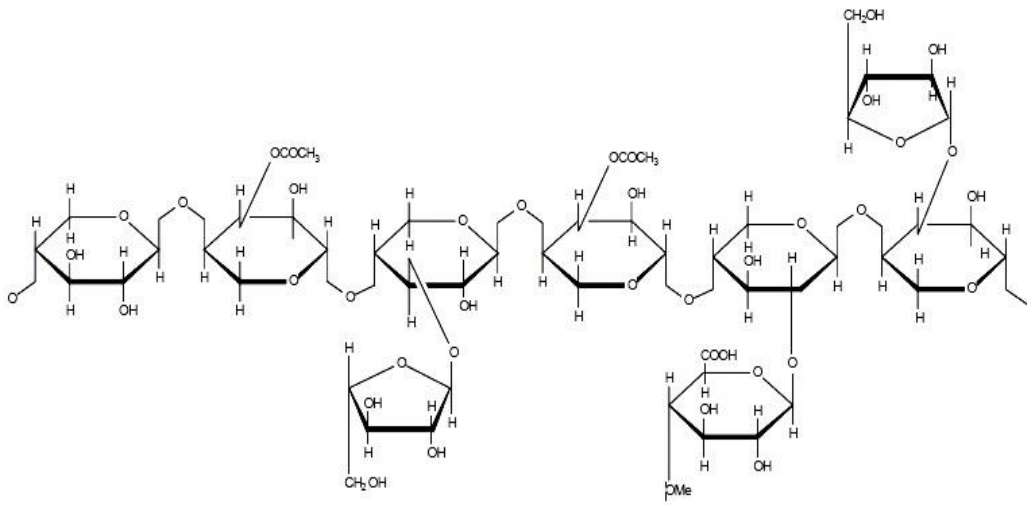
ester bağları ile ksilana bağlanırlar (Şekil 2.3) (Ratanakhanokchai ve ark., 2013; Subramaniyan, 2002).



Şekil 2.3 Ligninin kimyasal yapısı (Uyarlama: Maas, 2008)

### 2.1.3 Hemiselüloz

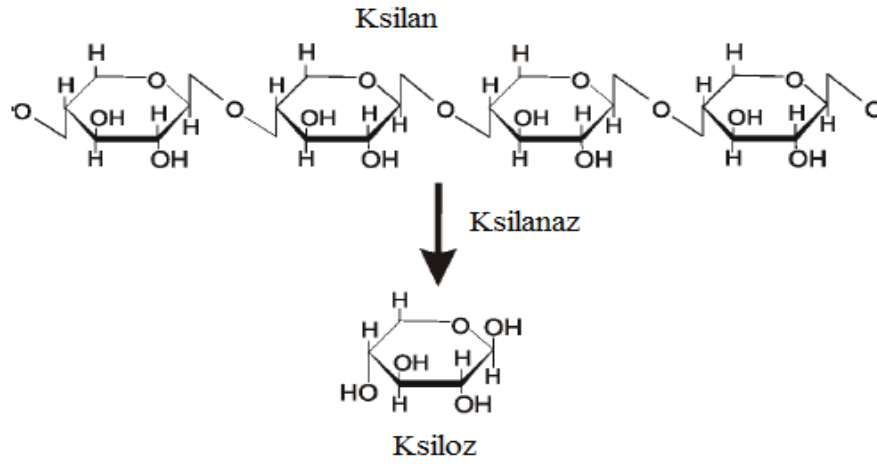
Hemiselülozlar ksılan, mannan, galaktan, arabinan gibi ana heteropolimerler iğerir. Bu heteropolimerler temel monomer olan D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz, L-arabinozdan meydana gelirler (Şekil 2.4) (Beg ve ark., 2001).



Şekil 2.4 Hemiselülozün kimyasal yapısı (Uyarlama: Maas, 2008)

### 2.1.3.1 Ksilan

Hemiselülozların ana bileşeni ve bitki hücrelerinin en büyük yapısal polisakkariti olan ksilan, ksilanazların substratıdır (Şekil 2.5). Ksilan doğada en çok bulunan ikinci polisakkarittir ve dünyada yenilenebilir karbonun üçte birini oluşturmaktadır (Collins ve ark., 2005).



Şekil 2.5 Ksilanın ve ksilanaz ile hidrolizi sonucu elde edilen ksilozun yapısı  
(Uyarlama: Held, 2012)

Ksilanlar,  $\beta$ -1,4 glikozidik bağlarla bağlanmış, ksiloz monomerlerinden meydana gelmiş kompleks polisakkaritlerdir (Beg ve ark., 2001). Ksilanlar bitki kuru ağırlığının yaklaşık %30-35'ini oluşturmaktadır (Kulkarni ve ark., 1999).

Hücre duvarlarında bulunan ksilan oranları, yumuşak odundan, sert oduna ve genel bitkilere göre farklılık göstermektedir. Sert yapıllılarda hücre duvar içeriğinin %15-30'u, yumuşak yapıllılarda %7-10'u ve genel bitkilerde %30'dan fazlasını oluşturmaktadır (Collins ve ark., 2005).

### 2.1.3.2 Ksilanaz ve Endüstriyel Uygulama Alanları

Endo-1,4- $\beta$ -ksilanaz (1,4- $\beta$ -D ksilan ksilanohidrolaz EC:3.2.1.8),  $\beta$ -1,4 bağları ile bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşmuş, ksilan omurgasındaki bağları hidroliz eden

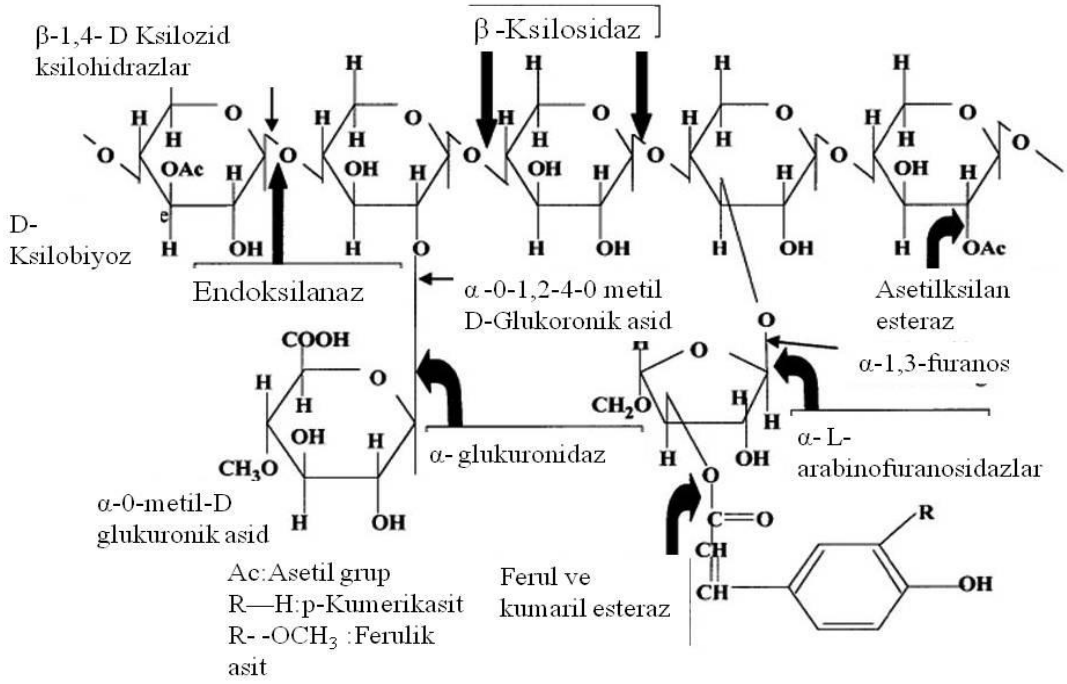
enzimdir (Şekil 2.5). Ksilan hidrolizi için seçilen bağlar, zincir uzunluğuna, dallanma derecesi ve substrat molekülü doğasına göre değişmektedir.

Mikrobiyal kaynaklar arasında, ortam içine salgılanan ksilanaz seviyeleri bakteriye göre daha fazla olan filamentli mantarlar (funguslar) oldukça dikkat çekicidir (Polizeli ve ark., 2005).

Ksilanın yapısının karmaşık olması nedeniyle, molekülün tamamen hidrolizi için farklı enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ksilanı hidroliz eden enzimlerin tamamına “ksilanolitik enzim sistemi” adı verilir. (Collins ve ark., 2005).

Bu grubu oluşturan enzimler (Şekil 2.6);

- Endo-1,4- $\beta$ -D-ksilanazlar (E.C. 3.2.1.8): ksilan omurgası içinde, ksiloz birimleri arasındaki glikozid bağları hidroliz ederler.
- 1,4- $\beta$ -D-ksilasidazlar (E.C.3.2.1.37): ksilobiyozu ve bazı küçük 4- $\beta$ -D ksilooligosakkaritleri ksiloza hidroliz ederler.
- $\alpha$ -L-arabinofuranosidazlar (E.C. 3.2.1.55): arabinoglukurunoksilan ksiloz omurgasındaki yan zincirleri hidroliz eder.
- $\alpha$ -glukorinidaz (E.C. 3.2.1.1): glukurunoksilan bulunan glukuronik asit artıkları ve  $\beta$ -D-ksilopiranosil omurga birimleri arasındaki  $\alpha$ -1,2 glikosidik bağları hidroliz eder.
- asetil-ksilan esterazlar (E.C.3.1.1.72 ): asetil ksilan  $\beta$ -D-ksilopiranosil kalıntıları üzerindeki pozisyon 2 ve / veya 3 'deki O-asetil gruplarını çıkarır.
- p-kumarik asit ve ferulik asit esterazlar (E.C. 3.1.1): sırasıyla arabinoz ve ferulik asit arasındaki yan grupları ve arabinoz ile pumarik asit arasında ksilan üzerindeki ester bağlarını böler.



Şekil 2.6 Ksilanın hidrolizini gerçekleştiren enzimler (Uyarlama: Beg ve ark., 2001)

Kağıt hamuru üretimi için kullanılan odun, yüksek sıcaklık ve basınçta muamele görür. İhtiyaç duyulan enzimler, enzimatik yöntemlerde yüksek bir pH aralığında, yüksek ısı kararlılık gösteren ve aktivite sergileyen yetenekte olmalıdır. Tüm ticari ksilanazlar bir saatlik yarılanma ömrü ile 50-60°C’de kısmen bu şartları yerine getirebilirler (Haki ve ark., 2003). Bununla birlikte bazı ksilanazların 80°C ile 100°C sıcaklıklarda da yüksek aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Polizeli ve ark., 2005; Haki ve ark.,2003).

Genel olarak, mantar kökenli ksilanazlar 4-6 asidik pH’da etkilidir. Aktinomiset ve bakterilerden türetilen ksilanazların ise daha geniş bir pH aralığında (pH 5-9) etkili oldukları bilinmektedir (Beg ve ark., 2001; Polizeli ve ark., 2005)

Ksilanazların sınıflandırmaları ilk olarak fizikokimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılmıştır. Buna göre; düşük molekül ağırlıklı (<30 kDa) 180-240 aminoasit birimi içeren ksilanazlar ve yüksek molekül ağırlıklı (>30 kDa) 270-800 aminoasit birimi içeren ksilanazlar olarak iki grup oluşturulması önerilmiştir (Wong ve ark, 1988). Bu sınıflandırmanın yeterli olmadığı görüşü ile daha sonra enzimde bulunan katalik

bölgelerin primer yapılarına göre enzim aileleri oluşturulmuş, ksilanazlar aile 10 ve aile 11 olarak sınıflandırılmıştır (Collins ve ark., 2005).

Ksilanazların endüstriyel kullanım alanlarının gıda endüstrisi, yem endüstrisi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi ve diğer endüstriler olarak dört başlık altında toplandığı belirtilmiştir (Collins ve ark., 2005).

Ksilanazlar  $\alpha$ -amilaz, glukoz oksidaz ve proteazlarla birlikte ekmek yapımında kullanılabilir. Ksilanazların diğer enzimler gibi, unda bulunan, suda çözünmeyen hemiselülozu çözünür hemiselüloza dönüştürmeye yardımcı olduğu bilinmektedir. Böylelikle suda çözünen hemiselüloz sayesinde yoğurulması kolay ve yumuşak, ayrıca yapışmayan bir hamur elde edilebildiği saptanmıştır (Polizeli ve ark., 2005). Bu hamurla yapılan ekmeklerin somun hacminin arttığı, tazeliğinin de uzun süre korunduğu saptanmıştır (Kulkarni ve ark., 1999; Beg ve ark., 2001). Ekmek kalitesini arttırmada kullanılan amilazın, ksilanaz ile takviyesi yapılarak kullanıldığında etkilerinin daha da arttığı belirlenmiştir (Beg ve ark., 2001).

Meyve suyu ve şarap endüstrisi de enzim pazarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Daha önceleri meyve suları ve şarapların elde edilmesinde bulanıklık büyük bir sorun olurken, enzimlerin kullanılmasıyla bu soruna çözüm bulunulmuştur (Polizeli ve ark., 2005). Ksilanazın, şarap ve biranın bulanıklığının giderilmesinde (Kulkarni ve ark., 1999; Beg ve ark., 2001), bitkisel yağların, nişastanın ve kahvenin ekstraksiyonunda (Polizeli ve ark., 2005) kullanımının olduğu bildirilmiştir. Bunların yanı sıra, buğday ve arpa nişastalarından glutenin ayrılmasında, bazı tarımsal ürünlerin ve hububatların besin değerini arttırmada (Beg ve ark., 2001), ksilanazdan yararlanılmaktadır.

Hayvan yemi sektöründe de kullanım alanı bulunan ksilanazlar, kullanılan ham maddedeki ksilanların yıkımını gerçekleştirmektedir. Ksilanaz eklenmiş ham maddelerin kullanımıyla, besin sindirimini iyileştirilmesi sağlanarak, enerjinin daha iyi kullanılabilmesi mümkün hale getirilmektedir (Polizeli ve ark., 2005).

Bu enzimlerin kağıt endüstrisinde kullanılması ile klor kullanım miktarı düşürülmekte ve bu sayede de çevre kirliliğinin azaltılması mümkün olmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda



kullanılabilen ksilanaz, hücre duvarı yapısını bozar. Bunun sonucu olarak ağartmanın çeşitli aşamalarında lignin çıkarılması kolaylaşmaktadır (Haki ve ark.,2003).

Ksilanaz ile önceden muamele edilmiş kağıt hamurları elektron mikroskopunda incelendiğinde, enzimatik ağartmanın lignin ve karbonhidrat arasındaki bağların kırılmasını sağladığı görülmüştür. Bunun sonucunda kağıt hamurunun renginin açılmasının mümkün olduğu belirlenmiştir (Beg ve ark., 2001).

Yukarıda açıklanan kullanım alanlarına ek olarak ksilanazların; deterjan endüstrisinde deterjanların temizleme etkilerini arttırmada, lignoselülozdan hidrolizle basit şekerlerin elde edilmesinde ve bu şekerlerden fermentatif mikroorganizmalar aracılığıyla sıvı yakıt (Beg ve ark., 2001) üretiminde kullanıldığı bilinmektedir.

## **2.2 Ksilanaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu**

Endüstriyel üretim süreçlerinde amaç kısa zaman ve düşük maliyet ile yüksek verimin elde edilebilmesidir. Bu amaçla süreç optimizasyonu çalışmaları genellikle istatistiksel deney tasarım teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Tek faktör-tek zaman yaklaşımı genel bir optimizasyon metodu olmakla birlikte uzun zaman alması, fazla sayıda deney gerektirmesi ve elde edilen sonuçların tam güvenilir olmaması nedeniyle problem yaratmaktadır (Wong ve ark., 2008). Ayrıca bu yöntem bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimleri açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu sorunların aşılması için tepki yüzey metodolojisi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

### **2.2.1 Tepki Yüzey Metodolojisi**

Tepki yüzey metodolojisi, ürün ve süreç tasarımı geliştirilmesi, iyileştirilmesi ve optimizasyonunda yaygın olarak kullanılan istatistiksel bir tekniktir. Bu tekniğin amacı en iyi performansı veya kalite özelliklerini (tepki) girdilerin (bağımsız değişkenlerin) farklı seviyelerinin en az sayıda deneyle test edilmesidir (Myers ve Montgomery, 2002).

Tepki yüzeyleri ve tasarımları problemlerinde, bağımsız değişken ile tepki arasındaki ilişki bilinmez. Bu nedenle deneysel çalışmanın amacı, bağımsız değişkenler ve tepki arasındaki doğru fonksiyonel ilişkinin belirlenmesidir. Bu ilişki ancak değişkenlerin uygun seviyelerinin seçimi ile mümkündür (Box ve Wilson,1951).

Tepki yüzey metodolojisi gereği deneylerdeki işlem sırası, bağımsız değişken/değişkenlerin seçimi, deney deseninin çıkarılması, kullanılacak değişkenlerin formu (kodlu-kodsuz), tepki ölçüm yöntemi, model denkleminin çıkarılması, model denkleminin uygunluğunun test edilmesi, deneyin grafiğinin çizilmesi şeklinde sıralanabilir. Bağımsız değişkenlerin ne olacağına karar verme, araştırmacı tarafından deney başlangıcında verilmesi gereken en önemli karardır. Çünkü araştırmacının yapacağı bir hata, sistem için daha önemsiz bir değişkenin modele alınması, önemli bir değişkenin de model dışında bırakılmasına neden olabilir. Genellikle, araştırmacının kontrol edilebilir girdi değişkenlerine ( $\acute{e}_1, \acute{e}_2, \dots, \acute{e}_k$ ) bağlı olan tepkiyi ( $y$ ) içeren ürün, proses veya sistem ile ilgili olduğu farz edilir. İlişki şu şekilde verilebilir (Khuri ve Cornel, 1996).

$$y = f(\acute{e}_1, \acute{e}_2, \dots, \acute{e}_k) + \epsilon \quad (2.1)$$

Eşitlik 2.2'deki  $\acute{e}_1, \acute{e}_2, \dots, \acute{e}_k$  genellikle doğal değişkenler olarak isimlendirilir, çünkü santigrat derece ( $^{\circ}\text{C}$ ), gram/litre gibi ölçümlerin doğal birimlerinde ifade edilirler.

$$\begin{aligned} E(y) = \Pi &= E[f(\acute{e}_1, \acute{e}_2, \dots, \acute{e}_k)] + E(\epsilon) \\ &= f(\acute{e}_1, \acute{e}_2, \dots, \acute{e}_k) \end{aligned} \quad (2.2)$$

Birçok tepki yüzey metodolojisi çalışmasında doğal değişkenlerin kodlu değişkenlere ( $x_1, x_2, \dots, x_k$ ) dönüştürülmesi uygundur. Kodlu değişkenler genellikle sıfır ortalama veya standart sapma ile birimsiz olarak tanımlanırlar.

Kodlu değişkenler cinsinden doğru tepki fonksiyonu (2.3) şu şekilde yazılabilir.

$$\Pi = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (2.3)$$

Bir çok durumda ya birinci dereceden ya da ikinci dereceden model kullanılır. İki bağımsız değişken olan durumlar için kodlu değişkenler cinsinden birinci derece model şu şekilde ifade edilebilir:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 \quad (2.4)$$

Eşitlik 2.4’de verilen birinci dereceden model bazen ana etki modeli olarak adlandırılır. Çünkü iki değişkenin ( $X_1$  ve  $X_2$ ) sadece ana etkilerini içermektedir. Eğer bu değişkenler arasında etkileşim varsa bu etkileşim modele kolaylıkla şu şekilde eklenebilir:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (2.5)$$

Bu eşitlik etkileşimli birinci dereceden modeldir. Doğru tepki yüzeyindeki eğrilik yeterince şiddetlidir. Bu nedenle birinci dereceden model (etkileşim terimini içerse bile) yetersiz kalmaktadır. Bu durumda büyük ihtimalle ikinci dereceden model gerekli olmaktadır. İki değişkenli durum için ikinci dereceden model şu şekilde ifade edilebilir.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 X_2 + \beta_{22} X_2^2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (2.6)$$

İkinci dereceden model tepki yüzey metodolojisinde bir çok neden için pek çok geniş kullanım alanına sahiptir. Bunlardan bazıılarını şu şekilde sıralayabiliriz.

1. İkinci dereceden model oldukça esnektir. Doğru tepki yüzeyini tahmin etmede genellikle iyi çalışır.
2. İkinci derece modelde parametreleri tahmin etmek kolaydır. Bu amaç için en küçük kareler yöntemi kullanılabilir.
3. İkinci dereceden modellerin gerçek tepki yüzey problemlerini çözmekte iyi çalıştığını gösteren bir çok pratik deney mevcuttur (Myers ve Montgomery, 2002).

Literatüre bakıldığında Jatinder ve arkadaşları (2005) *Scytalidium thermophilum*’dan selülaz ve ksilanazının üretimi için kültür koşullarının Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak optimizasyonu çalışmalarında aşı seviyesi, amonyum sülfat ve pH

değişkenleri olarak, 3 faktöriyel deney tasarımı kullanmışlardır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda yaklaşık 196 IU/g substrat ksilanaz aktivitesi elde ettikleri görülmüştür.

Bocchini ve arkadaşlarının (2002) batık kültür tekniği ile çoğaltılmış *Bacillus circulans* D1'den ksilanaz üretiminin Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak optimizasyonu çalışmalarında ksilan konsantrasyon, pH ve fermentasyon süresi olarak üç faktöriyel deney tasarımı kullandıkları görülmüştür. Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlarda pH'nın ksilanaz aktivitesinde önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Optimum ksilan konsantrasyonunda (5g/L) ve fermentasyon süresinde (48 saat) 19,1 U/mL ksilanaz aktivitesi elde edildiği bildirilmiştir.

Katapodis ve arkadaşları (2007) *Chaetomium thermophilum*'dan buğday samanı ile ksilanaz üretiminin Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak optimizasyonu çalışmasını gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada karbon (buğday samanı) ve azot (sodyum nitrat) kaynağı olarak iki faktöriyel deney tasarımı kullanmışlardır. Optimizasyon çalışması sonucunda en yüksek ksilanaz aktivitesini %3,9 (ağırlık/hacim) buğday samanı ve %7 sodyum nitrat (ağırlık/hacim) bulunan ortamlarda 61 U/mL olarak bulmuşlardır.

### **2.3 Ksilanazın Kısmi Saflaştırılması**

Proteinler elde edildikleri ortamda genelde kompleks halde bulunmaktadır. Bu sebeple, hedef proteinin fiziksel-kimyasal-biyolojik özelliklerine bağlı olarak, belirli yöntemler ile saflaştırılması istenmektedir. Yöntem seçiminde dikkat edilen önemli nokta, elde edilmek istenen protein bir enzimse, aktivite kaybının düşük seviyede gerçekleşmesi veya hiç gerçekleşmemesi olmaktadır. Yöntemin seçimindeki bir diğer kriter ise en düşük maliyetle, en yüksek saflığın elde edilebilmesidir (Nelson, 2010; Yıldırım,2010; Toker, 2000).

Yaygın olarak kullanılan amonyum sülfatla çöktürme yöntemi, proteinlerin kısmi saflaştırılmasında kullanılan yöntemlerden biridir. Proteinlerin yüzeyinde hidrofilik ve hidrofobik gruplar bulunmaktadır. Artan miktarda tuz çözeltisinin ortama ilave edilmeye başlamasıyla birlikte proteinlerin çözünürlükleri artar. Tuz çözeltisinin artan

konsantrasyonlarda eklenmeye devam etmesiyle, protein yüzeyinin iç kısmında bulunan hidrofobik kısımlardan su molekülleri uzaklaşır. Su moleküllerinin uzaklaşması ile birlikte hidrofobik kısımlar birbirleri ile etkileşime geçecek ve protein çökelmeye başlayacaktır.

Kısmi saflaştırma yöntemlerinden bir diğeri olan sulu iki faz ayırıştırma, 1950 yılında Albertsson tarafından geliştirilmiştir, fakat aktif kullanımı yakın zamanlarda mümkün olmuştur. Saflaştırma için kullanılmakta olan geleneksel tekniklerin, kolon kromatografisi vb, maliyetleri yüksek olduğu gibi aynı zamanda daha düşük verimler elde edilmesi de söz konusu olabilmektedir. Çalışılacak yapıların hassaslığı dikkate alındığında, protein yapılarının bozulmamasını sağlayan, hızlı çalışılabilecek, maliyeti düşük, çevre dostu olan ayırma tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlar dikkate alındığında sulu iki faz ayırma yöntemi, bu kriterleri taşıyan alternatif yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmada kullanılan Triton-X 114 ( $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_7-8$ ) iyonik olmayan (polar) bir deterjandır. Bazik olmayan bu yapı, hidrokarbon zincirinden oluşmuş hidrofobik (su sevmeyen) ve iyonik uç taşıyan hidrofilik (su seven) olarak iki kısımdan meydana gelmektedir. Suyu seven kısımlar molekülün baş kısmını (polar), suyu sevmeyen kısımlar ise kuyruk kısmını (apolar) oluşturmaktadır. Su içerisindeyken bu kısımlar gruplaşırlar, miselleri meydana getirirler. Miseller hidrofobik kısımların iç tarafta, hidrofilik kısımların dış tarafta toplanması ile bir bulutlanma meydana getirmektedir. Bu bulutlanma çeşitli etkilerle (sıcaklık, pH, tuzlar vb.) artıp, azalabilmektedir (Gupta ve ark., 1999; Bordier, 1980; Yaşınok ve ark., 2010).

Proteinlerin molekül ağırlık ve molekül büyüklük farkından faydalanılarak, santrifüj veya basınç yardımı ile ayrılması işlemi, ultrafiltrasyondur. Yöntem için bir kimyasal ilavesi, farklı teknolojik aşamalar vb. çalışmalar gerekmediğinden, uygulamada kolaylık sunmaktadır. Bu yöntemin çalışma prensibi, yarı geçirgen bir membran içeren bir hücreye konan protein çözeltisi içerisinde küçük moleküllerin, membranın ultramikroskopik porlarından suyla ve tamponla, ortam suyuna geçirilmesi şeklinde olmaktadır (Bacchin ve ark., 1995; Cheryan, 1998; Cuperus, ve ark., 1991).

Kısmi saflaştırma uygulamaları hakkında literatürde çok fazla uygulamanın raporlandığı görülmektedir. Bataillon ve arkadaşlarının (2000) *Bacillus sp.* suşundan ksilanazın

saflaştırılması ve karakterizasyonu için amonyum sülfat çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemini kolon kromatografisi uygulamasından önce, ön saflaştırma şeklinde kullandıkları görülmüştür. 10kDa membran ile ultrafiltrasyon edilen örnek, %80 doygunlukta amonyum ile muamele görmüş ve sırasıyla 1,0, 1,1 kat saflaştırma elde edilmiştir.

Gawande ve Kamat'ın (1999) *Aspergillus sp.* suşundan ksilanazın saflaştırılmasına dair yaptıkları çalışmada da %62-67,5 amonyum sülfat doygunluğunda, 2,15 ve 3,7 kat saflaştırma elde ettikleri görülmüştür.

Kamble ve Jadhav'ın (2012) *Bacillus*'dan ksilanazın saflaştırma ve karakterizasyonu çalışmalarında da %35-80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi ile 1,37 kat saflaştırma elde edilmiştir.

Li ve arkadaşlarına (2010) ait olan *Streptomyces rameus*'dan ksilanazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve buğday samanı hamurundaki beyazlatma etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada %40-60 konsantrasyonda amonyum sülfat çöktürülmesi işleminde 3,5 kat saflaştırmaya ulaşılmıştır.

Salama ve arkadaşları (2008) *Aspergillus versicolor*'dan elde edilen saflaştırılmış hücre dışı ksilanazların biyokimyasal çalışmasını incelediklerinde %80 amonyum sülfat konsantrasyonunda 2,47 kat saflaştırma elde etmişlerdir.

*Rhizopus oryzae*'den elde edilen endo- $\beta$ -1,4-4 ksilanazın üretimi, kısmi saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu üzerinde çalışan Bakır ve arkadaşları (2000), %40-75 amonyum sülfat konsantrasyonunda 2,48 kat saflaştırma elde edilmiştir.

Khandeparkar ve Bhosle'nin (2006) yaptığı çalışma olan *Enterobacter sp.*'den izole edilen termofilik ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonunda 10.000 MW membrandan ultrafiltrasyona tabi tutulmuş örneğe %80 konsantrasyonunda amonyum sülfat ilave etmişlerdir. Bunun sonucunda da %64,8 verim ile 9 kat saflaştırma elde etmişlerdir.

Yaşınok ve arkadaşlarının (2010) *Bacillus pumilus*'tan elde ettikleri ksilanazın gen izolasyonu, enzim üretimi, saflaştırılması, karakterizasyonu ve sulu iki fazlı sistem ile

tek aşamalı ayrılma çalışmalarında polietilen glikol (PEG) ve potasyum tuzu ile oluşturulan sulu iki faz sistemi ile ayrıştırma yapmışlar ve üst fazda 7 kat saflaştırma, %70 verim ile elde etmişlerdir. Alt fazda aktivite görülmemiştir.

Bim ve arkadaşlarının (2000) *Bacillus pumilus*'den elde ettikleri ksilanazın sulu iki faz sistemlerde ekstraksiyonu ve kraft kağıt hamuru ağartma uygulaması çalışmasında fosfat ve polietilen glikol (PEG) ile yapılan sulu iki faz ayırımında %98 verimle 33 kat saflaştırma elde ettiklerini bildirmişlerdir.

## 2.4 Ksilanazın Karakterizasyonu

Enzimlerin en iyi aktivite gösterebildikleri ve denatüre olmadan çalışabildikleri belirli değerler bulunmaktadır. Protein yapıda olan enzimlerin çalışabildiği pH aralığı asidik, bazik ve nötr değerlerde olabilmektedir. Enzimin aktivite gösterdiği pH aralığının bilinmesi, çalışılacak kullanım alanlarının belirlenmesini kolaylaştırmaktadır. Aktif merkezi iyonlaşabilen gruplardan oluşan enzimler, bu özellikleri ile reaksiyonları katalizleyebilir veya substrata bağlanabilirler. Enzimin kullanacağı substratın da iyonlaşabilen gruplara sahip olması halinde, substrat tek iyonik forma sahip enzimle birleşebilecektir. Bu durumda pH değişimi ile birleşmelerde problemler meydana gelecektir (Segel 1993, Shukla ve ark., 2000). Protein yapıda olan enzimlerin sıcaklıklarının artmasıyla aktifliklerinde artış gözlenmektedir. Fakat bir noktadan sonra bu artış durmaktadır. Yüksek sıcaklıkta denatürasyona uğrayan enzimin, aktivitesinde kayıp oluşacaktır. Bunun yanı sıra belli sürede yıktığı substrat miktarı ve tercih ettiği substrat çeşidi de değişiklik göstermektedir. Enzim konsantrasyonunun sabit olduğu durumlarda, substrat konsantrasyonu arttığında aktivite artar. Belli bir noktaya kadar devam eden bu artış daha sonra sabit bir hal alarak devam eder. Reaksiyon hızının maksimum olduğu aktiviteye  $V_{max}$  hız noktası denir.  $V_{max}$  değerinin yarısına karşılık gelen substrat değerine Michaelis sabiti denir ve  $K_m$  ile gösterilir. Bu açılarından bakıldığında enzim karakterizasyonu, çalışmaların pratikleşmesini sağlamaktadır. Aynı şekilde ihtiyaç duyduğu substrat miktarı ve çeşidi enzimin endüstride kullanımı açısından oldukça önemlidir.

Literatüre bakıldığında Susan van Dyk (2010) ve arkadaşları *Bacillus licheniformis*'den kompleks ksilanazın karakterizasyonu çalışmalarında optimum pH 6,0 ve 7,0 arasında, optimum sıcaklığı 55°C bulmuşlardır. Sıcaklık dayanımına bakıldığında ise 55°C sıcaklık ile 2 saat içerisinde aktivitenin %46'sını kaybettiğini görmüşlerdir.

*Humicola insolens*'den iki ksilanazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve özellikleri üzerine yapılan çalışmada Düsterhöft ve arkadaşları (1997), optimum pH ve sıcaklığı, her iki ksilanaz için de (XY11 VE XY12), sırasıyla pH 6-6,5 ve 55-60°C bulmuşlardır. Sıcaklık dayanımında da XY12 60°C'de 45 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybederken, XY11 aynı süre sonunda aktivitesinin %50'sini korumuştur. pH dayanımlarına bakıldığında da alkalın değerlerde XY12'nin XY11'den daha stabil olduğu görülmüştür.

Zhang ve arkadaşlarının (2012) yaptığı çalışma olan tuza dayanıklı *Thermobifida halotolerans*'dan ısıl kararlılığı yüksek ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonunda optimum aktivite 80°C'de, optimum pH 6,0 değerinde bulunmuştur. 70°C sıcaklıkta 1 saat tutulan enzim inhibe olmuştur. Saflaştırılmış enzimin oldukça geniş bir pH aralığında dayanımının olduğu görülmüştür. 12 saat içerisinde enzim aktivitesinin %60'dan fazlasını pH 4,0-10,0 aralığında muhafaza etmiştir.

*Streptomyces rameus*'den ksilanazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve buğday samanı hamurundaki beyazlatma etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada Li ve arkadaşları (2010) substrat seçiciliğinde saflaştırılmış ksilanazın en yüksek aktiviteyi yulaf ksilan ile verdiği görülmüştür. Yine bu çalışmada Michaelis-Menten sabitleri huş ağacı ksilanı için  $K_m$  5,8 mg mL<sup>-1</sup> ve kayın ağacı ksilanı için  $K_m$  5,3 mg mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

*Marasmius sp.*'den elde edilen ısıl kararlılığı yüksek ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında Ratanachomsri ve arkadaşları (2006), saflaştırılan enzimin en yüksek aktiviteyi 90°C sıcaklıkta gösterirken, optimum pH'ı 4,0-8,0 geniş aralıkta gösterdiğini tespit etmişlerdir. Substrat seçiciliğine baktıklarında en yüksek aktiviteyi huş ağacı ksilanında elde etmişlerdir. Huş ağacı kullanılarak incelenen kinetik parametrelerde  $K_m$  2.6±0.6 mg/mL,  $V_{max}$  428±26 U/mg değerleri bulunmuştur.



*Rhizopus oryzae*'dan elde edilen endo- $\beta$ -1,4 ksilanazın üretimi, kısmi saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu üzerinde çalışan Bakır ve arkadaşları (2000), optimum pH'ı 4,5 ve optimum sıcaklığı 55°C bulmuşlardır. Kinetik parametrelerde  $K_m$  18.5 mg/mL,  $V_{max}$  90 IU/mg değerlerine ulaşmışlardır.

*Bacillus pumilus*'dan alkalın ksilanazların karakterizasyonu çalışmalarında Duarte ve arkadaşları (2000) farklı suşlar için optimum pH, 8,0 ve 9,0 olarak bulurken, optimum sıcaklığı 55°C ve 60°C olarak bulmuşlardır.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1 Materyaller**

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Sigma Aldrich (Almanya) ve Merck (Almanya) kimyasal şirketlerinden; lignoselülozik maddelerden mısır koçanı Adapazarı, buğday kepeği Eskişehir, ayçiçeği sapı Kütahya ve pamuk sapı Şanlıurfa illerinden temin edilmiştir.

#### **3.2 Mikroorganizma ve Fermantasyon Koşulları**

Çalışmalarda termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum* ATCC 16454 (*Humicola insolens*) kullanılmıştır. Mikroorganizma YpSs agarda (Ek 1) 45°C sıcaklıkta 3 gün boyunca, spor oluşturma kadar inkübe edilmiştir. Petriler, oda sıcaklığında en fazla 2 ay saklanmıştır.

Ana kültürün aşılınması için ön kültür (Ek 1) hazırlanmıştır. Yapılacak çalışmanın amacına göre gerekli miktar ön kültür kullanılarak, 100 mL ana kültür (Ek 1) aşılınmıştır. Ana kültür ortamında; 100 mL hacim için; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L; CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O, 0,1 g/L olarak sabit tutulurken, çalışmanın amacına göre aşılama oranı 1-3 mL, pH 5-7, sıcaklık 40-50°C, karbon kaynağı (mısır koçanı) 20-40 g/L, azot kaynağı (maya özütü) ise 3-5 g/L aralıklarında değişen değerlerde kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak mısır koçanı öğütülüp, 2 mm elekten geçirilerek ana kültüre eklenmiştir.

#### **3.3 Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

Ana kültür ortamlarından, optimizasyon çalışmaları için her gün, ön saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları için ise en yüksek enzim aktivitesinin gözlenmediği 5. gün örnek alınmıştır. Alınan örnekler 14000 rpm'de 10 dakika, çözünmemiş kısımlarından arındırılmak üzere santrifüjlenmiştir. Pellet kısımları atılmış ve süpernatant kısımları ksilanaz aktivitesi açısından incelenmek üzere ayrılmıştır.

Aktivitenin belirlenmesi için substrat olarak, 50 mM pH 7.0 sodyum fosfat tamponunda %1,0 (a/h) kayın ağacı ksilanı kullanılmıştır (Bailey ve ark., 1992).

Ksilanaz aktivitesi, enzimatik reaksiyon sırasında ortaya çıkan, indirgenmiş şeker konsantrasyonu ölçülerek belirlenmiştir.

Tepkime, her ikisi de 60°C sıcaklıkta dengelenmiş; uygun şekilde seyreltilmiş 1 mL enzim ve 10 mL substratın karıştırılması ile gerçekleştirilmiştir. Uygun zaman aralıklarında tepkime karışımından 1 mL örnek alınmış, alınan örnekler 1,5 mL dinitrosalisilik asit (DNSA) üzerine eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Renk değişiminin görülebilmesi için örnekler 5 dakika süreyle, 100°C su banyosunda tutulmuş ve ardından hemen soğutulmuştur. Daha sonra numunelerin absorbanları bir kör numuneye karşı spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Miller, 1959).

DNSA reaktifi Ek 2'de tarif edildiği gibi hazırlanmıştır. DNSA yönteminde indirgeyici şekerlerin belirlenebilmesi için standart olarak ksiloz kullanılmıştır (Ek 3).

Bir birim ksilanaz aktivitesi (IU); 60°C ve tepkime koşullarında 1 dakikada 1 µmol ksiloz üretebilen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır.

### **3.4 Protein Miktarının Belirlenmesi**

Protein konsantrasyonu standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılarak Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976) (Ek 4).

### **3.5 Ksilanaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu**

*Scytalidium thermophilum*'dan ksilanaz üretiminin optimizasyonu için kültür ortamı bileşenleri ve fermantasyon koşulları Box-Behnken deney tasarım metodu kullanılarak (Box ve Behnken, 1960), Tepki Yüzey Metodolojisi ile (RSM: Response Surface Methodology) istatistiksel olarak incelenmiştir. Çalışmada beş bağımsız değişken; aşı oranı ( $X_1$ ), sıcaklık ( $X_2$ ), pH ( $X_3$ ), karbon kaynağı ( $X_4$ ) ve azot kaynağı ( $X_5$ ) test

edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin seviye ve aralıkları Tablo 3.1’de verilmiştir. Toplamda 46 deney seti, her biri 3 tekrarlı olmak üzere, 6 merkez noktalı Box-Behnken deney tasarım matrisine göre gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 3.1** Box-Behnken deney tasarımı bağımsız değişken değerleri

Bağımsız Değişken	Değişken Adı	Seviye		
		-1	0	+1
X <sub>1</sub>	Aşı Oranı (mL)	1	2	3
X <sub>2</sub>	Sıcaklık (°C)	40	45	50
X <sub>3</sub>	pH	5	6	7
X <sub>4</sub>	Karbon kaynağı (mısır koçanı) (g/L)	20	30	40
X <sub>5</sub>	Azot kaynağı (maya özütü) (g/L)	3	4	5

Ksılanaz aktivitesi veri analizi için Minitab14 istatistik programıyla (ABD) çalışılmıştır. Optimizasyon koşulunun tespiti için aşağıdaki denkleme göre tam ikinci dereceden (full-quadratic) model kullanılmıştır.

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

Eşitlikte, Y, tepki; b<sub>0</sub>, kesişim noktası; b<sub>i</sub>, lineer kat sayılar; b<sub>ii</sub>, üstel katsayılar; b<sub>ij</sub>, etkileşim katsayıları; X, bağımsız değişkenin kodlanmış seviyesi olarak belirtilmiştir.

### 3.6 Kısmi Saflaştırma

Ksılanazın özellikle yüksek saflık derecesine gerek olmayan endüstriyel uygulamalarda kullanımına yönelik olarak üç farklı kısmi saflaştırma yöntemi (amonyum sülfatla çöktürme, sulu iki faz ayırıştırma ve ultrafiltrasyon) çalışılmış ve her bir saflaştırma yöntemi için; spesifik (özgül) aktivite (IU/mg), verim (%) ve saflaştırma oranı (kat) değerleri hesaplanmıştır.

#### 3.6.1 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Ksılanazı kompleks kültür ortamından ayırabilmek amacıyla doymuş amonyum sülfat çözeltisi hazırlanmış ve çözelti 4°C sıcaklıkta tutulmuştur. Çalışılacak ana kültür

süzülmüş, 11000 rpm'de, 4°C sıcaklıkta santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı alınmıştır. 20 mL ham enzim solüsyonuna (süpernatant) %20-80 (a/h) konsantrasyon aralığında çalışılmak üzere doymuş amonyum sülfat çözeltisi ilave edilmiştir. Çözelti, 10 saat süre ile manyetik karıştırıcı üzerinde, 4°C'de karıştırılmış ve 11000 rpm'de santrifüjlenmiştir. İşlem sonunda elde edilen protein pelleti tampon solüsyonunda çözülüş, protein içeriği (Bradford, 1976) ve enzim aktivitesi açısından incelenmiştir. Saflaştırma sonucu ulaşılan özgül (spesifik) aktivite (IU/mg), verim (%) ve saflaştırma oranı (kat) değerleri hesaplanmıştır.

### **3.6.2 Sulu İki Faz Ayrıştırma**

Ksilanazın sulu iki faz tekniği ile kısmi saflaştırılması %2-20 (h/h) TX-114 konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. TX-114, enzim solüsyonuna son konsantrasyonu %2, 5, 10, 20 (h/h) olacak şekilde eklenmiş, köpük oluşturulmadan karıştırılmış ve 37°C sıcaklıkta 3 ile 24 saat arasında değişen sürelerde su banyosunda inkübe edilmiştir. Bekleme süresi sonunda örnekler, 25°C sıcaklıkta 11000 rpm'de tam faz ayrışımının sağlanabilmesi için 60 dakika süreyle santrifüj edilerek, alt (TX-114) ve üst (su) fazları ayrılaştırılmış ve hacimleri tespit edilmiştir. Alınan örnekler protein içeriği (Bradford, 1976) ve enzim aktivitesi açısından incelenmiştir.

Saflaştırma sonucu ulaşılan özgül (spesifik) aktivite (IU/mg), verim (%) ve saflaştırma oranı (kat) değerleri hesaplanmıştır.

### **3.6.3 Ultrafiltrasyon ile Ayrıştırma**

Ultrafiltrasyon için 50 mL hacimde ultrafiltrasyon hücresi ve membranları (Milipore-Amicon, ABD) kullanılmıştır. Çalışmada anakültürden alınan örnek öncelikle kaba filtre kağıdı ile süzülüp santrifüj edilerek hücrelerden ve kaba kirliliklerden ayrıştırılmıştır. Ardından ksilanazın kısmi saflaştırılması için fraksiyonel yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre 10 mL'lik enzim solüsyonu önce 100 kDa cut-off rejener hemiselüloz membrandan geçirilerek, 100 kDa ve üzerindeki molekül ağırlığa sahip proteinler ayrıştırılmıştır. Elde edilen filtrat 30 kDa cut-off membrandan

geçirilerek, 30 kDa ve üzerindeki proteinler ayrılmış, bu ikinci adımda elde edilen filtrat ise 10 kDa cut-off membrandan geçirilmiştir. 10 kDa'dan geçmeyen kısım alınmış, bu sayede ksilanazın da aralarında bulunduğu 10-30 kDa molekül aralığa sahip proteinler ultrafiltrasyon hücresinde elde edilmiştir. Elde edilen bu örnekler protein içeriği (Bradford, 1976) ve enzim aktivitesi açısından incelenmiştir. Saflaştırma sonucu ulaşılan özgül (spesifik) aktivite (IU/mg), verim (%) ve saflaştırma oranı (kat) değerleri hesaplanmıştır.

### **3.7 Karakterizasyon**

#### **3.7.1 Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına pH Etkisi**

Ksilanaz aktivitesine pH'ın etkisi ve optimum pH değerinin bulunması için 2,0-11,0 aralığında farklı pH değerlerinde 1,0 pH birimi aralıklarla, en yüksek aktivitenin gözlemlendiği aralıkta (pH 6,0-8,0) ise 0,5 birim aralıklarla çalışılmıştır. Çalışmalarda enzim konsantrasyonu ve sıcaklık standart aktivite ölçüm metodundaki değerlerde sabit tutulmuştur. Bağıl aktiviter, farklı pH'larda elde edilen aktivite değerlerinin en yüksek enzim aktivitesine oranı hesaplanarak bulunmuştur.

Ksilanazın pH dayanımı; pH 4,0-11,0 aralığında 1 birim aralıklarla ve 4 saat süresince belirli zaman aralıklarıyla örnek alınarak tespit edilmiştir. İnkübasyon sonunda bağıl aktiviter standart aktivite ölçüm metoduna göre belirlenmiş ve bulunan enzim aktiviteri başlangıçtaki en yüksek aktivite değerine oranlanarak sunulmuştur.

#### **3.7.2 Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına Sıcaklık Etkisi**

Ksilanazın optimum çalışma sıcaklığı 30-90°C sıcaklık aralığında, en yüksek aktivite gözlenen bölgede (60-75°C) 5°C aralıklarla tespit edilmiştir.

Çalışmalarda enzim konsantrasyonu ve pH, standart aktivite ölçüm metodundaki değerlerde sabit tutulmuştur. Farklı sıcaklık değerlerinde gözlemlenen aktivite değerleri, en yüksek aktivite değerine oranlanarak bağıl aktiviter hesaplanmıştır.

Sıcaklığın ksilanaz dayanımına etkisinin belirlenebilmesi için ham enzim en yüksek aktivite gösterdiği 50-70°C sıcaklık aralığında 10°C aralıklarla 4 saat süresince inkübe edilmiştir. Farklı sıcaklık uygulamaları sonunda kalan enzim aktiviteleri standart ölçüm yöntemiyle tespit edilmiş ve sıcaklık uygulaması öncesi aktivite değerlerine oranlanarak bağıl aktiviteleri hesaplanmıştır.

### 3.7.3 Kinetik Parametreler

Çalışmada %0,01-2,0 (a/h) ksilan konsantrasyonu aralığında, substrat konsantrasyonu hariç, diğer parametreler sabit tutularak standart aktivite tayin yöntemiyle ksilanaz aktiviteleri belirlenmiştir. Veriler kullanılarak  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk (Lineweaver ve Burk, 1934) grafikleri oluşturularak tespit edilmiştir.

### 3.7.4 Substrat Seçiciliği

Ksilanazın substrat seçiciliğinin tespiti amacıyla ticari substratlar (huş ağacı ksilani, kayın ağacı ksilani, yulaf ksilani, karboksimetil selüloz, avicel, 50mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponunda, %1,0 (a/h) konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Elde edilen substrat çözeltileri kullanılarak standart aktivite tayin yöntemiyle ksilanaz aktiviteleri belirlenmiştir.

Lignoselülozik substratlar olarak; mısır koçanı, ayçiçek sapı, buğday kepeği, pamuk sapı öğütülüp, 2 mm gözenek çaplı elekten geçirilerek kullanılmıştır. Son hacim 50 mL olacak şekilde 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tampon içerisine 0,75 g kuru substrat eklenmiş ve otoklavlanmıştır. Daha sonra substrat karışımına, 0,5 mL ham enzim eklenmiş, 50°C sıcaklıkta 180 rpm çalkalama hızındaki inkübatörde tutularak, belirlenen zaman aralıklarında örnek alınmıştır. Örnekler DNSA metodu ile indirgenmiş şeker içeriği ve buna bağlı olarak ksilanaz aktivitesi açısından incelenmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Ksilanaz Üretim Koşullarının Optimizasyonu

*Scytalidium thermophilum*'dan ksilanaz üretiminin istatistiksel optimizasyonu önemli kültür ortamı bileşenleri ve fermantasyon koşulları (aşı oranı, sıcaklık, pH, karbon kaynağı ve azot kaynağı) her biri 3 tekrarlı olmak üzere, toplamda 46 deney seti ile gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımı ve ilgili rezidü değerleri ile, elde edilen ksilanaz aktivitesi sonuçları Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Yapılan denemeler sonunda 1,86 – 106,02 IU/mL aralığında ksilanaz aktivitesi değerleri bulunmuştur. İkinci derece polinom modeli ile yapılan regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmektedir. Her bir katsayının öneminin ve değişkenler arasındaki etkileşiminin tespit edilmesi için T ve P (olasılık) değerleri kullanılmıştır. Genel olarak P değeri küçük (<0,05) ve T değeri büyük olan durumlarda katsayının önemi de yüksektir. Çizelge 4.2'de verildiği gibi sabit terim ve tüm lineer parametreler çok düşük (<0,001) P değerlerine sahiptir. Bu durum bu terimlerin tepki üzerindeki etkilerinin %0,1 güven seviyesinde olduğunu göstermektedir. Kuadratik terimlerden; aşu oranı (aşu oranı\*aşu oranı), karbon (karbon\*karbon) ve azot (azot\*azot) kaynağının düşük T ve yüksek P (>0,05) değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Sadece iki kuadratik terim (sıcaklık\*sıcaklık), (pH\*pH) küçük P değerine (<0,001) sahip olmaları nedeniyle önemli terimler olarak değerlendirilmiştir. Etkileşim terimleri içinde 5 katsayı; aşu oranı\*sıcaklık, sıcaklık\*pH, sıcaklık\*karbon, sıcaklık\*azot ve pH\*karbon sahip oldukları 0,05'den küçük P değerleri nedeniyle önemli etkiye sahip katsayılar olarak değerlendirilmiştir. P değerleri 0,05'den yüksek olan terimler model denkliğinde kullanılmamıştır. Önemli regresyon parametreleri kullanılarak 2 derece polinom model eşitliği elde edilmiştir (Eşitlik 4.1)

$$Y[\text{Ksilanaz aktivitesi (IU/mL)}] = 64.532 - 8.621 X_1 + 10.140 X_2 + 21.836 X_3 - 10.502 X_4 + 21.311 X_5 - 12.090 X_2^2 - 24.967 X_3^2 - 11.083 X_1X_2 + 14.195 X_2X_3 - 11.910 X_2X_4 + 10.188 X_2X_5 + 13.348 X_3X_4 \quad (4.1)$$

Eksi işaretli olan lineer katsayılar: aşu oranı ve karbon kaynağı konsantrasyonu tepki üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Diğer lineer katsayılar; sıcaklık, pH ve azot kaynağı konsantrasyonu artı işaretli katsayıları nedeniyle tepki üzerinde olumlu etkiye sahiptir.



**Çizelge 4.1** Deneysel tasarımı ve ksilanaz aktivite sonuçları

Set numaraları	Aşı oranı (X <sub>1</sub> )	Sıcaklık (X <sub>2</sub> )	pH (X <sub>3</sub> )	Karbon kaynağı (X <sub>4</sub> )	Azot kaynağı (X <sub>5</sub> )	Deneysel ksilanaz aktivitesi (IU/mL)	Hesaplanan Ksilanaz aktivitesi (IU/mL)	Rezidü
1	-1	-1	0	0	0	44,100	38,130	5,970
2	-1	1	0	0	0	85,410	80,575	4,835
3	1	-1	0	0	0	46,980	43,052	3,928
4	1	1	0	0	0	43,960	41,167	2,793
5	0	0	-1	-1	0	49,930	43,446	6,484
6	0	0	-1	1	0	3,730	-4,253	7,983
7	0	0	1	-1	0	54,880	60,422	-5,542
8	0	0	1	1	0	62,070	66,114	-4,044
9	0	-1	0	0	-1	31,830	29,445	2,385
10	0	-1	0	0	1	46,310	51,693	-5,383
11	0	1	0	0	-1	25,440	29,350	-3,910
12	0	1	0	0	1	80,670	92,348	-11,678
13	-1	0	-1	0	0	9,810	20,959	-11,149
14	-1	0	1	0	0	72,680	71,990	0,690
15	1	0	-1	0	0	7,020	11,076	-4,056
16	1	0	1	0	0	55,170	47,388	7,782
17	0	0	0	-1	-1	49,200	52,737	-3,537
18	0	0	0	-1	1	106,020	97,600	8,420
19	0	0	0	1	-1	31,190	33,974	-2,784
20	0	0	0	1	1	83,530	74,356	9,174
21	0	0	0	0	0	57,590	64,532	-6,942

22	0	0	0	0	0	68,280	64,532	3,748
23	0	0	0	0	0	63,360	64,532	-1,172
24	0	-1	-1	0	0	19,780	9,694	10,086
25	0	-1	1	0	0	24,250	24,976	-0,726
26	0	1	-1	0	0	2,550	1,584	0,966
27	0	1	1	0	0	63,800	73,646	-9,846
28	-1	0	0	-1	0	79,450	87,461	-8,011
29	-1	0	0	1	0	52,310	59,158	-6,848
30	1	0	0	-1	0	61,400	62,919	-1,519
31	1	0	0	1	0	48,860	49,215	-0,355
32	0	0	-1	0	-1	1,860	2,695	-0,835
33	0	0	-1	0	1	19,820	29,927	-9,477
34	0	0	1	0	-1	40,510	30,346	10,164
35	0	0	1	0	1	90,510	88,989	1,521
36	-1	0	0	0	-1	51,020	45,990	5,030
37	-1	0	0	0	1	102,910	93,428	9,483
38	1	0	0	0	-1	27,050	33,563	-6,513
39	1	0	0	0	1	69,310	71,370	-2,060
40	0	-1	0	-1	0	36,340	42,762	-6,422
41	0	-1	0	1	0	35,740	45,578	-9,838
42	0	1	0	-1	0	96,990	86,862	10,128
43	0	1	0	1	0	48,750	42,038	6,712
44	0	0	0	0	0	70,480	64,532	5,948
45	0	0	0	0	0	59,780	64,532	-4,752
46	0	0	0	0	0	67,700	64,532	3,168

**Çizelge 4.2** Ksilanaz aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları

İsmlendirme	Katsayı	SE katsayı	T	P
Sabit	64,532	3,547	18,192	< 0,001
Aşı	-8,621	2,172	-3,969	< 0,001
Sıcaklık	10,140	2,172	4,668	< 0,001
pH	21,836	2,172	10,052	< 0,001
Karbon	-10,502	2,172	-4,835	< 0,001
Azot	21,311	2,172	9,811	< 0,001
Aşı*Aşı	-1,711	2,941	-0,582	0,566
Sıcaklık*Sıcaklık	-12,090	2,941	-4,110	< 0,001
pH*pH	-24,967	2,941	-8,489	< 0,001
Karbon*Karbon	1,868	2,941	0,635	0,531
Azot*Azot	-1,733	2,941	-0,589	0,561
Aşı*Sıcaklık	-11,083	4,344	-2,551	0,017
Aşı*pH	-3,680	4,344	-0,847	0,405
Aşı*Karbon	3,650	4,344	0,840	0,409
Aşı*Azot	-2,408	4,344	-0,554	0,584
Sıcaklık*pH	14,915	4,344	3,267	0,003
Sıcaklık*Karbon	-11,910	4,344	-2,741	0,011
Sıcaklık*Azot	10,188	4,344	2,345	0,027
pH*Karbon	13,348	4,344	3,072	0,005
pH*Azot	8,010	4,344	1,844	0,077
Karbon*Azot	-1,120	4,344	-0,258	0,799

S= 8,689; R-Sq= %94,1; R-Sq(adj)= %89,3

Tespit edilen en yüksek lineer katsayılar pH ve azot kaynağı konsantrasyonuna ait olup, sırasıyla 21,826 ve 21,311 olarak tespit edilmiştir. Yüksek katsayı değerleri nedeniyle denenen 5 bağımsız değişken arasında, tepki üzerine en yüksek etkiyi bu iki parametre göstermektedir (Çizelge 4.2).

Geliştirilen model eşitliğinin uygunluğu determinant katsayısı ( $R^2$ ; R-Sq) ve ayarlanmış determinant katsayısıyla ( $R^2$ ; R-Sq adj) tespit edilir.  $R^2$  değeri %94,1, R-Sq adj. değeri %89,3 olarak bulunmuştur. Bu sonuç tepkideki toplam değişkenliğin %94,1 oranında geliştirilen model eşitliği ile ifade edilebileceğini göstermektedir.

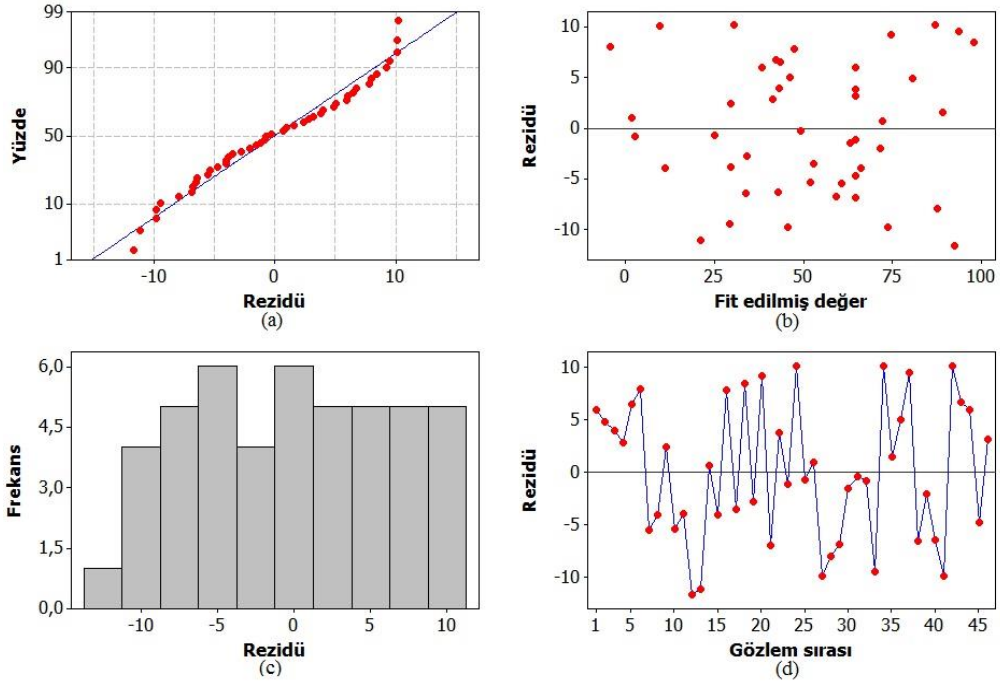
Modelin test edilmesi için Fisher's F-test ve olasılık P incelenmesini içeren varyans analizi de (ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda model eşitlik için çok düşük P ( $>0.0001$ ) ve yüksek F (19,80) değerleri tespit edilmiştir (P değerinin 0,093 olması nedeniyle lack of fit önemsiz bulunmuştur). Bu sonuçlar geliştirilen modelin uygunluğu istatistiksel olarak onaylanmaktadır (Çizelge 4.3).

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğinin incelenmesi için rezidülerin normal olasılık grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.1 a). Rezidü değerleri deneysel olarak tespit edilmiş ksilanaz aktiviteleri ile hesaplanmış ksilanaz aktiviteleri arasındaki fark olup, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Rezidü veri noktalarının grafiği lineer çizgiye yakınsa verilerin normal dağıldığı kabul edilebilir (Jaiswal ve ark., 2012) Şekil 4.1 a'da görüldüğü gibi data noktalarının normal dağıldığı söylenebilir. Hesaplanmış ksilanaz aktivitesi değerlerine karşı bu değerlere ait rezidüler de grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.1 b). Rezidülerin sıfır çizgisinin iki tarafında da rastgele dağılım gösterdiği belirlenmiş, artı veya eksi rezidülerin herhangi birinin daha baskın olmadığı gözlemlenmiştir. Rezidülerin dağılımı Şekil 4.1 c'de verilen histogramda gösterilmiştir. Histogram incelendiğinde -10/ +10 rezidü aralığında simetriye yakın bir dağılım gözlemlenmiştir. 46 veri noktasından, 41'inin +10/-10 rezidü aralığında olduğu görülmüş, 5 veri noktası ise belirtilen aralığın dışında kalmıştır. Verilerdeki rastgele olmayan hataların tespit edilmesi için, rezidü değerleri gözlem sırasına karşı grafiğe geçirilmiştir. Grafikte rezidülerin sıfır çizgisi etrafında rastgele dağılım gösterdiği, gözlem sırasına bağlı herhangi bir artı veya eksi korelasyon olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1 d).

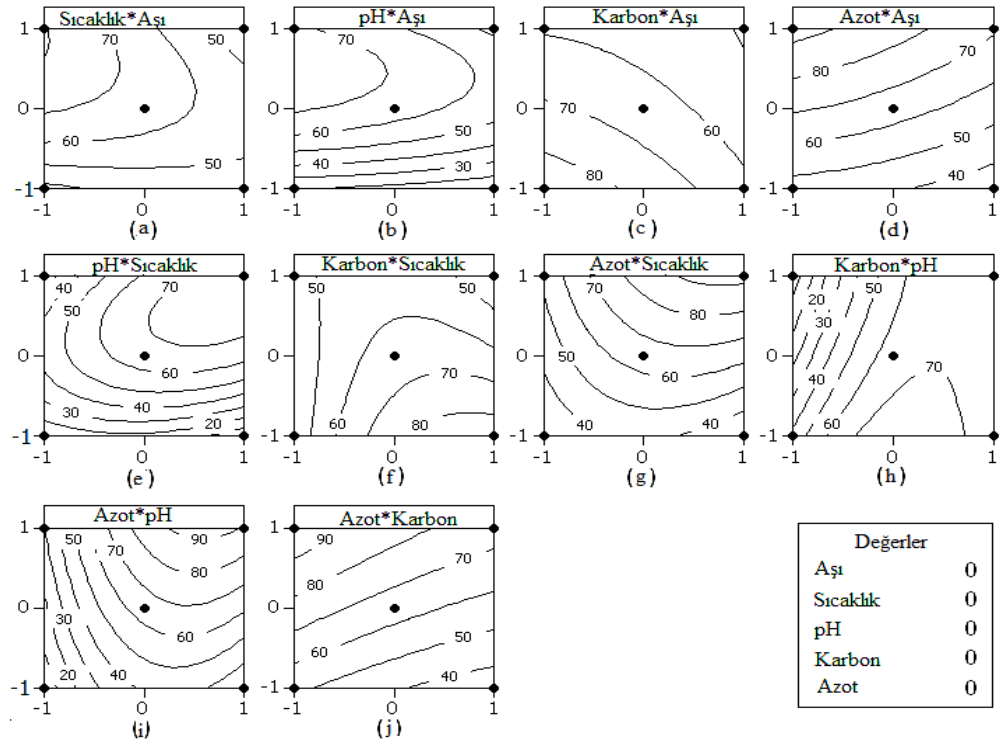
**Çizelge 4.3** Ksilanaz aktivitesi için varyans (ANOVA) analizi

Kaynak	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regresyon	20	29890,2	29890,2	1494,51	19,80	<0,001
Doğrusal	5	19494,4	19494,4	3898,88	51,64	<0,001
Karesi	5	7011,1	7011,1	1402,22	18,57	<0,001
Etkileşim	10	3384,7	3384,7	338,47	4,48	0,001
Rezidü hatası	25	1887,4	1887,4	75,50		
Lack-of-Fit	20	1755,8	1755,8	87,79	3,34	0,093
Saflık hatası	5	131,6	131,6	26,32		
Toplam	45	31777,7				

Bağımsız değişkenlerin ve bu değişkenler arasındaki etkileşimin ksilanaz aktivitesine olan etkilerinin belirlenmesi için kontur grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.2 a-j). Grafikler diğer değişkenler merkez noktada sabit tutulduğunda, sadece iki bağımsız değişkenin ksilanaz aktivitesine etkisini göstermektedir. Grafikler incelendiğinde artan sıcaklık (Şekil 4.2 a,e-g), pH (Şekil 4.2 b,e,h,i) ve azot kaynağı konsantrasyonu (Şekil 4.2 d,g,i,j) ile ksilanaz aktivitesinin arttığı görülmektedir. Buna karşılık aşı oranı (Şekil 4.2 a-d) ve karbon kaynağı konsantrasyonu (Şekil 4.2 c,f,h,j) arttıkça ksilanaz aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Çalışılan sıcaklık aralığında en yüksek ksilanaz aktivitesinin üst limit olan 50°C’de gözlemlenmesi *Scytalidium thermophilum*’un termofilik doğası ile açıklanabilir. Benzer şekilde yüksek azot kaynağı konsantrasyonlarında daha yüksek ksilanaz aktivite değerleri elde edilmiştir. Mikroorganizmalarda azot metabolik olarak biyokütle oluşumu ve protein üretimi için kullanılmaktadır. Genellikle toksik seviyeye kadar fermantasyon işlemlerinde yüksek azot konsantrasyonları tercih edilir.



Şekil 4.1 Rezidülerin dağılım grafikleri: a) normal olasılık rezidü b) fit edilmiş değere karşı rezidüler c) histogram rezidü d) gözlem sırasına karşı rezidü



Şekil 4.2 Bağımsız değişkenler ve aralarındaki etkileşimlere göre çizilmiş kontur plotlar

Sıcaklık, pH ve azot kaynağı konsantrasyonunun aksine aşı oranı ve karbon kaynağı konsantrasyonu ksilanaz üretimi üzerinde olumsuz etki göstermiştir. *Scytalidium thermophilum* aerobik bir mikroorganizmadır. Aşı oranı arttıkça kültür ortamındaki mikroorganizma konsantrasyonunda artar ve bu durum oksijen ihtiyacının artmasına neden olur. Ortamdaki oksijen çok sayıdaki mikroorganizma tarafından çabuk tüketildiğinde stres koşulu oluşur, mikrobiyal çoğalma oksijen stresi nedeniyle inhibe edilir ve sonuç olarak ksilanaz üretimi azalır. Yüksek karbon kaynağı konsantrasyonları genelde mikroorganizmalar tarafından tercih edilen bir durumdur. Ancak karbon kaynağının metabolik süreçlerde tüketiminde fiziksel yapısı büyük önem taşır. Çalışmada karbon kaynağı olarak kullanılan 2 mm'den küçük mısır koçan partiküllerinin çalkalama sırasında küf miselleri üzerine bir mekanik kuvvet uyguladığı ve bu etki nedeniyle mikrobiyal çoğalmanın, dolayısıyla ksilanaz üretiminin inhibe edildiği düşünülmektedir.

Kontur grafik kullanılarak optimum kültür ortamı kodlanmış şekilde  $X_1=-1$ ,  $X_2=+1$ ,  $X_3=+1$ ,  $X_4=-1$ ,  $X_5=+5$  olarak bulunmuştur. Belirlenen bu optimum koşulda tepki (ksilanaz aktivitesi) ikinci derece polinom model denkliği olan model denkliği kullanılarak (Eşitlik 4.1) 133,91 IU/mL olarak hesaplanmıştır.

#### **4.2 Teorik Bulguların Doğrulanması**

Modelin hassasiyetinin kontrol edilmesi için ksilanaz üretimi belirtilen optimum fermantasyon koşullarında 5 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve en yüksek ksilanaz aktivitesi fermantasyonunun 5. gününde ortalama 134,09 IU/mL olarak gözlemlenmiştir. Model denkliğinden hesaplanan 133,91 IU/mL ksilanaz aktivitesi değeri ile oldukça yakın bir sonuç elde edilmiş, modelin hassasiyetinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

### 4.3 Kısmi Saflaştırma

#### 4.3.1 Amonyum Sülfatla Çöktürme

Ksilanazın amonyum sülfatla çöktürme ile kısmi saflaştırılmasında %20-80 (a/h) konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Başlangıçta %20'lik konsantrasyon aralıkları ile çalışılmış (Çizelge 4.4), daha sonra en yüksek aktivite elde edilen %30-60 bölgesinde %10'luk konsantrasyon aralıklarında çalışılarak (Çizelge 4.5) incelemeler yapılmıştır.

**Çizelge 4.4** %20-80 konsantrasyon ağırlığında amonyum sülfat ile çöktürme

Ham Enzim Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)	Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%)	Süpernatant Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)	Çökeltide Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)
530,42	20	178,4	16,7
	40	0	216,2
	60	0	253,7
	80	0	230,6

Bu deneylerin sonucunda, %20 konsantrasyon değerlerinde çökeltme tamamlanmazken, en yüksek aktivitenin de %60 konsantrasyonda elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.4). Çalışılan bütün konsantrasyon değerlerinde başlangıç aktivitesinin yarıdan fazlası kaybolmuştur. Bu durumun, enzimin tuz toleransının düşük olması sebebiyle ya da 10 saatlik çöktürme işlemi esnasında meydana gelen mekanik etkiden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. %20 ve %30 konsantrasyonlarında çökeltmenin tamamlanmadığı görülmektedir.

**Çizelge 4.5** %30-60 konsantrasyon aralığında amonyum sülfat ile çöktürme

Ham Enzim Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)	Amonyum Sülfat Konsantrasyonu (%)	Süpernatant Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)	Çökeltide Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)
373,7	30	62,9	97,3
	40	0	166,4
	50	0	190,0
	60	0	174,3



Ekonomik açıdan uygunluğun önemli olması sebebiyle en yüksek aktivitenin elde edilebileceği, en düşük konsantrasyon değerleri ile çalışılması tercih edilmektedir. Sonuç olarak, %50 amonyum sülfat konsantrasyonunda yaklaşık %52 verim ile 2,5 kat saflaştırma elde edilmiştir (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6** %50 amonyum sülfat konsantrasyonu için saflaştırma tablosu

Saflaştırma adımı	Hacim (mL)	Ksilanaz Aktivitesi (U)	Toplam ksilanaz aktivitesi (U)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Toplam protein miktarı (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma oranı (kat)
Ham enzim	100	42,4	4245	0,852	85,2	49,8	100	1
%50 amonyum sülfat çöktürmesi	8	276,6	2213,2	2,196	17,5	125,9	52	2,5

#### 4.3.2 Sulu İki Faz Ayrıştırma

Ksilanazın sulu iki faz tekniği ile kısmi saflaştırılması %2-20 (h/h) TX-114 konsantrasyon aralığında 3-24 saatlik inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. %2 TX-114 konsantrasyonun çalışılan koşullarda ksilanaz için saflaştırma sağlamamıştır. %5 ve üzeri konsantrasyonlarda ise TX-114 konsantrasyonu arttıkça saflaştırma katının arttığı, buna karşılık enzim veriminin düştüğü gözlemlenmiştir (Çizelge 4.7). En yüksek saflaştırma sonucu %10-20 konsantrasyon aralığında gözlemlenirken, özellikle %20 koşulunda, enzim veriminin çok düştüğü görülmüştür. Ayrıca, %20 TX-114 koşulunda konsantrasyonun yüksek olması nedeniyle faz ayrışmasında problem yaşanmıştır.

**Çizelge 4.7** %2-20 TX-114 konsantrasyonu aralığında sulu iki faz ayrıştırma

TX-114 konsantrasyonu (%)	Verim (%)	Saflaştırma oranı (kat)
2	67,0	0,9
5	34,5	1,1
10	47,7	1,8
20	16,1	1,9

Bu sebeple, %5-10 aralığında farklı konsantrasyon değerlerinde ve farklı deney inkübasyon sürelerinde çalışma yapılmıştır. En iyi sonuca, %7 TX-114 konsantrasyonunda 37°C’de 24 saat inkübasyon süresi ile ulaşılmıştır.

Sonuç olarak %7 TX-114 konsantrasyonunda yaklaşık %79 verim ile 2,7 kat saflaştırma elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8** %7 TX-114 konsantrasyonunda 24 saatlik sulu iki faz ayırıştırma tablosu

Saflaştırma adımı	Hacim (mL)	Ksilanaz Aktivitesi (U)	Toplam ksilanaz aktivitesi (U)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Toplam protein miktarı (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma oranı (kat)
Ham enzim	8	32,6	261,2	1,114	8,9	29,3	100	1
%7 Triton-X 114	11	18,8	207,2	0,236	2,5	79,8	79	2,7

#### 4.3.3 Ultrafiltrasyon ile Ayırıştırma

Son olarak üç aşamalı gerçekleştirilen kısmi saflaştırma yöntemlerinden ultrafiltrasyon işlemlerinde, birinci aşama olan 100 kDa'lık membran kullanılması ile %80 verim, 1,4 kat saflaştırma elde edilebilmiştir. Ardından 2. aşama olarak denenecek 30 kDa membran ile %53 verim elde edilerek, 1,8 kat saflaştırmaya çıkılabilmektedir. Son aşama olan 10 kDa'lık membranın kullanılması ile başlangıca göre %25 verimle 4,3 kat saflaştırmaya ulaşılabilmektedir (Çizelge 4.9). Ancak ham enzim solüsyonunda, ksilanazın yanında selülazın da aktivite (0.42 IU/mL) gösteriyor olması sebebiyle, selüloz bazlı membranlar zarar görmüştür. Normal şartlarda tekrar kullanılma imkanı bulunan membranın zarar görüyor olması, maliyeti ve dolayısıyla tekniğin uygulanabilirliği açısından dezavantaj oluşturmaktadır.

**Çizelge 4.9** Üç aşamalı ultrafiltrasyon tekniği ile saflaştırma tablosu

Saflaştırma adımı	Hacim (mL)	Ksilanaz Aktivitesi (U)	Toplam ksilanaz aktivitesi (U)	Protein konsantrasyonu (mg/mL)	Toplam protein miktarı (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Verim (%)	Saflaştırma oranı (kat)
Ham enzim	10	72,6	726	0,370	3,7	196,2	100	1
100 kDa filtrat	8	72,7	582,1	0,263	2,1	276,7	80	1,4
30 kDa filtrat	7	54,5	382,0	0,154	1,0	354,3	53	1,8
10 kDa retantat	3	61,4	184,2	0,007	0,2	841,1	25	4,3

Ön saflaştırma tekniklerinden, üç farklı uygulama sonuçları karşılaştırıldığında, en yüksek saflaştırma performansının ultrafiltrasyon tekniğiyle elde edildiği görülmektedir. Fakat bu teknikle elde edilen verim oldukça düşüktür. Verim açısından ele alındığında, başlangıç aktivitesinin %79'unun korunduğu teknik olan sulu iki faz ayrıştırmanın daha avantajlı olduğu görülmektedir. Amonyum sülfat çöktürmesi ise hem ekonomik olması açısından hem de orta seviyede verim sağlanması açısından kullanılabilir bir teknik olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.10).

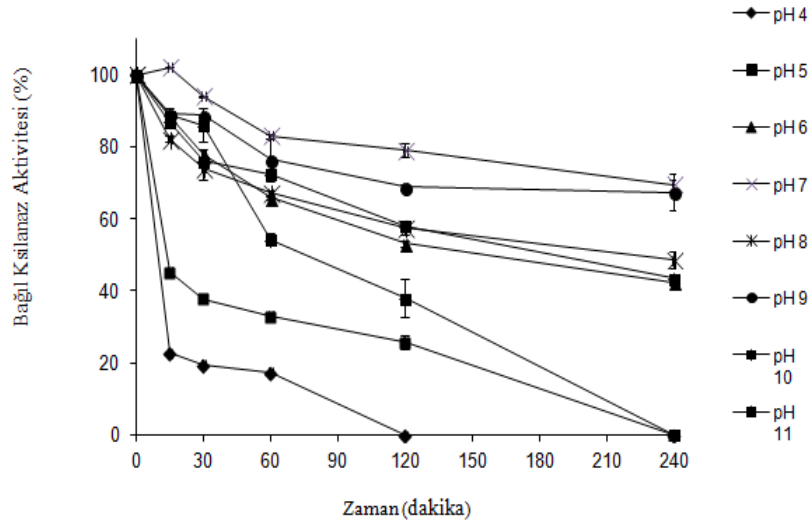
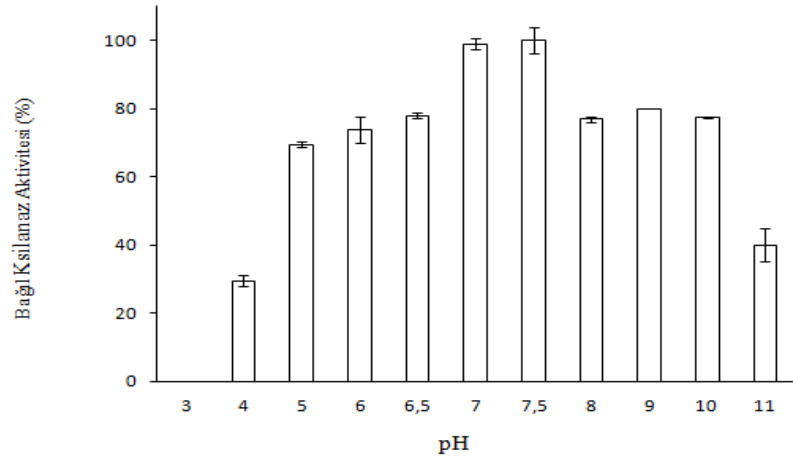
**Çizelge 4.10** Ön saflaştırma tekniklerine ait özet sonuçlar

Ön saflaştırma tekniği	Verim (%)	Saflaştırma oranı (kat)
Amonyum sülfatla çöktürme	52	2,5
Sulu iki faz ayrıştırma	79	2,7
Ultrafiltrasyon	25	4,3

#### 4.4 Karakterizasyon

##### 4.4.1 Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına pH Etkisi

Enzimler belirli pH aralığında aktivitelerini devam ettirebilirken, en yüksek aktiviteyi gösterdikleri belli bir değer vardır. Bu durum, enzimin kullanılacağı alana göre seçilmesinde kolaylık sağlamaktadır. Çalışmamızda ham enzim en yüksek aktivite değerini pH 7-7,5 aralığında göstermiştir (Şekil 4.3 a). Ksilanazın bazik bölgede (6-10) dayanımı yüksek iken, asidik bölgede (pH 4-5) daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3 b). Enzimin bazik bölgede dayanımının yüksek olması özelliği, üretim sürecinde bazik ortam koşullarına sahip kağıt endüstrisi için avantaj sağlamaktadır. Ham enzimin en yüksek dayanımı pH 7'de gösterdiği tespit edilmiştir. pH 7'de 4 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin yaklaşık %70'ini korumuştur.

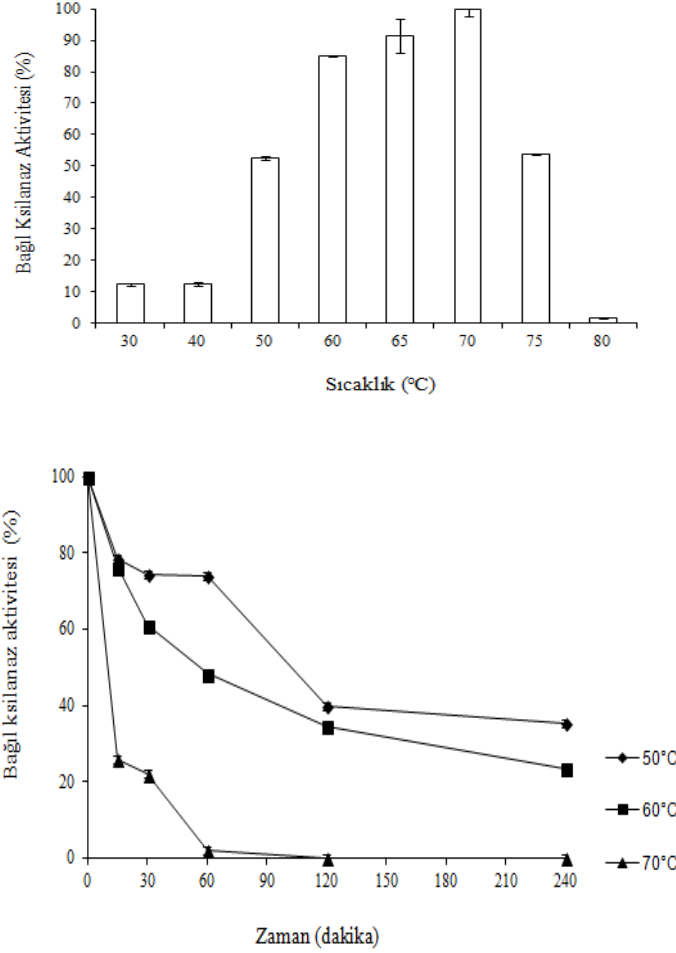


Şekil 4.3 Ham ksilanaz aktivitesi ve dayanımına pH etkisi

#### 4.4.2 Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımına Sıcaklık Etkisi

Termofilik bir küften elde edilen ham ksilanazın optimum aktivite gösterdiği çalışma sıcaklığı 70°C olarak bulunmuştur. Ham enzim sıcaklık dayanımına 50-70°C sıcaklık aralığında bakıldığında ise 50°C'de 1 saat inkübasyon sonucunda aktivitenin yaklaşık %75'ini koruduğu görülmüştür. Bunun karşılığında ham enzimin en yüksek aktivite gösterdiği 70°C'de 1 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin tamamını kaybettiği görülmüştür (Şekil 4.4 b). Enzimin endüstride ağartma işlemi ve gıda sanayisinde

hamur hacminin artırılması işlemlerinde kullanıldığı düşünüldüğünde, yüksek sıcaklıkta da çalışabiliyor olmasının önemli olduğu görülmektedir.

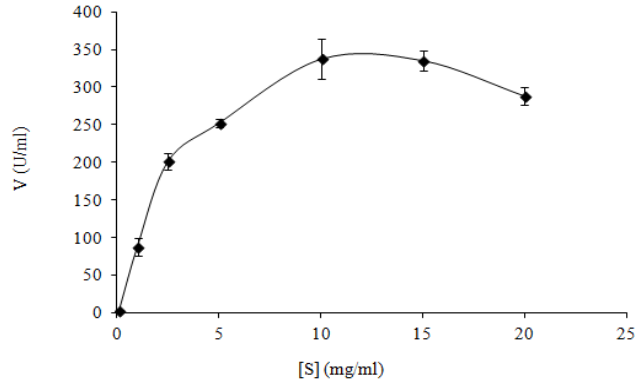


Şekil 4.4 Ham ksilanaz aktivitesi ve dayanımına sıcaklığın etkisi

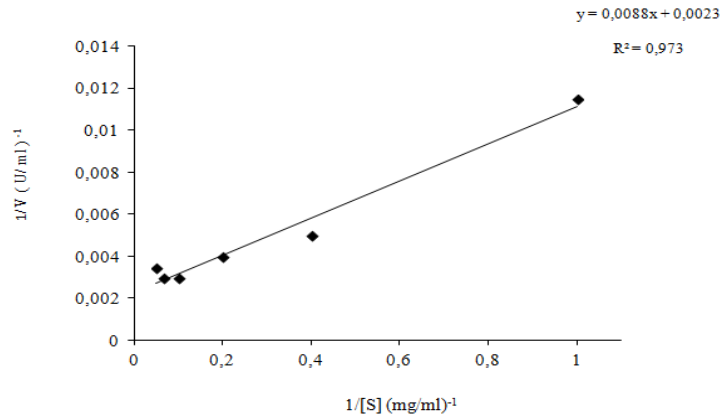
#### 4.4.3 Kinetik Parametreler

Ham ksilanazın kinetik parametrelerinin tespiti için 0,1-20mg/mL ksilan konsantrasyonu aralığında çalışılmıştır. Veriler Michaelis-Menten profiline uyumludur (Şekil 4.5 a). Ham enzimde belirgin şekilde, yüksek ksilan konsantrasyonlarında (>10 mg/mL) substrat inhibisyonu gözlemlenmiştir. Kinetik parametrelerin ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) hesaplamaları Lineweaver-Burk grafiğinden (Şekil 4.5 b) yapılmıştır. Ham enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla 1,93mg/mL ve 347,1U/mL olarak tespit edilmiştir.  $K_m$ 'in

küçük olması, elde edilen enzimin düşük substrat konsantrasyonlarında yüksek aktivite sağladığını göstermektedir.



(a)



(b)

Şekil 4.5 Ham enzimin; a) Michaelis-Menten ve b) Lineweaver-Burk grafikleri

#### 4.4.4 Substrat Seçiciliği

Ticari substratlar arasında, ksilanaz, huş ağacı ksilanında en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Çizelge 4.11). Bunun yanında yulaf ve kayın ağacı ksilanına da oldukça yüksek (>%90) aktivite göstermektedir. Ticari ksilanlardan huş ağacı ksilanı ve yulaf ksilanı üretimde olmadığından eldesi mümkün olmamaktadır. Bu sebeple yüksek aktivite elde edilmiş olmasına rağmen kullanımı söz konusu olamamaktadır. Ham enzim

solüsyonunun avicel ve CMC üzerinde de katalitik etkisi olduğu görülmüştür. Lignoselülozik yapılarda en yüksek aktivite mısır koçanında (%25) görülmüştür.

**Çizelge 4.11** Ham ksilanazın substrat seçiciliği

Substratlar	Ksilanaz aktivitesi (IU/mL)	Bağıl ksilanaz aktivitesi (%)
<b><i>Ticari</i></b>		
Huş ağacı ksilanı	120,52	100,00
Yulaf ksilanı	115,40 ± 5,87	95,75 ± 4.87
Kayın ağacı ksilanı	112,18 ± 3,79	93,08 ± 3,14
Avicel	6,26 ± 2,47	5,19 ± 2.05
Karboksimetil selüloz	1,33 ± 0,33	1,10 ± 0,27
<b><i>Lignoselülozik</i></b>		
Buğday kepeği	3,25	100,00
Mısır koçanı	0,82 ± 0,09	25,23 ± 2,77
Ayçiçeği sapı	0,20 ± 0,00	6,15 ± 0,00
Pamuk sapı	0,15 ± 0,04	4,62 ± 1,23

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Scytalidium thermophilum*'dan üretilen ksilanazın, kültür ortamı koşulları optimize edilmiştir. Optimize edilen ksilanaza bir sonraki aşamada kısmi saflaştırma tekniklerinden, amonyum sülfatla çöktürme, sulu iki faz ayrıştırma ve ultrafiltrasyon teknikleri uygulanmıştır. Son olarak karakterizasyonu için optimum pH ve sıcaklık ile pH ve sıcaklık dayanımı değerleri tespit edilmiş, substrat seçiciliği ve kinetik parametreleri incelenmiştir.

Literatüre bakıldığında Jatinder ve arkadaşlarının (2006) *Scytalidium thermophilum*'dan selülotik ve hemiselülotik enzimlerin üretimi için kültür ortamı koşullarını optimize ettikleri görülmektedir. Gerçekleştirdikleri çalışmada 3 faktöriyel deney tasarımı (aşu oranı, amonyum sülfat ve pH) kullandıkları görülmüştür. Bu tez çalışmasında ise 5 faktöriyel deney tasarımı metodu kullanılmış ve belirtilen çalışmadan farklı olarak sıcaklık, karbon ve azot kaynağı konsantrasyonları da optimizasyon çalışmalarına dahil edilmiştir. Jatinder ve arkadaşları (2006) optimize ettikleri koşullarda yaklaşık 196 IU/g substrat ksilanaz aktivitesi elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise optimize edilen koşullarda 134,09 IU/mL ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir, bu değer aynı zamanda 6704,5 IU/ g mısır koçanı olarak ifade edilebilmektedir. Substrata bağlı olarak verilen bu aktivite değeri Jatinder ve arkadaşlarının (2006) elde ettikleri aktivite değerinden oldukça yüksektir. Bunun nedeninin farklı bir *Scytalidium thermophilum* suşu, farklı fermantasyon koşulları, farklı fermantasyon sıcaklığı ve pH'ı ile farklı karbon ve azot kaynağı kullanılması olabileceği düşünülmüştür.

Jatinder ve arkadaşları (2006) çalışmalarında *Scytalidium thermophilum*'dan ksilanazın üretiminde karbon kaynağı olarak buğday kepeği ve pirinç samanı kullanmışlardır. Bu çalışmada ise, karbon kaynağı için mısır koçanları kullanılmıştır. Bu çalışmanın karakterizasyon safhasında substrat seçiciliğine bakıldığında buğday kepeğinden en yüksek aktivite elde edilmiştir (Çizelge 4.11). Bu açıdan bakıldığında çalışma literatür ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda karbon kaynağı olarak mısır koçanlarının tercih edilmesiyle, atık bir halde olan ve kullanımı olmayan bir ürünün değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



Bocchini ve arkadaşlarının (2002) batık kültür tekniği ile *Bacillus circulans* D1'den ksilanaz üretiminin Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak optimizasyonu çalışmalarında ksilan konsantrasyonu, pH ve fermentasyon süresi olarak üç faktöriyel deney tasarımı kullandıkları görülmüştür. Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlarda pH'nın ksilanaz aktivitesinde önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir. Optimum ksilan konsantrasyonu (5g/L) ve fermentasyon süresi (48 saat) 19,1 U/mL ksilanaz aktivitesi elde edildiği bildirilmiştir. Bocchini ve arkadaşlarının (2002) aksine bu çalışmada pH'nın enzimin aktivitesini yüksek derecede etkilediği bulunmuştur.

Katapodis ve arkadaşları (2007) *Chaetomium thermophilum*'dan buğday samanı ile ksilanaz üretiminin Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak optimizasyon çalışmasını gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada karbon (buğday samanı) ve azot (sodyum nitrat) kaynağı olarak iki faktöriyel deney tasarımı kullanmışlardır. Optimizasyon çalışması sonucunda en yüksek ksilanaz aktivitesini %3,9 (a/h) buğday samanı ve %7 sodyum nitrat (a/h) bulunan ortamlarda 61 U/mL olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda, Katapodis ve arkadaşlarının (2007) kullandığı karbon ve azot kaynağından farklı olarak mısır koçanı ve maya özütü kullanılmış ve daha yüksek aktivite değeri elde edilmiştir.

Sonuç olarak optimizasyon çalışması sayesinde elde edilen ksilanaz aktivitesinin, başlangıç koşullarındaki değerinin (67,531 IU/mL) yaklaşık olarak iki katına (134,09 IU/mL) ulaşılmıştır.

Küfler üzerinde yapılan benzer çalışmalar, kullandıkları karbon kaynakları kullanımları dikkate alınarak araştırılmıştır. Literatür taramasında Lenartovicz ve arkadaşları (2002), De Souza ve arkadaşları (1999) ile Gomes ve arkadaşları (1993), %3 (a/h) konsantrasyonunda mısır koçanı kullanmışlardır. Üç kaynakta da ksilan kaynağı olarak huş ağacı ksilanı kullanılmış ve sırasıyla 125 (IU/mL), 190 (U/mL) ve 1438,7 (U/mL) maksimum ksilanaz aktivitesi buldukları bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda optimizasyon koşulları sonunda %1 (a/h) konsantrasyonunda mısır koçanı kullanılmış ve 134,09 (IU/mL) aktivite elde edilmiştir.

Anthony ve arkadaşları (2003), Coelho ve Carmona (2003) ve Knob ve arkadaşları (2008) çalışmalarında %1 (a/h) konsantrasyonunda mısır koçanı ile çalışmışlardır.

Ksilanaz aktivitesi için Anthony ve arkadaşları (2003) yulaf ksilanı, Coelho ve Carmona (2003) ve Knob ve arkadaşları (2008) huş ağacı ksilanı kullanmışlardır. Bu çalışmalarından sırasıyla 19,3 (IU/mL), 7,54 (IU/mL) ve 0,89 (IU/mL) aktivite elde ettiklerini belirtmişlerdir. Aynı karbon kaynağı ve yüzdesi kullanılmasına rağmen farklı sonuç elde edilmesi organizmaların çeşitliliğinden ve farklı fermentasyon koşullarından kaynaklanabilmektedir.

Ksilanazın saflaştırma uygulamaları için literatüre bakıldığında, Bataillon ve arkadaşlarının (2000) *Bacillus* sp. suşundan ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu için amonyum sülfat çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemini kolon kromatografisi uygulamasından önce, ön saflaştırma şeklinde kullandıkları görülmüştür. 10kDa membran ile ultrafiltrasyona tabi tutulan örnek, %80 doygunlukta amonyum sülfat ile muamele görmüş ve sırasıyla 1,0, 1,1 kat saflaştırma elde edilmiştir. Khandeparkar ve Bhosle' nin (2006) yaptığı çalışma olan *Enterobacter sp.*'den izole edilen termofilik ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonunda 10.000 MW membrandan ultrafiltrasyon edilmiş örneğe, %80 konsantrasyonunda amonyum sülfat ilave etmişlerdir. Bunun sonucunda da %64,8 verim ile 9 kat saflaştırma elde etmişlerdir. Bu uygulamalarda iki teknik ardı ardına kullanılmıştır. Görüldüğü gibi, bu iki işlem sırasıyla uygulandığında saflaştırma katı daha yüksek çıkmaktadır. Tekniklerin peş peşe kullanılmasıyla, daha sonra yapılacak kolon çalışmalarından elde edilecek verimin artırılması sağlanabilecektir. Fakat böyle ardı ardına gerçekleştirilen uygulamalarda, enzimin aktivitesinin kayboluyor olması sorun oluşturabilmektedir.

Bu çalışmada, ekonomik olan ve pratik uygulanabilen tekniklerle, yüksek verim ve yüksek saflaştırma katı elde edilebilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda, ultrafiltrasyon tekniğinde en yüksek saflaştırma katı (4,3) elde edilirken, aktivitenin yarısından fazlasını kaybettiği görülmüştür. Membranlar ve basınç yardımı ile uygulanan ultrafiltrasyon tekniğinde, *Scytalidium thermophilum*'un ksilanazın yanı sıra selülaz salgılaması sonucunda, selüloz yapıdaki membranlar yıkıma uğramış ve özelliğini yitirmiştir. Bu durum sonucunda, herhangi başka kimyasala ihtiyaç duymadan uygulanacak olan bu teknikte, beklenen pratik çalışma ile yüksek verim elde edilememiştir. Örneğin membrandan uzun sürede geçmesi ve membran üzerinde

katman oluşumunu engelleyen karıştırıcının mekanik etkisi sebebiyle enzimin aktivitesinde kayıp görülmektedir. Bu durum, tekniğin uzun sürelerde ve büyük ölçeklerde kullanılmasında sağlıklı sonuçlar alınamayacağını göstermiştir.

Yine literatürde Salama ve arkadaşları (2008) *Aspergillus versicolor*'dan elde ettikleri ksilanazı 2,47 kat saflaştırmışlardır. Burada da %80 konsantrasyonda amonyum sülfat kullanımı söz konusu olmuştur. Amonyum sülfat konsantrasyonunun minimum olması, ekonomik olması açısından, tercih edilmektedir. Büyük ölçeklerde örneğin işleme tabi tutulacağı endüstriyel çalışmalarda yüksek amonyum sülfat kullanılması ekonomik olmayacaktır. Çalışmamızda 2,5 kat saflaştırmanın %50 konsantrasyonda amonyum sülfatla, literatürlere göre daha ekonomik bir miktarla elde edilebildiği görülmektedir. Tuz ile çöktürme sonucunda başlangıç aktivitesinin yarısının korunduğu görülmüştür. Burada meydana gelen kayıp, teknik gereği işlemlerin -4°C'de, belirli süre devam etmesinden kaynaklanabilmektedir. Ayrıca yine karıştırıcı ile müdahale edilmesi de enzimleri olumsuz etkilemektedir. Bu tarz etkiler enzimlerin denatüre olmasına neden olmaktadır ve aktivite kaybına sebebiyet vermektedir. Amonyum sülfat ile saflaştırmasının ardından tuzların diyaliz ile ayrılması, selüloz bazlı diyaliz membranı kullanılarak mümkün olmadığından bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden bu tekniğin ardından direkt amonyum sülfat ile çalışan kolon kromatografisi uygulanması oluşan sorunun giderilmesinde çözüm olabilecektir.

Kamble ve Jadhav'ın (2012) *Bacillus*'dan ksilanazın saflaştırma ve karakterizasyonu çalışmalarında da %35-80 doygunlukta amonyum sülfat çöktürmesi ile 1,37 kat saflaştırma, *Rhizopus oryzae*'dan elde edilen endo- $\beta$ -1,4-4 ksilanazın üretimi, kısmi saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu üzerinde çalışan Bakır ve arkadaşları (2000), %40-75 amonyum sülfat konsantrasyonunda 2,48 kat saflaştırma elde etmişlerdir. Bunun karşısında, Li ve arkadaşlarına (2012) ait olan *Streptomyces rameus*'dan ksilanazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve buğday samanı hamurundaki beyazlatma etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada %40-60 konsantrasyonda amonyum sülfat çöktürülmesi işleminde 3,5 kat saflaştırılma, Gawende ve Kamat'ın (1999) *Aspergillus sp.* suşundan ksilanazın saflaştırılmasına dair yaptıkları çalışmada da

%62- 67,5 amonyum sülfat doygunlukta, 2,15 ve 3,7 kat saflaştırma elde ettikleri görülmüştür.

Son kısmi saflaştırma tekniği olan sulu iki faza ayırmada kullanılan iyonik olmayan yapıdaki detarjanın, TritonX-114, enzimin yapısını denatüre etmemesiyle ve işlemler esnasında enzimlerin yapısını bozabilecek uygulamaların olmaması nedeniyle, başlangıç aktivitesinin büyük oranda (%79) korunması mümkün olmuştur. Triton-X 114'den %7 konsantrasyonda kullanılmasıyla 2,7 saflaştırma katı elde edilmiştir. Sıvı ortamdan elde edilen ham enzim örneğinin herhangi başka bir muameleye maruz bırakılmadan, triton ilavesi ile direkt olarak saflaştırılması tekniği, diğer tekniklere göre, oldukça pratiktir. Yaşınok ve arkadaşları (2010) *Bacillus pumilus*'tan elde ettikleri ksilanazın gen izolasyonu, enzim üretimi, saflaştırılması, karakterizasyonu ve sulu iki fazlı sistem ile tek aşamalı ayrılma çalışmalarında polietilen glikol (PEG) ve potasyum tuzu ile oluşturulan sulu iki faz sistemi ile ayırıştırma yapmışlar ve üst fazda 7 kat saflaştırma, %70 verim ile elde ederken, Bim ve arkadaşları (2000) *Bacillus pulmilus*'tan elde ettikleri ksilanazın sulu iki faz sistemlerde ekstraksiyonu ve kraft kağıt hamuru ağartma uygulaması çalışmasında fosfat ve polietilen glikol (PEG) ile yapılan sulu iki faz ayırımında %98 verimle 33 kat saflaştırma elde etmişlerdir. Bizim çalışmamızda elde edilen verim yüksek (%79) olsa da, literatürde farklı uygulamalarla yapılan sulu iki faz ayırmalarda daha yüksek saflaştırma katı elde edilebildiği görülmektedir. Üç kısmi saflaştırma tekniğinin peş peşe uygulanması ile daha sonra yapılacak kromotografik yöntemlerde daha fazla saflaştırma katı elde edilebilmesi mümkün olabilecektir. Fakat enzimin başlangıç aktivitesinde meydana gelen kayıplar, uzun vadeli uygulamalarda bunu mümkün kılmamıştır.

Ham enzimin karakterizasyonu için pH ve sıcaklık optimum ve dayanımlarına bakılmıştır. Bu çalışmada, ksilanazın bazik pH değerlerinde dayanımı yüksekken, en yüksek dayanımı pH 7-7,5 değerinde göstermiştir. Düsterhöft ve arkadaşlarının (1997) *Humicola insolens*'den (*Scytalidium thermophilum*) iki ksilanazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve özellikleri üzerine yapılan çalışmada, optimum pH her iki ksilanaz içinde (XY11 VE XY12), pH 6-6,5 bulunurken, pH dayanımlarına bakıldığında da alkalın değerlerde XY12'nin XY11'den daha stabil olduğu görülmüştür. *Humicola*

*insolens*'den elde edilen bu sonuçların, çalışmamız sonuçları ile paralel olduğu görülmektedir. Optimizasyon basamağında bağımsız değişkenlerin ve bu değişkenler arasındaki etkileşimin ksilanaz aktivitesine olan etkilerinin belirlenmesi için çizilmiş kontur grafiklerinde de, kültür ortamı pH değerinin 5,0'dan 7,0'a çıkarılmasında gözlemlenen ksilanaz aktivitesinde artış sağlandığı görülmüştür. Bunun nedeninin, *Scytalidium thermophilum* ksilanazın hücre dışı bir enzim olduğu düşünülmüştür. Hücre dışı enzimler alışık oldukları hücre ortamından dışarı salgılandıklarında çevre ortamının pH değerinden kolayca etkilenirler. Organizmalar enerji metabolizması için nötr hücre dışı pH (7,0) tercih ettiklerinden çalışılan pH aralığında üst limit olan pH 7,0 değerinde en yüksek ksilanaz aktivitesi gözlemlendiği düşünülmüştür.

Literatürde Düsterhöft ve arkadaşlarının (1997) *Humicola insolens*'den (*Scytalidium thermophilum*) iki ksilanazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve özellikleri üzerine yapılan çalışmada her iki ksilanaz için de (XY11 VE XY12), optimum sıcaklık 55-60°C bulunurken, sıcaklık dayanımında da XY12 60°C'de 45 dakika sonunda tüm aktivitesini kaybederken, XY11 aynı süre sonunda aktivitesinin %50'sini korumuştur. Bu çalışmada da termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum*'dan elde edilmiş olan ksilanazın optimum aktiviteyi 70°C'de, sıcaklık dayanımının 50°C'de en yüksek olduğu görülmektedir. Elde edilen bu sonuç ile ksilanazın kullanıldığı, ekmek hamuru hacminin artırılması ve kağıt hamuru beyazlatması işlemlerinde yüksek sıcaklıklara dayanımıyla avantaj sağladığı görülmektedir.

Yine literatürde, Zhang ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışma olan tuza dayanımlı *Thermobifida halotolerans*'tan termostabil ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonunda optimum aktivite 80°C'de, optimum pH 6,0 değerinde bulunmuştur. 70°C sıcaklıkta 1 saat tutulan enzim inhibe olmuştur. Saflaştırılmış enzimin oldukça geniş bir pH değer aralığında dayanımının olduğu görülmüştür. 12 saat içerisinde enzim aktivitesinin %60'dan fazlasını pH 4,0-10,0 aralığında muhafaza etmiştir. *Marasmius* sp.'den elde edilen termostabil ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında Ratanachomsri ve arkadaşları (2006), saflaştırılan enzim en yüksek aktivite değerini 90°C sıcaklıkta gösterdiğini bildirmişlerdir. Optimum pH değerinin ise 4,0-8,0 geniş pH aralığında değer gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Li ve arkadaşlarının (2012) *Streptomyces rameus*'dan ksilanazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve buğday samanı hamurundaki beyazlatma etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmalarında substrat seçiciliğinde, saflaştırılmış ksilanazın en yüksek aktiviteyi yulaf ksilanında verdiği görülmüştür. Yine bu çalışmada Michaelis-Menten sabitleri  $K_m$  huş ağacı ksilanı için  $5,8 \text{ mg mL}^{-1}$  ve kayın ağacı ksilanı için  $5,3 \text{ mg/mL}^{-1}$  belirlenmiştir. *Marasmius* sp.'den elde edilen ısı kararlılığı yüksek ksilanazın saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmasında Ratanachomsri ve arkadaşları (2006) saflaştırılan enzimin substrat seçiciliğine baktıklarında en yüksek aktiviteyi huş ağacı ksilanında elde etmişlerdir. Huş ağacı kullanılarak bakılan kinetik parametrelerde  $K_m$   $2,6 \pm 0,6 \text{ mg/mL}$ ,  $V_{max}$   $428 \pm 26 \text{ U/mg}$  değerleri bulunmuştur. *Rhizopus oryzae*'den elde edilen endo- $\beta$ -1,4 ksilanazın üretimi, kısmi saflaştırılması ve biyokimyasal karakterizasyonu üzerinde çalışan Bakır ve arkadaşları (2000), kinetik çalışmalarda  $K_m$   $18,5 \text{ mg/mL}$ ,  $V_{max}$   $90 \text{ IU/mg}$  değerlerine ulaşmışlardır.

Bu çalışmada ise substrat seçiciliğine bakıldığında en yüksek aktivite, ticari ksilanda, huş ağacı ksilanında elde edilmiştir. Literatür çalışmasında bulunan değerlerle paralel bir durum görülmektedir. Fakat literatür çalışmalarında huş ağacı ksilanında yüksek aktivite görüldüğü gibi, yulaf ksilanında da yüksek aktivite görülebilmektedir. Bu durumun mikroorganizma farklılığından da kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Buğday kepeği ve mısır koçanı gibi lignoselülozik maddelerde de enzimin aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum kullanım alanı çok fazla olmayan mısır koçanının, enzimin substratı olarak kullanılabilmesini ve böylelikle değerlendirilebileceğini göstermektedir. Fakat işlenmemiş ve kompleks halde olması nedeniyle, daha yumuşak yapıya sahip olan buğday kepeğine göre daha düşük aktiviteler elde edilmiştir. Buğday kepeğinde en yüksek aktivitenin elde edilmesi, yapılacak başka çalışmalarda substrat olarak kullanılabilmesini göstermektedir.

Sonuç olarak bakıldığında, hayvan altlığı ve yem katkısı olarak değerlendirilmesi haricinde bir kullanımı olmayan mısır koçanlarının, *Scytalidium thermophilum* üretiminde değerlendirilmesi söz konusu olabilmektedir. Günümüzde artan nüfus ile meydana gelen besin ihtiyacı düşünüldüğünde, artık halde bulunan maddelerin kullanılması, besin rekabetinin oluşmasına da engel olabilecektir. Ayrıca yüksek

miktarda üretimi olan ama tüketimi olmayan bir maddenin de geri dönüşümü sağlanabilecektir. Bu durum küfün üretilmesi ve çoğaltılmasında kolaylık sağlamaktadır. Enzimin kimyasallara ve uzun süreli muameleye bırakıldığında aktivitesini kaybediyor olması dezavantaja yol açsa da, uygulama sürelerinin belirlenen değerlerde ayarlanıp kısa tutulması sonucunda bu sorun ortadan kaldırılabilecektir. Endüstriyel kullanımda, büyük miktarlar elde edileceğinden, toplu olarak satılan ve selüloz bazlı olmayan membranların kullanılması ile ultrafiltrasyonda karşılaşılan selülaz enzim sorunu ortadan kaldırılabilecektir. Bu sayede de ultrafiltrasyondan yüksek saflık elde etmek mümkün olabilecektir.

## 6. KAYNAKLAR

- Anthony, T., Raj, K.C., Rajendran, A. ve Gunasekaran, P., 2003. High Molecular Weight Cellulase-free Xylanase from Alkali-Tolerant *Aspergillus fumigatus* AR1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32,647-654.
- Bacchin, P., Aimar, P., ve Sanches, V., 1995. Model of Colloidal Fouling of Membranes. *AIChE Journal*, 41(2), 368-376.
- Bailey, MJ., Biely, P. ve Pountanen, K., 1992. Interlaboratory Testing of Methods for Assay Xylanase Activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1117, 252-270.
- Bakır, U., Yavaşcaoğlu, Ş., Güvenç, F. ve Ersayın, A., 2001. An Endo-1,4-Xylanase from *Rhizopus oryzae*: Production, Partial Purification and Biochemical Characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 328–334.
- Bataillon, M., Cardinali, N., Castillon, N. ve Duchiron, F., 2000. Purification and Characterization of a Moderately Thermostable Xylanase from *Bacillus* sp. Strain SPS-0. *Enzyme and Microbial Technology*, 26,187-192.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. ve Hoondal, G., 2001. Microbial Xylanases and Their Industrial Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56,326-338.
- Bim, M.A. ve Franco, T.T., 2000. Extraction in Aqueous Two-Phase Systems of Alkaline Xylanase Produced by *Bacillus pumilus* and its Application in Kraft Pulp Bleaching. *Journal of Chromatography B*, 743, 349-356.
- Bocchini, D.H., Alves-Prado, H.F., Baida, L.C., Roberto, I.C., Gomes, E ve Da Silva, R., 2002. Optimazation of Xylanase Production by *Bacillus circulans* D1 in Submerged Fermentation Using Response Surface Methodology. *Process Biochemistry*, 38, 727-731.
- Bordier, C., 1981. Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(4), 1604-1607.
- Box, G. E. P ve Wilson, K. B., 1951. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*, 13.
- Box, G. Ve Behnken, D., 1960. Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing The Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.



- Cheryan, M., 1998. Ultrafiltration Membrans. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*, Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, 89-96.
- Collins, T., Gerday, C. Ve Feller, G., 2004. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *Federation of European Microbiological Rewiews*, 29, 3-23.
- Coelho, G.D. ve Carmona, E. C., 2003. Xylanolytic Complex from *Aspergillus giganteus*: Production and Characterization. *J. Basic Microbiol*, 43, 269-277.
- Cuperus, F.P. ve Smolders, C.A., 1991. Characterization of UF Membranes Membrane Characteristics and Characterization Techniques. *Advances in Colloid and Interface Science*, 34,135-173.
- Demirbaş, A., 2008. Importance of Biomass Energy Sources for Turkey. *Energy Policy*, 36, 834-842.
- De Souza, C.G.M., Girardo, N.S., Costa, M.A.F. ve Peralta, R.M., 1999. Influence of growth Conditions on the Production of Xylanolytic Enzymes by *Aspergillus flavus*. *Journal of Basic Microbiology*, 39(3), 155-160.
- Duarte, M.C.T., Pellegrino, A.C.A., Portugalı, E.P., Ponezi, A.N. ve Franco, T.T., 2000. Characterization of Alkaline Xylanases from *Bacillus pumilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 90-94.
- Düsterhöft, E-M., Linssen, V.A.J.M., Voragen, A.G.J ve Beldman, G., 1997. Purification, Characterization and Properties of Two Xylanases from *Humicola insolens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20,437-445.
- Gawande, P.V. ve Kamat, M.Y., 1999. Purification of *Aspergillus* sp. Xylanase by Precipitation With an Anionic Polymer Eudragit S100. *Process Biochemistry*, 34, 577-580.
- Gomesl, J., Purkarthofer, H., Hayn, M., Kapplmiller, J., Sinner, M. ve Steiner, W, 1993. Production of a High Level of Cellulase- Free Xylanase by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and Pilot Scales using Lignocellulosic Materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 700-707.
- Gupta, R., Bradoo, S. ve Saxena, R.K., 1999. Aqueous Two-Phase Systems: An Attractive Technology for Downstream Processing of Biomolecules. *Current Science*, 77(4).
- Haki, G.D. ve Rakshit, S.K., 2003. Devolopments in Industrially Important Thermostable Enzymes. *Bioresource Technology*, 89, 17-34.

- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W. ve Zupan, S., 1996. Production of Fungal Xylanases, *Bioresource Technology*, 58, 137-161.
- Held, P. Enzymatic Digestion of Polysaccharides; Part II: Optimazation of Polymer Digestion and Glucose Production in Microplates. BioTek Application note. <http://www.biotek.com/resources/articles/enzymatic-digestion-of-polysaccharides-2.html>; (Erişim Tarihi:12.01.2014).
- Jaiswal, N., Prakash, O., Talat, M., Hasan, SH. Ve Pandey, RK., 2012.  $\alpha$ -Amylase immobilization on gelatin: Optimization od Process Variables. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10,161-167.
- Jatinder, K., Chadha, BS. Ve Saini HS., 2006. Optimization of Cultre Conditions for Production of Cellulases and Xylanaese by *Scytalidium thermophilum* using Response Surface Methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22,169-176.
- Kamble, R.D. ve Jadhav, A.R., 2012. Properties and Application of a Partially Purified Thermoalkali Stable Xylanase from *Cellulosimicrobium* sp. MTCC 10645 in Kraft Pulp Bleaching. *ISRN Biotechnology*, 5.
- Katapodis, P., Christakopoulou, V., Kekos, D. ve Christakopoulos, P., 2007. Optimization of Xylanase Production by *Chaetomium thermophilum* in Wheat Straw using Response Surface Methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 35,136-141.
- Khandeparker, R. ve Bhosle, N.B., 2006. Purification and Characterization of Thermoalkalophilic Xylanase İsolated from the Enterobacter sp. MTCC 5112. *Research in Microbiology*, 157,4, 315-325.
- Khuri, A.I. ve Cornell, J.A., 1996. *Response Surfaces, Designs and Analyses*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1-3.
- Klemm, D., Schmauder, H.P. ve Heinze, T., 2005. Cellulose, *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 275-287.
- Knob, A. ve Carmona, E.C., 2008. Xylanase Production by *Penicillium sclerotiorum* and its Characterization. *World Applied Science Journal*, 4(2), 277-283.
- Kulkarni, N., Shendye, A. ve Rao, M., 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases, *Federation of European Microbiological Rewiews*, 23, 411-456.
- Lenartovicz V., De Souza C.G.M, Moreira F.G., Peralta, R.M., 2002. Temperature Effect in the Production of Multiple Xylanases by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Basic Microbiology*, 42, 388-395.

- Li, X., She, Y., Sun, B., Song, H., Zhu, Y., Lv, Y., ve Song, H., 2010. Purification and Characterization of A Cellulase-Free, thermostable Xylanase from *Streptomyces rameus* L2001 and its Biobleaching Effect on Wheat Straw Pulp. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 71-78.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *Journal of American Chemical Society*, 56, 658-666.
- Maas, R.H.W., 2008. *Microbial Conversion of Lignocellulose-Derived Carbohydrates into Bioethanol and Lactic Acid*. Thesis Wageningen University, 158, Hollanda.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Myers, R.H. ve Montgomery, D.C., 2002. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley and Sons, New York.
- Nelson, D. ve Cox, M., 2005. *Enzimler, Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*, Çeviri Ed: Medret Kılıç, Palme Yayıncılık, 243-384, Ankara.
- Öztürk, H.H. ve Başçetinçelik, A., 2006. Energy Exploitation of Agricultural Biomass Potential in Turkey, *Energy Exploration and Exploitation*, 24, 313-330.
- Pauly, M. ve Keegstra, K., 2010. Plant cell Wall Polymers as Precursors for Biofuels. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 305-312.
- 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.
- Quiroz-Castañeda, E.R. ve Folch-Mallol, J.L., 2013. Chapter 6: Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, InTech, <http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/hydrolysis-of-biomass-mediated-by-cellulases-for-the-production-of-sugars> (Erişim Tarihi: 12.12.2013)
- Ratanachomsri, U., Sriprang, R., Sornlek, W., Buaban, B., Champreda, V., Tanapongpipat, S. ve Eurwilaichitr, L., 2006. Thermostable Xylanase From *Marasmius* sp.: Purification and Characterization. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(1), 105-110.

- Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K.L., Sakka, K., Kosugi A., ve Mori, Y., 2013. *Paenibacillus curdolanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization, Biomass, InTech, 369-394.
- Salama, M.A, Ismail, K.M.I., Amany, H.A., Lill, A.-E. ve Geweely, N.S.I, 2008. Biochemical studies of Prufied Extracelluler Xylanases from *Aspergillus versicolor*. *International Journal of Botany*, 4(1), 41-48.
- Sathitsuksanoh, N., Zhu, Z., Rollin, J. ve Zhang, Y.-H. P., 2010. *Bioalcohol production, biochemical conversion of lignocellulosic biomass*. Woodhead Publishing Limited, 122-140, Cambridge.
- Segel, I.H., 1933. *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems*. A Wiley- Interscience Publication, 14-17, London.
- Shukla, G.S., Chiu, J.-F. ve Hart, B.A., 2000. Cadmium-Induced Elevations in the Gene Expression of the Regulatory Subunit of G-Glutamylcysteine Synthetase in Rat Lung and Alveolar Epithelial Cells. *Toxicology*, 151, 45–54.
- Subramaniyan, S. ve Prema, P., 2002. Biotechnonology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology ve Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33-46.
- Susan van Dyk, J., Sakka, M., Sakka, K. ve Pletschke, B.I., 2010. Characterisation of The Multi-Enzyme Complex Xylanase Activity from *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme and Microbial Techonology*, 47, 174-177.
- Toker, N.Y., 2000. Protein Saflaştırılması ile İlgili Bazı Metotlar. *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 26(2),403-412.
- Wong, K.K. Y., Tan, L.U. L. ve Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of 3-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications, *Microbiological Reviews*, 52(3), 305-317.
- Yaşınok, A.E., Biran, S., Kocabaş, A. ve Bakır, U., 2010. Xylanase from a Soil Isolate, *Bacillus pumilus*: Gene Isolation, Enzyme Production, Purification, Characterization and One-Step Separation by Aqueous-Two-Phase System. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1641–1652.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., 2010. *Moleküler Biyoloji*, 2. Baskı, , Ankara.

- Yin Li, 2007. Improvement of Xylanase Production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1381–1388.
- Zhang,F., Hu, S.N., Chen, J.J., Lin, L.B., Wei,Y.L, Tang, S.K., Xu,L.H. ve Li, W.J., 2012. Purification and Partial Characterisation of a Thermostable Xylanase from Salt-Tolerant *Thermobifida halotolerans* YIM 90462. *Process Biochemistry*, 47, 225-228.

## **EKLER**

## EK 1

### KATI BESİ YERİ, ÖN KÜLTÜR VE ANA KÜLTÜR İÇERİKLER

Tablo 1.1 Katı Besi Yeri Bileşikleri

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Maya Özütü	4,0
$K_2HPO_4$	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
Nişasta	15,0
Agar	20,0

Tablo 1.2 Ön Kültür Bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Maya Özütü	4,0
$K_2HPO_4$	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
Glukoz	10,0

Tablo 1.3 Ana Kültür İçerikler

Bileşen	Konsantrasyon (g/L)
Maya Özütü	4,0
$K_2HPO_4$	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,1
Karbon Kaynağı	40,0

## EK 2

### DNSA REAKTİFİNİN İÇERİĞİ VE İNDİRGEN ŞEKER ÖLÇÜM YÖNTEMİ

Reaktif İçeriği,

- 36% Potasyum Sodyum Tartarat ( $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$ )
- 1% NaOH
- 1% DNSA (dinitrosalisilik asit)
- 0.2% Fenol
- 0.05% Sodyum sülfid ( $Na_2SO_3$ )

Yöntem,

Reaktif karanlık şişe içerisinde  $4^{\circ}C$ 'de saklanmalıdır.

- Enzim ve substrat 1:10 oranında karıştırılır.
- 1,5 mL DNSA bulunan tüpler içerisine, 1 mL örnek ilave edilir.
- Tüpler beş dakika kaynayan bir su banyosunda tutulur ve buzlu su yardımıyla hemen soğutulur.
- Tüpler oda sıcaklığına dengelenir ve bir kör numuneye karşı 540 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede okutulur.



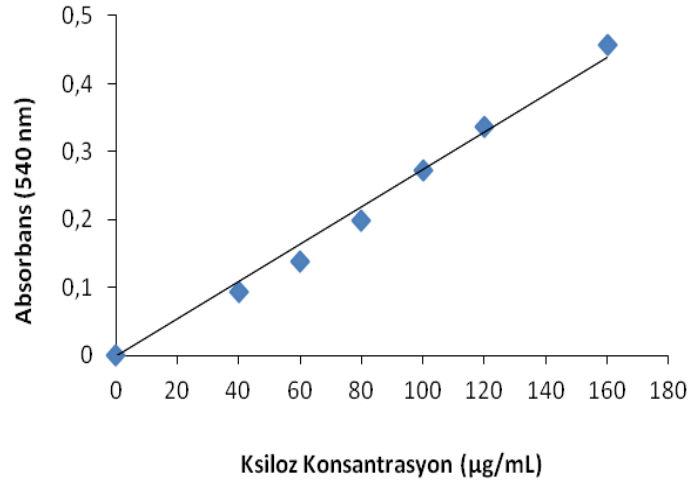
### EK 3

## KSİLOZ STANDART EĞRİSİ

1 µg/mL konsantrasyonunda stok solüsyon hazırlanır. İstenilen konsantrasyonlara göre stok solüsyondan alınır ve son hacim Tablo 3.1’de verildiği gibi tampon ile 5 mL’ye tamamlanır.

Tablo 3. 1 Ksiloz seyreltme

Konsantrasyon (µg/mL)	0	40	60	80	100	120	160
Stok (µL)	0	200	300	400	500	600	800
Tampon (mL)	0	4,8	4,7	4,6	4,5	4,4	4,2



Şekil 3.1 DNSA Yöntemi ile elde edilen ksiloz standart eğrisi

**EK 4**  
**BRADFORD REAKTİFİ İÇERİĞİ, PROTEİN STANDARDININ**  
**HAZIRLANMASI**  
**VE**  
**BRADFORD STANDART EĞRİSİ**

5X konsantre stok solüsyonu hazırlanması için aşağıdaki kimyasallar karıştırılır:

- 250 mL 95% etanol
- 500 mg Brilliant Blue G boya
- 500 mL 85% orto-fosforik asit.

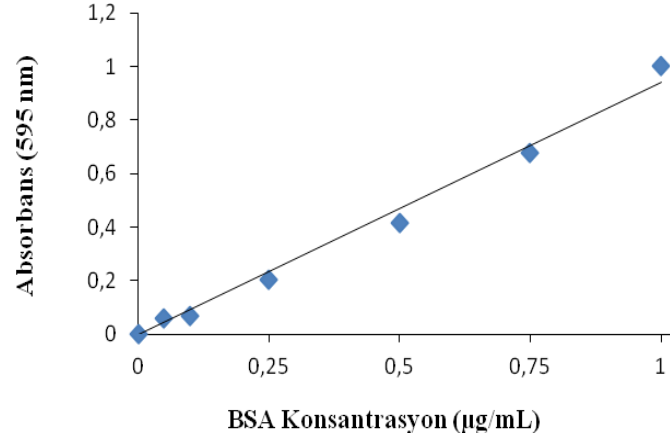
Kimyasallar eklendikten sonra, karışım distile su ile 1L'ye tamamlanır. Stok çözelti buzdolabında, karanlık şişe içerisinde saklanmalıdır. Kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirilmeli, iyice karıştırılmalı, filtre kağıdından süzülmalıdır.

BSA stok solüsyonu bir tampon içerisinde 1000 µg/mL konsantrasyonunda seyreltilmiştir. Tablo 5.1'de verilen şekilde farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanır.

Tablo 5 1. Protein standart eğrisi için seyreltme oranları

Protein (µg/mL)	0	0,05	0,1	0,25	0,5	0,75	1
BSA stok (mL)	0	0,1	0,2	0,5	1	1,5	2
Tampon (mL)	2	1,9	1,8	1,5	1	0,5	0

Numuneler hazırlandıktan sonra bradford reaktifinden 1 mL, içinde örnek olan tüp içerisine aktarılır. 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm’de absorbansları okunur.



Şekil 5.1 Bradford yöntemi için standart eğrisi

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Neslihan ÖZBEN  
Doğum Tarihi ve Yer : 16.06.1984 Ankara  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 05557654907  
e-mail : n\_ozben@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Tezsiz Yükseklisans	2008-2010
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniverstitesi	2003-2007
Lise	Iğdır Lisesi	1998-2001

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2007-2009	Özbilim Derşhanesi Muğla	Etüt Öğretmeni
2009-2010	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Öğrenci Sarayı Merkez Yemekhane Muğla	Sorumlu Yönetici