

***Scytalidium thermophilum* KSİLANAZININ  
KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE  
SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL  
KARAKTERİZASYONU**

**Sevgi GÜDER  
Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Biyokimya Programı  
Yrd.Doç.Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ**

**Ocak-2014**

T.C.  
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Scytalidium thermophilum* KSİLANAZININ KROMATOĞRAFİK  
YÖNTEMLERLE SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL  
KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevgi GÜDER

Anabilim Dalı : KİMYA

Programı : BİYOKİMYA

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

KARAMAN, 2014

## TEZ ONAYI

Sevgi GÜDER tarafından hazırlanan “*Scytalidium thermophilum* Ksilanazının Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’ndan **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Jüri Üyeleri

İmza

Yrd. Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Yrd. Doç. Dr. Abdullah Tahir BAYRAÇ

Yrd. Doç. Dr. Oktay TALAZ

Tez Savunma Tarihi: 09/01/2014

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Enstitü Müdürü**  
Prof. Dr. Fevzi KILIÇEL

## **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.

Sevgi GÜDER

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### *Scytalidium thermophilum* KSİLANAZININ KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE SAFLAŞTIRILMASI VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Sevgi GÜDER

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

Ocak, 2014, 69 sayfa

Bu çalışmanın amacı, termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454 ksilanazının, kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılması ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonudur.

Ülkemizde her yıl milyonlarca ton tarımsal atık olarak ortaya çıkan ve çok düşük ekonomik değere sahip olan mısır koçanları, kültür ortamında karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Ksilanaz, jel filtrasyon ve anyon değişim kolon kromatografi teknikleri ile %9,6 verimle 21,8 kat saflaştırılmıştır. Ksilanazın molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası sırasıyla 21 kDa ve pH 8,6 olarak bulunmuştur. Enzimin aktivitesi, farklı pH ve sıcaklık koşullarında gösterdiği kinetik özellikler açısından karakterize edilmiştir. Saf ksilanaz için optimum sıcaklık ve pH değerleri sırasıyla 65°C ve pH 6,5 olarak tespit edilmiştir. Saf enzim, pH 7,0 ve 40°C sıcaklık değerlerinde 4 saatlik inkübasyon sonunda başlangıç aktivitesinin %85'inden fazlasını koruyarak, en yüksek kararlılığı sergilemiştir. Ksilanazın  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, kayın ağacı ksilanı kullanılarak sırasıyla 2,2±0,06 mg/mL ve 168,2±4,2 IU/mL olarak belirlenmiştir. Saf ksilanazın çeşitli ticari ve lignoselülozik substratlara olan seçiciliği incelenmiş ve en yüksek afinite kayın ağacı ksilanı ile buğday kepeğine karşı tespit edilmiştir. Bu bulgular, göreceli olarak düşük molekül ağırlığına ve yüksek çalışma sıcaklığına sahip olması nedeniyle ksilanazın, farklı endüstriyel uygulamalarda kullanımının avantajlı olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Scytalidium thermophilum*, Ksilanaz, Kromatografik Saflaştırma, Biyokimyasal Karakterizasyon

## ABSTRACT

Ms Thesis

### PURIFICATION OF *Scytalidium thermophilum* XYLANASE BY CHROMATOGRAPHIC METHODS AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION

Sevgi GÜDER

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

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ

January, 2014, 69 pages

The purpose of this study was purification of thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454 xylanase using chromatographic techniques and biochemical characterization of the enzyme.

Corn cobs, which are produced at an amount of millions of tons as agricultural waste in our country and have very low economical value, are used as carbon source in culture medium. By using gel filtration and anion exchange chromatographic techniques, xylanase was purified 21.8 fold with 9.6% yield. Molecular weight and isoelectric point of xylanase were determined as 21 kDa and pH 8.6, respectively. Enzyme activity was characterized in terms of kinetic properties at different pH and temperature conditions. Optimum temperature and pH values of purified xylanase was determined as 65°C and 6.5, respectively. Purified enzyme showed highest stability at pH 7.0 and 40°C temperature by retaining more than 85% of its initial activity after 4 hours incubation.  $K_m$  and  $V_{max}$  values of xylanase by using beechwood xylan was predicted as  $2.2 \pm 0.06$  mg/mL and  $168.2 \pm 4.2$  IU/mL, respectively. Specificity of xylanase for various commercial and lignocellulosic substrates was investigated and maximum affinity was determined towards beechwood xylan and wheat bran. These findings indicate that xylanase could be advantageous in different industrial applications due to its relatively low molecular weight and high operating temperature.

**Key Words:** *Scytalidium thermophilum*, Xylanase, Chromatographic Purification, Biochemical Characterization

## ÖN SÖZ

Öncelikle, bu konuda araştırma ve kendimi geliştirme olanağı sağlayan, önerileriyle bana yol gösteren danışmanım Yrd. Doç. Dr. Didem SUTAY KOCABAŞ'a ve bu çalışma için 110M615 nolu proje kapsamında destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Yine çalışmamda izoelektrik nokta tayini deneyinde yardımcı olan, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca, laboratuvarlarında çalışmam için bana yardımcı olan Gıda Mühendisliği Bölümü'ne gösterdikleri anlayıştan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tanıştığımız günden bu yana hayatımın en önemli parçası olarak, varlığını her an hissettiren ve bana müthiş bir güç veren Yavuz ÇİFTÇİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, teşekkürden daha fazlasını borçlu olduğumu düşündüğüm, fakat burada teşekkürden daha fazlasını öneremeyeceğim, annem Ayşe GÜDER ve kız kardeşim Cennet GÜDER'e sonsuz destekleri için çok teşekkür ederim.

Sevgi GÜDER

Ocak, 2014

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>ÖNSÖZ</b> .....	iii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	vii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	ix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	4
2.1. Enzimler .....	4
2.2. Lignoselülozik Materyallerin Yapısı .....	5
2.2.1. Selüloz .....	5
2.2.2. Hemiselüloz .....	7
2.2.2.1. Ksilan .....	8
2.2.3. Lignin .....	9
2.3. Hemiselülozların Enzimatik Hidrolizi ve Ksilanazlar .....	10
2.3.1. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar .....	11
2.3.2. Ksilanazların Sınıflandırılması .....	11
2.3.3. Ksilanazların Endüstrideki Kullanım Alanları .....	13
2.4. <i>Scytalidium thermophilum</i> .....	15
2.5. Protein Saflaştırma .....	16
2.6. Protein Saflaştırma Yöntemleri .....	18
2.6.1. Ön Saflaştırma Yöntemleri .....	18
2.6.2. Tam Saflaştırma Yöntemleri .....	19
2.6.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografi .....	20
2.6.2.2. İyon Değişim Kromatografi .....	21
2.7. Elektroforez Uygulamaları .....	23
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	25
3.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları .....	25
3.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	25



3.3. Protein Miktarının Belirlenmesi .....	26
3.4. Ksilanaz Saflaştırma Yöntemleri .....	27
3.5. Agar Test Metodu .....	28
3.6. Ksilanazın Karakterizasyon Yöntemleri .....	29
3.6.1. Elektroforetik Karakterizasyon Yöntemleri .....	29
3.6.1.1. Moleküler Ağırlık Tayini .....	29
3.6.1.2. İzoelektrik Nokta Tayini .....	29
3.6.2. Kinetik Karakterizasyon Yöntemleri .....	29
3.6.2.1. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine pH Etkisi .....	30
3.6.2.2. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	30
3.6.2.3. Ksilanazın Kinetik Analizi .....	31
3.6.2.4. Substrat Seçiciliği .....	31
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>33</b>
4.1. Ksilanazın Saflaştırılması .....	33
4.2. Agar Test .....	36
4.3. Ksilanazın Karakterizasyon Yöntemleri .....	37
4.3.1. Elektroforetik Karakterizasyon Yöntemleri .....	37
4.3.1.1. Moleküler Ağırlık Tayini .....	37
4.3.1.2. İzoelektrik Nokta Tayini .....	38
4.3.2. Ksilanazın Kinetik Karakterizasyonu .....	39
4.3.2.1. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine pH Etkisi .....	39
4.3.2.2. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine Sıcaklığın Etkisi .....	41
4.3.2.3. Kinetik Parametreler .....	42
4.3.2.4. Substrat Seçiciliği .....	43
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>45</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>54</b>
<b>7. EKLER</b> .....	<b>58</b>
EK 1 .....	59
EK 2 .....	60
EK 3 .....	61
EK 4 .....	62
EK 5 .....	63
EK 6 .....	64

EK 7 .....	65
EK 8 .....	67
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Farklı lignoselülozik materyaldeki bileşenlerin oranı .....	5
Çizelge 4.1 : Jel filtrasyon kromatografi deney koşulları .....	33
Çizelge 4.2 : Anyon değişim kromatografi deney koşulları .....	35
Çizelge 4.3 : Küçük molekül ağırlıklı <i>S. thermophilum</i> ksilanazının saflaştırma tablosu .....	36
Çizelge 4.4 : Ksilanazın substrat seçiciliği .....	44

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 : Selülozun yapısı .....	6
Şekil 2.2 : Ksilanın yapısı ve ksilanın tam hidrolizinden sorumlu ksilanolitik enzimlerin etki bölgeleri .....	8
Şekil 2.3 : Ligninin yapısı .....	10
Şekil 2.4 : <i>Scytalidium thermophilum</i> 'un mikroskopik görüntüsü.....	16
Şekil 2.5 : Protein saflaştırmada takip edilen genel bir protokol şeması .....	17
Şekil 2.6 : Basit bir kromatografi sisteminde yer alan ekipmanlar .....	20
Şekil 2.7 : Jel filtrasyon kromatografi ile ayırıştırmanın temel prensibi .....	21
Şekil 2.8 : İyon değiştirici matris tipleri .....	22
Şekil 2.9 : İyon değişim kromatografisinin temel prensibi .....	23
Şekil 4.1 : <i>S. thermophilum</i> ksilanazının jel filtrasyon kromatografi ile saflaştırılması sonucunda iki ksilanaza ait kromatogram .....	34
Şekil 4.2 : <i>S. thermophilum</i> ksilanazının jel filtrasyon kromatografi ile saflaştırılması sonucunda küçük molekül ağırlıklı ksilanaza ait kromatogram .....	34
Şekil 4.3 : <i>S. thermophilum</i> ksilanazının jel filtrasyon sonrası gerçekleştirilen anyon değişim kromatografi ile saflaştırılmasına ait kromatogram .....	36
Şekil 4.4 : Ksilanaz aktivite boyaması .....	37
Şekil 4.5 : Jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografileri ile saflaştırılmış küçük molekül ağırlıklı ksilanazın SDS-PAGE analizi .....	38
Şekil 4.6 : Ksilanazın izoelektrik noktası .....	39
Şekil 4.7 : Ksilanazın, (a) optimum çalışma pH değeri, (b) pH dayanımı .....	40
Şekil 4.8 : Ksilanazın, (a) optimum çalışma sıcaklığı, (b) sıcaklık dayanımı .....	42
Şekil 4.9 : Saf enzimin, (a) Michaelis-Menten, (b) Lineweaver-Burk grafikleri .....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

### Açıklamalar

<b>rpm</b>	Revolutions per minute (dakikadaki dönüş hızı)
<b><i>g</i></b>	Yerçekim ivmesi
<b>kDa</b>	Kilo dalton (atomik kütle birimi)
<b>V</b>	Volt (potansiyel farkı birimi)
<b><math>K_m</math></b>	Michaelis-Menten sabiti
<b><math>V_{max}</math></b>	En yüksek tepkime hızı
<b>[S]</b>	Substrat konsantrasyonu
<b>IU</b>	International Unit (uluslar arası enzim aktivitesi birimi)

### Kısaltmalar

### Açıklamalar

<b>APS</b>	Amonyum persülfat
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>DNS</b>	Dinitro salisilik asit
<b>E.C.</b>	Enzyme Commission
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>TEMED</b>	Tetrametilen etilendiamin

## 1. GİRİŞ

Enzimler, genel olarak protein yapıda moleküllerdir ve canlı organizmalar tarafından üretilmektedirler. Özgün moleküller olan enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek biyolojik tepkimelerde katalizör görevi görürler. Böylece, denge konumunu değiştirmeden tepkimenin hızını arttırmaları. Günümüzde enzimler, gıda, ilaç, tekstil, su arıtma tesisleri ve kağıt hamuru endüstrisi gibi pek çok endüstriyel alanda ve ayrıca analitik amaçlar için kullanılmaktadır (Kıran ve ark., 2006).

Endüstride önemli bir alternatif olan enzimler, genellikle mikroorganizmalardan elde edilmekle birlikte, bitkisel ve hayvansal dokulardan da üretilmektedir. Mikroorganizmalar, hızlı şekilde üremeleri, üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması, katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha karalı ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi nedenlerle ticari amaçlı enzimlerin üretiminde en çok tercih edilen önemli kaynaklardır (Kıran ve ark., 2006).

Günümüzde, mikroorganizmaların lignoselülozik maddeleri kullanarak işe yarar son ürünler oluşturabilme yeteneklerinden kazanç sağlanmaya çalışılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin lignoselülozik materyallerin endüstriyel hidrolizinde kimyasal yöntemler yerine kullanımı, enzim reaksiyonlarının yüksek özgülüğü, reaksiyon koşullarının daha ılımlı olması ve kimyasal modifikasyonlar sonucu substrat kaybının olmayışı gibi nedenlerle daha avantajlıdır. Bu gibi biyolojik dönüştürme süreçleri, özellikle ormancılık ve tarımsal faaliyetler sonucu ortaya çıkan atıkların bertarafının yanı sıra sıvı yakıt üretimi ve çeşitli kimyasal maddelerin sentezi gibi süreçler için de ilgi çekici olmaktadır (Juturu ve Wu, 2012).

Lignoselüloz, doğada biyokütlenin büyük kısmını oluşturan yenilenebilir bir enerji kaynağıdır ve küresel karbon döngüsünün devamı için ayrıştırılması gerekmektedir (Tuomela ve ark., 2000). Bitki biyokütlesi, kuru ağırlık açısından, ortalama %40 selüloz, %33 hemiselüloz ve %23 ligninden oluşmaktadır (Dhiman, 2008).

Ksilooligosakkaritler,  $\beta$ -1,4 bağıyla bağlanan ksiloz brimlerinden oluşmuş şeker oligomerleridir. Ksilooligosakkaritler, doğal olarak sebze ve meyvelerde, bambu

filizlerinde, bal ve sütte bulunduğu bilinmektedir. Ksilooligosakkaritler, genellikle 2-10 arası monosakkarit birimleri içerdiklerinden, insan vücudu tarafından sindirilemezler. Sindirim sistemi tarafından parçalanamadıkları ve geri emilemedikleri için, bağırsakta yaşayan bakterilere substrat olarak hizmet etmekte ve böylece bağırsak mikroflorasını daha sağlıklı bir kompozisyona ulaştırmaktadırlar. Bu özelliklerinden dolayı ksilooligosakkaritler, prebiyotik olarak sınıflandırılmaktadır. Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan ksilooligosakkaritler, gıdaların besinsel ve duyuşsal özelliklerini iyi yönde etkileyerek, tüketicinin sağlıklı ürünler tüketme isteğine cevap vermektedirler. Bunun yanında, minerallerin biyolojik olarak kullanımını iyileştirmeleri, kabızlık sorununu azaltmaları ve kolesterol seviyesini düşürerek kalp-damar hastalıklarının gelişmelerini önlemeleri gibi sağlık açısından yararları da olduğu bilinmektedir (Erdoğan ve Akpınar, 2008).

Lignoselülozik materyaller selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Hemiselülozun büyük bir çoğunluğunu ksilanlar oluşturmakla birlikte, arabinan, galaktan ve mannan bileşenlerini de içermektedir. Heteropolisakkarit yapıdaki ksilanın temel bileşenini  $\beta$ -1,4 bağılı monomer ksiloz birimleri oluşturmakla birlikte, arabinoz, mannoz, glikoz ve ramnoz gibi monosakkaritler de yapı oluşumuna katılmaktadırlar. Ksilooligosakkaritlerin üretimi için, ilk olarak uygun bir lignoselülozik maddeden ksilan izole edilir ve sonra da elde edilen ksilan enzim, asit ve ısı gibi yöntemlerle parçalanarak ksilooligosakkaritler elde edilir. Ksilooligosakkarit üretimi için sert odunsu bitkiler, mısır koçanı, saman, pirinç kabuğu, badem kabuğu, zeytin çekirdeği, buğday ve arpa sapı gibi tarımsal atıklar lignoselülozik materyaller olarak kullanılmaktadır (Erdoğan ve Akpınar, 2008).

Mısır üretiminde temel atık ve artık olarak mısır koçanları tüm dünyada çok miktarda üretilmektedir. Mısır koçanları, hayvan yemi ve toprakta gübre olarak kullanılabilirdiği gibi yakıt olarak da kullanılmaktadır. Mısır koçanı %40-45 selüloz, %30-35 hemiselüloz ve %10-20 lignin içermektedir (Piyatheerawong, 2011).

Karmaşık yapıya sahip ksilanın hidrolizi için, yüksek düzeydeki spesifiklikleri, önemsenmeyecek seviyede sahip oldukları substrat kaybı ve kontrolü kolay reaksiyon koşulları nedeniyle mikrobiyal kaynaklı ksilanazlar (1,4- $\beta$ -D-ksilan ksilanohidrolaz, E.C. 3.2.1.8), biyolojik katalizör olarak tercih edilmektedir (Kulkarni ve ark., 1999).

Biyoteknolojide ksilanazlar, klor kullanımını en aza indirerek kağıt hamurunun biyobeyazlatmasında, hayvan yem endüstrisinde hayvanın yemden daha iyi yararlanarak performansını arttırmak ve sindirebilirliği kolaylaştırarak kilo artışı sağlama, ekmeğin hacimsel artışı ve meyve suyu, bira gibi içeceklerin berraklaştırılması amacıyla gıda endüstrisinde, lignoselülozik materyallerin dönüşümü sonucunda biyoyakıt üretilmesi gibi pek çok endüstriyel uygulamalar için kullanılmaktadır (Subramanian ve Prema, 2002).

Mikrobiyal kaynaktan üretilen proteinlerin (ksilanaz gibi), diğer birçok proteinde olduğu gibi, hedefe yönelik uygulamalarda genelde kullanım öncesi safsızlıklardan arındırılarak saflaştırılması gerekmektedir. Protein saflaştırmak için pek çok yöntem vardır. Bu yöntemlerin ilk adımı genelde kısmi saflaştırma işlemlerini (çöktürme, diyaliz, ultrafiltrasyon vb.) içerirken, ikinci adımı tam saflaştırmayı sağlayan teknikler (kromatografik teknikler vb.) oluşturmaktadır. Bu çalışmada termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454 (*Humicola insolens*) ksilanazı, molekül büyüklüğüne göre ayırmayı sağlayan jel filtrasyon ve proteinlerin yüküne bağlı ayırma gerçekleştiren anyon değişim kromatografisi teknikleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Saf olarak elde edilen proteinler, kullanım için değerlendirilmeden önce karakterize edilerek, bir anlamda proteinlerin kimlik kartı oluşturulmaktadır. Bu çalışmada, saflaştırılmış ksilanazın miktarı, saflığı ve izoelektrik noktasının belirlenmesi için jel elektroforez yöntemleri (SDS-PAGE ve izoelektrik fokuslama) kullanılmıştır. Ksilanazın kinetik karakterizasyonu, enzim aktivitesi ve dayanımı üzerine pH ve sıcaklığın etkisi, kinetik parametreler ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) ve substrat seçiciliği incelenerek gerçekleştirilmiştir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Enzimler

Enzimler, canlı organizmalar tarafından sentezlenen, biyokimyasal tepkimeleri katalizleyen, yan ürün oluşumuna izin vermeyen ve %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Laboratuvarında gerçekleşmesi çok zaman alan, bazen de yüksek basınç, yüksek sıcaklık, asidik ve bazik ortam gerektiren tepkimeler, enzimler kullanılarak birkaç saniye gibi çok kısa zamanda ve hücre içi koşullarda gerçekleştirilebilmektedir. Enzimler oldukça özgün moleküllerdir ve hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını düzenlemektedirler (Kıran, 2006).

Enzimler katalizledikleri tepkimelerin denge konumunu ve sabitini değiştirmeden, aktivasyon enerjisini düşürerek dengeye çabuk ulaşılmasını sağlamaktadırlar (Wilson ve Walker, 2010).

Enzimin aktif bölgesine bağlanarak, enzim aktivitesi sonucu ürüne dönüştürülen moleküllere substrat denilmektedir. Aktif bölge, bir enzim-substrat kompleksi oluşturarak substratı ürüne dönüştürmek üzere substrata bağlanan, fonksiyonel yan grup taşıyan belirli amino asitlerin oluşturduğu ve enzimin katalitik potansiyelinden sorumlu enzim bölgesidir (Nelson ve Cox, 2005) .

Enzimlerin aktivite gösterebilmeleri için gerekli olan, protein yapıda olmayan, genellikle metal iyonlarından ( $Fe^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  vb.) oluşan yan gruplar kofaktör olarak adlandırılmaktadır. Enzimlerin aktivite gösterebilmek için gereksinim duydukları kompleks organik moleküllere ise koenzim adı verilmektedir (Yıldırım ve ark., 2010).

Enzimler genellikle substrat adının sonuna -az eki getirilerek (fosfataz, üreaz, lipaz, ksilanaz vb.) veya genel adlarıyla (pepsin, tripsin vb.) isimlendirilmektedir (Yıldırım ve ark., 2010). Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB) tarafından, her enzim katalizör görevi gördüğü kimyasal tepkimenin tipine göre sistematik olarak isimlendirilmektedir. Bu sınıflandırmada her enzim katalizlediği tepkimeye bağlı olarak, özel dört rakamlı bir kod numarası ile (E.C.) tanımlanmıştır (örneğin, 1,4- $\beta$ -D-ksilan ksilanohidrolaz, E.C. 3.2.1.8) (Wilson ve Walker, 2010).

## 2.2. Lignoselülozik Materyallerin Yapısı

Doğadaki karbonun ana deposu olan bitki hücre duvarları, üç temel polimerik bileşene sahiptir. Lignoselülozun iki temel bileşeni olan selüloz ve hemiselüloz, fotosentezle oluşturulmaktadır. Bu iki karbonhidrat molekülü, kovalent çapraz bağlar vasıtasıyla karbonhidrat olmayan lignin molekülü ile iç içe geçmiştir. Tarım ve orman endüstrilerinde yılda yaklaşık 40 milyon ton lignoselüloz atık olarak elde edilmektedir. Bu nedenle küresel karbon döngüsünün gerçekleşebilmesi için, biyokütlenin çok büyük bir kısmını oluşturan lignoselülozik maddelerin ayrıştırılması gerekmektedir (Juturu ve Wu, 2012).

Hücre duvarındaki bileşenlerin kalitatif ve kantitatif oranı, büyüme mevsimi boyunca değişiklik gösterir. Değişik bileşenlerin oranları, bitki dokusunun tipine ve yaşına olduğu kadar, türlere ve tek bir tür içerisindeki farklı dokulara da bağlılık göstermektedir (Kromus ve ark., 2006).

Sert odunlardaki selüloz ve hemiselüloz oranları, genelde yumuşak odunlardakinden daha yüksek olmakla birlikte, yumuşak odunlardaki lignin içeriği sert odunlardakinden daha yüksektir. Otlar, odunsu bitkilere oranla hemiselüloz bakımından zengin (%25-50 a/a), lignin (%10-30 a/a) ve selüloz (%25-40 a/a) bakımından ise daha fakir olmaktadır (Çizelge 2.1) (Betts ve ark., 1992).

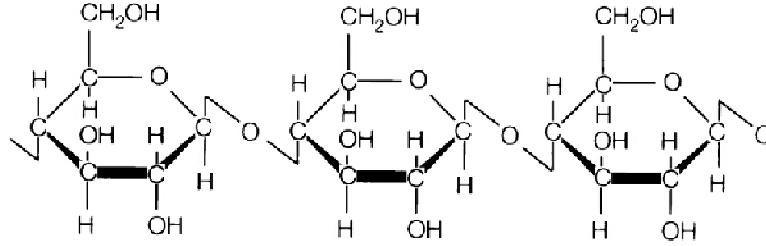
**Çizelge 2.1.** Farklı lignoselülozik materyaldeki bileşenlerin oranı (Betts ve ark., 1992)

Materyal	Lignin (%)	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)
Yumuşak odun	25-35	45-50	25-35
Sert odun	18-25	45-55	24-40
Otlar	10-30	25-40	25-50

### 2.2.1. Selüloz

Bitki hücre duvarının temel bileşenlerinden biri olan selüloz, doğada en çok bulunan biyopolimerdir. Selüloz,  $\beta$ -1,4-D-bağlı uzun glikoz zincirlerinden oluşması nedeniyle hücre duvarına yapısal sertlik sağlamaktadır (Şekil 2.1). Bu özellik selülozu, çözünmez

ve bozunmaya karşı dirençli yapmaktadır. Endüstriyel ölçekli biyoyakıt üretiminde, selülazlar olarak bilinen selülitik enzimler, lignoselülozik materyaldeki selülozu yıkıma uğratarak glikoz oligomerleri haline dönüştürdükten sonra farklı şekerlerle fermente edilip yakıt katkı maddesi oluşturmak üzere işlenmektedir (Maurer ve ark., 2013).



**Şekil 2.1.** Selülozun yapısı (Anonim, 2013a)

Selüloz,  $\beta$ -1,4 bağlı binlerce glikoz biriminden oluşan doğrusal yapıda bir polisakkarittir. Selüloz zincirleri, hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleriyle mikrofibriller halinde 24-36 zincirlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Bu mikrofibriller çözünmez kristal yapıdadır ve enzimatik şekerleşmesi zordur. Selülozun tam polimerizasyon zincirinin yıkımında oluşan tek ürün glikozdur. Selülozun yıkımından sorumlu enzimler; selüloz zincirindeki iç bağları rastgele kıran endo- $\beta$ -1,4-glukanaz (E.C. 3.2.1.4), selüloz polimerinin ucundaki indirgen ya da indirgen olmayan kısımlara saldıran ekzo-  $\beta$ -1,4-glukanaz (E.C. 3.2.1.91) ve endo ve ekzo-glukanaz karışımının ana ürünü olan selülobiyozu glikoza dönüştüren  $\beta$ -glikosidaz (E.C. 3.2.1.21) olmak üzere üç sınıfta toplanmaktadır (Horn ve ark., 2012).

Selülozun şekilsiz formu, molekül içi hidrojen bağlarının az olması nedeniyle nispeten kolay yıkılmaktadır. Ancak, fiziksel yapısı nedeniyle kristal formdaki selüloz, biyolojik yıkıma karşı daha dayanıklıdır (Horn ve ark., 2012). Selülozun hidrolizinde bu kristal yapı, selüloz fibrillerine nispeten elastikiyet ve dayanıklılık kazandırmaktadır (Yamanaka ve ark., 1989).

### 2.2.2. Hemiselüloz

Hemiselüloz, tek ve çok yıllık bitkilerin hücre duvarında selüloz ve ligninle beraber bulunan ve farklı şeker birimlerinin farklı şekillerde birleşmesi sonucunda oluşmuş dallı bir heteropolisakarittir. Hemiselülozlar, doğadaki toplam biyokütlenin %30-35'ini oluşturmaktadır ve ksilan, hemiselülozun başlıca en çok bulunan bileşenidir (Kulkarni ve ark., 1999).

Hemiselülozun temel bileşeni ksilan olmakla birlikte, mannan, galaktan ve arabinanları da içeren bir heteropolimerden oluşmaktadır. Hemiselülozun yapısında bu heteropolimerlerle bağlı bulunan, D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz ve L-arabinoz gibi şeker birimleri de bulunmaktadır (Dhiman ve ark, 2008).

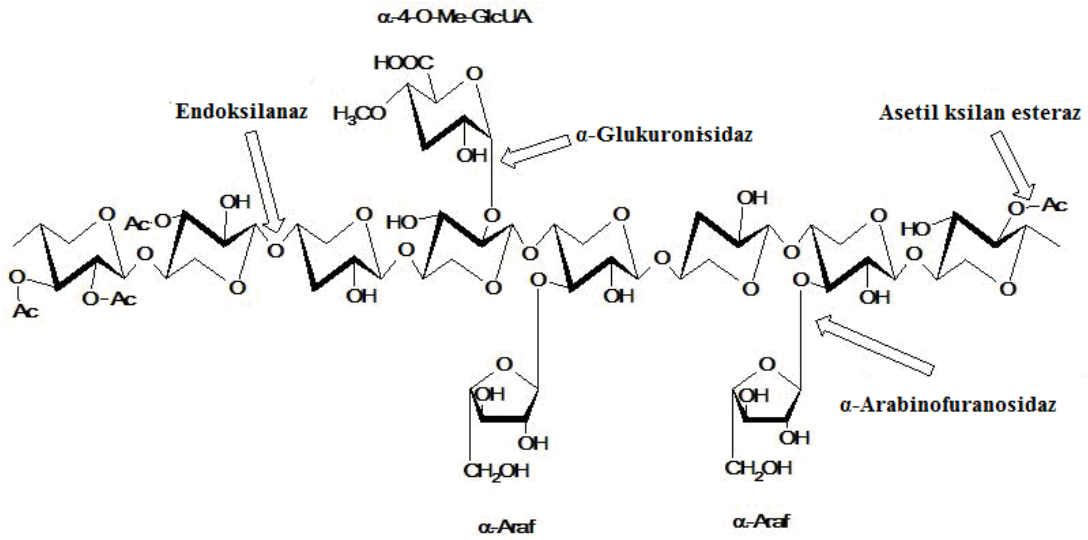
Hemiselüloz, şeker asitleri, mannoz, glikoz ve galaktoz gibi heksozlar ile ksiloz ve arabinoz gibi pentozlardan oluşan farklı polimerik yapılara sahip karmaşık bir karbonhidrattır. Sert odun ve tarımsal bitkilerden (ot ve saman gibi) elde edilen hemiselülozun temel bileşeni ksilandır. Yumuşak odunda ise bu bileşeni glukomannan oluşturmaktadır. Hemiselüloz, selülozdan daha düşük bir molekül ağırlığa sahiptir ve farklı şekerlerden oluşan kısa yan zincirler şeklinde dallanmaya sahip olup kolay hidroliz olabilen bir polimerdir. Selülozun aksine kimyasal bakımdan homojen yapı göstermemektedir. Hemiselüloz, lignin ve selüloz fibrilleri arasındaki bağlantıyı sağlamada görev almakta ve selüloz-hemiselüloz-lignin bütünlüğüne daha fazla sertlik kazandırmaktadır. Farklı hemiselüloz bileşenlerin çözünürlüğü, mannoz, ksiloz, glikoz, arabinoz ve galaktoz sırasına göre azalmaktadır. Sıcaklıktaki artışla hemiselülozun çözünürlüğü artmaktadır (Hendriks ve Zeeman, 2009).

Dallanma tekrarı ve kompozisyonu ksilanın kaynağına bağlıdır. Değişik kaynaklardaki ksilanların kompozisyonları farklılık göstermektedir. Örneğin, huş ağacı ksilanı %89,3 ksiloz, %1 arabinoz, %1,4 glikoz, %8,3 anhidrouronik asit içermektedir. Pirinç kepeği ksilanı %46 ksiloz, %44,9 arabinoz, %6,1 galaktoz, %1,9 glukoz, %1,1 anhidrouronik asit içerirken, buğday arabinoksilanı %65,8 ksiloz, %33,5 arabinoz, %0,1 mannoz, %0,1 galaktoz, %0,3 glikoz içermektedir. Mısır lifi ksilanı  $\beta$ -1,4 bağı ile bağlı ksiloz birimlerinden oluşmuş karmaşık yapıdaki heteroksilanlardan biridir ve %48-54

ksiloz, %33-35 arabinoz, %5-11 galaktoz, %3-6 glukouronik asit bileşimine sahiptir (Adhikari ve Satyanarayana, 2007).

### 2.2.2.1. Ksilan

Ksilan, doğada en bol bulunan selülozik olmayan yenilenebilir polisakkarittir. Sert odun ve tek yıllık bitkilerin kuru ağırlığının yaklaşık %20-30'luk kısmını oluşturmaktadır. Ksilan, lignin ve diğer polisakkaritler arasında bir arayüz oluşturmaktadır. Hücre duvarının ikincil halkasında bulunan ksilan, fenolik lignin kalıntıları ve diğer polisakkaritlere (pektin, glukan gibi) kovalent bağlanmaktadır. Ksilan molekülü, az miktarda L-arabinoz ve esas olarak da D-ksiloz monomerik biriminden oluşmaktadır. Ayrıca, ksilan omurgası üzerinde asetil, arabinosil ve glukurosil gibi kısımlar da bulunmaktadır (Şekil 2.2) (Dhiman ve ark., 2008).



**Şekil 2.2.** Ksilanın yapısı ve ksilanın tam hidrolizinden sorumlu ksilanolitik enzimlerin etki bölgeleri; Ac: asetil grup,  $\alpha$ -Araf: arabinofuranoz,  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA:  $\alpha$ -4-O-metilglukuronik asit (Motta ve ark., 2013, değiştirilmiştir)

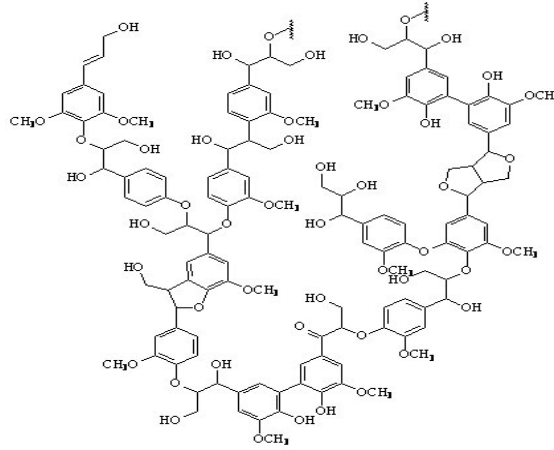
Sert odundaki ksilan molekülleri,  $\beta$ -1,4-glikozidik bağlarla bağlı O-asetil-4-O-metilglukuronoksilandan oluşmaktadır. Yumuşak odun ksilanı ise, arabino-4-O-

metilglukuronoksilanlardan oluşmaktadır. Sert odun ksilanının C-2 ve C-3 atomlarındaki yüksek asetillenme oranı nedeniyle, onun suda kısmen çözünebilmesini sağlamaktadır. Sert odun ksilanının aksine, yumuşak odun ksilanları asetillenmez ve suda rahatça çözünmektedirler. Ayrıca bunlar, C-3 pozisyonunda  $\alpha$ -1,3-glikozidik bağlarla bağlı,  $\alpha$ -L-arabinofuranoz birimlerine sahiptirler. Yumuşak odun ksilan zincir uzunluğu, sert odun ksilanına göre daha kısa ve dallanma derecesi daha düşüktür (Dhiman ve ark, 2008).

Hemiselülozun temel yapı taşı olan ksilanlar, heterojen bileşenli ve karmaşık kimyasal bir yapıya sahip olduklarından, bunların tam anlamıyla yıkımı için bir ksilanolitik enzim sistemi gerekmektedir (bkz. Şekil 2.2). Ksilan omurgasını hidroliz eden ksilanolitik enzimleri; 1,4- $\beta$ -ksilanazlar,  $\beta$ -D-ksilosidazlar,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidazlar,  $\alpha$ -D-glukuronidazlar, asetil-ksilan esterazlar, fenolik amit esterazlar şeklinde sınıflandırmak mümkün olmaktadır. Ksilanın enzimatik hidrolizinde yer alan başlıca enzim ise  $\beta$ -1,4 bağları ile bağlanmış ve ksiloz birimlerinden oluşan iskeleti hidrolizleyen endo-1,4- $\beta$ -ksilanazlardır (1,4- $\beta$ -D-ksilan ksilanohidrolaz) (E.C. 3.2.1.8) (Singh ve ark., 2003).

### 2.2.3. Lignin

Hücre duvarının bir diğer bileşeni olan lignin, selüloz ve hemiselülozdan sonra doğada en çok bulunan polimerlerden biridir. Üç farklı fenilpropan birimleri (p-kumaril, koniferil ve sinapil alkol) içeren amorf yapıda bir heteropolimerdir (Şekil 2.3). Ligninin temel amacı, bitkiye yapısal destek vermek ve mikrobiyal saldırı ve oksidatif strese karşı direnç sağlamaktır. Amorf yapıdaki heteropolimer lignin suda çözünmemektedir. Lignin hemiselüloz gibi, normalde nötr koşullar altında 180°C sıcaklık civarındaki su içinde çözünmeye başlamaktadır. Ligninin asidik, nötr ya da alkali ortamlardaki çözünürlüğü, p-kumaril, koniferil, sinapil alkol ya da bunların bir arada bulunmasına bağlı olarak değişmektedir (Hendriks ve Zeeman, 2009).



**Şekil 2.3.** Ligninin yapısı (Gregory, 2007)

### 2.3. Hemiselülozların Enzimatik Hidrolizi ve Ksilanazlar

Hemiselülozun ana bileşeni olan ksilanın, karmaşık yapısının tamamen hidroliz olması için farklı enzimlere ihtiyaç vardır. Ksilanın tamamen hidrolizine katılan bu enzim grubuna ksilanolitik enzim sistemi adı verilmektedir (Subramaniyan ve Prema, 2002). Ksilanın tamamen bozunmasına katılan enzimleri;  $\beta$ -1,4-endoksilanaz (E.C. 3.2.1.8),  $\beta$ -1,4-ksilosidaz (E.C. 3.2.1.37),  $\alpha$ -L-arabinofuranoz (E.C. 3.2.1.55),  $\alpha$ -glukuronosidaz (E.C. 3.2.1.139), asetil ksilan esteraz (E.C. 3.1.1.72) ve fenolik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.73) şeklinde gruplandırmak mümkündür (bkz. Şekil 2.2) (Dhiman ve ark., 2008).

$\beta$ -1,4-Endoksilanaz (E.C. 3.2.1.8) ve  $\beta$ -1,4-ksilosidaz (E.C. 3.2.1.37), hemiselülozun ana bileşeni olan ksilanın hidrolizinde önemli rol oynamaktadır (Dhiman ve ark., 2008). Endoksilanazlar,  $\beta$ -1,4-D-ksilopiranoz üreten ksilooligomerlerin homopolimer omurgası üzerinde hareket etmektedirler (Juturu ve Wu, 2012). Ksilosidazlar ise, indirgen olmayan uçtaki ardışık haldeki D-ksiloz kalıntılarını serbest bırakarak, ksilooligosakkaritlerin hidrolizini katalizlemeden sorumludur (Subramaniyan ve Prema, 2000) .

$\alpha$ -L-Arabinofuranosidazlar (E.C. 3.2.1.55), ksilandaki indirgen olmayan uçtaki  $\alpha$ -L-arabinofuranosil gruplarını (arabananlar, arabinoksilanlar ve arabinogalaktanlar) hidroliz

etmektedir.  $\alpha$ -Glukuronosidazlar (E.C. 3.2.1.139), ksiloz ve D-glukuronik asit arasındaki  $\alpha$ -1,2-glikozidik bağların hidrolizinden sorumludur (Kanwar ve Devi, 2012).

Asetil esteraz, ferulik esteraz, glukuronosidaz ve arabinosidaz gibi enzimler, ksilan omurgasından farklı yan zincirlerin serbest kalması için gerekmektedir (Dhiman ve ark., 2008). Bu enzimler, ksilan molekülündeki asetik asit ve fenolik asit birimlerinin koparılmasını sağlamaktadırlar. Asetil, ferulil ve p-kumoril gruplarının ksilandan koparılması, ligninin uzaklaştırılmasında önemli bir basamaktır. Aynı zamanda hemiselüloz ve lignin arasında ester bağlarının koparılmasıyla ligninin çözülmesine katkıda bulunmaktadır (Subramaniyan ve Prema, 2000).

### **2.3.1. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar**

Hemiselülozun ana bileşeni olan ksilanın hidrolizinden sorumlu ksilanazlar, ksilan bulunan ortamlarda çoğalan mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bakteriler, mayalar, filamentli küfler gibi pek çok mikroorganizma, ksilanın kolayca hidrolize olmasını sağlayan  $\beta$ -1,4-endoksilanaz ve  $\beta$ -1,4-ksilosidazı üretmektedirler (Kanwar ve Devi, 2012; Juturu ve Wu, 2012).

Bakteriyel ksilanazlar, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında kararlılığa sahiptir ve endüstride en çok tercih edilen ksilanaz kaynaklarıdır. Benzer şekilde aktinomisetlerden izole edilen ksilanazlar, tepkime parametrelerinin geniş bir aralığında aktif durumda olmaktadır. Fungal ksilanazlar ise pH 4-6 arasında değişen asidik pH koşullarında kararlıdır. Bununla birlikte, sayıca az olan bazı fungal türlerinden üretilen ksilanazlar, yüksek alkali pH değerlerinde aktiftirler ve bunlar asidik fungal ksilanazlara göre daha az verimlidirler (Dhiman ve ark., 2008).

### **2.3.2. Ksilanazların Sınıflandırılması**

Ksilanazlar, üretildiği organizmaya bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Birden fazla ksilanazın oluşumunun (izoenzim), mikroorganizma kaynaklı olduğu bilinmektedir.



Örneğin, *Aspergillus niger* izoenzim beş endo-ksilanaza sahipken, bitki patojeni *Cochliobolus carbonum* ise üç farklı endo-ksilanaza sahiptir. Ksilanazların çeşitliliği, polimer ksilanın heterojen yapısıyla açıklanmıştır (Juturu ve Wu, 2012). Ksilanazlardaki çeşitlilik, çoklu katalitik etkinin yanı sıra, çeşitli yardımcı etki alanları ile de karakterize edilmektedir. Bunlar, ksilan ve selüloz bağlama bölgeleri, ısıl kararlılık bölgeleri ve fonksiyonu henüz açıklanamamış olan bölgelerdir (Collins ve ark., 2005).

Wong ve arkadaşları (1988), fizikokimyasal özelliklere bağlı olarak ksilanazları iki gruba ayırmışlardır. Birinci gruptaki ksilanazlar, molekül ağırlığı küçük (<30 kDa) ve bazik izoelektrik noktasına sahip iken; ikinci gruptakiler, molekül ağırlığı büyük (>30 kDa) ve asidik izoelektrik noktasına sahip ksilanazlar şeklindedir. Ancak, şu ana kadar tespit edilmiş ksilanazların yaklaşık %30'u, özellikle de fungal kaynaklı ksilanazlar, bu sınıflandırma sistemine göre gruplandırılmamıştır. Bu nedenle daha sonraları enzimlerin sınıflandırılması için standart bir araç haline gelen, glikosil hidrolazlar kategorisi altında, farklı tipteki ksilanazların yer aldığı kapsamlı yeni bir sınıflandırma yapılmıştır. Bu sınıflandırma, sadece enzimin katalitik etki bölgelerinin birincil yapıları karşılaştırılarak oluşturulan enzim ailelerine dayanmaktadır. Bu sınıflandırmada ksilanazlar, normalde 10 (F) ve 11 (G) şeklinde sınırlandırılmıştır. Ancak, E.C. 3.2.1.8 enzim numarası kullanılarak, uygun bir veri tabanında yapılan araştırmada, ksilanaz aktivitesine sahip 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 ve 62 içinde gruplandırılmış enzim aileleri de bulunmuştur (Collins ve ark., 2005).

Ksilanaz üreten, ekstrem termofilik (50-80°C) ve hipertermofilik (> 80°C) özellikteki bazı mikroorganizmaların, termal bölgeler, sıcak su kaynakları, çürümüş organik atıklar gibi sıcak kaynaklardan elde edildiği bildirilmiştir. Termofilik özellikteki bakteriyel ksilanazların, yapılan son sınıflandırmaya göre 10 ve 11'e ait olduğu tespit edilmiş ve diğer glikosid hidrolaz ailelerinin herhangi birine ait termofilik ksilanaz çalışmaları bildirilmemiştir. Yine bu çalışmalarda en kararlı enzimlerin çoğunluğunun, hücre dışı enzimler üreten ekstrem termofil organizmalar olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Collins ve ark., 2005).

*Thermonospora fusca* ve *Bacillus stearothermophilus* gibi termofilik bakteriden üretilen ksilanazların, 65-80°C aralığında optimum sıcaklık sergilediği bildirilmiştir. Isıya dayanıklı bir *Aspergillus* suşundan 37°C sıcaklıkta ısıl kararlı ksilanaz üretilirken,

maksimum aktivitesini 80°C sıcaklıkta gösterdiği bilinmektedir. Termofilik bir anaerob olan *Clostridium stercorarium*'dan üretilen ksilanaz, 70°C'de optimum sıcaklığa ve 80°C sıcaklıkta da 90 dakikalık bir yarı ömre sahiptir. Buna rağmen, *Thermotoga* suşundan elde edilen ksilanaz için optimum sıcaklığı 105°C iken, pH 5,5 ve 95°C sıcaklıkta 90 dakikalık bir yarı ömre sahiptir. Termofilik bir küf olan *Thermoascus aurantiacus*'dan elde edilen ksilanazın, 24 saat boyunca 70°C sıcaklıkta kararlı olduğu bildirilmekte ve 80°C sıcaklıkta 54 dakika yarı ömrü olduğu bilinmektedir. *Paecilomyces variota* ve *T. byssochlamydoides* türlerini de içeren diğer termofilik küf kaynaklı ksilanazların, pH 5-6,5 aralığında optimum sıcaklığının 65-75°C olarak bildirilmektedir (Kulkarni ve ark., 1999).

### **2.3.3. Ksilanazların Endüstrideki Kullanım Alanları**

Mikroorganizmalardan elde edilen ksilanolitik enzimler, biyoteknolojik açıdan birçok endüstriyel işlemlerde kullanılabilirliği nedeniyle oldukça ilgi çekici olmaktadır. Özellikle kağıt ve kağıt hamuru başta olmak üzere, gıda ve hayvan yem endüstrisi gibi alanlarda temel anlamda endüstriyel enzim olma yolunda çok büyük öneme sahiptirler.

Son yıllarda, kağıt ve kağıt hamurunun beyazlatılmasında enzimlerin kullanımı araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Bu işlem için ksilanazlar, düşük maliyetli ve çevreyle dost bir alternatif sunmaktadır. Kağıt endüstrisinde ağartma, kağıt hamurundaki lignin uzaklaştırılarak parlak ya da tamamen beyazlatılmış kağıt hamuru üretme işlemidir. Kağıt hamurundaki lignin, karakteristik bir kahverengi oluşturmaktadır. Ksilanazlar, lignin giderilerek kağıt hamurunun beyazlatılması ve hamurun parlaklığının artırılması için kullanılmaktadır. Kağıt endüstrisinde ksilanazın önemi, ksilanın hidrolizi sonucunda ligninin ayrılmasının kolaylaştırılması ile ilişkilidir. Böylece, eskiden beyazlatma maddesi olarak kullanılan klor bazlı kimyasal maddelerin kullanımını azaltılarak, toksik ve kanserojen etkileri olan yan ürünlerin oluşması ve dolayısıyla çevre kirliliği engellenmiş olmaktadır (Motta ve ark., 2013).

Hayvan beslemede  $\beta$ -1,4-endo-ksilanazlar (E.C. 3.2.1.8), yem içindeki besinsel değeri olmayan bazı bileşenlerin yıkımı sonucunda, yemle beslenen hayvanlarda daha çok

ağırlık artışının sağlanması amacıyla kullanılmaktadır. Çavdarla beslenen tavuklarda yemden geri dönüşüm oranı ve kilo kaybı bağırsaktaki viskozite ile ilişkilendirilmektedir. Et tavukçuluğunda çavdardan elde edilen yemlerde ksilanaz kullanılması, bağırsaktaki viskoziteyi düşürerek yemden daha iyi bir şekilde yararlanılmasını ve dolayısıyla da kilo artışı sağlamıştır. Yemlere ksilanaz eklenmesi ile ksilanın kısmi hidrolizi sonucunda ruminal sindirimde selüloza erişebilirlik kolaylaşmakta ve böylece hayvan yemlerinin besinsel değeri artarak sindirim hızlanmaktadır. Ancak, yemden ksilanın tamamen uzaklaştırılması istenmemektedir. Çünkü, hemiselülozun önemli bir bileşeni olan ksilanların tamamen uzaklaştırılması ile bağırsak hastalıklarının artabileceği anlaşılmıştır (Harris ve Ramalingam, 2010).

Ksilanazların, gıda endüstrisinde yaygın olarak fırıncılıkta ekmek yapımında kullanıldığı bilinmektedir. Ekmeğin ham maddesi olan buğday ununda, önemli miktarda var olan hemiselüloz kalıntıları nedeniyle, ksilanazlar burada uygulama alanı bulmaktadır. Fırıncılıkta ksilanazlar, hamurdaki gluten kısmı üzerinde etkinlik göstererek, ekmekteki su içeriğinin daha fazla dağılmasına yardımcı olmaktadır. Böylece ekmek hamuruna ksilanaz eklenmesiyle, istenilen hamur kıvamı, ekmek hacmi ve raf ömrü önemli ölçüde iyileştirilmiş olmaktadır. Çözünür arabinoksilana karşı yüksek aktiviteye sahip olan ksilanazların, buğday unu hamurundaki viskozitenin hızla düşmesini sağlayarak, buğday ayırma işleminde mükemmel bir performans gösterdiği bildirilmiştir. Ksilanazların gıda endüstrisinde ayrıca, meyve suyu, şarap ve bira gibi içeceklerin berraklaştırılmasında, nişasta ekstraksiyonunda, kahve ekstraksiyonunda ve çözünür kahve hazırlanmasında da kullanıldığı bilinmektedir (Kulkarni ve ark., 1999).

Yüzey aktif maddeler (surfaktanlar) olarak kullanılması için alkil glikozitlerin üretiminde ksilanazlar ilgi çekmektedir. Alkil glikozitler, D-glikoz ve yağ alkolü gibi monomerik şekerlerden üretilmektedir. Fakat polisakkarit kullanılarak doğrudan glikozilasyonu, polisakkarit hidrolizine gerek kalmadığından endüstriyel üretim için daha uygun olmaktadır. Bu yüzden bu işlemlerde ksilanaz kullanımı kolaylık sağlamaktadır (Collins ve ark., 2005).

Ksilanazların bir diğer uygulaması, tarım ve gıda endüstrisi atıklarında bol miktarda bulunan ksilanın, ksilanaz kullanılmasıyla ksiloza dönüşümü sağlanarak atık arıtımında

kullanılmasıdır. Bazı ksilanazlar da bitki hücrelerinden protoplast üretimi için, hücre duvarının yumuşatılmasında kullanılmaktadır (Wong ve ark., 1988).

İkinci nesil biyoyakıtlar, lignoselülozik maddelerin dönüşümü sonucu oluşan temel ürünlerdir. Yenilenemeyen kaynak olan fosil yakıtlara, piyasa değeri açısından yüksek ve yenilenebilir bir yakıt olan etanol alternatif olarak tespit edilmiştir. Ksilanazlar, diğer hidrolitik enzimlerle birlikte, lignoselülozik biyokütleden etanol gibi biyolojik yakıt üretimi için kullanılabilir. Biyoetanol üretiminde ilk adım, lignoselülozik hammaddeden selüloz ve hemiselülozu serbest bırakmak için lignin giderilmesini içerir. İkinci adımda ise, serbest şekerlerin oluşumu için karbonhidrat polimerinin yıkımı ve daha sonra etanol üretimi için beş ve altı karbonlu şekerlerin karışımı ile fermantasyon gerçekleştirilmektedir (Motta ve ark., 2013).

#### **2.4. *Scytalidium thermophilum***

*Scytalidium thermophilum* (*Humicola insolens*), mantar gübre üretiminde önemli termofilik bir kültür (Şekil 2.4). Mantar gübre üretiminde önemli bir rol oynayan termofilik küfler alemi, gübreleşme sürecinin son aşamasında pastörizasyon sürecinden geriye kalan sporelerden büyük çapta çoğaltılmaktadır. Bunların gübre kalitesine önemli ölçüde katkı sağladığına inanılmaktadır. Mantar miselinin büyümesi üzerine bu mantarların etkisi üç farklı şekilde açıklanmıştır. İlk olarak bunlar, mantar miselinin büyümesine engel olacak olan gübredeki amonyak konsantrasyonunu düşürmektedirler. İkinci olarak, mantar miselinin büyümesi için görünüşte hareketsiz bir biçimdeki besinler olarak kullanılabilirler. Üçüncü olarak da, *Scytalidium thermophilum* ve diğer pek çok termofilik mantarlar için kanıtlandığı gibi, mantar miseli üzerinde büyümeyi geliştirici etkiye sahip olabilmektedirler (Wiegant, 1992).



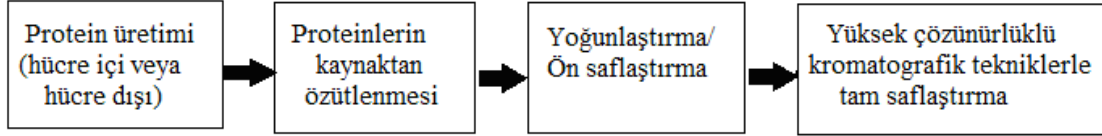
**Şekil 2.4.** *Scytalidium thermophilum*'un mikroskopik görüntüsü (Anonim, 2013b)

## 2.5. Protein Saflaştırma

Tüm organizmalarda karmaşık fonksiyonlar ve metabolik tepkimelerin çoğu proteinlerce gerçekleştirilmektedir. İlgili duyulan bir proteinin işlevi, yapısı ve diğer proteinlerle etkileşiminin karakterizasyonu için protein saflaştırması şarttır. Bir proteinin amino asit kompozisyonu ve dizisinin aydınlatılması öncelikle ilgili proteinin saf olmasını gerektirir. Saf bir protein, karmaşık bir karışımdan tek bir protein türünün izole edilmesi sonunda elde edilmektedir. Saflaştırma sürecinin çeşitli adımları sonucunda, protein içinde hapsoldüğü ortamdan kurtarılmakta, karışımda bulunan protein ve protein olmayan kısımlar birbirinden ayrılarak istenen protein tüm diğer proteinlerden ayrıştırılmaktadır. Başlangıç malzemesi genelde bir biyolojik doku veya mikrobiyal kültür olabilmektedir. İlk bakışta, genellikle farklı birçok protein içeren bir hücre ya da doku homojenatından bir proteinin saflaştırılması zor bir iş gibi görünmektedir. Ancak uygulamada, bir proteinin saflaştırılması için ortalama sadece dört farklı ayırma adımına ihtiyaç vardır. Her bir protein saflaştırma süreci, ilgili proteine özgün olmaktadır (Wilson ve Walker, 2010).

Endüstriyel ve klinik uygulamalar ya da akademik çalışmalar için proteinlerin elde edildiği kaynaklar oldukça farklılık göstermektedir. Protein kaynaklarının başlıca gruplarını ise mikroorganizmalar, bitkiler, hayvan dokuları ve rekombinant proteinler

oluşturmaktadır. Protein kaynaklarının bu kadar farklı ve çeşitli olmasına rağmen, bu kaynaklardan elde edilen proteinler ister doğal isterse rekombinant olsunlar, genellikle benzer saflaştırma protokolleri ve teknikleri ile saflaştırılmaktadır (Şekil 2.5) (Tuncer, 2008).



**Şekil 2.5.** Protein saflaştırmada takip edilen genel bir protokol şeması (Tuncer, 2008)

Protein saflaştırma süreci para, zaman, çaba ve değerli ekipmanların kullanımını gerektirmektedir. Saflaştırma stratejisinin doğru tasarımı, proteinin molekül ağırlığı, izoelektrik noktası, hidrofobisite özelliği, karbonhidrat varlığı, substratlara ilgisi ve metal iyonlarına duyarlılığı hakkında bilgi edinilmesinde yardımcı olabilmektedir. Protein saflaştırma çalışmasından başarı elde edebilmenin anahtarı, en uygun tekniğin seçimine, seçilen tekniğin geliştirilmesine, verimi arttırmak ve saflaştırma sürecinin basamak sayısını en aza indirmek için seçilen tekniklerin mantıklı bir şekilde kullanılmasına bağlı olmaktadır (Roe, 2006).

Protein saflaştırılmasındaki amacı ikiye ayırmak mümkündür. Hedef proteinin saflaştırılması endüstriyel kullanım amacıyla yapılacaksa, yüksek miktarda, kararlı, iyi karakterize edilmiş, düşük maliyette, saflık oranı yüksek olmayan preparatlara ihtiyaç duyulmaktadır. Burada saflaştırma basamakların sayısı, yöntemin süresi, son ürünün maliyeti ve verimliliği gibi konular birinci derecede önem teşkil etmektedir. Şayet protein saflaştırma, proteinin yapısal, işlevsel gibi özelliklerinin belirlenmesini içeren akademik bir amaçla yapılacaksa, mümkün olduğunca yüksek saflıkta homojen proteinlere ihtiyaç duyulmaktadır (Roe, 2006).

## **2.6. Protein Saflaştırma Yöntemleri**

Protein saflaştırma yöntemlerini, ön saflaştırma ve tam saflaştırma metotları olarak iki ana başlık altında toplamak mümkündür.

### **2.6.1. Ön Saflaştırma Yöntemleri**

Proteinlerin ekstraksiyonu ve çöktürülmesi, diyaliz, ultrafiltrasyon gibi teknikler, ucuz, çabuk ve basit bir şekilde herhangi bir proteinden kirletici bileşeni (hücre organeli, lipid, safsızlıklar, proteinler gibi) kısmen ayırarak (kısmi saflaştırma) proteini konsantre hale getiren ön ayırma teknikleridir (Tuncer, 2008).

Saflaştırma işleminin ilk adımı, proteinlerin kaynaklarından özütlenmesi (ekstraksiyonu) ile başlamaktadır. Hedef proteinin hücre içi (bitki ve hayvan dokuları, bakteri, maya ve bitki hücreleri) ya da hücre dışı (mikroorganizmaların fermantasyonu veya hayvan hücre kültürleri ile üretilen proteinlerin çoğu) kaynaklı olmasına göre ekstraksiyon işlemi değişiklik göstermektedir. Hücre dışına salınan hedef proteinlere genelde filtrasyon ya da santrifüjleme teknikleri ile ulaşılırken, hücre içindeki proteinlere ulaşmak için doku ve hücre parçalama yöntemleri (ozmotik şok, deterjan ve enzimle parçalama, bıçak ve elle homojenizasyon gibi) kullanılmaktadır (Roe, 2006).

Ham protein özütlerinden hedef proteinin çöktürülmesi; nötral tuzlar, organik çözücüler ve yüksek moleküler kütleli organik polimerler gibi ajanlar kullanılarak veya protein solüsyonunun denatürasyonu ile başarılabilir. Protein saflaştırmasında, yaygın olarak kullanılan ilk adım, amonyum sülfat gibi yüksek çözünürlüklü bir tuz ile proteinlerin çökeltilmesidir. Bu işlemde, çözeltiye giderek artan miktarda amonyum sülfat eklenir. Çözeltiye eklenen amonyum sülfat bir proteinin yüzeyinde bulunan hidrofobik grupları saran su tabakasını uzaklaştırır. Böylece protein-su etkileşimleri ortadan kalkar ve hidrofobik grupların etkileşmesi sonucunda çökeltme meydana gelmektedir (Tuncer, 2008).

Diyaliz ise, yarı geçirgen bir zardan proteinlerin geçişine izin vermeden tuz ve su gibi küçük moleküllerin uzaklaştırılması ya da bir sonraki aşamada etkili bir şekilde verim

almak için saflaştırma adımından sonra tamponun değiştirilmesi amacıyla sıkça kullanılmaktadır (Roe, 2006).

Su ve diğer küçük moleküllerin, santrifüjleme ya da yüksek basınç gibi transmembran gücü ile yarı geçirgen bir zardan geçirilerek proteinlerin konsantre edilmesi, ultrafiltrasyon tekniği olarak tanımlanmaktadır (Roe, 2006).

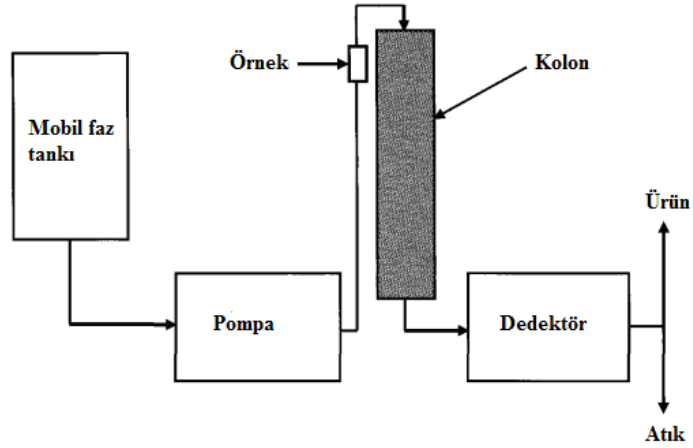
### **2.6.2. Tam Saflaştırma Yöntemleri**

Hedef proteinin daha yüksek oranlarda saflaştırılması ve en sonunda da homojen saflıkta elde edilebilmesi için, yüksek çözünürlüklü, daha ekonomik, kapasitesi yüksek ve yüksek verimlilikte ürün veren kromatografik tekniklerin kullanılması gerekmektedir.

Kelime anlamıyla kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbiriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, tanınması ve saflaştırılması yöntemlerinin genel adı olarak tanımlanmaktadır. Kolon kromatografide sabit faz, metal ya da cam kolon içinde paketlenmiştir. Analit karışımı ve mobil faz (elüent), bir pompalama sistemi ile kolon boyunca geçirilmektedir. Sabit faz (matris), kolonun iç duvarına ince bir film tabakası şeklinde kaplanan küçük parçacıklardan oluşmaktadır (Wilson ve Walker, 2010).

Bir kromatografik sistem; bir kolon, hareketli faz tankı, pompa, örnek enjektörü, detektör ve bazen bir fraksiyon toplayıcısından oluşmaktadır (Şekil 2.6).





**Şekil 2.6.** Basit bir kromatografi sisteminde yer alan ekipmanlar (Tuncer, 2008)

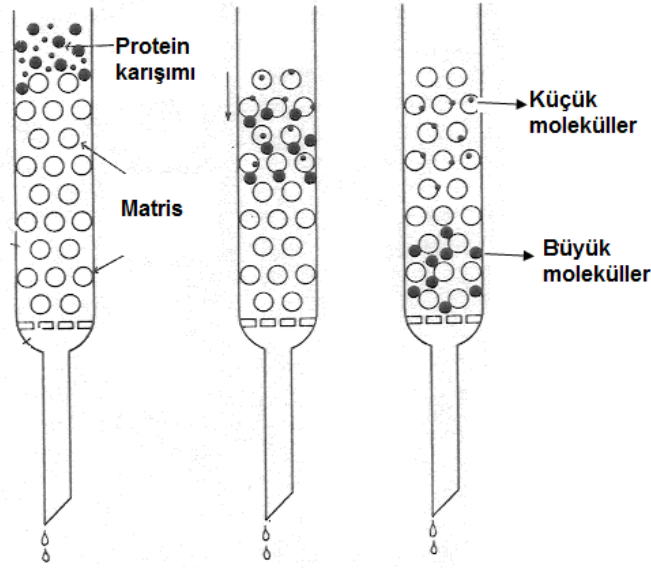
### 2.6.2.1. Jel Filtrasyon Kromatografi

Jel filtrasyon kromatografi, gözenekli matrisin moleküler elek özelliği ile moleküllerin büyüklüğü ve şekline bağlı olarak ayrılmasına dayanmaktadır. Kolonun matrisi, genelde ya stiren ya da divinilbenzen gibi çapraz bağlı kopolimerlerden oluşmaktadır ve analitlerin ayrılması için uygun bir mobil faz ile dengelenmektedir (Wilson ve Walker, 2010).

Bu kromatografi, biyolojik doku ve ekstraktlarındaki proteinlerin molekül büyüklüklerindeki çeşitlilik nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Jel filtrasyon kromatografi, tampon değişimi, protein olmayan kirleticilerin uzaklaştırılması (DNA, virüsler gibi), biyolojik etkileşimlerin incelenmesi gibi pek çok amaçla kullanılmaktadır (Roe, 2006).

Jel filtrasyon kromatografisinin temel prensibi oldukça basittir. Moleküllerin ayrıştırılması için kullanılacak olan uygun bir hareketli faz (tampon), matris (jel) veya porlu-cam granülleri ile paketlenmiş bir kolondan ibarettir. Ayrıştırılması yapılacak olan molekül içeren örnek materyal karışımı, bir bant oluşturacak şekilde hareketli faz ile dengelenmiş kolon yatağının üst kısmına yüklenir. Yükleme takiben kolonun üst kısmından hareketli faz eklendikçe örnek kolon içerisine doğru hareket eder. Bu sırada jel materyali arasındaki gözeneklere (porlara) giremeyecek kadar büyük moleküller, jel

materyalinin ara boşluklarından geçerek, elüsyon sıvısında (elüentte) ilk olarak bu moleküller kolondan atılır. Daha küçük moleküller ise, gözenekli jel materyalinin içindeki ve dışındaki hareketli faz arasında dağılmakta ve gözenekler arasına girmektedirler. Bu nedenle de, kolondan çıkan elüent içinde en son küçük moleküller çıkarlar (Şekil 2.7) (Tuncer, 2008).



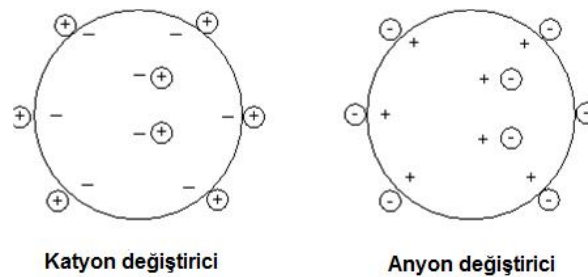
Şekil 2.7. Jel filtrasyon kromatografi ile ayırıştırmanın temel prensibi (Tuncer, 2008)

### 2.6.2.2. İyon Değişim Kromatografi

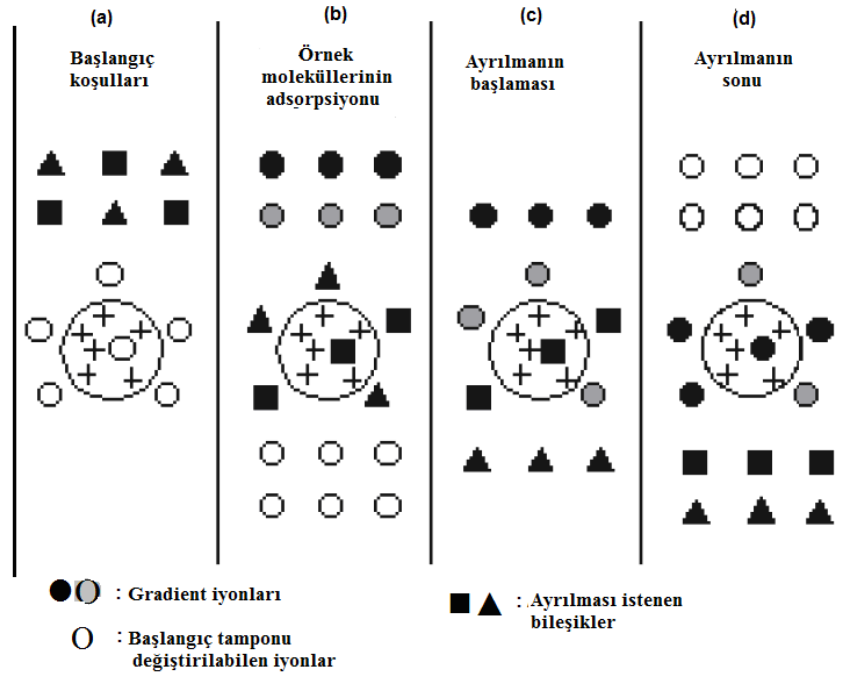
Bu kromatografi yöntemi, iyon değiştiriciye kovalent bağlı zıt yüklü sabit faz ile analit arasındaki elektrostatik çekime dayanmaktadır. Bu teknik, yüksek çözünürlük ve yüksek kapasitesi nedeniyle peptitler, nükleik asitler, polinükleotidler ve diğer yüklü moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için sıkça tercih edilmektedir. İyon değiştiricilerin katyon değiştirici ve anyon değiştirici matrisler olmak üzere iki tipi bulunmaktadır (Şekil 2.8). Katyon değiştiriciler negatif yüklü gruplara sahiptir ve pozitif yüklü katyonları çekerler. Negatif yükler asidik grupların iyonizasyonu sonucu olduğundan, katyon değiştiricilere asidik iyon değiştiriciler de denilmektedir. Anyon değiştiriciler ise, pozitif yüklü gruplardır ve negatif yüklü anyonları çekerler. Genellikle

pozitif yükler, protonların bazik gruplarla birleşmesi sonucunda oluştuğundan, aynı zamanda bu tipteki iyon değiştiriciler bazik iyon değiştiriciler olarak da bilinmektedir (Wilson ve Walker, 2010).

İyon değişim kromatografinin çalışma prensibini birkaç adımda açıklayabilmek mümkündür. İlk olarak, iyon değiştiricinin (kolon materyalinin), ayrıştırılmak istenen molekülleri bağlamasını sağlamak için, ortamın pH ve iyonik kuvveti dengelenerek, başlangıç koşullarına getirilmesi sağlanır (Şekil 2.9a). Daha sonra dengelenmiş kolona örnek yüklenir ve örnek, hareketli faz ile iyon değiştiricinin matris yapısı boyunca değişim bölgesine ulaşır (Şekil 2.9b). Bu aşamada örnek içerisindeki uygun yüklü moleküller, değiştirilebilen iyonlarla (genellikle klor veya sodyum gibi basit anyonlar veya katyonlar) yer değiştirerek, kolon matrisine geri dönüşümlü olarak bağlanırlar (Şekil 2.9c). Kolona bağlanmayan moleküller ise hareketli faz (yıkama tamponu) ile birlikte kolonu terk ederler. Kolon materyaline geri dönüşümlü olarak bağlanmış olan yüklü moleküllerin kolondan elüsyonu, elüsyon tamponunun pH'nın değiştirilmesi veya iyonik kuvvetinin artırılması ile gerçekleştirilir. Bunun için, kolon matrisine iyonik olarak bağlı bulunan yüklü moleküllerin de-adsorpsiyonu, elüsyon sıvısı içindeki tuz derişiminin dereceli olarak artırılması ile sağlanır. Tuz derişiminin kademeli olarak artırılması, yüklü moleküllerin bağlanma derecelerine bağlı olarak, bu moleküllerin sırası ile kolondan elüsyonu sağlanmaktadır (Şekil 2.9d) (Tuncer, 2008).



**Şekil 2.8.** İyon değiştirici matris tipleri (Tuncer, 2008)



**Şekil 2.9.** İyon değişim kromatografisinin temel prensibi (tuz gradienti ile) (Khan, 2012, değiştirilmiştir)

## 2.7. Elektroforez Uygulamaları

Elektroforez terimi, bir elektriksel alanın etkisi altında yüklü bir parçacığın hareketini açıklamaktadır. Amino asitler, peptitler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi pek çok önemli biyolojik moleküller, verilen herhangi bir pH değerinde, çözelti içinde elektriksel yüklü anyon (-) veya katyon (+) oluşturabilecek iyonlaşabilen gruplara sahiptir. Bu yüklü parçacıklar sahip olduğu net yüke bağlı olarak, bir elektriksel alan altında anot ya da katoda göç ederler. Elektroforez işlemleri, ayrılacak moleküllerin iyonizasyon durumunu sürekli korumak amacıyla uygun bir tampon içerisinde gerçekleştirilmektedir. pH'daki herhangi bir değişiklik, toplam yükün ve ayrılacak moleküllerin hareketliliğinin (elektriksel alandaki göç hızı) değişmesine neden olur. Akrilamid jel kullanılarak yapılan elektroforez, PAGE olarak kısaltılan poliakrilamid jel elektroforezi olarak adlandırılmaktadır (Wilson ve Walker, 2010).

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), protein karışımlarının nitel olarak analizi için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Bu metot

proteinlerin büyüklüğüne göre ayrılmasına dayandığı için, saflaştırılmış bir proteinin görüntülenmesi ve molekül ağırlığının belirlenmesi için oldukça kullanışlıdır. SDS ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$ ) anyonik bir deterjandır. Örnekler, SDS ve  $\beta$ -merkaptetanol içeren örnek tamponu ile birlikte 5 dakika boyunca kaynatılır (Wilson ve Walker, 2010). Güçlü bir şekilde bağlı SDS ve  $\beta$ -merkaptetanol proteinin tersiyer yapısını bir arada tutan disülfit köprülerini kırarak proteini denatüre ederler. Böylece karışımdaki her bir protein tamamen denatüre olarak, polipeptit zinciri boyunca bir dizi negatif yüklü SDS molekülü ile tersiyer yapı açılarak düz bir çubuk şeklini alır. Protein zinciri herhangi bir dönüş hareketi ile katlanabilir eğilimindedir; ancak denatürasyon sonucunda protein zincirinin farklı bölgelerinde oluşan negatif yükler arasındaki itme nedeniyle tersiyer sarmal yapıdan, çubuk şeklinde düz bir konformasyona dönüşerek bu yapıda kalır (Roe, 2006).

Elektroforez sonrasında proteinler, jele bağlanmayan fakat proteinlere bağlanan coomassie mavisi ya da gümüş nitrat gibi bir boyama metodu ile bant şeklinde görünür hale getirilmektedir (Roe, 2006).

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454, EK 1'de açıklandığı gibi YpSs agar (yeast extract-starch-agar) üzerinde çoğaltılmış ve stok kültür olarak kullanılmıştır. Mikroorganizma, agar üzerinde 45°C sıcaklıkta sporlanana kadar inkübe edilmiş ve en fazla 1 ay oda sıcaklığında saklanmıştır. Stok sporlar sıvı ön kültüre aşıl原因arak, 45°C sıcaklıkta 155 rpm çalkalama hızındaki bir çalkalamalı inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilerek çoğaltılmış ve enzim üretimi için ana kültüre %2 (h/h) oranında aşıl原因mıştır. Ana kültür ortamında, 2 mm elekten geçirilmiş mısır koçanı (20 g/L) karbon kaynağı olarak kullanılmıştır (EK 1). Enzim üretimi, 100 mL ana kültürün bulunduğu 250 mL'lik erlenlerde 45°C sıcaklıkta 155 rpm çalkalama hızındaki çalkalamalı inkübatörde 5 gün boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

Üretim ortamından hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için kültür ortamı ilk olarak kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Filtrat daha sonra 14,000 x g'de 7 dakika santrifüj edilmiş ve 0,45 µm gözenekli bir membrandan geçirilmiştir. Elde edilen süpernatant ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır.

#### 3.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

*Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454 ksilanaz aktivitesi, ksilandan gelen serbest indirgen şeker miktarı DNS (3,5-dinitro salisilik asit) metodu (EK 2) ile ölçölmektedir (Miller, 1959). Substrat olarak kullanılan %1'lik kayın ağacı ksilani, 50 mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) çözdürölmüş ve toplam reaksiyon karışımı 11 mL olacak şekilde uygun oranda seyreltilmiş enzimin 1 mL'si ile karıştırılmıştır. Karışım, 60°C sıcaklıkta 4 dakika boyunca inkübe edilmiş ve 2 dakika aralıklarla 1 mL karışım alınıp 1,5 mL DNS ile karıştırılarak reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon sonunda oluşan şeker (ksiloz) miktarı, 5 dakika boyunca kaynatılarak gözlemlenmiştir. Şeker miktarına bağlı renk oluşumu spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda absorbans değeri ile ölçölmüştür.

Standart olarak 1 mg/mL ksiloz çözeltisi kullanılmıştır. Stok çözeltiden 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0) ile uygun şekilde seyreltme yapılarak 0-20-40-60-80-100-120-160 µg/mL konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlanmış ve konsantrasyona bağlı şeker miktarı, 60°C sıcaklıkta 1 mL standart çözeltinin 1,5 mL DNS ile karıştırılmasıyla belirlenmiştir. Şeker miktarına bağlı renk oluşumu yine 5 dakika kaynatılarak gözlemlenmiş ve renk oluşumu spektrofotometrik olarak 540 nm dalga boyunda absorbans değeri ile ölçülmüştür. Elde edilen absorbans verileri kullanılarak ksiloz standart eğrisi çizilmiştir (EK 3).

Bir ünite ksilanaz aktivitesi (IU), verilen şartlarda (pH ve sıcaklık), dakikada 1 mikromol indirgen şekeri (ksiloz) açığa çıkarmak için gerekli enzim miktarı olarak ifade edilmektedir. Enzim aktivitesi “Eşitlik 3.1” kullanılarak hesaplanmıştır:

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

Denklemdede;

IU: µmol ksiloz dakika<sup>-1</sup>

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

Seyreltme faktörü: Enzimin seyreltilme oranı

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

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

### 3.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein miktarı, standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılarak belirlenmiştir (Bradford, 1976) (EK 4).

### 3.4. Ksilanaz Saflaştırma Yöntemi

Enzim saflaştırması sırasıyla; jel filtrasyon kromatografi ve anyon değişim kromatografi teknikleriyle ÄKTA Prime FPLC (Amersham Biosciences, İsveç) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Kültürün 5. gününde alınan ham enzim çözeltisi hücrelerden arındırmak amacıyla, ilk olarak 14,000 x g'de 7 dakika santrifüj edilmiş, daha sonra da 0,45 µm gözenekli membrandan geçirilerek hazırlanmıştır. Saflaştırma çalışmalarında kullanılacak bütün sıvılar da kullanım öncesi 0,45 µm gözenekli membrandan geçirilerek filtrelenmiştir.

Saflaştırmanın ilk adımı HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences, İsveç) yüksek çözünürlüklü jel filtrasyon kolonunda yürütülmüştür. Kolonun özellikleri EK 5'de verilmiştir. Kolon dengelenmesi 0,5 mL/dk akış hızında 50 mM pH 7,0 sodyum fosfat tamponu ile yapılmıştır. Saflaştırma işlemi, 7 mL örnek hacmi kullanılarak 0,5 mL/dk akış hızı, 400 mL elüsyon hacmi ve 6 mL fraksiyonlar toplanarak dengeleme tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Her fraksiyonda ksilanaz aktivitesi test edilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesine sahip fraksiyonlar birleştirilmiş ve 3 kDa membrana (Millipore, Almanya) sahip bir santrifüj konsantratör ile konsantre edilip bir sonraki saflaştırma adımı için kullanılır hale getirilmiştir.

Saflaştırmanın ikinci adımında HiPrep 16/60 Q XL (Amersham Biosciences, İsveç) anyon değişim kolonu kullanılmıştır. Kolonun özellikleri EK 6'da verilmiştir. Kolon, 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponu ile 3 mL/dk akış hızında dengelenmiştir. Saflaştırma işlemi 3 mL örnek hacmi, 3 mL/dk akış hızı ve dengeleme tamponu içinde 1 M NaCl (pH 7,0) kullanılarak 0-1 M NaCl tuz gradienti ile 6 mL fraksiyonlar toplanarak 300 mL elüsyon hacmi ile yapılmıştır. Bütün fraksiyonlara ksilanaz aktivitesi testi uygulanmıştır. Yüksek ksilanaz aktivitesine sahip fraksiyon, 3 kDa membran (Millipore, Almanya) santrifüj konsantratör ile konsantre edilmiştir.

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



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

$$\text{Spesifik Enzim Aktivitesi (IU/mg)} = \frac{\text{Toplam enzim aktivitesi (IU)}}{\text{Toplam protein miktarı (mg)}} \quad (3.3)$$

$$\text{Saflaştırma Oranı (Kat)} = \frac{\text{Spesifik enzim aktivitesi}}{\text{Başlangıçtaki spesifik enzim aktivitesi}} \quad (3.4)$$

### 3.5. Agar Test Metodu

Spektrofotometrik olarak tespit edilen ksilanaz aktivitesi, aktivite boyama yöntemiyle de incelenmiştir. Bu amaçla, 50 mM sodyum fosfat pH 7,0 tamponu içerisinde %1,5 (a/h) agar ve %1,5 (a/h) kayın ağacı ksilan homojen şekilde çözülerek agar hazırlanmış ve petri kaplarına yaklaşık 4 mm kalınlıkta dökülmüştür. Agar donduktan sonra üzerinde 3 mm çapında delikler açılarak, deliklere ham enzim, saflaştırılmış ksilanaz, pozitif kontrol amacıyla ticari ksilanaz ve negatif kontrol olarak da 50 mM sodyum fosfat pH 7,0 tamponu yüklenmiştir. Örneklerin agara difüzyonu ve enzimlerin aktivite göstererek ksilan parçalanma reaksiyonunun gerçekleşmesi için petri kapları 60°C sıcaklıkta 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesinin tespiti için örnekler %1 (a/h) kongo kırmızı ile boyanmıştır. Boyanın uzaklaştırılması 1 M NaCl ile sağlanmış ve %0,2 (h/h) asetik asit ile renk açılması sabitlenmiştir.

### **3.6. Ksilanazın Karakterizasyon Yöntemleri**

#### **3.6.1. Elektroforetik Karakterizasyon Yöntemleri**

##### **3.6.1.1. Moleküler Ağırlık Tayini (SDS-PAGE)**

Ksilanazın homojenliği ve molekül ağırlığı EK 7'deki şekilde, Mini Protean Tetra Cell (Biorad, Almanya) sisteminde sodyum-dodesil sülfat (SDS) varlığında %7 (h/h) ve %12 (h/h) jel konsantrasyonları kullanılarak poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemiyle belirlenmiştir (Laemmli, 1970). Jel 200 V sabit voltajda çalıştırılmıştır. Enzimin molekül ağırlığı, 3-100 kDa aralığını kapsayan standart proteinleri içeren düşük molekül ağırlıklı standartlar (Fermantas, Amerika) ile karşılaştırılmıştır. Elektroforetik çalışmadan sonra jeller, Blum ve arkadaşlarının (1987) kullandıkları gümüş boyama metodu ile boyanmıştır (EK 8).

##### **3.6.1.2. İzoelektrik Nokta Tayini (pI)**

Saf enzimin izoelektrik noktası (pI), Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvar'da belirlenmiştir. pH aralığı 3-10 olan amfolitleri içeren izoelektrik fokuslama (Biorad, Almanya) jel sisteminde, hem voltaj hem de pH gradientinin olduğu bir alanda elektroforetik analiz gerçekleştirilmiştir. Jel uzunluğu 7 cm olup, 25 µL x 230 ng/µL hacminde örnek yüklenmiş ve jel 20000 V'da çalıştırılmıştır. Daha sonra jeller coomassie boyama metodu ile boyanmıştır.

#### **3.6.2. Kinetik Karakterizasyon Yöntemleri**

*Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454 ksilanazı, aktivite ve dayanım üzerine pH ve sıcaklığın etkisi, kinetik parametreler ve substrat seçiciliği incelenerek karakterize edilmiştir.

### 3.6.2.1. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine pH Etkisi

Ksilanaz aktivitesi üzerine pH'nin etkisini belirlemek için, sıcaklık (60°C) ve enzim konsantrasyonu sabit tutularak, enzim aktivitesi 50 mM konsantrasyonundaki 1 birim pH farkı ile test edilmiştir. Bunun için, farklı pH değerlerine sahip (pH 3,0-11,0) ve içerisinde %1 (a/h) kayın ağacı ksilan bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Enzim ve substrat 60°C sıcaklıkta 3 dakika boyunca inkübe edilerek standart enzim aktivite tayini uygulanmıştır. Bağlı aktivite, çalışılan pH aralığında gözlemlenen en yüksek ksilanaz aktivitesi baz alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar pH karşı bağlı aktivite cinsinden grafiğe alınmış ve optimum pH bulunmuştur.

Ksilanaz aktivitesinin kararlılığı üzerine pH'nin etkisini belirlemek için, enzim örneği 6 saat boyunca 1 birim pH farkı ile pH 3,0-11,0 aralığındaki tamponlar içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca belirli aralıklarla (15-30-60-120-240-360 dakika) alınan örneklerle yukarıda tarif edildiği gibi standart enzim aktivite tayini uygulanmıştır. Bağlı aktivite, çalışılan pH aralığında gözlemlenen en yüksek ksilanaz aktivitesi baz alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar zamana karşı bağlı aktivite cinsinden grafiğe alınmış ve kararlı olduğu pH belirlenmiştir.

### 3.6.2.2. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Ksilanaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi, enzim konsantrasyonu ve pH sabit tutularak, 30-80°C aralığında (10°C aralıklarla) enzim aktivitesi test edilerek belirlenmiştir. 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponunda çözdürülerek hazırlanmış %1 (a/h) kayın ağacı ksilan çözeltisi 5 dakika, enzim ise 2 dakika ön inkübasyonla dengeye getirilmiş ve standart enzim aktivite testi uygulanmıştır. Bağlı aktivite, çalışılan sıcaklık aralığında gözlemlenen en yüksek ksilanaz aktivitesi baz alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar sıcaklığa karşı bağlı aktivite cinsinden grafiğe geçirilmiş ve optimum sıcaklık bulunmuştur.

Ksilanaz aktivitesinin kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için, enzim 4 saat boyunca 4-70°C sıcaklık aralığında inkübe edilmiş ve reaksiyon karışımından belirli

zaman aralıklarında (15-30-60-120-180-240-360 dakika) örnek alınmıştır. Bağlı aktivite, çalışılan sıcaklık aralığında gözlemlenen en yüksek ksilanaz aktivitesi baz alınarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar zamana karşı bağlı aktivite cinsinden grafiğe geçirilmiş ve kararlı olduğu sıcaklık belirlenmiştir.

### 3.6.2.3. Ksilanazın Kinetik Analizi

Ksilanazın kinetik analizi, enzim konsantrasyonu sabit tutularak, kayın ağacı ksilanının %0,01-2,0 (a/h) aralığında değişen farklı substrat konsantrasyonlarındaki enzim aktivitesi test edilerek yapılmıştır. Ksilanaz aktivitesine karşı substrat konsantrasyonu grafiğe geçirilerek, Michaelis-Menten eğrisi elde edilmiştir. Kinetik sabitleri, ( $K_m$  ve  $V_{max}$ ) Lineweaver-Burk (1934) grafiğinden hesaplanmıştır.

### 3.6.2.4. Substrat Seçiciliği

Ksilanazın substrat seçiciliği yulaf ksilanı, kayın ağacı ksilanı, huş ağacı ksilanı, avicel ve karboksimetil selüloz ticari substratları ile mısır koçanı, ayçiçek sapı, pamuk sapı ve buğday kepeği olan lignoselülozik substratlara karşı enzim ilgisi ölçülerek incelenmiştir. Ticari substratlar %1 (a/h) konsantrasyonda 50 mM sodyum fosfat (pH 7.0) içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Ticari substratın 10 mL'si 0,5 mL saf enzimle karıştırılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Ksilanaz aktivitesi, enzimatik reaksiyon sonucu ortaya çıkan indirgeyici şeker miktarı dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile tayin edilmiştir. Reaksiyon çözeltisinden alınan 1 mL örnek, 1,5 mL DNS ile karıştırılmış ve renk oluşumu için 5 dakika kaynatılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Lignoselülozik substratlar ise öğütülüp 2 mm gözenek çapındaki elekten geçirildikten sonra, 100 mL'lik bir erlen içerisinde 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponu ile karıştırılıp (0,75 g lignoselülozik substrat + 49,5 mL tampon) 121°C sıcaklıkta 20 dakika boyunca otoklavlanarak ön işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra 0,5 mL saf enzim ile karıştırılan bu maddeler çalkalamalı bir inkübatörde 180 rpm çalkalama

hızında 50°C sıcaklıkta 8 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon karışımından ilk 2 saat 30 dakika, 2-8 saat arasında ise 1 saat zaman aralıklarıyla 1 mL örnek alınarak 1,5 mL DNS ile reaksiyon durdurulmuştur. Kaynatma sonucunda ksiloza bağlı renk oluşumu, spektrofotometre ile 540 nm dalga boyunda absorbans değeri ile ölçülmüştür. Ölçülen bu absorbans değerleri ve ksiloz standart eğrisi kullanılarak ksilanaz aktiviteleri hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR

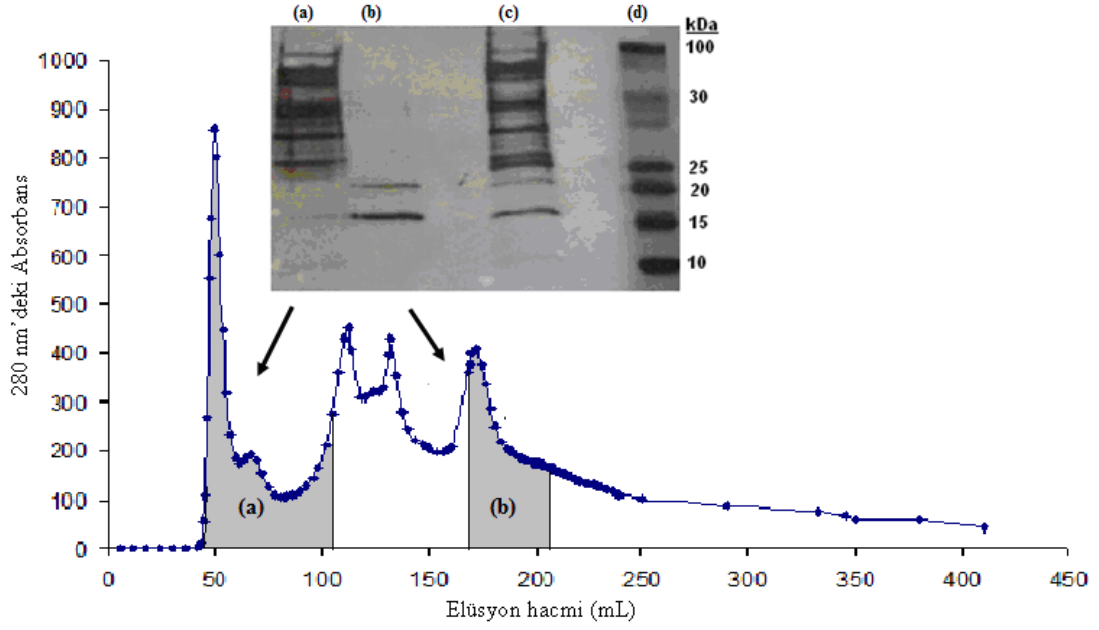
### 4.1. Ksilanazın Saflaştırılması

Ana kültür ortamından en yüksek aktivitenin gözlemlendiği 5'inci günde alınan süpernatant, ksilanazın saflaştırılması amacıyla jel filtrasyon ve anyon değişimi içeren iki adımlı kolon kromatografi tekniğine tabi tutulmuştur.

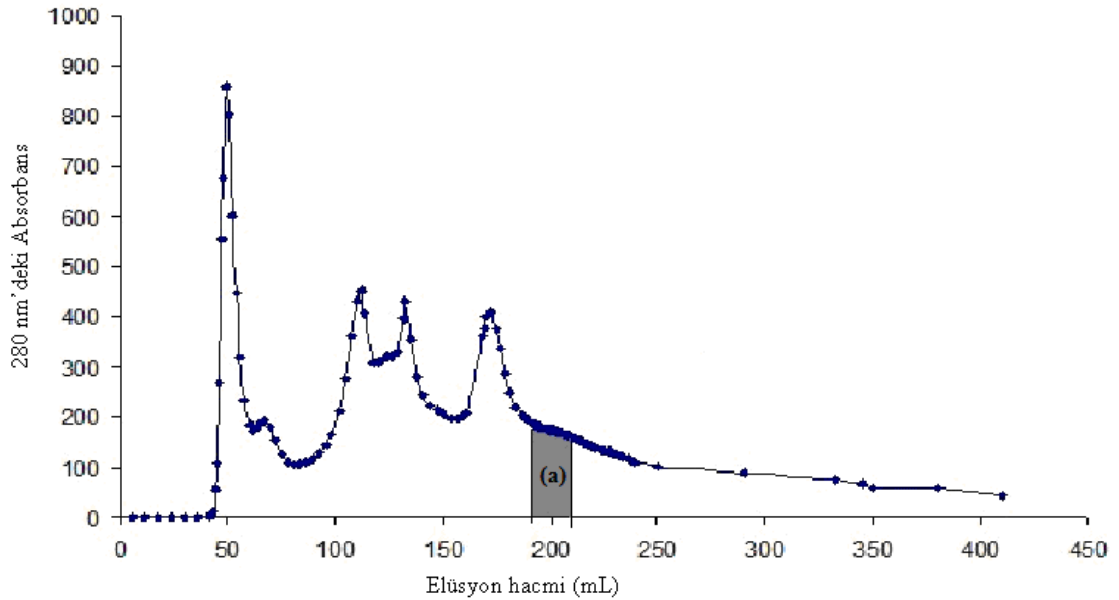
İlk saflaştırma adımı olarak gerçekleştirilen jel filtrasyon kromatografi, 120 mL hacimli HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences, İsveç) yüksek çözünürlüklü kolonunda 0,5 mL/dk akış hızı ve 400 mL elüsyon hacmi ile 6 mL'lik fraksiyonlar toplanarak gerçekleştirilmiştir. Deney çalışma koşulları Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. Kolon 50 mM sodyum fosfat pH 7,0 tamponu ile dengelenmiş ve elüsyon da aynı tamponla yapılmıştır. Ksilanaz, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi iki farklı bölgede 40-110 mL ile 170-210 mL arasındaki fraksiyonlarda toplanmıştır. Jel filtrasyon kromatografinin temel prensibine dayanarak, ilk pikte gelen ksilanazlar (40-110 mL) büyük molekül ağırlıklı iken, ikinci pike ait ksilanazlar (170-210 mL) daha küçük molekül ağırlıklı ksilanazlardır. Bu iki pike ait fraksiyonlar kendi içlerinde birleştirilmiş ve SDS-PAGE üzerinde izlenmiştir. SDS-PAGE sonucuna göre büyük molekül ağırlıklı ksilanazlar başka proteinlerin de bulunduğu kalabalık bir ortamda bulunmaktadır. Bu fraksiyonlar, düşük ksilanaz aktivitesine sahip olmaları ve ileri saflaştırılmalarındaki zorluklar nedenleriyle sonraki işlemlerde dikkate alınmamıştır. İleri saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri için yüksek ksilanaz aktivitesine sahip düşük molekül ağırlıklı ksilanazlar kullanılmıştır (Şekil 4.2).

**Çizelge 4.1.** Jel filtrasyon kromatografi deney koşulları

Kolon	HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Amersham Biosciences)
Örnek hacmi (mL)	7,0
pH	7,0
Tampon çözelti	50 mM sodyum fosfat
Akış hızı (mL/dakika)	0,5
Fraksiyon hacmi (mL)	6
Elüsyon hacmi (mL)	400



**Şekil 4.1.** *S. thermophilum* ksilanazının jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması sonucunda iki ksilanaza ait kromatogram; (a) büyük molekül ağırlıklı ksilanaz aktivitesini içeren fraksiyonlar, (b) küçük molekül ağırlıklı ksilanazları içeren fraksiyonlar, (c) ham enzim, (d) standart proteinler (0,5 mL/dk akış hızı, 50 mM sodyum fosfat pH 7,0 tamponu)



**Şekil 4.2.** *S. thermophilum* ksilanazının jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması sonucunda küçük molekül ağırlıklı ksilanaza ait kromatogram; (a) en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip fraksiyonlar (0,5 mL/dk akış hızı, 50 mM sodyum fosfat pH 7,0 tamponu)

Ksilanaz saflaştırma çalışmasının ikinci adımı anyon değişim kromatografi tekniğidir. Bunun için, jel filtrasyon kromatografiden elde edilen en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip 3 fraksiyon (192-210 mL) birleştirilmiş ve 3 kDa gözenekli santrifüj konsantratör (Millipore, Almanya) ile 3 mL'ye konsantre edilmiştir. Anyon değişim kromatografi, 20 mL hacimli HiPrep 16/60 Q XL (Amersham Biosciences, İsveç) kolonunda 3 mL/dk akış hızı ile 6 mL fraksiyonlar toplanarak 300 mL elüsyon hacmi ile yapılmıştır. Deney çalışma koşulları Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. Kolon dengelenmesi 50 mM sodyum fosfat (pH 7,0) tamponu ile yapılmış ve elüsyon işlemi içerisinde 1 M NaCl içeren aynı tampon ile gerçekleştirilmiştir.

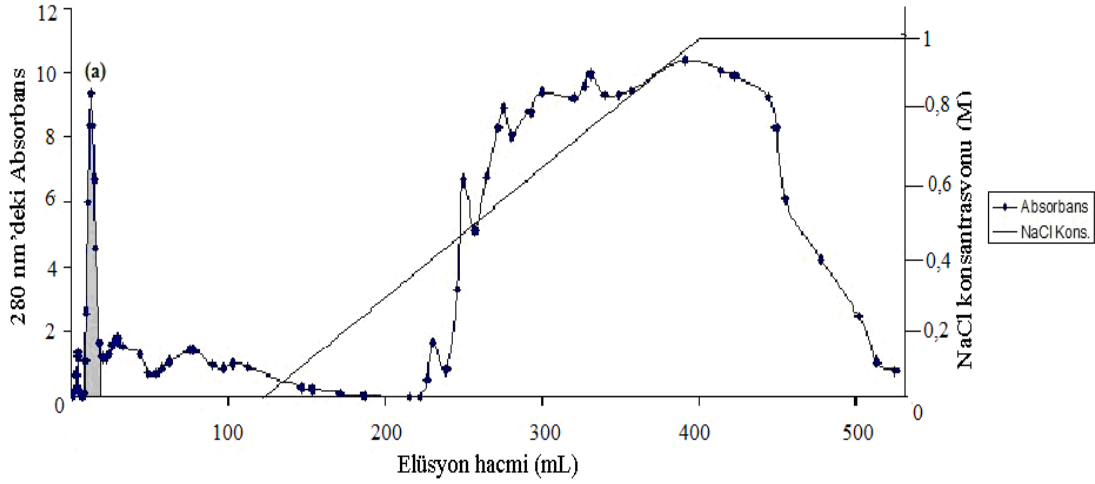
Jel filtrasyona benzer şekilde, anyon değişim kolonundan elde edilen her fraksiyon ksilanaz aktivitesi için test edilmiştir. Ksilanaz anyon değişim kolonuna bağlanmadan tek fraksiyonda (8-14 mL) elde edilmiştir (Şekil 4.3).

Anyon değişim kromatografi sonucunda ksilanaz, %9,6 verimle 21,8 kat saflaştırılmıştır (Çizelge 4.3). Ksilanazın anyon değişim kolonuna bağlanmadan çıkması nedeniyle bundan sonra herhangi bir tuz giderme aşamasına gerek kalmamıştır.

**Çizelge 4.2.** Anyon değişim kromatografi deney koşulları

Kolon	HiPrep Q XL 16/10 (Amersham Biosciences)
pH	7,0
Örnek hacmi (mL)	3,0
Tampon çözelti	50 mM sodyum fosfat
Tuz çözeltisi	1 M NaCl
Akış hızı (mL/dakika)	3
Fraksiyon hacmi (mL)	6
Elüsyon hacmi (mL)	300
Tuz gradienti	0-1 M (%0-%100)





**Şekil 4.3.** *S. thermophilum* ksilanazının jel filtrasyon sonrası gerçekleştirilen anyon değişim kromatografi ile saflaştırılmasına ait kromatogram; (a) ksilanaz aktivitesine sahip fraksiyonlar (3 mL/dk akış hızı, 50 mM sodyum fosfat pH 7,0 tamponu, aynı tamponun 1 M NaCl içeren hali ile elüsyon)

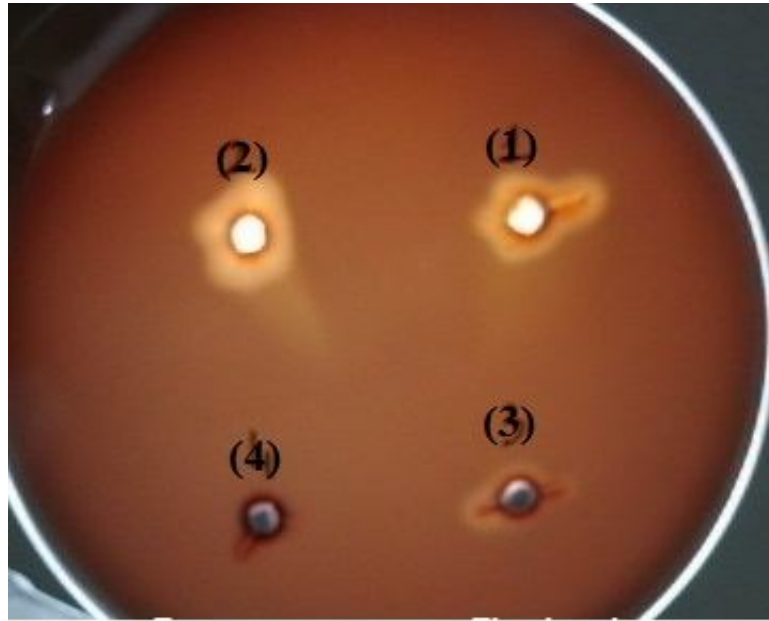
**Çizelge 4.3.** Küçük molekül ağırlıklı *S. thermophilum* ksilanazının saflaştırma tablosu

Saflaştırma Adımı	Hacim (mL)	Ksilanaz Aktivitesi (IU/mL)	Toplam Ksilanaz Aktivitesi (IU)	Protein Konsantrasyonu (mg/mL)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (IU/mg)	Verim (%)	Saflaştırma Katı
Ham Enzim	7	200,1	1400,7	1,127	7,89	177,6	100	1,0
Jel filtrasyon kromatografi	3	65,5	196,5	0,061	0,183	1073,6	14,0	6,0
Anyon değişim kromatografi	6	22,4	134,6	0,0058	0,0348	3869,0	9,6	21,8

## 4.2. Agar Test

Spektrofotometrik olarak tespit edilen ksilanaz aktivitesi, aktivite boyama yöntemiyle de tespit edilmiştir. Bunun için, agar ve kayın ağacı ksilan karışımından hazırlanmış agar üzerinde dört farklı noktaya ham enzim, konsantre saf enzim, sodyum fosfat tamponu ve ticari ksilanaz çözeltileri yüklenmiştir. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesinin tespiti için agar, kongo kırmızı ile boyanmış ve boyanın fazlası NaCl ile

uzaklaştırılmıştır. Enzim aktivitesine bağlı renk oluşumu asetik asit çözeltisi ile sabitlenmiştir. Renk açılması ksilanaz aktivitesi varlığını göstermiştir. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi ham enzim, saf ksilanaz ve ticari ksilanaz örneklerine ait bölgelerde aktiviteye bağlı renk açılması gözlemlenirken, negatif kontrol olan tampon çözelti bölgesinde renk açılması olmamıştır. Sonuç olarak, spektrofotometrik olarak tespit edilen aktivitenin ksilanaza ait olduğu aktivite boyama yöntemiyle de doğrulanmıştır.



**Şekil 4.4.** Ksilanaz aktivite boyaması; (1) ham enzim, (2) saflaştırılmış konsantre enzim, (3) ticari ksilanaz (pozitif kontrol), (4) pH 7,0 sodyum fosfat tamponu (negatif kontrol)

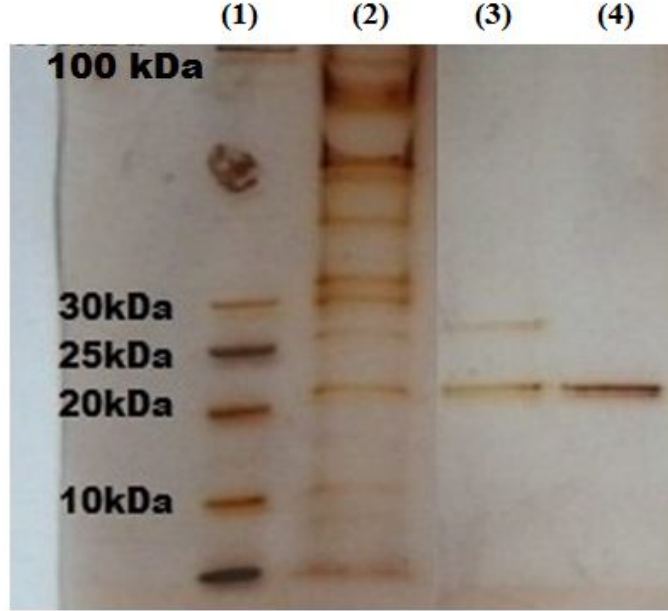
### **4.3. Ksilanazın Karakterizasyonu**

#### **4.3.1. Elektroforetik Karakterizasyon**

##### **4.3.1.1. Moleküler Ağırlık Tayini (SDS-PAGE)**

*S. thermophilum* ATCC No.16454 ksilanazı sırasıyla jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografi yöntemleri ile saflaştırıldıktan sonra, iki farklı akrilamid konsantrasyonunda; %7 (h/h) (üst jel) ve %12 (h/h) (ayırıcı alt jel) olacak şekilde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlığı

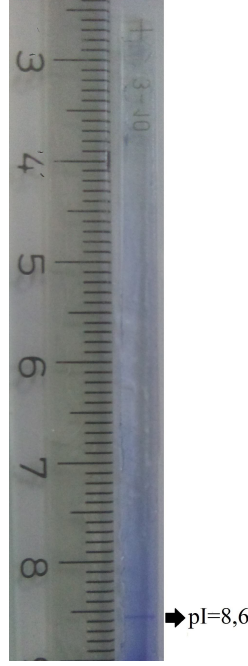
belirlenmiştir. Şekil 4.5’de görüldüğü gibi, ksilanaz tam olarak saflaştırılmış ve SDS-PAGE analizinde tek protein bandı olarak gözlemlenmiştir. Ksilanaz bandının molekül ağırlığı standart proteinler baz alınarak yaklaşık 21 kDa olarak ölçülmüştür.



**Şekil 4.5.** Jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografileri ile saflaştırılmış küçük molekül ağırlıklı ksilanazın SDS-PAGE analizi; (1) standart proteinler, (2) ham enzim, (3) jel filtrasyondan çıkan küçük molekül ağırlıklı ksilanaz, (4) anyon değişimden çıkan tam saflaştırılmış küçük molekül ağırlıklı ksilanaz

#### 4.3.1.2. Ksilanazın İzoelektrik Noktası (pI)

İzoelektrik nokta fokuslama için geniş bant aralığı kullanılmış olup, bu bantlar için pH skalası lineer olarak 3-10 arasında değişmiştir. Jel uzunluğu 7 cm olup cetvel yardımı ile saflaştırılmış ksilanazın pI değeri 8,6 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** Ksilanazın izoelektrik noktası

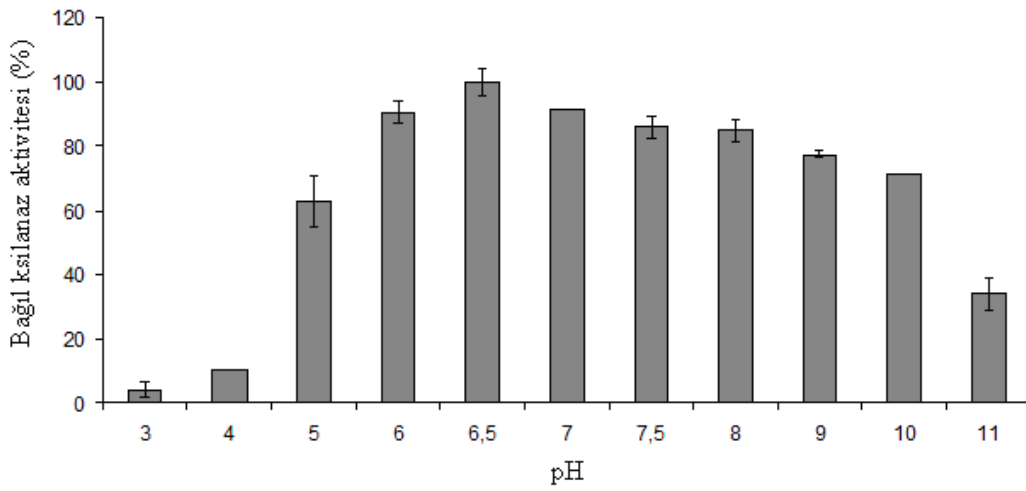
### **4.3.2. Ksilanazın Kinetik Karakterizasyonu**

#### **4.3.2.1. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine pH Etkisi**

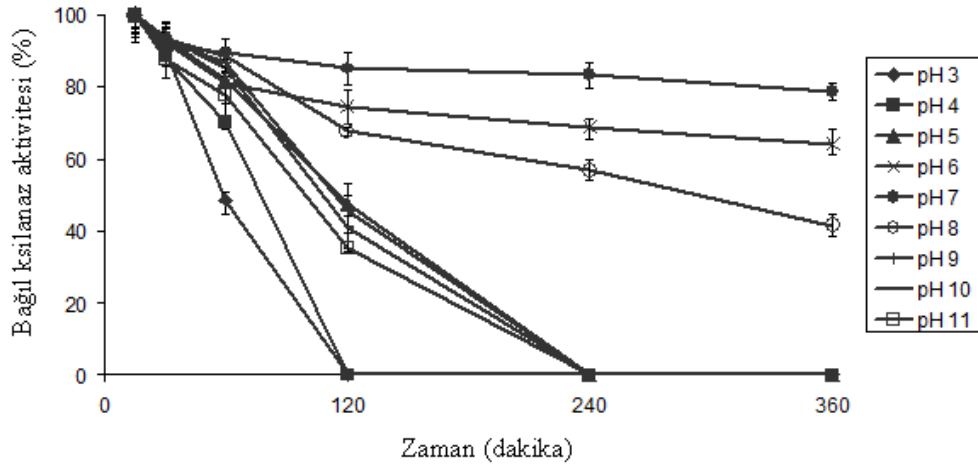
Safleştirilmiş ksilanazın optimum çalışma pH değeri, pH 3,0-11,0 arasında, en yüksek aktivite gözlemlenen bölgede (pH 6,0-8,0) 0,5 birim aralıklarla çalışılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.7a). Saf ksilanazın optimum çalışma pH değeri Şekil 4.7a'da görüldüğü gibi pH 6,5 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak bakıldığında saf ksilanaz pH 6,0-7,0 aralığında %85'in üzerinde aktivite göstermiştir. pH 4,0'un üzerinde ksilanaz aktivitesi hızlı bir şekilde artmış ve pH 6,5'den sonra aktivite düşmeye başlamıştır. pH 10,0'da aktivitesinin %29'unu kaybederken, pH 11'de %66'sını kaybetmiştir. pH 6,0-8,0 arasında aktivitesinin %80'den fazlasını koruyarak en iyi ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Sonuçlar, saf ksilanazın bazik karakterde olduğunu göstermiştir.

Saf ksilanazın pH dayanımı, pH 3,0-11,0 aralığında, 1 birim aralıklarla ve 6 saat süresince tespit edilmiştir (Şekil 4.7b). Saf enzim en yüksek dayanımını Şekil 4.7b'de görüldüğü gibi pH 7,0 değerinde göstermiştir. pH 7,0'de 25°C sıcaklıkta 6 saat

inkübasyon sonucunda aktivitesinin yaklaşık %80'ini korumuştur. Saf ksilanaz, pH 6,0-8,0 aralığında 6 saat boyunca yaklaşık %40'ın üzerinde aktivitesini koruyarak kararlılığını sürdürebilmiştir. pH 3,0 ve 4,0 değerlerinde en fazla 1 saat boyunca aktivite sergilerken, pH 5,0, 9,0, 10,0 ve 11,0 değerlerinde ise 2 saat sonunda enzim aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. Saf ksilanazın bazik bölgede nispeten daha dayanıklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



(a)



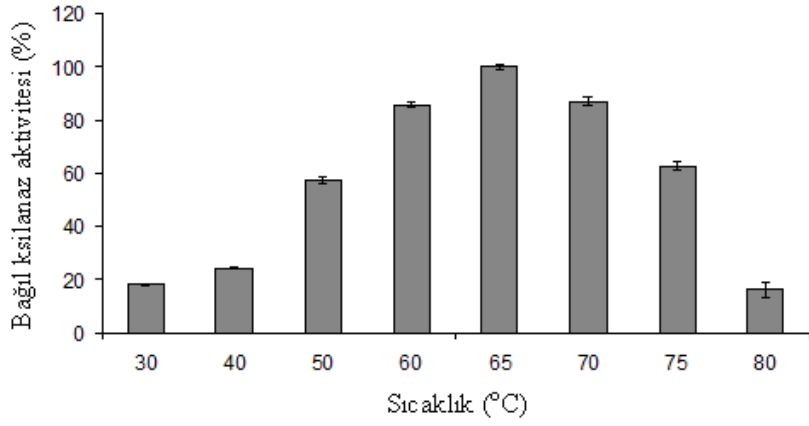
(b)

**Şekil 4.7.** Ksilanazın, (a) optimum çalışma pH değeri, (b) pH dayanımı

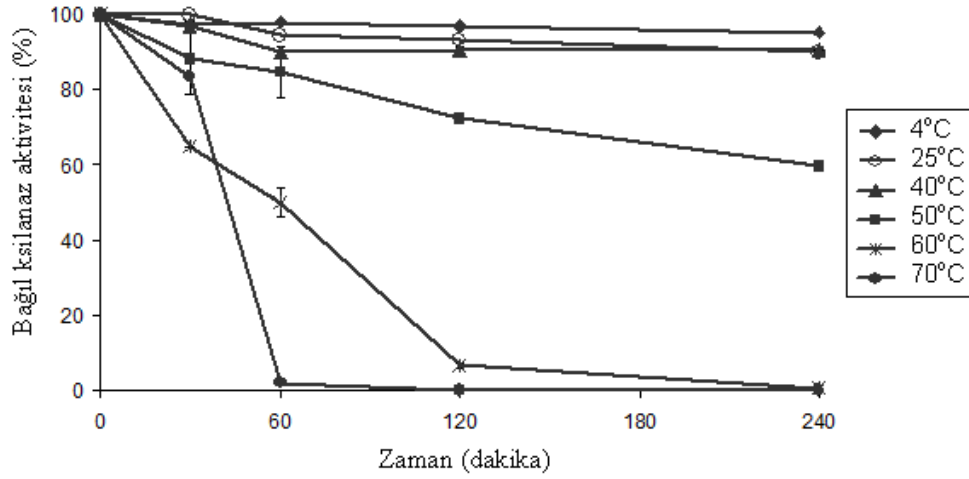
#### 4.3.2.2. Ksilanaz Aktivitesi ve Dayanımı Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Saflaştırılmış ksilanazın optimum çalışma sıcaklığı 30-80°C aralığında, en yüksek aktivite gözlenen bölgede (60-75°C) 5°C aralıklarla tespit edilmiştir (Şekil 4.8a). Saf ksilanazın optimum çalışma sıcaklığı Şekil 4.8a'da görüldüğü gibi 65°C olarak tespit edilmiştir. Genel olarak bakıldığında saf ksilanaz 60-70°C sıcaklık aralığında %80'in üzerinde aktivite göstermiştir. Enzim 40°C'de %25 aktivite sergilerken, 50°C'de bu değer %57 düzeyine çıkmıştır.

Saflaştırılmış ksilanazın sıcaklık dayanımı 4-70°C sıcaklık aralığında, 4 saat süresince tespit edilmiştir (Şekil 4.8b). Saf enzim, 4°C saklama koşulunda yüksek dayanım göstermiştir. Saf ksilanaz, 40°C sıcaklıkta 4 saat inkübasyon sonunda, başlangıç aktivitesinin %90'ından fazlasını koruyarak en yüksek kararlılığı sergilemiştir. 50°C sıcaklıkta 4 saat inkübasyon sonucunda ise aktivitesinin yaklaşık %60'ını korumuştur. Sıcaklık 60°C'ye çıkarıldığında 1 saat inkübasyon sonunda yaklaşık %50 aktivite korunumu gözlemlenmiştir. 60°C sıcaklıkta 2 saat sonunda, 70°C sıcaklıkta ise 1 saat sonunda aktivitenin neredeyse tamamı kaybolmuştur.



(a)



(b)

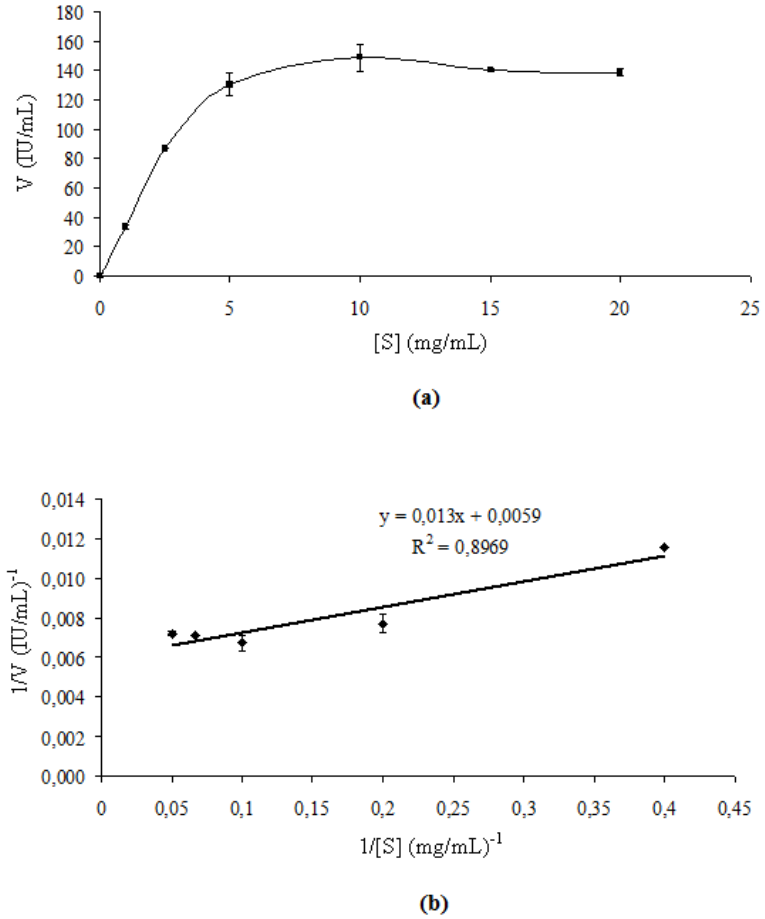
Şekil 4.8. Ksilanazın, (a) optimum çalışma sıcaklığı, (b) sıcaklık dayanımı

#### 4.3.2.3. Kinetik Parametreler

Saflaştırılmış ksilanazın kinetik parametrelerinin analizi için 0,1-20 mg/mL ksilan konsantrasyonu aralığında çalışılmıştır. Saf enzim için elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.9a ve 4.9b’de sunulmuştur. Şekil 4.9a’da görüldüğü gibi veriler Michaelis-Menten profiline uyumlu bulunmuştur. Yüksek ksilan konsantrasyonunda (>10 mg/mL) substrat inhibisyonu gözlemlenmiştir.

Saf enzim için kinetik parametreler olan  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri, Lineweaver-Burk grafiğinden sırasıyla  $2,2 \pm 0,06$  mg/mL ve  $168,2 \pm 4,2$  IU/mL olarak tespit edilmiştir

(Şekil 4.9b).  $V_{\max}$  değeri, enzimin saflaştırma sonrası konsantrasyon oranına bağlı olarak değişmekle birlikte,  $K_m$  değeri saf enzim için belirleyici faktördür.  $K_m$  değeri ne kadar küçükse enzimin substrata olan ilgisi o kadar fazla olur.



Şekil 4.9. Saf enzimin, (a) Michaelis-Menten ve (b) Lineweaver-Burk grafikleri

#### 4.3.2.4. Substrat Seçiciliği

Ksılanazın substrat seçiciliğinin belirlenmesi için, ticari substrat olarak huş ağacı ksılan, yulaf ksılan, kayın ağacı ksılanı, avicel ve karboksimetil selüloz; lignoselülozik substrat olarak ise buğday kepeği, mısır koçanı, ayçiçeği sapı ve pamuk sapı kullanılmıştır. Deneylerde öncelikle substrat konsantrasyonu, reaksiyon karışımı oranı ve reaksiyon



süresi parametreleri çalışılmıştır. Ölçülebilir reaksiyon ürünü koşulu elde edildikten sonra Çizelge 4.4’de sonucu verilen deneyler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4’de görüldüğü üzere, saf ksilanazın en yüksek afinite gösterdiği ticari substrat kayın ağacı ksilanıdır. Yulaf ve huş ağacı ksilanlarına da afinite (>%73) göstermiştir. Saf enzim, avicel ve karboksimetil selüloz substrat olarak kullanılıp tepkime gerçekleştirildiğinde absorbans artışı gözlenmemiş, dolayısıyla bu substratlar üzerinde katalitik etki göstermemiştir.

Saf ksilanazın lignoselülozik substratlara olan ilgisi incelendiğinde ise, en yüksek katalitik etkiyi buğday kepeği üzerinde gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, saf enzimin buğday kepeğinden sonra mısır koçanına da afinite (>%50) gösterdiği tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Ksilanazın substrat seçiciliği

Substratlar	Saf ksilanaz	
	Ksilanaz aktivitesi (IU/mL)	Bağlı ksilanaz aktivitesi (%)
<b>Ticari</b>		
Kayın ağacı ksilanı	157,28	100,00
Huş ağacı ksilanı	136,82 ± 16,30	86,99 ± 10,36
Yulaf ksilanı	115,21 ± 3,03	73,25 ± 1,93
Avicel	0	0
Karboksimetil selüloz	0	0
<b>Lignoselülozik</b>		
Buğday kepeği	0,82	100,00
Mısır koçanı	0,46 ± 0,04	56,10 ± 4,88
Ayçiçeği sapı	0,09 ± 0,02	10,97 ± 2,44
Pamuk sapı	0,07 ± 0,01	8,54 ± 1,22

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizma kaynaklıdır. Bunun nedeni mikroorganizma kökenli enzimlerin, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları, ekstrem koşullarda aktivite gösterebilmeleri ve büyük miktarda üretilibilmeleridir.

Her ne kadar mikrobiyal enzimlerin kullanımı için yukarıda belirtildiği gibi çok geçerli nedenler varsa da, her mikrobiyal enzim endüstriyel alanda kullanılmamaktadır. Endüstride kullanılan enzimlerin, çevreyle dost işe yarar son ürünler verme, ucuz ve kararlı olma gibi avantajlara sahip olması gerekmektedir (Kıran ve ark., 2006).

Dünyada, çözüm üretilmesi gereken en büyük sorunlardan ikisi, gerekli olan enerji kaynaklarının teminini sağlamak ve çevresel kirliliğe çözüm bulmaktır. Fosil yakıtlara karşı zamanla bağımlılığa dönüşen ilgimiz, bugün yaşadığımız en büyük çevresel tehlike olan küresel ısınmanın en önemli nedenlerinden birisini oluşturmuştur. Ayrıca petrol gibi bu fosil yakıtların tükenebilir doğal enerji kaynakları olması sorunu daha da büyütülmektedir. Bu gibi sorunlar doğa ile dost, yenilenebilir enerji kaynaklarının bulunmasını gerektirmektedir. Dünya üzerinde miktarı giderek artan lignoselülozik atıklar, yenilenebilir enerji kaynağı olarak bu soruna alternatif bir çözüm üretebilmektedir.

Günümüzde giderek önem kazanan ksilanazların, bitki hücre duvarının hemiselüloz kısmını parçaladığı, ot yiyen hayvanların ve bazı bitki patojenlerinin bitkileri parçalamak için ksilanaz ürettikleri saptanmıştır. Pek çok bakteri ve küfün, hemiselüloz-ksilan içeren ortamlarda heterotrofik olarak gelişmesini sağlayan ve ortamda son ürün olarak serbest ksiloz oluşturan hücre dışı ksilanazlar ürettiği anlaşılmıştır (Kulkarni ve ark., 1999).

Mikrobiyal kaynaklı ksilanazların (1,4-β-D-ksilan ksilanohidrolaz, E.C. 3.2.1.8) yüksek spesifiklikleri, ılımlı reaksiyon koşulları, ihmal edilebilir düzeydeki yan ürünleri ve substrat kayıpları nedeni ile ksilanın hidrolizi için tercih edilen biyolojik katalizörler oldukları bilinmektedir (Kulkarni ve ark., 1999).

Bu çalışmada, kültür ortamında ekonomik değeri olmayan tarımsal atık mısır koçanları karbon kaynağı olarak kullanılarak, termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum*'dan hücre dışı ksilanazın üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen ksilanaz kromatografik teknikler kullanılarak tam olarak saflaştırılmış ve saf enzim biyokimyasal açıdan karakterize edilmiştir.

Endüstri alanındaki gelişmeler, kimyasal maddelerin kullanımı yerine çevre dostu, yan ürün oluşturmayan enzimlere olan ilgiyi arttırmıştır. Bunun için de enzimlerin saflaştırılması ve karakterize edilmesi gerekmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, mikrobiyal kaynaklı ksilanazların saflaştırılması, genellikle ön saflaştırma (amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon gibi) aşamasını takiben daha ileri saflaştırma için iki ya da üç adımlı kromatografi tekniklerini içermektedir.

Bu çalışmada, *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454 (*Humicola insolens*) ksilanazı, sırasıyla jel filtrasyon ve anyon değişim kromatografileri kullanılarak iki adımda saflaştırılmıştır. İlk adımda kullandığımız jel filtrasyon kromatografi tekniği sonucunda iki aktif ksilanaz piki elde edilmiştir. Jel filtrasyon kolonundan ilk çıkan pik (büyük molekül ağırlıklı ksilanaz), SDS-PAGE analizinde karmaşık pek çok bant şeklinde görüntülenirken, ikinci pike ait fraksiyonlar (küçük molekül ağırlıklı ksilanaz) sadece iki bant oluşturmuştur. Bu nedenle, ksilanaz aktivitesi daha çok olan ikinci pik ksilanazları daha ileri düzeyde saflaştırılmıştır. Diğer pikin çıkarılması ile verim düşmüş, fakat saflaştırma katı artmıştır. Sonuçta; 3869,0 IU/mg spesifik aktivite, %9,6 verim ve 21,8 kat saflaştırma ile ksilanaz tek bant olarak elde edilmiştir.

Grabski ve Jeffries (1991), *Streptomyces roseiscleroticus* NRRL B-11019'dan ürettikleri  $\beta$ -1-4-endoksilanazı, amonyum sülfat çöktürmesi ve karboksimetil Bio-Gel A ile Mono-S agarozaya sahip iki farklı katyon değişim kromatografi yöntemleriyle 194 U/mg spesifik aktivite ile 45 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Chen ve arkadaşları (1997), yulaf ksilanı bulunan kültür ortamında 5 gün boyunca *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 ile ürettikleri ksilanazı, ultrafiltrasyon, amonyum sülfat çöktürmesi, katyon değişim kromatografi ve jel filtrasyon kromatografi tekniklerinin birlikte kullanarak dört adımda, 6,630 IU/mg protein spesifik aktivite ve %5,1 verimle 56 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Kimura ve arkadaşları (1995), kültür ortamında karbon kaynağı olarak buğday kepeği kullanarak *Aspergillus sojae*'den üretilen izoenzim iki ksilanazı (X-I ve X-II), amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografi ve jel filtrasyon tekniklerini kullanarak sırasıyla 66,3 ve 37,1 IU/mg spesifik aktivite ve %9 ve %5 verimle saflaştırıldıkları bildirilmiştir.

Kocabaş ve arkadaşları (2011) ise, *Aspergillus terreus* NRRL 1960'dan ürettikleri ksilanazı, %61 verimle 19 kat hidrofobik etkileşim kromatografi tekniğiyle tek adımda saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Diğer bir çalışmada Carmona ve arkadaşları (2005), termofilik küf *Aspergillus versicolor*'dan elde ettikleri iki ksilanazdan (ksilanaz I ve ksilanaz II) küçük miktara sahip ksilanaz II'yi saflaştırıp karakterize ettiklerini bildirmişlerdir. Saflaştırma işlemine anyon değişim kromatografi ile başlanmış ve burada ksilanaz I kolona bağlanmadan çıkarken, ksilanaz II kolona bağlanmıştır. Ksilanaz II'nin daha ileri saflaştırılması için sırasıyla anyon değişim ve jel filtrasyon kromatografileri kullanılmıştır. Sonuçta ksilanaz II'yi, 302 IU/mg spesifik aktivite ve %3,1 verimle 28 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara göre, saf ksilanazın verimi genel anlamda literatürde verilen sonuçlarla uyumludur. Çalışmamıza destek veren 110M615 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında amaç, ksilanazın kristalizasyonu çalışması olduğu için, tam saf ksilanaz eldesi ile hedefe ulaşılmıştır. Ayrıca, enzim aktivitesi kaybına neden olabilecek ön saflaştırma teknikleri kullanılmadan, iki adımda tam saflaştırma sağlanmış olması da bir avantaj olarak göze çarpmaktadır.

Çalışmamızda saflaştırılan ksilanazın molekül ağırlığı, SDS-PAGE analizi ile yaklaşık 21 kDa tek protein bandı olarak ve izoelektrik noktası ise pI 8,6 olarak tespit edilmiştir.

Bu konuyla ilgili olarak, Düsterhöft ve arkadaşları tarafından (1997) yapılan çalışma sonucunda, *Humicola insolens*'den (*Scytalidium thermophilum* 'un eski adı) elde edilen iki ksilanazın (ksilanaz I ve ksilanaz II) molekül ağırlıkları SDS-PAGE ile sırasıyla 6 ve 21 kDa, izoelektrik noktaları sırasıyla pI 9,0 ve pI 7,7 olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise, 21 kDa ksilanaz ile saflaştırma gerçekleştirilmiş olup, bunun dışında 21 kDa'dan büyük molekül ağırlığına sahip bir ksilanaz daha tespit edilmiştir.

Ksilanazın izoelektrik noktası da 8,6 bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, kullandığımız *Scytalidium thermophilum*'un, Düsterhöft ve arkadaşlarının kullandığı mikroorganizma ile tamamen aynı olmadığı düşünülmektedir.

*Thermomyces lanuginosus* tarafından üretilen ksilanazın SDS-PAGE ile molekül ağırlığı 25,5 kDa, izoelektrik noktası pI 4,1 olarak belirlenmiştir (Cesar ve Mrša, 1996).

*Streptomyces roseiscleroticus* NRRL B-11019'dan elde edilen  $\beta$ -1-4-endoksilanazın molekül ağırlığı, SDS-PAGE analizi sonucunda 22,6 kDa, izoelektrik noktası da pI 9,5 olarak belirlenmiştir (Grabski ve Jeffries, 1991).

Bakır ve arkadaşlarının (2001) yaptığı bir çalışmada, *Rhizopus oryzae*'den ürettikleri endo- $\beta$ -1,4-ksilanazın molekül ağırlığını (SDS-PAGE ile) 22 kDa olarak rapor edilmiştir.

Lieratürde bu konuyla ilgili bir diğer çalışmada, termofilik bir küf olan *Aspergillus versicolor*'dan üretilen ksilanazın molekül ağırlığı Carmona ve arkadaşları (2005) tarafından, 32 kDa olarak verilirken; Ninawe ve arkadaşları (2008), *Streptomyces cyaneus* SN32'den elde edilen hücre dışı ksilanazın molekül ağırlığını 20,5 kDa, izoelektrik noktasını da pH 8,5 şeklinde tespit etmişlerdir.

Gaffney ve arkadaşları (2009), *Thermomyces lanuginosus* 195'den üretilen ksilanazın molekül ağırlığını 22 kDa olarak bildirirken; Fengxia ve arkadaşları (2008) ise, *Aspergillus ficuum* AF-98 küfünden elde ettikleri ksilanazın molekül ağırlığını 35 kDa olarak bildirmişlerdir.

Elde ettiğimiz saf ksilanazın molekül ağırlığı literatürdeki çalışmalarla yakınlık göstermektedir. Wong ve arkadaşları (1988), ksilanazları molekül ağırlığına göre sınıflandırmışlar ve <30 kDa olanları küçük molekül ağırlıklı ksilanazlar olarak tanımlamışlardır. Bu tespite göre, ksilanazımızın düşük molekül ağırlıklı olduğunu söylemek mümkündür. Molekül ağırlığının düşük olması kağıt endüstrisi için ilgi çekici olabilmektedir. Küçük molekül ağırlıklı ksilanazlar kağıt hamurunu ağartma işlemi için daha avantajlıdır. Çünkü küçük enzimler, kağıdın lif duvarı çeperine daha fazla nüfuz edebilmekte ve hamurun özelliğini daha etkili bir şekilde değiştirebilmektedir (Patel ve ark., 1993). Collins ve arkadaşlarının (2005) yaptığı familya sınıflandırmasına göre,

ksilanazımızın düşük molekül ağırlığı ve yüksek izoelektrik noktası nedeniyle, Familya 11'e ait olduğunu söylemek mümkündür.

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda, *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454'den üretilen ksilanazımızın optimum sıcaklık değeri 65°C olarak tespit edilmiştir. Ksilanazın kararlılığı üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde ise, 4, 25 ve 40°C sıcaklıklarda 4 saatlik inkübasyon sonucunda aktivitesinin %90'ından fazlasını korumuştur.

Bu karakterizasyon çalışmasıyla ilgili, Grabski ve Jeffries (1991), *Streptomyces roseiscleroticus* NRRL B-11019'dan üretilen  $\beta$ -1-4-endoksilanazın, arabinoksilanın hidrolizi için optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerini 60°C olarak bildirmişlerdir.

Kültür ortamında karbon kaynağı olarak buğday kepeğini kullanarak, *Aspergillus sojae*'den üretilen izoenzim iki ksilanazın (X-I ve X-II) her ikisi de 60°C sıcaklıkta optimum aktivite sergilemişlerdir (Kimura ve ark., 1995).

Bir diğer çalışmada, Cesar ve Mrša (1996), *Thermomyces lanuginosus* tarafından üretilen ksilanazın optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığını 60-70°C olarak verirken; yulaf ksilani bulunan kültür ortamında çoğaltılan *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 ile üretilen ksilanazın optimum sıcaklığını Chen ve arkadaşları (1997), 45°C olarak bildirilmişlerdir.

Düsterhöft ve arkadaşları tarafından (1997) yapılan çalışma sonucunda, *Humicola insolens*'den üretilen iki ksilanazın optimum sıcaklıkları 55°C (ksilanaz I) ve 60°C (ksilanaz II) olarak rapor edilirken; ksilanaz II, 60°C sıcaklıkta 45 dakika inkübasyondan sonra aktivitesinin tamamını kaybetmiş, ksilanaz I ise aynı koşullarda aktivitesinin %50'sini korumuştur.

*Acrophialophora nainiana*'dan elde edilen ksilanaz 55°C sıcaklıkta optimum aktiviteye sahip iken, 55°C sıcaklıkta 44 saate kadar kararlılık sergilemiştir (Salles ve ark., 2000).

Gaffney ve arkadaşları (2009) ise, *Thermomyces lanuginosus* 195'den üretilen ksilanazın sıcaklık kararlılığının tespiti için, 20-100°C sıcaklık aralığını kullanılmışlardır. Enzim, 70°C sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edildiğinde bağlı

aktivitesinin %87'sini korumuştur. Enzimin, 100°C sıcaklığına kadar inkübe edildiğinde bile %18 bağıl aktivitesini koruyarak önemli ölçüde termal özellik sergilemeye devam ettiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz optimum sıcaklık değeri literatür sonuçları ile yakınlık göstermektedir. Mikrobiyal kaynaklı ksilanazımızın, yüksek sıcaklık değerinde optimum aktivite ve kararlılık sergilemesi, endüstriyel uygulamalar için bir avantaj olarak ilgi çekicidir.

*Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454'den üretilen ksilanaz, pH 6,5 değerinde optimum aktivite sergilemiştir. pH 6,0-8,0 arasında aktivitesinin %80'den fazlasını koruyarak en iyi ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir. Sonuçlar, saf ksilanazın bazik karakterde olduğunu göstermiştir. Ksilanazın kararlılığı üzerine pH etkisi incelendiğinde ise, en yüksek pH 7,0 değerinde kararlılık göstermiş ve 6 saat inkübasyon sonucunda aktivitesinin yaklaşık %80'ini korumuştur. Saf ksilanazın, pH 6,0-8,0 aralığında 6 saat boyunca yaklaşık %60'ın üzerinde aktivitesini koruyarak, bazik bölgede nispeten daha dayanıklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bu konuyla ilgili literatürdeki sonuçlar değişkenlik göstermektedir. Grabski ve Jeffries (1991), *Streptomyces roseiscleroticus* NRRL B-11019'dan ürettikleri ksilanazın arabinoksilanın hidrolizi için optimum pH değerini 6,5-7,0 olarak belirlemişler ve pH 8,0'de optimum enzim aktivitesinin %75'ten fazlasını koruduğunu bildirilmişlerdir.

Kimura ve arkadaşları (1995), kültür ortamında karbon kaynağı olarak buğday kepeğini kullanarak *Aspergillus sojae*'den ürettikleri izoenzim iki ksilanazın (X-I ve X-II) optimum pH değerlerini sırasıyla pH 5,0 ve 5,5 olarak bildirirken, her iki enzimin pH 5,0-8,0 aralığında kararlılık sergilediklerini rapor etmişlerdir.

*Thermomyces lanuginosus*'dan üretilen ksilanazın optimum pH değeri Cesar ve Mrša (1996) tarafından 7,0 olarak verilirken; Düsterhöft ve arkadaşları (1997), *Humicola insolens*'den üretilen iki ksilanaz (ksilanaz I ve ksilanaz II) için, optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin benzerlik gösterdiğini ve sırasıyla pH 6 ve 6,5 olduğunu belirlemişlerdir. Ksilanaz II, pH 6-9 aralığında 15 saat boyunca kararlılık gösterirken, ksilanaz I ise pH 8'de %15 ve pH 9'da %46 aktivite kaybına uğramıştır.

Salles ve arkadaşlarının (2000) yaptığı bir çalışmada, *Acrophialophora nainiana*'dan üretilen ksilanaz için optimum pH değerini 7,0 olarak bildirirken; Carmona ve arkadaşları (2005), termofilik bir küf *Aspergillus versicolor*'dan üretilen ksilanaz için optimum pH aralığını 6,0-7,0 olarak bildirmişlerdir.

Fengxia ve arkadaşları (2008) ise, *Aspergillus ficuum* AF-98 küfünden elde ettikleri ksilanazın optimum pH değerini 5,0 olarak belirlerken; pH 3,0'de %50 bağıl aktivite, pH 7,0'de ise %30 bağıl aktiviteye sahip olması sonucunda saf enzimin asidik koşullar için daha uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, saflaştırılan ksilanazın farklı konsantrasyonlardaki kayın ağacı ksilanına olan ilgisi incelenmiş ve Lineweaver-Burk grafiğinden  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $2,2 \pm 0,06$  mg/mL ve  $168,2 \pm 4,2$  IU/mL olarak hesaplanmıştır.

$K_m$  değeri saf enzim için belirleyici faktördür. Elde ettiğimiz saf ksilanazın  $K_m$  değeri literatüre göre genelde düşük bir aralıktadır. Bu değer küçük olması elde edilen saf enzimin düşük substrat konsantrasyonlarında yüksek aktivite sağladığını göstermiştir. Bu özellik enzimlerin pratik uygulamaları için avantaj sağlamaktadır.

Literatürde bu konuyla ilgili pek çok sonuca ulaşabilmek mümkündür. Grabski ve Jeffries (1991), *Streptomyces roseiscleroticus* NRRL B-11019'dan elde ettikleri ksilanaz için, yulaf ksilanına karşı 7,9 mg/mL bir  $K_m$  ve 305  $\mu\text{mol/mg/dk}$   $V_{max}$  değerlerini vermiştir. Hidroliz hızı, 4 mg/mL'den daha az ksilan konsantrasyonlar için doğrusal iken, 10 mg/mL'den daha fazla ksilan konsantrasyonlarda önemli derecede inhibisyon gözlemlendiği rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda da 10 mg/mL'den yüksek ksilan konsantrasyonunda inhibisyon gözlemlenmiş ve bu literatür sonucuyla uyumluluk göstermiştir.

Chen ve arkadaşları (1997), yulaf ksilanı bulunan kültür ortamında *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 ile ürettikleri ksilanazın, substrat olarak kullanılan yulaf ksilanına karşı  $K_m$  10,14 mg/mL ve  $V_{max}$  4,025 IU/mg protein kinetik sabitlerini bildirmişlerdir.



Bakır ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmaya göre, *Rhizopus oryzae*'dan elde edilen endo- $\beta$ -1,4-ksilanazın, huş ağacı ksilanına karşı kinetik parametreleri  $K_m$  18,5 mg/mL ve  $V_{max}$  90 IU/mg proteindir.

Carmona ve arkadaşları (2005), termofilik küf *Aspergillus versicolor*'dan ürettikleri ksilanaz için, yulaf ksilanına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 2,3 mg/mL ve 5,6  $\mu$ mol/mL/dk olarak hesaplamışlardır.

Diğer bir çalışmada Ninawe ve arkadaşları (2008), *Streptomyces cyaneus* SN32'den elde ettikleri hücre dışı ksilanazının huş ağacı ksilanına karşı  $K_m$  değerini 11,1 mg/mL ve  $V_{max}$  değerini 45,45  $\mu$ mol/dk/mg şeklinde bildirmişlerdir.

Fengxia ve arkadaşları (2008) ise, *Aspergillus ficuum* AF-98 küfünden elde ettikleri ksilanazın kayın ağacı ksilanına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerini sırasıyla 3,267 mg/mL ve 18,38 M/dk/mg, huş ağacı ksilanına karşı bu değerler sırasıyla 3,747 mg/mL ve 11,1 M/dk/mg şeklinde olduğunu bildirmişlerdir.

Kocabaş ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında, *Aspergillus terreus* NRRL 1960'dan üretilen düşük molekül ağırlıklı bir ksilanazın kinetik sabitlerini, huş ağacı ksilanına karşı  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $2,5 \pm 0,05$  mg ksilan/mL ve  $50,2 \pm 0,4$  IU/ $\mu$ g protein olarak rapor edilmiştir.

Çalışmamızda, karakterizasyon çalışmalarının son kısmını substrat seçiciliği oluşturmaktadır. *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454'den ürettiğimiz ksilanazın çeşitli substratlara olan ilgisi incelendiğinde, en yüksek katalitik etkiyi kayın ağacı ksilanı ve buğday kepeği üzerinde gösterdiği görülmüştür. Saf ksilanaz, kayın ağacından sonra huş ağacı ve yulaf ksilanlarına da afinite (>%73) göstermiştir. Ayrıca, saf enzimin buğday kepeğinden sonra mısır koçanına da afinite (>%50) gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, buğday kepeğinin de fermantasyon ortamında mısır koçanı gibi karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca saf enzim, karboksimetil selüloz ve avisele karşı selülaz aktivitesi sergilemeyerek literatürle uyum göstermektedir.

Bu konuyla ilgili Salles ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları bir çalışmaya göre, *Acrophialophora nainiana*'dan ürettikleri ksilanazın, karboksimetil selüloz, mannan,

filtre kağıdı, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-ksilopiranoside ve *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranoside substratlarına karşı hiçbir aktivite göstermediğini ve ksilanazın substrat spesifikliğinin sadece yulaf ksilanı ve huş ağacı ksilanı ile sınırlandığını bildirmişlerdir.

Kimura ve arkadaşları (1995) tarafından, katı kültür ortamında çoğalttıkları *Aspergillus sojae*'den üretilen iki ksilanazın (X-I ve X-II), arabinan, karboksi metil selüloz, avicel, nişasta, ksilobiyoz, selülobiyoz, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-ksilopiranoside ve *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosid substratlarına karşı hiçbir aktivite göstermediği ve her iki enzimin de pirinç sapına olan ilgilerinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Bir diğer çalışmada, Gaffney ve arkadaşları (2009), *Thermomyces lanuginosus* 195'den üretilen ksilanazın, yulaf ksilanına karşı afinitesinin (%43) kayın ağacı ksilanına karşı olan afinitesinden (%33) daha yüksek olduğunu ve selülozik substratlar olan karboksi metil selüloz, avicel ve laminarine karşı herhangi bir aktivite göstermediğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada, yenilenebilir lignoselülozik bir hammadde olan ve çok düşük ekonomik değerine sahip tarımsal atık mısır koçanları, karbon kaynağı olarak kültür ortamında değerlendirilmiştir. Bu ortamda, termofilik bir küf olan *Scytalidium thermophilum* ATCC No.16454'den elde edilen ksilanaz, sadece iki adımda tek protein bandı gözlemlenecek şekilde, %9,6 verim ve 21,8 kat ile tam olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımının iki ile sınırlı olması, ön saflaştırma gerekmemesi, maliyet ve zaman açısından endüstriyel uygulamalar için avantaj sağlamaktadır. Ksilanazın yüksek sayılabilecek sıcaklıklarda kararlılık sergilemesi, yüksek sıcaklıklar gerektiren endüstriyel uygulamalar için de ilgi çekici olabileceğini göstermektedir. Ksilanazın, buğday kepeğine olan yüksek ilgisi de, buğday kepeğinin ilerideki ksilanaz üretim çalışmalarında kullanılabilir potansiyel bir karbon kaynağı olabileceğini düşündürmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adhikari, S. ve Satyanarayana, T., 2007. Structure and Composition of Xylan. Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects, Ed: R.C. Kuhad and Ajay Singh. *I. K. International Pvt. Ltd.*, New Delhi, India, 275-277.
- Anonim, 2013a. Carbohydrates Part II. The Biochem Synapse, <http://thebiochemsynapse.wordpress.com/2013/02/16/carbohydrates-part-ii/> - (Erişim Tarihi: 07.12.2013).
- Anonim, 2013b. Reino Hongos. Los Organismos Unicelulares, [http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesalfonso\\_romero\\_barcojo/actividades\\_tic/trabajos\\_profesorado/unidades\\_didacticas/ciencias\\_naturales/ud\\_celula/ontenidos/organismos\\_unicelulares.html](http://www.juntadeandalucia.es/averroes/iesalfonso_romero_barcojo/actividades_tic/trabajos_profesorado/unidades_didacticas/ciencias_naturales/ud_celula/ontenidos/organismos_unicelulares.html) - (Erişim Tarihi: 07.12.2013).
- Bakır, U., Yavaşcaoğlu, S., Guvenç, F. ve Ersayın, A., 2001. An Endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: Production, Partial Purification and Biochemical Characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 29 (6-7), 328-334.
- Betts, W.B., Dart, R.K., Ball, A.S. ve Pedlar, S.L., 1992. Biosynthesis and Structure of Lignocellulose. Biodegradation: Natural and Synthetic Materials, Ed: W.B. Betts. *Springer Series in Applied Biology*, London, 139-155.
- Blum, H., Beier, H. ve Gross, H.J., 1987. Improved Silver Staining of Plant Proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis*, 8 (2), 93-98.
- 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.
- Carmona, E.C., Fialho, M.B., Buchgnani, É.B., Coelho, G.D., Brocheto-Braga, M.R. ve Jorge, J.A., 2005. Production, Purification and Characterization of A Minor Form of Xylanase from *Aspergillus versicolor*. *Process Biochemistry*, 40 (1), 359-364.
- Cesar, T. ve Mrřa, V., 1996. Purification and Properties of The Xylanase Produced by *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19 (4), 289-296.
- Chen, C., Chen, J.L. ve L., T.Y., 1997. Purification and Characterization of a Xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for Xylooligosaccharide Production. *Enzyme and Microbial Technology*, 21 (2), 91-96.
- Collins, T., Gerday, C. ve Feller, G., 2005. Xylanases, Xylanase families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1), 3-23.
- Dhiman, S.S., Sharma, J. ve Battan, B., 2008. Industrial Applications and Future Prospects of Microbial Xylanases: A Review. *BioResources*, 3 (4), 1377-1402.

- Düsterhöft, E.M., Linssen, V. A. J. M., Voragen, A. G. J. ve Beldman, G., 1997. Purification, Characterization, and Properties of Two Xylanases from *Hemicola insolens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 20 (6), 437-445.
- Erdoğan, K. ve Akpınar, Ö., 2008. Ksilooligosakkaritlerin Önemi, Üretim Yöntemleri ve Kullanım Alanları. *Akademik Gıda*, 6 (4), 14-20.
- Fengxia, L., Mei, L., Zhaoxin, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z. ve Yi, W., 2008. Purification and Characterization of Xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*, 99 (13), 5938-5941.
- Gaffney, M., Carberry, S., Doyle, S. ve Murphy, R., 2009. Purification and Characterisation of A Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and Its Functional Expression by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 45 (5), 348-354.
- Grabski, A.C. ve Jeffries, T.W., 1991. Production, Purification, and Characterization of  $\beta$ -(1-4)-Endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. *Applied Environmental Microbiology*, 57 (4), 987-992.
- Gregory, A.P., 2007. Ethanol: It's Not About Kernels Anymore. Green Energy, [http://www.research.uky.edu/odyssey/winter07/green\\_energy.html](http://www.research.uky.edu/odyssey/winter07/green_energy.html); (Erişim tarihi: 05.12.2013).
- Harris, A.D. ve Ramalingam, C., 2010. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. *Journal of Experimental Sciences*, 1 (7), 1-11.
- Hendriks, A.T.W.M. ve Zeeman, G., 2009. Pretreatments to Enhance The Digestibility of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 100 (1), 10-18.
- Horn, S.J., Kolstad, G.V., Westereng, B. ve Eijsink, V., 2012. Novel Enzymes for The Degradation of Cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5 (45), 1-13.
- Juturu, V. ve Wu, J.C., 2012. Microbial Xylanases: Engineering, Production and Industrial Applications. *Biotechnology Advances*, 30 (6), 1219-1227.
- Kanwar, S.S. ve Devi, S., 2012. Thermostable Xylanases of Microbial Origin: Recent Insights and Biotechnological Potential. *The International Journal of Biotechnology*, 1 (1), 1-20.
- Khan, H.U., 2012. The Theory of Ion Exchange. The Role of Ion Exchange Chromatography in Purification and Characterization of Molecules, <http://www.intechopen.com/books/ion-exchange-technologies/the-role-of-ion-exchange-chromatography-in-purification-and-characterization-of-molecules> - (Erişim Tarihi: 07.12.2013).
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1), 12-19.

- Kimura, I., Sasahara, H. ve Tajima, S., 1995. Purification and Characterization of Two Xylanases and and Arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (4), 334-339.
- Kocabaş, A., Kocabaş, D.S. ve Bolukbaşı, U.B., 2011. One-Step Purification and Characterization of A Low Molecular Weight Xylanase from *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *Journal of Applied Biological Sciences*, 5 (2), 61-65.
- Kromus, S., Kamm, B., Kamm, M., Fowler, P. ve Narodoslowsky, M., 2006. The Green Biorefinery Concept-Fundamentals and Potential. *Green Biorefineries*, 1, 253-294.
- Kulkarni, N., Shendye, A. ve Rao, M., 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (4), 411-456.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56 (3), 658-666.
- Maurer, S.A., Brady, N.W., Fajardo, N.P. ve Radke, C.J., 2013. Surface Kinetics for Cooperative Fungal Cellulase Digestion of Cellulose from Quartz Crystal Microgravimetry. *Journal of Colloid and Interface Science*, 394, 498-508.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3), 426-428.
- Motta, F.L., Andrade, C.C.P. ve Santana, M.H.A., 2013. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization, Ed: Anuj Chandel. *Intech*, Brezilya, 251-274.
- Nelson, D.L. ve Cox, M.M., 2005. Lehninger Biyokimyanın Temel İlkeleri. *Palme Yayıncılık*, 1180 s, Ankara.
- Ninawe, S., Kapoor, M. ve Kuhad, R.C., 2008. Purification and Characterization of Extracellular Xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, 99 (5), 1252-1258.
- Patel, R.N., Grabski, A.C. ve Jeffries, T.W., 1993. Chromophore Release from Kraft Pulp by Purified *Streptomyces roseiscleroticus* Xylanases. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, 39, 405-412.
- Piyatheerawong, W., 2011. Experimental Design to Enhance Xylanase Production from *Paenibacillus curdlanolyticus* B6 Utilizing Corn Cob as Carbon Source. *KKU Research Journal*, 16 (5), 428-434.

- Roe, S., 2006. Protein Purification Techniques. *Oxford University Pres*, 262 p, New York, USA.
- Salles, B.C., Cunha, R.B., Fontes, W., Sousa, M.V. ve Filho, E.X.F., 2000. Purification and Characterization of A New Xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology*, 81 (2-3), 199-204.
- Singh, S., Madlala, A.M. ve Prior, B.A., 2003. *Thermomyces lanuginosus* : Properties of Strains and Their Hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews*, 27 (1), 3-16.
- Subramaniyan, S., ve Prema, P., 2000. Cellulase-Free Xylanases from *Bacillus* and Other Microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 183 (1), 1-7.
- Subramaniyan, S., ve Prema, P., 2002. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 (1), 33-46.
- Tuncer, M., 2008. Protein Saflaştırma Kromatografik Teknikler. *Mersin Üniversitesi Yayınları*, Yayın No:14, 285 s, Mersin.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. ve Itävaara, M., 2000. Biodegradation of Lignin in A Compost Environment: A Review. *Bioresource Technology*, 72 (2), 169-183.
- Wiegant, W.M., 1992. Growth Characteristics of The Thermophilic Fungus *Scytalidium thermophilum* in Relation to Production of Mushroom Compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (4), 1301-1307.
- Wilson, K. ve Walker, J., 2010. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. *Cambridge University Pres*, 761 p, New York, USA.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. ve Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. *Microbiological Reviews*, 52 (3), 350-317.
- Yamanaka, S., Watanabe, K., Kitamura, N., Iguchi, M. ve Mitsubashi, S., 1989. The Structure and Mechanical Properties of Sheets Prepared from Bacterial Cellulose. *Journal of Material Science*, 24 (9), 3141-3145.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., 2010. Moleküler Biyoloji. *Nobel Yayın Dağıtım*, 613 s, Ankara.

## **EKLER**

EK 1 : Kültür Ortam BileŖenleri

EK 2 : DNS (3,5-dinitrosalisilik asit) Metodu

EK 3 : Ksiloz Standart Eğrisi

EK 4 : Bradford Metodu ile Protein Miktarının Belirlenmesi

EK 5 : Jel Filtrasyon Kromatografi Kolon zellikleri

EK 6 : Anyon DeđiŖim Kromatografi Kolon zellikleri

EK 7 : SDS-PAGE için Kullanılan Reaktifler ve Jellerin Hazırlanması

EK 8 : GmŖ Boyama Metodu

## EK 1

### KÜLTÜR ORTAM BİLEŞENLERİ

#### YpSs Agar Ortamı

4,0 g/L maya özütü  
1,0 g/L  $K_2HPO_4$   
5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
15,0 g/L çözümlü nişasta  
20 g/L agar

#### Ön Kültür Ortamı

4,0 g/L maya özütü  
1,0 g/L  $K_2HPO_4$   
0,5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
10 g/L glikoz

#### Ana Kültür Ortamı

4,0 g/L maya özütü  
1,0 g/L  $K_2HPO_4$   
0,5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$   
0,1 g/L  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$   
20 g/L mısır koçanı



## EK 2

### DNS METODU

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

#### Reaktifler

320 g/L sodyum potasyum tartarat

10 g/L sodyum hidroksit (NaOH)

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

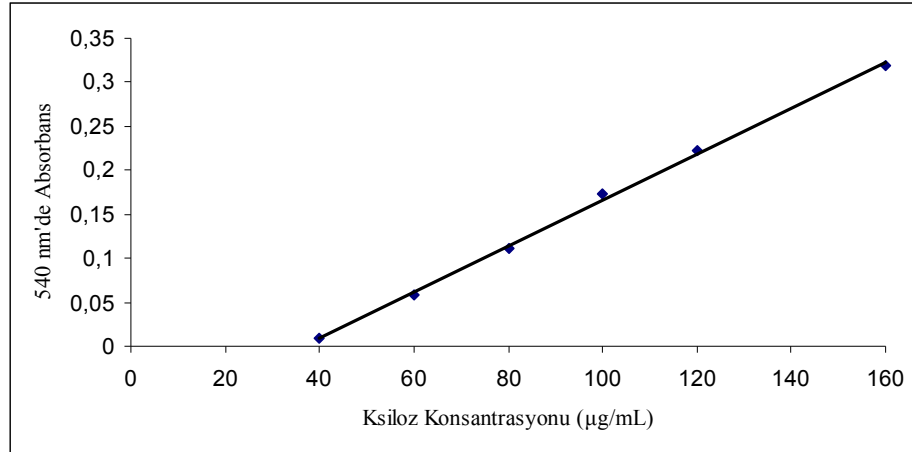
0,5 g/L sodyum sülfid ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) (taze eklenir)

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

### EK 3

#### KSİLOZ STANDART EĞRİSİ

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

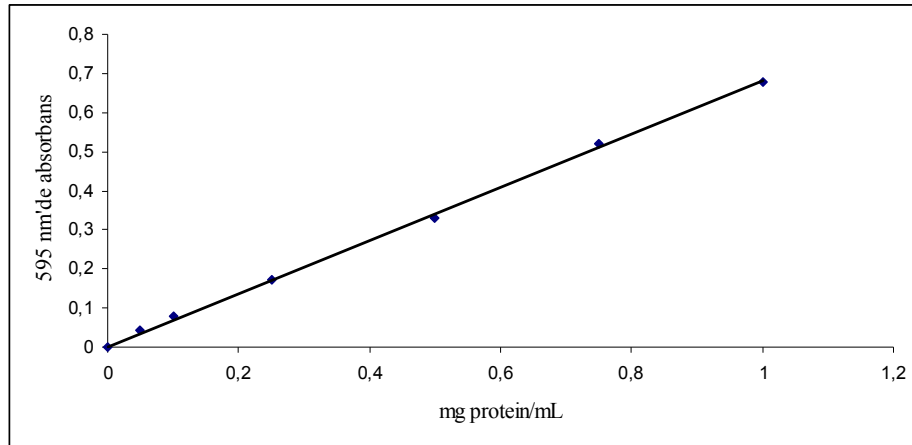


Şekil 3.1. Ksiloz standart eğrisi

## EK 4

### BRADFORD METODU İLE PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Protein miktarı, Bradford (1976) tarafından tarif edildiği gibi sığır serum albümin (BSA) standart protein olarak kullanılarak belirlenmiştir. 1 mg/mL stok BSA 50mM sodyum fosfat tamponunda (pH 7,0) çözdürülerek hazırlanmıştır. Stok çözelti yine aynı tampon ile uygun oranlarda seyreltilerek 0-0,05-0,1-0,25-0,5-0,75-1,0 mg/mL konsantrasyonlarda standart protein çözeltiler hazırlanmıştır. Protein içeriğini ölçmek için bir cam test tüpün içerisinde 0,05 mL BSA çözeltisi ve 1,5 mL Bradford reaktifi karıştırılmıştır. 595 nm'deki absorbans değeri 30 dakika sonra bir spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve standart BSA eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bradford metodu için standart BSA eğrisi

## EK 5

### JEL FİLTASYON KROMATOGRAFİ KOLON ÖZELLİKLERİ

*S. thermophilum* ksilanazının saflaştırılması için, paketlenmiş kullanıma hazır HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 High Resolution (MW:1000-100000 Da) kolonu kullanılmıştır. Kolon verileri Çizelge 5.1’de sunulmuştur.

**Çizelge 5.1.** Jel filtrasyon kolon verileri

Matris	Çapraz-bağlı N,N-metilenbisakrilamid ve alil dekstranın kopolimeri
Ortalama parçacık boyutu	47 µm (25-75 µm)
Ayırma aralığı ( $M_r$ )	Globüler proteinler için 1000-100000
Kolon hacmi	120 mL
Örnek hacmi	5 mL’ye kadar
Önerilen akış hızı	0,5 mL/dk (15 cm/sa)
Maksimum akış hızı	1 mL/dk (30 cm/sa)
Çalışma boyunca kolon yatağı üzerindeki maksimum basınç	0,15 MPa, 1,5 bar, 22 psi
Donanım basınç sınırı	0,5 MPa, 5 bar, 73 psi
pH kararlılığı	
Kısa süreli	2-13
Çalışma	3-11
Uzun süreli	3-11

## EK 6

### ANYON DEĞİŞİM KROMATOGRAFİ KOLON ÖZELLİKLERİ

*S. thermophilum* ksilanazının ikinci adım saflaştırılması için, paketlenmiş kullanıma hazır HiPrep 16/10 Q XL kolon kullanılmıştır. Kolon verileri Çizelge 6.1'de sunulmuştur.

**Çizelge 6.1.** Anyon değişim kolon verileri

Matris	%6 çapraz-bağlı küresel agaroz
Değiştiricinin tipi	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Ortalama parçacık boyutu	90 µm
Yatak yüksekliği	100 mm
Yatak hacmi	20 mL
Önerilen akış hızı	2-10 mL/dk (60-300 cm/sa)
Maksimum akış hızı	1 mL/dk (30 cm/sa)
Çalışma boyunca kolon yatağı üzerindeki maksimum basınç	0,15 MPa, 1,5 bar, 22 psi
Donanım basınç sınırı	0,5 MPa, 5 bar, 73 psi
pH kararlılığı	
Kısa süreli	2-14
Çalışma	2-12
Uzun süreli	2-12

## EK 7

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

#### Stok Çözeltiler

A. Akrilamid/bis (30% T, 2,67% C)

B. 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

C. 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

D. %10 SDS

E. Örnek Tamponu

Saf su	4,0 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 mL
Gliserol	2,5 mL
%10 SDS (a/h)	2,0 mL
%0,05 (a/h) bromfenol mavisi	0,2 mL

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

F. 5X Elektrot (Yürütücü) Tampon, pH 8,3

Tris baz	9,0 g
Glisin	42,3 g
SDS	3,0 g

G. %10 Amonyum Persülfat (APS)

## EK 7 (Devam)

### SDS Jel Çözeltilerinin Hazırlanması

#### A. Alt (Separating) Jel

Monomer konsantrasyonu (%30 T, %2.67 C)	%12
Akrilamid/bis (%30 T, %2.67 C stok)	4,0 mL
Saf su	3,35 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-
%10 SDS	100 µL
%10 Amonyum persülfat (taze hazırlanır)	50 µL
TEMED ( <i>N,N</i> -tetrametilen etilendiamin)	5 µL

#### B. Üst (Stacking) Jel

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

## EK 8

### GÜMÜŞ BOYAMA METODU

SDS-PAGE sonunda jeller, Blum ve arkadaşlarının (1987) yöntemine göre, gümüş boyama yapılarak boyanmıştır.

#### Reaktifler

##### A. Sabitleştirici

150 mL metanol, 36 mL asetik asit ve 150 µL %37'lik formaldehit karıştırılıp, 300 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Bu çözelti birkaç kez kullanılmıştır.

##### B. %50 Etanol

100 mL saf etanol, 100 mL saf su ile karıştırılmıştır. Bu çözelti her zaman taze hazırlanmıştır.

##### C. Ön İşlem Çözeltisi

0,08 g sodyum tiyosülfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 400 mL saf suda cam çubukla karıştırılarak çözdürülmüştür. 8 mL'si ayrılıp geliştirme çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

##### D. Gümüş Nitrat Çözeltisi

0,8 g gümüş nitrat 400 mL saf suda çözdürülmüş ve 300 µL %37'lik formaldehit eklenmiştir.

##### E. Geliştirme Çözeltisi

9 g potasyum karbonat 400 mL saf suda çözdürülmüştür. Ön işlem çözeltisinden ayrılan 8 mL'lik kısım ve 300 µL %37'lik formaldehit eklenmiştir.

##### F. Durdurma Çözeltisi

200 mL metanol ve 48 mL asetik asit karıştırılıp 400 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.



## EK 8 (Devam)

Çizelge 8.1’de gümüş boyama metodunun uygulama basamakları verilmiştir.

**Çizelge 8.1.** Gümüş boyama metodu

	ADIM	ÇÖZELTİ	İŞLEM SÜRESİ
1	Sabitleştirme	Sabitleştirici	≥1 saat
2	Yıkama	%50 etanol çözeltisi	3x20 dakika
3	Ön işlem	Ön işlem çözeltisi	1 dakika
4	Durulama	Saf su	3x20 saniye
5	Aşılama	Gümüş nitrat çözeltisi	20 dakika
6	Durulama	Saf su	2x20 saniye
7	Geliştirme	Geliştirme çözeltisi	~10 dakika
8	Yıkama	Saf su	2x2 dakika
9	Durulama	Durulama çözeltisi	≥10 dakika

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sevgi GÜDER  
Doğum Tarihi ve Yer : 25.04.1988 / KARAMAN  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Telefon : 05457765839  
e-mail : svguder@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Pamukkale Üniversitesi, Kimya Bölümü	2011
Lise	Karaman Bifa Lisesi	2005