

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> ENDOKSİLANAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU  
VE ENZİMİN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zeliha CEVHER**

**TEMMUZ 2010**

**TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> ENDOKSİLANAZ GENİNİN KLONLANMASI, EKSPRESYONU  
VE ENZİMİN KARAKTERİZASYONU**

**Biyolog Zeliha CEVHER**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde  
“Yüksek Lisans (Biyoloji)”  
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 21.06.2010  
Tezin Savunma Tarihi : 14.07.2010**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI  
Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ  
Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Nagihan SAĞLAM ERTUNGA**

**Enstitü Müdürü : Prof. Dr. Salih TERZİOĞLU**

**Trabzon 2010**

## ÖNSÖZ

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> endoksilanaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu konulu tez çalışması Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında bana her konuda değerli bilgi ve önerileri ile yol gösteren ve büyük emek sarf eden danışman hocam sayın Doç. Dr. Sabriye ÇANAKÇI'ya ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ'e sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Yüksek lisans eğitimim sırasında hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak bana her zaman destek olan, tecrübelerini benimle paylaşarak daha da sağlam adımlar atmamı sağlayan hocam Arş. Gör. Kadriye İNAN'a ayrıca teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca benden yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Remziye NALÇACIOĞLU'na ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgilerini benimle paylaşan ve destek olan Murat KAÇAĞAN'a, Arş. Gör. Dilşat Nigar ÇOLAK'a, Arş. Gör. Mutlu GÜLTEPE'ye ve tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma teşekkür etmeyi borç bilirim. Bu günlere gelmemi sağlayan ve her zaman destekleyen ailem ve tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Zeliha CEVHER  
Trabzon, 2010

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY .....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
TABLolar DİZİNİ .....	IX
SEMBOLLER DİZİNİ .....	X
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Termofilik Mikroorganizmalar.....	2
1.2.1 Termofilik Mikroorganizmaların Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık (Termostabilite) Mekanizması.....	3
1.2.2. Termostabil Enzimler ve Önemi .....	5
1.3. <i>Geobacillus</i> Cinsi .....	6
1.4. Hemiselüloz .....	7
1.4.1. Ksilan.....	7
1.5. Ksilanazlar .....	10
1.5.1. Endo-1,4- $\beta$ -Ksilanaz .....	12
1.5.2. Ksilanazların Sınıflandırılması .....	13
1.5.2.1. Ekstremofilik Ksilanazlar .....	15
1.5.2.2. Soğukça Adapte Olmuş Ksilanazlar .....	16
1.5.3. Ksilanazın Yapısı ve Ksilanolitik Enzimlerin Aktivitesi Arasındaki İlişki.....	16
1.6. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar .....	17
1.7. Ksilanaz Enziminin Moleküler Biyolojisi .....	18
1.8. Ksilanazların Endüstriyel Uygulama Alanları.....	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR .....	24
2.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar .....	24
2.2. <i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> Suşunda silanaz Aktivitesinin Tespiti .....	25
2.3. Moleküler Çalışmalar .....	25

2.3.1.	Genomik DNA izolasyonu .....	25
2.3.2.	Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması .....	26
2.3.3.	Ters PCR (Inverse PCR) İle Genin Kalan Kısımlarının Bulunması ve Klonlanması.....	28
2.3.4.	Endo $\beta$ -1,4-ksilanaz Geninin pET20b(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması .....	30
2.4.	Biyokimyasal Çalışmalar .....	31
2.4.1.	Protein Konsantrasyon Tayini .....	31
2.4.2.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi .....	32
2.4.3.	Optimum Sıcaklık .....	32
2.4.4.	Optimum pH .....	33
2.4.5.	Enzim Kinetiği .....	33
2.4.6.	Isıl Kararlılığı .....	33
2.4.7.	pH Kararlılığı .....	34
2.4.8.	Metal İyonları ve Kimyasalların Etkisi .....	34
2.4.9.	Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi .....	34
2.4.10.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi .....	35
3.	BULGULAR .....	37
3.1.	<i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> Bakterisinin Teşhisi .....	37
3.2.	Moleküler Çalışmalar .....	37
3.2.1.	Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması .....	37
3.2.1.1.	Dejenerat Primer Sentezi .....	37
3.2.1.2.	PCR Reaksiyonu ile Ksilanaz Gen Parçasının Çoğaltılması ve Klonlanması.....	37
3.2.1.3.	Ters PCR (Inverse PCR) ile Genin Tamamlanması .....	38
3.2.1.4.	Ksilanaz Geninin pET20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu .....	40
3.3.	Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz Enziminin Karakterizasyonu .....	41
3.3.1.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi .....	42
3.3.2.	Optimum Sıcaklık .....	42
3.3.3.	Optimum pH .....	43
3.3.4.	Kinetik İncelemeler .....	43
3.3.5.	pH Kararlılığı .....	44
3.3.6.	Isıl Kararlılığı .....	45
3.3.7.	Metal İyonlarının ve Kimyasalların Etkisi .....	46
3.3.8.	Enzimin Substrat Spesifikliği .....	48

3.3.9.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	49
4.	TARTIŞMA.....	51
5.	SONUÇLAR.....	55
6.	ÖNERİLER .....	57
7.	KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ		

## ÖZET

Ksilan, doğada ikinci sırada sıklıkta bulunan bir polisakkarittir. Endoksilanazlar da ksilanın hidrolizinden sorumlu bir enzim grubu olup başta kağıt ve kağıt hamuru endüstrileri olmak üzere endüstride en çok kullanılan enzimlerden biridir. Termofilik mikroorganizmaların ksilanazları sıcaklık ve pH değişikliklerine karşı dirençli olduklarından dolayı endüstriyel süreçlerde önemli rolleri vardır.

Bu çalışma da *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> izolatu olarak isimlendirilen termofilik bir bakterinin ısı kararlı ksilanaz gen sırasının invers PCR yöntemi ile bulunması, bir *E. coli* ekspresyon vektörüne klonlanması, saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> endoksilanazı kodlayan 1224 nt'lik genin baz dizilimi belirlenerek pET20b+ vektörüne klonlandı. Geni içeren vektör, *E. coli* BL21 hücrelerine aktararak ksilanaz ekspres edildi ve MagneHis™ Protein Saflaştırma Sistem kiti kullanılarak enzim saflaştırıldı. Saflaştırılan Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının 75 °C ve optimum pH'nın ise 7,0 olduğu bulundu. Oat spelt xylan için olan  $K_m$  değerinin 0,425 mM olduğu ve bu değer diğer ksilanaz enzimlerine göre daha düşük olduğu belirlendi.  $V_{maks}$  değeri 500 U/mg olarak belirlendi. Metal iyonlarının ve çeşitli kimyasalların enzime olan etkileri değişik konsantrasyonlarda gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda belirlendi ve 10 mM konsantrasyonda  $Hg^{2+}$  bivalent metal iyonunun enzim aktivitesini neredeyse tamamen inhibe ettiği tespit edildi. Enzimin molekül ağırlığı 47 kDa olup amino asit benzerliğine göre family 10 glikosil hidrolaz sınıfı bir enzim olduğu belirlendi. Geo7<sub>1</sub> endoksilanaz enziminin oat spelt xylan substratını hidrolizlemesi sonucu ortaya çıkan şekerlerin başlıca ksilobioz, ksilotetroz olduğu ayrıca bunların yanında az miktarda da olsa ksilotrioz ve diğer bazı oligosakkaritlerinde olduğu ince tabaka kromatografisinde (TLC) ile ortaya çıkarıldı.

Elde edilen veriler ışığında, enzimin biyokimyasal özellikleri, enzimin önemli bir endüstriyel enzim olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *Geobacillus*, endoksilanaz, ısı kararlı

## SUMMARY

### **Cloning, Expression and Characterisation of Endoxylanase From *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>**

Xylan is the second most abundant polysaccharide in nature. Endoxylanases, responsible for hydrolysis of the xylan, are an enzyme group used commonly in industry which is used especially at paper and pulp industries. In specially, xylanases from thermophiles are expected to play a significant role in industrial processes, since they are thermostable and resistant to pH changes.

In this study determining the thermal stable xylanase gene sequence of a thermophilic bacterium which is called *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> by inverse PCR, cloning of this gene to an *E. coli* expression vector, its purification and characterization are realized. A 1224 bp endoxylanase gene coding from *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> sequenced and cloned into pET20b+ vector. Vector encoding this gene was transformed into *E. coli* BL21, expressed and enzyme was purified by MagneHis<sup>TM</sup> Protein Purification System and characterized. The Geo7<sub>1</sub> Endoxylanase enzyme showed optimal activity at 75 °C in pH 7,0. It was determined that the enzyme had a lower  $K_m$  0,425 mM for oat spelt xylan than most of the xylanases and  $V_{max}$  of value 500 U/mg. Effects of metal ions and some chemicals on the enzyme was determined by the studies that were conducted with different concentrations. Hg<sup>2+</sup> (10 mM) almost strongly inhibited the enzyme activity. On the basis of amino acid sequence similarities, this 47 kDa enzyme could be assigned to family 10 of the glycosyl hydrolase classification system. Purified enzyme catalyzed the hydrolysis of oat spelt, the level of xylobiose and xylotetraose was high along with xylotriose and some oligosaccharides analyzed on TLC.

In the light of all data it has been suggested that the enzyme's biocatalytic properties proved to be one of the important industrial enzymes.

**Key Words:** *Geobacillus* sp., endoxylanase, thermostable



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Mısır kabuğuna ait heteroksilan yapısı .....	11
Şekil 2. Ksilanolitik Enzim Sistemi .....	13
Şekil 3. <i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> suşuna ait endo $\beta$ -1,4-ksilanaz genin tamamı .....	39
Şekil 4. <i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> suşuna ait endo $\beta$ -1,4-ksilanaz genin amino asit sırası .....	40
Şekil 5. pET20b(+)'ye klonlanan 7 <sub>1</sub> ksilanaz geninin kesim görüntüsü .....	41
Şekil 6. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği .....	42
Şekil 7. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin optimum pH grafiği .....	43
Şekil 8. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enzimine ait Michaelis- Menten grafiği .....	44
Şekil 9. Oat spelt xylan substratı için Lineweaver-Burk eğrisi .....	44
Şekil 10. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin pH kararlılığı .....	45
Şekil 11. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin ısı kararlılığı .....	46
Şekil 12. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enzimine metal iyonlarının etkisi .....	47
Şekil 13. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enzimine bazı kimyasalların etkisi .....	47
Şekil 14. İnce Tabaka Kromatografisi ile oat spelt xylan'ın parçalanması.....	49
Şekil 15. Saflaştırılan endoksilanaz enziminin SDS-PAGE jeli .....	50

## TABLolar DİZİNİ

### Sayfa No

Tablo 1. Bitkisel kaynağına bağılı olarak ksilanın kompozisyonundaki çeşitlilik .....	9
Tablo 2. <i>Bacillus</i> suşlarına ait ksilanazların fizikokimyasal özellikleri .....	18
Tablo 3. Ksilanazların Potansiyel Uygulama Alanları .....	23
Tablo 4. Dejenerat primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları. ....	26
Tablo 5. Dejenerat primerlerle PCR'ın çalışma programı.....	27
Tablo 6. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar .....	27
Tablo 7. Genomik DNA'nın kesim şartları .....	28
Tablo 8. PCR için reaksiyon şartları.....	29
Tablo 9. PCR cihazı için çalışma programı .....	29
Tablo 10. Ekspresyon primerleriyle PCR için reaksiyon şartları .....	30
Tablo 11. Ekspresyon primerleriyle PCR cihazı için çalışma programı .....	30
Tablo 12. Klonlama sırasında kullanılan primerlerin listesi .....	31
Tablo 13. <i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> ait endo $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin tamamının diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan nükleotit % benzerliği.....	39
Tablo 14. <i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> ait endo $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin tamamının diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan amino asit % benzerliği .....	40
Tablo 15. Geo7 <sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin substrat spesifikliği .....	48

## SEMBOLLER DİZİNİ

CMC	: Karboksimetilselüloz
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
IPTG	: Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
LB	: Luria-Bertani
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS- PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
Tris	: Tris (hidroksimetil) aminometan
kDa	: Kilodalton
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
V <sub>max</sub>	: Maksimum hız

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Reaksiyonları katalizleyen biyolojik katalizörlere enzimler denir. Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan birçok reaksiyonun uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini de doğurmuştur. Enzimatik işlemlerin geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir (Gümüşel, 2002).

Günümüzde tanımlanmış ve karakterize edilmiş birkaç bin enzim bulunmaktadır. Her geçen yıl da sayıları daha da artmaktadır. Günümüzde bu enzimler başta mikroorganizmalar olmak üzere bitkiler ve hayvanlar tarafından üretilmektedir. Bu enzimlerin üretiminde en büyük pay mikroorganizmalara ait olup, yaklaşık %90'ı bu organizmaların fermentasyonu ile sağlanmaktadır (Godfrey ve West, 1996). Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri; mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürünleri oluşturmamaları, daha kararlı ve daha ucuz olmaları, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Örneğin, mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterebilirler (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999). Ayrıca, mikroorganizma kökenli enzimlerin suda çözünmeyen matrikslerle immobilize edilerek daha uzun süre kullanılabilmesi, endüstriyel alanlarda mikrobiyal enzimlerin kullanılmasını sağlamıştır (Gümüşel, 2002).

Modern üretim tekniklerinin devreye girmesiyle enzim endüstrisi, son yarım yüzyılda büyük bir gelişim göstermiştir. Buna paralel olarak enzim biyoteknolojisinde önemli aşamalar kaydederek, bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi için işlem maliyeti bakımından ucuz olması, fiziksel ve kimyasal koşullara bağlı olmadan aktivitesini en yüksek düzeyde koruması ve mümkün olan en uzun süreyle aktivitesini sürdürmesi, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması, alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani

güvenilir olması gerekir (Sarıkaya, 1995). Öyle ki, endüstriyel enzim üretiminin dünya pazarındaki payı 1995 yılında 1 milyar Dolar iken, bu rakam 2000 yılında 1,5 milyar Dolar'a çıkmıştır (Kirk vd., 2002). 2005 yılında ise 1,7-2 milyar Dolar arasında olduğu bildirilmiştir (Godfrey ve West, 1996).

Bu enzimlerin endüstriyel kullanım alanlarına göre dağılımlarına bakıldığında, %29'unun gıda sektöründe, %15'inin hayvan yemi sektöründe, %56'sının ise genel teknik alanlarda kullanıldığı görülmektedir (Kirk vd., 2002; Schallmey vd., 2004).

## 1.2. Termofil Mikroorganizmalar

Termofilik bakteriler son yıllarda yoğun ilgi duyulan araştırma odaklarından birisi olmuştur. Pek çok canlı grubunun yaşayabilmesinin imkânsız olduğu sıcaklıklarda bile termofilik mikroorganizmaların enzimlerini kullanabilmeleri ve yaşamlarını sürdürebilmeleri, araştırmacıları bu konuda çalışmaların yapılmasına yöneltmiştir. Dünyamızda solfatarik alanlar, hidrotermal kuyular, sıcak su kaynakları gibi çeşitli jeotermal alanlardan aerobik termofillerin izolasyonları yapılmaktadır. Yapılan pek çok çalışmada sıcaklığın mikroorganizmaların fizyolojik aktiviteleri ve gelişimleri üzerindeki en önemli faktörlerden biri olduğu, yüksek sıcaklığın farklı mikroorganizmalar tarafından farklı düzeyde tolere edildiği tespit edilmiş; pek çok ökaryotik canlı kısa bir süreliğine 50 °C'lik sıcaklığa bile dayanamazken, bazı mikroorganizmaların oldukça yüksek sıcaklıklarda yaşayabildiği bildirilmiştir (Williams, 1995). Mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklıkları dikkate alındığında sakrofiller (20 °C altında), mezofiller (20-55 °C) ve termofiller (55 °C üzerinde) olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar (Gomes ve Steiner, 2004). Termofilik mikroorganizmaların biyokatalitik potansiyelleri ve enzimleri üzerinde birçok araştırmalar yapılmıştır (Gomes ve Steiner, 2004). 60-110 °C arasında yüksek sıcaklıklarda gelişebilen termofilik mikroorganizmalar, volkanik ve jeotermal kaynaklarda bulunurlar. 50-60 °C arasındaki sıcaklıklarda optimum olarak çoğalabilen mikroorganizmalar ise, ılımlı termofillerdir. 60-80 °C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilen ekstrem termofiller de; genellikle *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacterium*, *Thermotoga* ve *Aquifex* cinslerine aittirler (Stetter, 1998).

Sıcak su kaynakları üzerinde gelişen termofiller ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu yüksek sıcaklığa direnç gösteren termofil enzimlerin

araştırılması üzerinedir. Son yıllarda bakteriyel kaynaklardan 2400'ün üzerinde endonükleaz enzimi tanımlanmış, bu enzimlerin 220'sinin farklı özellik gösterdiği ve çoğunlukla *Thermus* ve *Bacillus stearothermophilus* türlerinden izole edildiği bildirilmiştir (Welch, 1995).

### **1.2.1. Termofil Mikroorganizmaların Yüksek Sıcaklığa Dayanıklılık (Termostabilite) Mekanizması**

Termofil mikroorganizmaların diğer canlılar gibi aynı enzimlere sahip oldukları, fakat termofilik enzimlerinin daha termostabil olduğu, proteoliz ve denatürasyona daha dayanıklı olduğu anlaşılmıştır (Kumar ve Nussinov, 2001). Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklardaki ortamlarda yaşayabilmeleri için, hücre membranlarındaki doymuş yağ asidi oranının fazla olduğu, yağ asitlerinin hücre için hidrofobik bir ortam oluşturduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur (Herbert ve Sharp, 1992).

Hipertermofilik ve termofilik enzimler (termozimler) ekstremozimler isimli başka bir enzim kategorisinin üyesidirler. Ekstremozim grubu enzimler yüksek tuz seviyelerinde (halozimler), yüksek alkali koşullarında (alkalozimler) ve diğer ekstrem koşullar altında fonksiyon gösterebilirler (Claire ve Gregory, 2001). Yüksek sıcaklık, tuz ve alkali ortamı ile diğer ekstrem koşullarda da aktivite göstermeleri bu enzimleri endüstriyel kullanım için uygun hale getirmiştir.

Termofiliklerin hücre membran yapısı: Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklardaki ortamlarda yaşayabilmeleri için hücreyi dayanıklı hale getirdiği ve hücre membranlarındaki doymuş yağ asitlerinin oranının fazla olduğu, yağ asitlerinin hücre için hidrofobik bir ortam oluşturduğu yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur (Herbert ve Sharp, 1992). Mezofilik organizmalar, ısıya karşı dirençli olmayan lipid bilayer yapısında bir hücre membranına sahiptirler. Hipertermofiller, yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilmeleri için lipid monolayer yapısında olan yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı direnç gösteren bir membran yapısına sahiptirler (Daniel ve Cowan, 2000).

Termofilik organizmalar daha etkili ve sıkı bir şekilde katlanabilen aminoasitlere sahip olmalarından dolayı termofilliğe direnç gösterirler. Isıya karşı daha yüksek bir direnç göstermesini sağlayan aspartik ve glutamik asitler içerdiklerin sahip oldukları amin

gruplarından dolayı heliks yapısını kuvvetlendirirler (Senes vd., 2000; Zhou vd., 2001; Adamian ve Liang, 2002; Rinia vd., 2002).

Protein yapısı: Termal proteinler, mezofilik proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini korurlar ve kararlı halde kalırlar. Querol ve arkadaşları (1996) yaptıkları çalışmalarda, termal kararlılığı artıran en az 13 farklı fiziksel ve kimyasal faktörün olduğunu göstermiştir. Bu faktörlerden bazıları tuz köprülerinin optimizasyonu, daha kısa halkalar, halkalarda glisin miktarının azaltılması ve prolin miktarının artırılması, hidrojen bağları ve proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlemelerdir.

Hidrofobik özellik ile proteinlerin katlanması arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Hidrofobik özelliğe sahip proteinler daha etkin bir katlanma yaparak yüksek sıcaklıklara karşı daha dirençli hale geçmektedirler. Deneysel çalışmalar, hidrofobik etkileşimlerin termofilik proteinlerin kararlılığında önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Sıcaklığa dirençli proteinler hidrofobik etkileşimlerle dimer oluşturarak termal hidrolize karşı daha dirençli hale geçmektedirler. Bütün bunların yanı sıra sıcaklığa dirençli proteinler disülfid bağları, aromatik etkileşimler, hidrojen bağları içermekte ve elektrostatik çekim mekanizmalarıyla yüksek sıcaklıklara karşı direnç gösterebilmektedirler (Kumar ve Nussinov, 2001).

Haney ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada, proteinlerin termal kararlılığının oluşmasında, aminoasit değişimlerinin önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Termofilik proteinlerin yüklü aminoasitler (Arg, Lys, His, Asp ve Glu), valin ve izolösin içeriğinde artış görülürken, yüklü polar aminoasit ( Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) içeriğinde ve denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma olduğu görülmüştür. Termostabilite kavramı ise, bütün proteinlerde bulunan kanonikal (koordinatlardan bağımsız) kuvvetlerin modifikasyonu, örnek olarak; elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerle ve bazı aminoasitlerin değişimiyle elde edilen birçok küçük yapısal modifikasyonların kazandırdığı özellikler olarak tanımlanmaktadır. Proteinlerde de termostabilite özel bir amino asitinin termofillerin disülfid bağları ile sıcaklığa dayanıklı hale gelebildiği belirlenmiştir. Ayrıca varlığına veya sentez sonrası modifikasyonuna bağlanamayan bir özellik olarak bilinmektedir (Scandurra vd., 1998).

DNA'larının pozitif süper sarmallar oluşturan ters giraz enzimlerini içerdiği ve bu yapının DNA'nın erime noktasını yükselttiği ve böylece mikroorganizmayı daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı hale getirdiği saptanmıştır (Lopez, 1999; Kumar ve Nussinov, 2001).

DNA yapısı: Lineer çift zincirli DNA 65 °C de termal denatürasyona uğrarken süpersarmal plazmitlerin en az 107 °C'ye kadar termal denatürasyona dirençli olduğu görülmektedir. Plazmit DNA'sı topolojik olarak kapalı olduğu için termal denatürasyona karşı daha dirençlidir. Marguet ve Foreterre (1994) yapmış oldukları bir çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun, çift zincirli DNA'yı 107 °C de termal degradesyona karşı koruduğu göstermiştir. Tuzlar tarafından nükleik asitlerin termal degradesyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler.

### 1.2.2. Termostabil Enzimler ve Önemi

Termostabil enzimler, protein stabilitesinin anlaşılması için model olarak kullanılmaktadır. Diğer önemli bir neden ise, bu enzimlerin yüksek sıcaklıklardaki biyoteknolojik işlemlerdeki avantajlarıdır. Bu duruma örnek verilecek olunursa, organik çözücü içerisindeki kimyasal reaksiyonların hızlarındaki artış nedeninin yüksek sıcaklıklarda ortam viskozitesindeki azalma ve difüzyon katsayısındaki artıştan kaynaklandığı yapılan araştırmalarda gözlenmiştir (Becker vd., 1997; Krahe vd., 1996). Çözünürlüğü düşük olan hidrofobik bileşiklerin olduğu çeşitli işlemlerde, sıcaklığın yükseltilerek çözünürlüğün artırılması ile reaksiyon hızının artması sağlanmaktadır. Ayrıca, yüksek sıcaklık, biyolojik hidroliz reaksiyonlarının hızlarını arttırmakta ve kontaminasyon riskini de azaltmaktadır. Termofilik enzimlerin, etki mekanizmalarının mezofilik olanlarla benzer oldukları belirtilmiştir (Adams, 1993; Danson ve Hough, 1998). Termofilik enzimlerden bazılarının mezofilik konak hücrede ekspresyonu ile termal kararlılıklarının bozulmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle, termofilik enzimlerin yüksek sıcaklıklara adaptasyon için geliştirdikleri moleküler stratejilerin genetik bir özellik olduğu belirtilmiştir (Niehaus vd., 1999; Jaenicke ve Böhm, 1998).

Termofillerden elde edilen termostabil enzimlerin, mikroorganizmaların gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda bile kararlı oldukları ve termofil enzimlerinin daha sağlam oldukları belirlenmiştir (Sabato vd., 1999). Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum büyüme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftirler. Bu yüksek



sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg, 2003). Uygulanabilen daha yüksek bir operasyon sıcaklığı aynı zamanda organik bileşiklerin çözünürlüğü ve elde edilebilirliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve etkili bioremediasyonda (tedavi) sağlar (Becker, 1997). Ayrıca, bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001). Bu sıcaklıklarda suyun yüzey geriliminin ve vizkositesinin azalması da diğer bir avantajdır (Kristjansson, 1989).

### 1.3. *Geobacillus* cinsi

*Geobacillus* cinsi, Nazina ve arkadaşları tarafından 2001 yılında *Bacillus* cinsinden ayrılıp bakteri sistematığıne kazandırılmış olan yeni bir cinstir. *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus*'ların termofilik türleri olan *B. kaustophilus* ve *B. thermoglucosidasius*'un farklı bir filogenetik gruba ait olacağı düşünüldüğü Nazina tarafından "Grup 5" olarak adlandırıldı. Yapılan fizyolojik ve genetik araştırmalar sonucunda *Geobacillus* cinsinin gerçekliği onaylandı.

Bu cinse ait bakteriler gram pozitif, aerobik veya fakültatif aerobik, hareketli, endosporlu, termofilik bakterileri içermektedir. Bu cinsin üyeleri, dünya üzerinde termofilik ve mezofilik coğrafik bölgelerde geniş yayılım gösterirler (McMullan vd., 2004).

*Geobacillus* cinsini *Bacillus* cinsinden ayıran en önemli özellik 16S rRNA gen sıralarıdır. 16S rRNA gen dizin analizlerini temel alan çalışmalara göre, *Geobacillus* cinsi ile *Bacillus* cinsi üyeleri arasında %95'den daha az bir benzerlik bulunmaktadır. Fakat *Geobacillus* cinsi kendi üyeleri arasındaki 16S rRNA gen benzerliği %96,5 ve %99,2 arasındadır. Bundan dolayı 16S rRNA gen dizi analizleri *Geobacillus* cinsine ait türlerin ayırımında geçerli değildir, sadece cins seviyesindeki sınıflandırmalarda önemli rol oynar (M.Banat, 2004).

Bu cinsin üyeleri yeryüzünde petrol alanları, kuru ot karışımı, hidrotermal ağız veya topraklar gibi çeşitli termofilik ve mezofilik coğrafik alanlara yayılmıştır ve 35 °C'den 78 °C'ye kadar büyüme sıcaklığı gösteren *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus*

*thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus subterraneus*, *Geobacillus uzenensis*, *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *Geobacillus toebii*, *Geobacillus vulcani*, *Geobacillus lituanicus*, *Geobacillus tepidamans*, *Geobacillus gargensis*, *Geobacillus jurassicus*, *Geobacillus caldoproteolyticus*, *Geobacillus pallidus* ve *Geobacillus debilis* türlerini içerir (Nazina, 2001).

#### 1.4. Hemiselüloz

Hemiselüloz, tabiatta selülozdan sonra en yaygın bulunan polisakkarit olup lignoselülozik yapıda kuru ağırlığın %22'sini oluşturur (Biely, 1984; Puls ve Schseil, 1993). Hemiselülozlar aynı zamanda alkalide çözünen heteropolisakkarit yapısında olan polisakkaritlerdir (Wilkie, 1983). Düz ya da dallanmış yapıda, D-ksiloz, L-arabinoz ya da D-galaktoz veya bunların kombinasyonundan oluşan, farklı cinslerden polisakkarit gruplarını içerirler (Zimmermann, 1992). Birçok hemiselüloz, ksilanca zengin bir yapı teşkil eder,  $\beta$ -1,4-ksilopiranosidaz gruplarından oluşan omurgaya,  $\alpha$ -D-glukuronik asit ya da 4-O-metil- $\alpha$ -D-glukuronik asit ve  $\alpha$ -L-arabinofuranoz birimleriyle bağlanır (Joseleau vd., 1992).

##### 1.4.1. Ksilan

Bitki hücre duvarı birbirleriyle birleşmiş olan selüloz, hemiselüloz (başta ksilan) ve lignin materyallerinden oluşur (Thomson, 1993). Odunun üç temel bileşenleri şunlardır; %35-50'lik kısım selüloz, %20-30'luk kısmını hemiselüloz ve %20-30'luk kısmını ise lignin oluşturur. Hemiselülozun yapısında mannan, galaktan ve arabinanın yanı sıra ana bileşen olarak ksilan yer alır. Selüloz ve lignin ile beraber hemiselüloz yapısına katılan bir bileşen olarak bitki hücre duvarlarının ana kompozisyonunu oluştururlar. Hücre duvarı yapısında bu üç bileşen kovalent ya da kovalent olmayan bağlarla bir ilişki halindedirler. Ksilanın ya da hemiselülozun lignin ve selüloz arasına yerleşmesi selülozun bütünlüğünün devamı ve selülaz degradasyonuna karşı liflerin korunması açısından önemlidir (Beg vd., 2001). Ksilan, hemiselülozun önemli bir yapıtaşı olup, bileşenlerine ayrıştırılarak yeniden kullanılabilirlik potansiyeli doğada en yaygın bulunan en yaygın bulunan ikinci kaynaktır

(Kulkarni vd., 1999). Bitkide ana hemiselülozik yapı olup doğada yeniden dönüştürülebilir biyokütlenin üçte birini oluşturur. Bitki kuru ağırlığının ksilan yüzdesi bitki kaynağına göre değişir. Buna göre, sert ağaç, kozalaklı ağaç ve çok yıllık bitkilerde ksilan yüzdesi sırasıyla 15-10, 7-10 ve 30 aralığında değişmektedir (Bakır, 2005). Ayrıca tahıl tanelerinin fiber içeriklerinin büyük bir kısmını da ksilan oluşturur (Cowan, 1996).

Ksilan, ksiloz birimlerinin  $\beta$ -1,4 glikozidik bağlarla bağlanması ile oluşan bir omurgayı içeren kompleks bir polisakkarit olup ana zincir  $\beta$ -ksilopiranoz birimlerinden oluşur. Sert odunlu bitkilerdeki ksilan *O*-asetil-4-*O*-metilglukuronoksilandır. Bu polisakkarit 70  $\beta$ -ksilopiranoz biriminden oluşur ve  $\beta$ -1,4 glikosidik bağlarla bağlıdır. Her 10 ksiloz biriminde bir ksiloz biriminin 2 numaralı karbonuna bir 4-*O*-metilglukuronik asit bağlanmıştır. Sert odunlu ksilanlar yüksek oranda asetillenmiştir. Örneğin; huş ağacı ksilanı 2 mol ksiloz başına 1 mol asetik asit içerir. Asetilasyon 2 numaralı karbondan (C-2) daha çok 3 numaralı karbondan (C-3) gerçekleşmektedir. Bu asetil grupların varlığı ksilanın su içinde kısmi çözünmesinden sorumludur. Eğer ksilan alkali ekstraksiyona maruz bırakılırsa asetil gruplar kolayca yapıdan uzaklaştırılabilir (Sunna ve Antranikian, 1997). Yumuşak odunlulardaki ksilan ise, arabino-4-*O*-metilglukuroksilandan oluşur. Sert odunlulardan daha yüksek oranda 4-*O*-metilglukuronik asit içeriğine sahiptir. Bunlar 2 numaralı karbon atomunda (C-2) yerleşmişlerdir. Sert odunlulardakinin aksine yumuşak odunlulardaki ksilan asetillenmemiştir. Bunun yerine  $\alpha$ -L-arabinofuranoz üniteleri ksilozun 3 numaralı karbon (C-3) atomuna  $\alpha$ -1,3 glikozidik bağlarla bağlanmıştır (Puls ve Schuseil, 1993). Bu arabinozil eklentileri ksiloz birimlerinin hemen hemen %12'sinde görülür (Wong vd., 1988).  $\beta$ -D-ksilopiranoz, 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glukuronik asit ve L-arabinofuranoz oranı 100:20:13 dür. Ksilanların çoğu ana ve yan zincirlerinde değişen grupları içeren bir heteropolisakkarit olarak bulunur. Ksilanın ana omurgasındaki yaygın yer alan radikal gruplar asetil, arabinozil ve glukuronozil birimleridir (Şekil 1).

Ksilan, esparto çimeni ve tütün dışındaki bütün bitkilerde heterojen yapıdadır. Ksilan polimeri çoğunlukla  $\beta$ -D-1,4-bağıyla birleşmiş D-ksiloz iskeletinden oluşmuştur. Ana iskelete bağlanan asetil, arabinozil ve glukuronozil yan grupları ksilan molekülünü dallanmış ve heterojen bir yapıya dönüştürmektedir (Beg vd., 2001).

Tablo 1'de görüldüğü gibi yan zincirlerin kompozisyonu ve frekansı ksilan kaynağına bağlı olarak değişim göstermektedir.

Tablo 1. Bitkisel kaynağına bağlı olarak ksilanın kompozisyonundaki çeşitlilik (Saha, 2000)

Ksilan kompozisyonu	Huş ağacı ksilan	Pirinç kabuğu nötral ksilanı	Buğday arabinoksilanı	Mısır lifi hemiselülozu
Ksiloz	89.3	46.0	65.8	48.0-54.0
Arabinoz	1.0	44.9	33.5	33.0-35.0
Glukoz	1.4	1.9	0.3	0.0
Galaktoz	0.0	6.1	0.1-0.2	5.0-11.0
Mannoz	0.0	0.0	0.1-0.2	0.0
Anhidroüronik asit	8.3	1.1	0.0	0.0
Glukuronik asit	0.0	0.0	0.0	3.0-6.0

Sert ağaç ksilanının (asetil-4-*O*-metil glukuroksilan) monomer sayısı 200 civarındadır. Ksilan ana iskeletindeki D-ksilopiranosit üniteleri, C-2 ve/veya C-3 pozisyonundaki asetik asit ve C-2 pozisyonunda asetil-4-*O*-metil glukuronik asit ile bağ olmaktadır (Eriksson vd., 1990; Kormelink ve Voragen, 1993; Coughlan ve Hazlewood, 1993).

Kozalaklı ağaç ksilanının (arabino-4-*O*-metilglukuronoksilan) monomer sayısı 120'den fazladır. Ksilan iskeleti, C-2 pozisyonunda 4-*O*-metil- $\alpha$ -glukuronik asit ve C-3 pozisyonunda ise L-arabinoz ile dallanmış yapı oluşturmaktadır. Bundan başka, birçok kozalaklı ağaç ksilanı, D-galakturonik asit ve D-ksiloz gibi gruplara sahiptir. Çimen ksilanı küçük miktarda, her 70 monomer sayısında bir 4-*O*-metil- $\alpha$ -glukuronik asit içermektedir. Ayrıca, ksilanın yapısında C-2 ve/veya C-3 pozisyonunda yüksek miktarda L-arabinozil ve az miktarda *O*-asetil yan grupları da bulunmaktadır.

Arabinoksilan molekülünün kompozisyonu ve ksilan bileşenlerinin nispi oranları türden türe, dokudan dokuya değişmektedir (Coughlan ve Hazlewood, 1993).

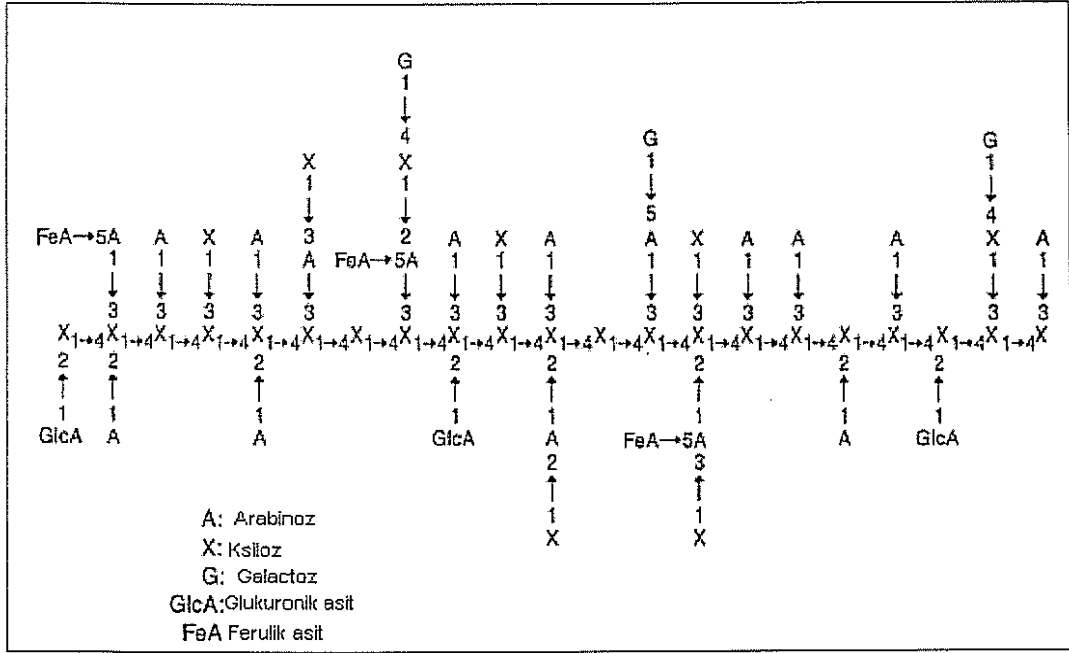
Ksilan, selüloz gibi değildir, yapısal polimer gruplarından oluşur. Ksilanlar, alkali-çözünür, doğrusal veya dallanmış polisakkaritler şeklindedir. İzole edilen ksilanlar, tipik olarak çok yaygın şekilde heteropolisakkaritlerdir ve  $\beta$ -1,4 D-ksilopiranozil rezidülerinden oluşur (Bakır, 2005).

## 1.5. Ksilanazlar

Ksilanın kompleks yapısı nedeniyle molekülün tamamen hidrolizi için farklı enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Ksilanı hidroliz eden enzimlerin tamamına ksilanolitik enzim sistemi adı verilir. Yenilenebilen bu kaynaktan bugün gıda ve yem sanayi çeşitli şekillerde yararlanırken (Biely, 1985; Berovic ve Ostroversnik, 1997), kağıt sanayi (Techapun vd., 2003; Haarhoff vd., 1999) ve ayrıca atık arıtım ve değerlendirme proseslerinde de (Biely, 1985; Carmona vd., 1997; Duarte ve Ferreira, 1994) ksilanaza yönelik uygulamalar bulunmaktadır. Ksilanın tüm bu sanayilerdeki işleme ve değerlendirme basamaklarında enzimatik hidrolizi ön plana çıkmaktadır. Ksilanazlar fungus ve bakterilerde yaygın şekilde bulunmaktadır (Kulkarni vd., 1999; Sunna ve Antranikian 1997). Bazıları nötral veya asidik pH'da aktif ve optimum olarak aktif olduğu sıcaklık ise 45 °C'nin altındadır. Endüstriyel ihtiyaçları gidermek için, daha yüksek sıcaklıklarda ve pH'larda aktif olan ksilanazlara ilgi büyüktür (Beg vd., 2001; Subramaniyan ve Prema, 2002), çünkü bu sıcaklık ve pH'larda pahalı değişikliklere gerek kalmadan kağıt endüstrisinde kullanılabilir. Son zamanlarda, termofil ve mezofillerden termal kararlı ksilanazların endüstriyel uygulamalarına ve alkali özellikte ksilanazlara büyük bir ilgi vardır. Termal kararlı ksilanazlar bazı avantajlara haiz olmalarına rağmen, hücre tarafından düşük oranlarda üretilmeleri bir dezavantaj olarak görülmektedir. Gelişen protein mühendisliği uygulamaları ile tüm bu dezavantajlar ortadan kaldırılabilecektir. Ksilanın enzimatik hidrolizinde yer alan başlıca enzim ise  $\beta$ -1,4 bağları ile bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşan iskeleti hidrolizleyen endo-1,4- $\beta$ -ksilanazlar (EC 3.2.1.8) dır (Singh vd., 1993).

Ksilanlar birbirine sıkıca bağlanmış yapıda değildir, ksilanı hidrolize eden çok miktarda enzim vardır. Sonuç olarak, ksilanazın spesifik aktivitesi kristalleşmiş selüloz gibi diğer polimerlerin hidrolazlarından daha geniştir. Ksilanların yıkımı için, endo 1,4- $\beta$ -D-ksilanaz,  $\beta$ -ksilobiaz,  $\beta$ -ksilosidaz ve yan grupların yıkılması için gereken enzimlerin bileşiminin gerektiği belirtilmektedir (Orpin ve Letcher, 1979). Bütün bu enzimler ksilanın şeker bileşenlerine dönüşümünde kooperatif şekilde rol oynar.

Hidrolizde en etkin olan enzim endo- $\beta$ -1,4-ksilanazdır ve ksilan ana iskeletindeki  $\beta$ -1,4 bağı kırarak ksilooligosakkaritleri üretir. Bu oligosakkaritler de, daha sonraki hidroliz sürecinde  $\beta$ -1,4-ksilosidaz enzimi ile D-ksiloza dönüştürülür.



Şekil 1. Mısır kabuğuna ait heteroksilan yapısı (Saha, 2000)

Ksılanın hidroliz ürünleri, küçük moleküler ağırlıktaki ksiloz, ksilobiyoz, ksilotrioz ve diğer oligosakkaritlerdir. Bu moleküller kolaylıkla mikrobiyal hücrelere girer, karbon ve enerji kaynağı olarak rol oynayarak büyümeyi devam ettirir. Örneğin, küçük pentoz molekülü olan ksiloz, bakteriyel ve fungal hücrelere kolaylıkla girebilir. Ayrıca, ksilanazlar da yapmış oldukları hidrolizlemenin moduna göre endo ve ekzo-ksilanazlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Endoksilanazlar ksılan omurgasını rastgele yerlerden kırarak ksiloz ve değişik uzunluklardaki ksilooligosakkaritleri oluştururken, ekzoksilanazlar ise kırma reaksiyonları sonucunda sadece tek tip bir (ksiloz veya ksilooligosakkarit) ürün oluştururlar (Kubata vd., 1995).

Kırılacak olan bağlar, substratın uzunluğuyla, dallanma derecesiyle, asıl bileşiminde bulunan atomun yerini alan başka atomun varlığıyla ve hidrolazların yapılarıyla belirlenir. Farklı spesifikliklere sahip enzimler, ksılan gibi kimyasal ve yapısal olarak heterojen şekilde substratların bozulmasında rol oynar.

Bu enzimlerin kullanılmasında ilk olarak, ksiloz ve ksilobiyoz oluşturan ksilanazlar yer alır. İkincisi ise, kendiliğinden ve uzun zincirlerde L-arabinoz üreten başlangıç dallanma noktasında bir L-arabinozu parçalayanlar ile parçalamayanlar arasında yapılıdır.

### 1.5.1. Endo $\beta$ -1,4-ksilanaz

Endoksilanaz enzimi, ksilan omurgasını rastgele hidrolize ederek depolimerizasyonu sağlar. Endoksilanazların genel olarak bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmalar tarafından üretildikleri bulunmuştur. Bununla birlikte, bitkisel kökenli endoksilanazların da bulunduğu ve bazı meyvelerin aşırı olgunlaşma dönemi sonunda, çekirdeklerin çimlenmesi sırasında üretildikleri saptanmıştır. Su yumuşakçaları dahil, bazı gelişmiş hayvanlarda da ksilan üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir. Endoksilanaz, ksilooligosakkarit ve ksilozların üretilmesi için ksilanın  $\beta$ -1,4-glikozidik bağlarını rastgele hidrolize edebilir. Böylelikle, endoksilanazlar doğada enerji ve materyallerin dönüşmesinde önemli bir rol oynar.

Ksiloz ve ksilooligosakkaritler içine polimerik maddenin dönüşümde endoksilanaz depolimerizasyon etkeni sonucudur.

$\beta$ -Ksilosidaz (EC 3.2.1.37): kısa oligosakkaritleri parçalar.  $\beta$ -ksilosidazlar endoksilanazların inhibisyonuna neden olacak son ürünleri parçalayarak ksilanın hidrolizleme düzeyini artırır.

Ksilanda bulunan yan gruplar,  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidaz,  $\alpha$ -D-glukuronidaz, galaktozidaz ve asetil ksilan esterazlar tarafından molekülden kopartılarak serbest kalırlar (Şekil 2).

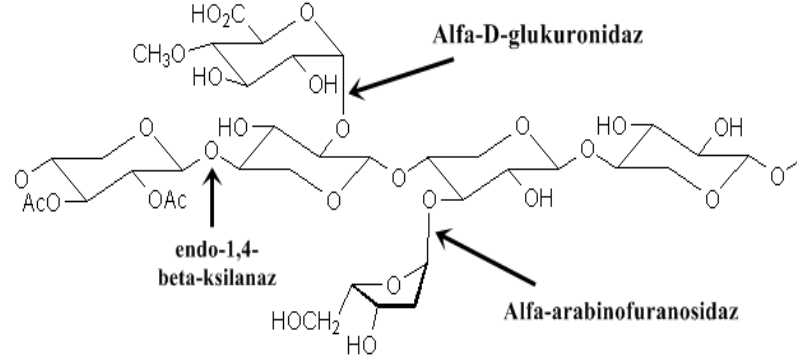
Ekzo 1,4- $\beta$ -D-Ksilosidaz enzimi (EC 3.2.1.37) indirgen olmayan uçtan D-ksiloz birimlerini başarılı bir şekilde kopartarak, 1,4- $\beta$ -D-ksilooligosakkarit hidrolizini katalizler. Ksilanın hidrolizi sırasında ksilozun koparılmasını sağlayan endoksilanazların,  $\beta$ -ksilosidaz tarafından kolayca hidrolize edilebilen ksilobiyoza karşı aktiviteleri yoktur.

$\alpha$ -Arabinofuranosidazlar (EC 3.2.1.55) arabinanların, arabinoksilanların ve arabinogalaktanların indirgenmeyen  $\alpha$ -L arabinofuranozil ucunu hidrolize ederler.

Ksilan hidrolizinde görevli enzimler arasında da sinerjik etkiden söz etmek mümkündür. Hidroliz sırasında, 1,4- $\beta$ -D-ksilan omurgasında etkin olan (endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz) ve yan zincirleri koparan enzimlerin aktif olduğu gözlemlenir. Asetil ksilan esteraz ve endoksilanaz arasındaki sinerjik etki asetil ksilanların degradasyonunda etkindir.

Asetik asitin asetil ksilan esterazla ayrılması, ksilan omurgasını endoksilanaz etkisi için uygun duruma getirecektir. Böylece daha hızlı bir hidroliz meydana gelir. Benzer şekilde,  $\alpha$ -arabinofuranosidazların endoksilanazlara eklenmesi arabinoksilanların

şekerleştirilmesini artırmaktadır.  $\alpha$ -D-Glukuronidazlar (EC 3.2.1.1) ksiloz ve D-glukuronik asit veya 4-O-metileter arasındaki  $\alpha$ -1,2-glikozidik bağlarının hidrolizinde görev yapan enzimlerdir. Ksilanın enzimatik hidrolizinde  $\alpha$ -1,2 bağları, hidrolizi yavaşlatan bölgelerdir ve  $\alpha$ -glukuronidazlar ise farklı substrat ile çalışırlar.



Şekil 2. Ksilanolitik Enzim Sistemi (Anonymous, 2009e)

Ekzo  $\beta$ -1,4-D-ksilosidaz enzimi ise, indirgen olmayan uçtan D-ksiloz birimlerini kopartarak  $\beta$ -1,4-D ksilooligosakkarit hidrolizini katalizler. Ksilanın hidrolizi sırasında ksilozun koparılmasını sağlayan endoksilanazların,  $\beta$ -ksilosidaz tarafından kolayca hidrolize edilebilen ksilobiyoza karşı aktiviteleri yoktur.  $\alpha$ -Arabinofuranosidazlar, arabinanların, arabinoksilanların ve arabinogalaktanların indirgenmeyen  $\alpha$ -L arabinofuranosil ucunu hidrolize ederler.

### 1.5.2. Ksilanazların Sınıflandırılması

Ksilanın heterojenitesi, karmaşıklığı, farklı ksilanazların primer dizileri, kıvrımlar ve değişen özellikleri ksilanazların çeşitliliğiyle sonuçlandı. Dolayısıyla yalnızca substrat özgüllüğünden yararlanılarak enzimlerin sınıflandırılması sınırlamalara yol açmıştır.

Wong vd., (1988) ksilanaz enzimlerini fizikokimyasal özelliklerine göre sınıflandırmış; 30 kDa'dan düşük moleküler ağırlığa, bazik  $pI$ 'a sahip ksilanaz ve 30 kDa'dan yüksek moleküler ağırlığa, asidik  $pI$ 'a sahip ksilanazlar şeklinde iki gruba ayırmışlardır. Ancak, bu model sınıflandırma (Sunna ve Antranikian, 1997; Matte ve Forsberg, 1992) için çeşitli istisnalar saptanmış ve hali hazırda tespit edilen ksilanazların



yaklaşık %30'u ile kısmi mantar ksilanazlarının bu sisteme göre sınıflandırılmasının gerçekleştirilemeyeceği açıklamışlardır.

Daha sonra, daha eksiksiz bir sınıflandırma sistemi tanıtıldı, bu sınıflandırma sadece ksilanazlar için değil, ancak (EC 3.2.1.x) genel olarak glikosidazlarda ve artık standart haline gelmiş bu enzimlerin sınıflandırılması anlamına gelmektedir. Bu sistem, katalitik etkilerin primer yapısını karşılaştırılmasına ve ilişkili dizilerin familyalarında bulunan grup enzimlerine dayanır. İlk sınıflandırma 6 tane familya içinde (A-F) ksilanazları ve selülazları, 1999 yılında 77 tane familya (1-77) ile güncellendi (Henrissat ve Coutinho, 2001). Yeni glikosidaz dizileri tanımlanarak bu gruplar büyümeye devam etmektedir. Daha sonra, 96 tane glikohidrolaz familyası tespit edilmiştir (Coutinho ve Henrissat, 1999). Bu enzimin yapısı ve moleküler mekanizması enzimin birincil yapısı ile ilişkilidir, bu sınıflandırma sistemi hem yapısal hem de mekanik özellikleri yansıtır. Belirli bir familya içinde, enzimler benzer üç boyutlu yapılara ve benzer moleküler mekanizmalara ve aynı zamanda da küçük, çözünebilir, sentetik substratlarda benzer bir özgülüğü olabileceği öne sürülmüştür (Claeysens ve Henrissat, 1992). Ksilanazların dikkatli karşılaştırılması sonucu bu enzimlerin özellikle iki ana gruba ayrıldıkları görülmüştür. İlk grup, yüksek moleküler ağırlık ve düşük  $pI$  noktasına sahip enzimlerden oluşurken, ikinci grupta düşük moleküler ağırlık ve yüksek  $pI$  noktasına sahip enzimler bulunmaktadır. Asidik ve yüksek moleküler ağırlığa sahip ksilanazların ( $MA > 30$  kDa), daha önce F familyası olarak tanımlanan glikosil hidrolaz familyası 10'a ait oldukları tespit edilmiştir. Bazik ve düşük moleküler ağırlığa sahip ksilanazlar ise, daha önce G familyası diye tanımlanan glikosil hidrolaz familyası 11'e ait oldukları bulunmuştur (Biely vd., 1997).

İlginç olarak, uygun veritabanlarının taranmasında enzim sınıflandırma numarası EC 3.2.1.8 kullanılarak ksilanaz enzim aktiviteleri 5., 7., 8., 16., 26., 43., 52. ve 62. familyalarda da bulunmuştur. Yalnızca 5., 7., 8., 10., 11. ve 43. familyalarında ki sekans sınıflandırılması endo-1,4- $\beta$ - ksilanaz aktivitesiyle çeşitli katalitik domainleri içerir. 16., 52. ve 62. familyaları için diziler de rapor edilmiştir, aslında iki katalitik etki içeren iki fonksiyonel enzim ikincil glikosidaz domaini gibi 10 veya 11. ksilanaz domainlerini içerir. Örneğin, *Ruminococcus flavefaciens* bakterisinde enzim amino-terminal ucunda 11. familyaya ait ksilanazı ve karboksi terminal ucunda 16. familyaya ait likenazı içerir. Böylece hem 11. hem de 16. familya içerisinde sınıflandırılmıştır. Ayrıca, 26. familya da bulunan enzimlerin sınıflandırılması endo-1,4- $\beta$ -ksilanaz olarak değildir. Sonuçta, mevcut

görünümlü ksilanaz aktivitesi ile enzimler sadece 10. ve 11. familya içerisinde sınırlandırılması doğru değildir ve 5., 7., 8. ve 43. familyaları kapsayacak şekilde dağılmışlardır (Collins vd., 2005).

En kritik enzimatik komponentler endo-ksilanazlardır (EC 3.2.1.8). Bu enzimler ana ksilan zincirinin iç  $\beta$ -1,4 bağlarını hidrolize eder (Saha ve Bothast, 1999). Katalitik domainin sekans analizlerine bağlı olarak, endoksilanazlar glikosil hidrolaz (GH) familyalarına göre kategorize edilmiştir (Henrissat ve Bairoch, 1996). GH familyasının üyeleri ortak yapısal motifleri ve katalitik mekanizmaları paylaşır. Umumi domainde, ksilanaz gen sekanslarının çoğu GH10 veya GH11 familya üyelerine göre kategorize edilmiştir (Collins vd., 2005). GH11 ksilanazlar genellikle GH10 enzimlerinden daha düşük moleküler ağırlıkta ve daha yüksek spesifik aktiviteye sahiptir. Fakat, GH10 enzimleri yüksek derecede dallanmış olan substratları daha iyi hidrolize eder. İki familyaya ilaveten, az sayıdaki ksilanazlar ise GH 5., 7., 8., 43. familyalarda bulunmuştur (Collins vd., 2005).

### 1.5.2.1. Ekstremofilik Ksilanazlar

Ekstremofiller, dünya yüzeyinin 3 km altında, nükleer reaktörlerde, hidrotermal ventlerde, asitli kaynaklarda, tuz kristallerinde, yüksek ağır metal içeren bölgelerde, kutup buzları ve göllerinde, basınçlı ortamlarda ve anaerobik koşullarda gelişebilen mikroorganizma gruplarına verilen isimdir. Bu aşırı şartlar; sıcaklık, radyasyon, basınç gibi fiziksel şekilde olabildiği gibi; tuzluluk, kuruluk, pH, oksijen durumu, redoks potansiyeli, metaller ve gazlar gibi jeokimyasal biçimlerde de olabilmektedir (Subramaniyan, 2002; Sunna, 1997).

Ksilanaz çalışmalarının büyük bir çoğunluğu mantar veya bakteriyel orjinlidir, çoğu durumlarda mezofilik sıcaklıklarda ve nötral (bakteriyel ksilanazlar) asidik (fungal ksilanazlar) pH'larda aktiftir. Yine de ksilanazlar, sadece sabit değil, yüksek sıcaklıklarda ve pH'larda da aktiftir (Subramaniyan ve Prema, 2000; Sunna ve Antranikian, 1997). Ksilanaz aktivitesi, 5-105 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda (Kulkarni vd., 1997; Collins vd., 2002; Collins vd., 2003), pH 2,0-11,0'e kadar (Kulkarni vd., 1999; Fushinobu vd., 1998; Kimura, vd., 2000) ve %30 gibi NaCl konsantrasyonları değerlerinde bile olduğu bildirilmiştir (Waino ve Ingvorsen, 2003; Wejse vd., 2003). Bunlar antroposentrik açıdan

aşırı olduğu söylenen kolonize ortamlara sahip mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir ve bu organizmalar aşırı habitatlara adapte olmuş olan bu enzimleri üretirler.

### 1.5.2.2. Soğuğa Adapte Olmuş Ksilanazlar

Ekstremofilik ksilanazlar, termofiller, alkalifiller ve asidofiller de en kapsamlı incelemişken soğuğa adapte olmuş ksilanazlar ise çok daha az araştırılmıştır. Çalışmaların çoğu, yüksek sıcaklığa tolerans gösterebilen termofilik enzimleri geliştirmeğe yönelmiştir enzimlerinde tercih edildiği durumlar da vardır (Gerday vd., 2000; Collins vd., 2005). Örnek olarak, daha soğuk reaksiyon şartlarında ısı-değişken ürünlerin özellikleri korunabilir. Alternatif olarak, enzimatik parçalamanın miktarı soğuğa karşı aktif enzimlerin ısı denatürasyonu aracılığıyla kolaylıkla kontrol edilebilirdi. Daha soğuk reaksiyon şartlarının kullanımı aynı zamanda enerji korunumuna yol açabilir (Collins vd., 2005).

### 1.5.3. Ksilanazın Yapısı ve Ksilanolitik Enzimlerin Aktivitesi Arasındaki İlişki

Ksilanazlar, farklı ksilan yapılarına karşı farklı aktiviteler gösterir. Ksilanın hidroliz oranı, ksilan zincirinin uzunluğu ve dallanma derecesine bağlıdır. *Aureobasidium pullulans* bakterisinin ürettiği olduğu 11. familyaya ait ksilanaz, uzun ksilan zincirlerinin hidrolizinde (19 ksiloz ünitesinden fazla) daha etkilidir. Enzim aktivitesi, zincirde bulunan dallanmalardan etkilenmemelidir (Liab vd., 2000). Fakat, bazı ksilanazların 4 veya 5 ksiloz ünitesini içine alabilen bir substrat bağlanma bölgesine sahip olduğu ve yapıda yan grup olarak bulunan arabinozil ünitelerinin de ksilanazların ksilan iskeletine bağlanmasını engelleyebileceği düşünülmektedir. Örnek olarak; *Polyporus tulipiferae* ait ksilanaz, etrafında birkaç arabinoz yan grubu bulunduran ksilan bölgelerini hidroliz edememektedir. *Polyporus tulipiferae*'ın tersine, *Butyrovibrio fibrisolvens* H17c ksilanaz aktivitesi, arabinoz yan ünitelerinden etkilenmemektedir ve enzim, ksilan iskeletini arabinoz ünitesinin olduğu bölgelerden de hidroliz edebilmektedir (Hespell ve Cotta, 1995).

## 1.6. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmalar

Ksilanaz üreten birçok ksilanolitik mantar (*Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp.) ve bakteri türleri (*Bacillus* spp.) tanımlanmıştır. Bakteriyel kaynaklı (Tablo 2) ksilanolitik enzimlerin kapsamlı biyokimyasal analizi yapılmış, bunlardan çok sayıda enzim saflaştırılarak karakterize edilmiştir.

*Thermomyces lanuginosus* (DSM 5826) (Schlacher vd., 1996), *Clostridium thermocellum* (DSM 1237) (Royer vd., 1989) ve aktinomiset *Thermomonaspora alba* ULJB1 (Blanco vd., 1997) tarafından üretilen termofilik ksilanazlar da bulunmaktadır.

Endüstriyel fermentasyonlarda kullanım yaygınlığı açısından en çok çalışılan bakteriyel ksilanaz üreticisi *Bacillaceae*'dir (Pham vd., 1998). *Bacillus* fermentasyonlarından yüksek miktarda ksilanaz üretimini sağlamak bu mikroorganizmanın endüstriyel uygulamalarda kullanımı açısından önemlidir. Samain ve arkadaşları (1997) yarı-kesikli *Bacillus* fermentasyonu sonucunda 1000 U/ml ksilanaz aktivitesi elde etmiştir. Bu da Eriksson ve arkadaşlarının *T. reesei*'den bulduğu 130 U/ml olan ksilanaz aktivitesinden oldukça fazladır.

*Bacillus* türlerinin avantajlarından birisi de, bunlardan elde edilen ksilanaz enzimlerinin optimal pH'larının bazik olması dolayısı ile kağıt sanayisinde kağıt hamurunun beyazlatılmasında kullanılmasıdır (Bakır, 2005).

Ksilanazı üreten mikroorganizmalar; *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium acetobutylicum*, *Streptomyces lividans*, *flavogriseus*, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*, *Trichidorma viridae*, *Pichia stipitis* bakterileri mezofilik büyüme ortamında ksilanaz üretmektedir (Gosalbes vd., 1991; Wong vd., 1988). Ayrıca, elde edilen yüksek ksilanaz verimi, *Bacillus* türünün endüstriyel uygulamalarda seçilmesinde önemli rol oynamaktadır (Pham vd., 1998). Yapılan çalışmalarda, *Bacillus* ksilanazlarının pH stabilitesinin bazik ortamlarda yüksek olduğu görülmüştür (Beg vd., 2001).

Tablo 2. *Bacillus* suşlarına ait ksilanazların fizikokimyasal özellikleri

Mikroorganizma	MA (kDa) (SDS-PAGE)	Optimum Sıcaklık	Optimum pH
<i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> (Bu çalışma)	47 kDa	75 °C	7,0
<i>Bacillus</i> sp. JB99 (Shrinivas vd., 2010)	20 kDa	70 °C	8,0
<i>Bacillus</i> sp. YJ6 (Yin vd., 2010)	19 kDa	50 °C	5,0
<i>Anoxybacillus</i> sp. E <sub>2</sub> (Wang vd., 2009)	38.8 kDa	65 °C	7,8
<i>Geobacillus</i> sp. MT-1 (Wu vd., 2006)	62 kDa	70 °C	7,0
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (Sharma vd., 2006)	(-)	80 °C	8,5
<i>Bacillus</i> sp. C-14 (Aygan, 2008)	61 kDa	50 °C	11,0
<i>Bacillus circulans</i> BL53 (Heck vd., 2006)	22-45 kDa	40-80 °C	5,0-8,0
<i>Bacillus subtilis</i> B10 (Huang vd., 2005)	(-)	50 °C	6,0
<i>Bacillus sphaericus</i> JS1 (Singh vd., 2004)	42 kDa	60 °C	8,0
<i>Bacillus</i> sp. BP-7 (Gallardo vd., 2003)	24 kDa	60 °C	6,0
<i>Bacillus</i> sp. KSM-N252 (Endo vd., 2001)	50 kDa	55 °C	10,0
<i>Bacillus</i> spp. 41M-1 (Nakamura vd., 1993)	36 kDa	50 °C	9,0

### 1.7. Ksilanaz Enziminin Moleküler Biyolojisi

*Bacillus* suşlarına ait birçok ksilanaz geni izolasyonu ve ekspresyonuna ait birçok çalışma bulunmaktadır. Ksilanazın özellikle kağıt endüstrisinde kullanımı (Wong vd., 1988) ksilanaz aktivitesi yüksek, selüloz üretimi olmayan üreticilerin bulunmasını gerektirir. Bunu sağlamak için en iyi strateji, izole edilen ksilanaz geninin selüloz üretmeyen bir başka taşıyıcı içine yerleştirilmesi ve ekspres edilmesidir. *Bacillus*'e ait ksilanaz geninin bu amaçla izole edilip *E. coli*'ye aktarılıp ekspres edilmesine ait ilk çalışma Bernier (1983) tarafından rapor edilmiştir. Daha sonra ksilan hidroliz enzimlerinin klonlama ve ekspres etme çalışmaları devam etmiştir (Pechan vd., 1990; La Grange vd., 1996).

### 1.8. Ksilanazların Endüstriyel Uygulama Alanları

Biyolojik katalizör olan enzimler hücre içerisinde üretilmelerine rağmen birçoğu hücre dışına salınarak aktivitelerine devam ederler. Enzimlerin bu özellikleri endüstriyel

uygulamalarda kullanılmalarının yolunu açmıştır. Enzimin aktivasyonu, sahip olduğu katalitik yapısından kaynaklanmakta olup reaksiyon esnasında enzim tüketilmeksizin gerçekleşir.

Mikrobiyal ksilanazlar, biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı birçok endüstriyel alanda büyük bir ilgi odağı olmuştur. Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkalın proteaz %25, diğer proteazlar %21, amilaz %18, Renin %10, Tripsin %3, Lipaz %3, diğer karbonhidrat enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) %10, analitik ve farmasötik enzimler %10 şeklinde bir dağılımla karşılaşılmaktadır (Rao vd., 1998).

Tarımsal bitki atıkları doğada kirliliğe sebep olmaktadır. Ksilanın doğada yaygınlığı, ksilanazların biyo-dönüştürme işleminde kullanımını ve bu atıkların yakıt, tek hücre proteini, ksiloz ve ksitol gibi yararlı ürünlere dönüştürülmesini gerektirir. Ksilanazların ekonomik önemi, yüksek birçok faydalı ürünün istenilen düzeyde üretimi için önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Beg vd., 2001). Bilindiği gibi ksilanazlar endüstrinin çeşitli alanlarında kullanım alanı olan enzimler olup aynı zamanda termofilik karakterli olanlarına ilgi ise gün geçtikçe artmaktadır.

Bakteriyel ksilanazların optimum pH'ı, fungal enzimlere göre daha yüksek olduğundan, bakteriyel ksilanazların bu endüstriyel işlemlerde kullanılması daha uygundur (Subramaniyan ve Prema, 2000).

Ksilan molekülünün hidrolizinde, ksilanaz, ksilosidaz ve yan gruplarının kırılmasında etkili yardımcı enzimler sinerjik olarak çalışırlar. Yardımcı enzimler dallanmaları ortadan kaldırarak, ana iskelette ksilanaz enzimi için yeni etki alanları oluştururlar (Sørensen vd., 2005). Ksilan hidrolizinde etkili enzimlerin, hemiselülozik biyokütlenin yakıt ve kimyasal türlere dönüştürülmesi, kağıt hamurunda ligninin uzaklaştırılması, meyve sularının berraklaştırılması, hayvan yemi sindiriminin ve besin değerinin artırılması, meyve suyu ve şarap aromasının artırılması, pentoz içeren disakkaritlerin sentezlenmesi gibi işlemlerde kullanılması, bu enzimleri endüstriyel olarak değerli kılmaktadır (Rahman vd., 2001; Makkonen vd., 2005; Wong vd., 1988; Gunata vd., 1990; Spagna vd., 1998; Remond vd., 2004).

Diğerlerinden farklı olarak, endoksilanazlar kraft hamurunun ağartılması, besinlerin pişirilmesi, hayvan besinlerinin hazırlanması ve diğerlerinde mümkün olan yararlılara sahiptir.

1. Kağıt ve kağıt hamuru işleniminde ksilanazların kullanımı; Ksilan molekülleri birbirine sıkıca bağlanmış yapıda değildir ve hidrolize edilmesinde çok miktarda hidrolitik enzimler elde edilebilir. Sonuç olarak, ksilanazın spesifik aktivitesi kristalleşmiş selüloz gibi diğer polimerlerin hidrolazlarından daha geniştir. Kağıt hamurunun üretim yönteminde ürün, artan lignin ve lignin bileşenleri karşısında kendi karakteristik kahverengi rengine sahiptir. Hamur renginin yoğunluğunu artan ligninin miktarı ve kimyasal durumu belirler. İmal edilen iyi kalitedeki kağıtların beyaz ve daha parlak renkte kağıt hamuruna sahip olabilmesi için lignin veya bileşenlerini meydana getiren ürünleri uzaklaştırarak kağıt hamurunu beyaz elde etmek mümkündür. Kağıt hamurunun biyolojik işlevsel açıdan beyazlatma yönteminde, lignini azaltan enzimlerden ziyade ksilanazın çok daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Bunun sebebi ise, lignin çoğunlukla hemiselüloza çapraz bağlanır ve hemiselüloz ligninden daha kolay ve hızlı şekilde depolimerize edilir. Hemiselülozun küçük miktardaki parçasının uzaklaştırılması bile polimerleşmesine yeterlidir ve muhtedil oksidantlar aracılığıyla artan ligninin uzaklaştırılması kolaylaşır (Subramaniyan vd., 2002).

Biyoteknolojik metodun prensibi, selülozu uzaklaştırmaksızın seçilen hemiselülozun taşınmasını sağlamaktır. Selülozun azaltılması, öylesine selüloz liflerine sabitce tesir eden ve bundan dolayı kağıt kalitesine tesir eden hamur yöntemi ile birleştirilmesi asıl problemdir. Hücre duvarlarından ksilanazın uzaklaştırılması, beyazlatma sürecinde enerji talebinin azaltılmasına yol açar. Bu nedenle, ksilanazı kullanan hamurun enzimatik işleyişi hem lif kalitesinin artırılmasını hemde fiyatını düşürmesini sağlayacağından daha iyi bir umuttur. Fakat, enzimatik ağartmanın başarısı kullanılan enzimin özelliklerine bağlıdır. Ksilanazları ekstra pH düzenleme basamağından kaçınmak için yüksek pH'da aktif olmalıdır, ksilanazın kağıt hamuruna yayılması için selülozun salınabilmesi gerekir. Bu yüzden, kağıt ve hamur endüstrisinde saflaştırmaya gerek kalmadan kullanılabilen, hiç selülaz üretimi olmadan düşük moleküler ağırlıkta, alkalın şartlarda aktif ksilanazları üst seviyelerde üreten yeni mikroorganizmaların bulunması önemlidir (Bakır, 2007).

Ksilanazların en ümit verici uygulamalarından biri olan kağıt hamurunun hazırlanmasında beyazlaştırma ajanı olarak klor kullanımının azaltılması ve kağıt hamurundan lignini ayırma özelliğidir. Enzim uygulaması kağıt hamurunun fibrilasyonunu ve suyun tutuşunu artırır, işlenmemiş kağıt hamurunda çırpma ya da dövme sayısını düşürür, hurda kağıt hamurunda bağları onarır, çözünen hamurdan ksilanın selektif

giderimini sağlar. Ksilanazlardan ayrıca odun hamurunda biobeyazlatma, sentetik ipek üretiminde ise hamurdan selüloz eldesinde faydalanılır (Viikari vd., 1986; Beg vd., 2001).

Biyolojik olarak beyazlatmada biyoteknolojik amacın hedefi, klor gibi ajanların azaltılmasıdır. Fikirler gere, ksilanaz ligninaz yerine tercih edilebilir. Bununla birlikte rapor edildiğine göre, fungusların çoğunda selüloz kontaminasyonun oluşabilirliği biyobeyazlatmada ksilanazın uygulanmasındaki asıl tehlikeyi gösterir. Yüksek miktarda ksilanazı üreten organizmalardan enzimlerin hazırlanması veya kağıt endüstrisinde minimum oranda yoğunluk kaybına yol açtığından selülaz olmayan aktivite uygulanabilir (Bakır, 2005).

2. Fırıncılıkta; Fırıncılıkta enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekmek yapımında kullanılan ve son yıllarda üzerinde önemle durulan enzimlerden birisi de ksilanazdır. Ksilanaz enzimi, hemiselüloz molekülüne etki ederek hamur reolojisini olumlu yönde etkiler. Hamurun işlenebilirlik özelliklerini geliştirerek daha iyi bir fırın ürününü ve dolayısıyla ile tekstürel özellikler bakımından daha iyi bir ekmek eldesine yardımcı eder. Ekmek yapımında hamurun işlenebilirliğini ve ürün hacmini geliştirerek, nihai ürünün kalitesini olumlu yönde etkilemektedir (Baillet vd., 2003; Guy vd., 2003; Maat vd., 1992; Qi vd., 2002). Ekmekçilikte ksilanazlar hamurun yoğrulma özelliklerini, ekmek içi yapısını ve son ürün hacmini artırarak, un kalitesindeki çeşitlilikten doğabilecek olan sorunların azaltılmasına yardımcı olurlar (Aehle, 2004). Martinez-Anaya ve Jimenez 1997 yılında ksilanaz içeren çeşitli ticari enzim preparatlarıyla yaptıkları ekmeklerin bayatlamalarında bir yavaşlama olduğunu belirlemişlerdir. Ancak Courtin (2001), ksilanaz kullanımının ekmek içi sertliğini azalttığını fakat ekmeğin bayatlaması üzerine bir etkisinin bulunmadığını belirtmiştir.

Biyoteknoloji alanında yaşanan hızlı gelişmeler ve ekmek yapımında enzimlere olan ilginin artması, spesifik yeni enzimlerin bu alanda kullanılmasını mümkün hale getirmektedir. Bu çerçevede, ksilanaz enzimlerinin de diğer enzimlerle birlikte kombinasyon halinde kullanılmalarının, özellikle hemiselüloz oranı yüksek tam tahıl ekmeklerinin yapımında gerek hamur gerekse ekmek özelliklerini olumlu yönde etkiledikleri kanıtlanmıştır. Ksilanazların etkinliği ekmek kalitesi artışında da ekmek hacmini artırarak gözlenmiştir. Bu durum ksilanazlarla birlikte amilazların kullanılmasıyla daha da artmıştır (Maat vd., 1992).



3. avdardan elde edilen yemler ile beslenen et tavuklarında yemden geri donüşüm oranı ve kilo kaybı intestinal viskozite ile ilişkilendirilmiştir. Et tavukçuluğunda çavdar temelli yemlere ksilanaz uygulamaları intestinal viskoziteyi düşürmüş ve böylece yemden etkin yararlanma, dolayısıyla kilo artışı sağlanmıştır.

4. Ksilan tarım ve gıda endüstrisi atıklarında bol miktarda bulunmaktadır. Ksilanaz uygulamaları ile bunlar ksiloza dönüştürülür (Rani ve Nand, 1996). Bitki hücrelerinde ise, ksilanaz uygulamaları firosterollerin yağ açılışını ve glikozilasyonunu indüklerler. Tütün süspansiyon hücrelerinin endoksilanazlarla muamele edilmesi, açılmış sterol glikozidlerinin seviyesinin 13 kat artmasına ve fitoaleksinlerin sentezini sağlamaktadır (Moreau ve ark, 1994).

5. Meyve ve sebzelerin sıvılaştırılması ve meyve sularının berraklaştırılması amacıyla pektinaz ve selüloz ile birlikte aynı anda kullanılır. Ayrıca kompostlamayı ve ruminantların beslenmesinde sindirimi artırmak amacıyla yem bitkilerinin ön işleminde kullanılmaktadır (Gilbert ve Hazlewood, 1993).

6. Alkil glikozitler yeni surfaktanlar için geleceği en parlak adaylardan biridir. D-glikoz ve yağ alkolü gibi monomerik şekerlerden üretilirler. Fakat polisakkarit kullanımı ile doğrudan glikozilasyonu endüstriyel üretim için daha uygundur. Çünkü polisakkaritlerin hidrolizine ve daha sonraki aşamalara gerek kalmaz. Bu yüzden bu işlemlerde ksilanaz kullanımı kolaylık arzeden bir fırsat sağlar.

7. Bazı ksilanazlar bitki hücrelerinden protoplast üretimi için hücre duvarının yumuşatılmasında da kullanılır. Mannanaz, ligninaz, ksilosidaz, glukanaaz, glukozidaz gibi diğer enzimlerle birlikte ksilanazlar, lignoselülozik materyallerden etanol ve ksilitol gibi biyolojik yakıt üretimi için kullanılabilir. Etanol üretiminde kullanılacak serbest şekerlerin üretimi amacıyla, karbonhidrat polimerlerinin depolimerizasyonunu takiben lignin, hemiselüloz ve selülozun ayrıştırılması ile delignifikasyon gerçekleştirilir. Sonuçta etanol üretimi için pentoz ve heksoz şekerlerinden oluşan karışım fermentasyon için kullanılır. Ksilanolitik enzim sistemlerinin pektinolitik enzim sistemleri ile birlikte önemli uygulamalarından biri de, jüt ve kenevir gibi lif bitkilerinin reçine benzeri maddelerden arındırılmasıdır (Beg vd., 2001).

8. Ksilanın yemlerde kısmi olarak hidrolizi rumen sindirimi esnasında selüloz enzimlerinin yemdeki selüloza ulaşımını kolaylaştırır. Ksilanın yemden tamamen

uzaklaştırılması bağırsak rahatsızlıklarına neden olacağından arzu edilmez (Wong vd., 1988).

9. Antimikrobiyal ajan veya antioksidant gibi farmakolojik aktif polisakkaritlerin üretilmesi amacıyla üretilmektedir.

Ksilanazların potansiyel uygulama alanları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Ksilanazların Potansiyel Uygulama Alanları (Collins vd., 2005)

ENDÜSTRİSİ	UYGULAMA ALANI	FONKSİYONU
Meyve ve sebze işleme süreçleri, demleme, şarap imalatı	Meyve ve sebze suyu, nektar ve pürele eldesi ile bitkisel yağ, şarap imalatı	Meyve suları viskozitesini azaltıcı etkisi yanında yumuşatma özelliği ile kaliteyi artırır
Fırıncılık	Hamur ve pastacılık ürünleri	Hamur elastikiyetini ve dayanıklılığını artırır
Hayvan besleme	Monogastrik (domuz ve kümes hayvanları) ve geviş getirenlerin yemleri	Nişasta ihtiva etmeyen polisakkaritlerin içeriğini azaltır, intestinal vizkoziteyi azaltarak hayvanın protein ve nişastadan maksimum ölçüde faydalanmasını sağlar
Kağıt ve kağıt hamuru üretimi	Kağıt hamurunun ağartılması	Kağıt imalatı esnasında klorin ve toksik disakkaritlerin kullanımlarının azaltılması
	Biyoleke yok edilmesi	Alkali kullanımının azaltılması ve biyoleke çıkarılması süreçlerinin kolaylaştırılması
Nişasta	Nişasta gluten ayırımı	Pasta hamuru viskozitesinin azaltılması ve gluten topaklanmasının artırılması
Tekstil	Keten, kendir, jüt ve rami işlenmesi	Enzimatik yüzey düzleştirimi
Biyodönüşüm	Tarımsal, evsel ve endüstriyel atıkların çevreye zararsızlaştırılması	Çöp arıtımı, fermente edilebilir ürünlerin üretimi, yenilenebilir bioetanol ve zararsız kimyasalların üretimi

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Materyal ve Kimyasallar

*BclI* (NEB), *HindIII* (Promega), *EcoRI* (Promega), *NotI* (TaKaRa), *SmaI* (GmbH), T4 DNA Ligaz (Promega), *Taq* DNA polimeraz (Fermentas), MagneHis<sup>TM</sup> Protein Saflaştırma Kiti (Promega), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), pGEM-T Easy Klonlama Vektörü (Promega A1360), Trypton (Merck V441613949), Yeast ekstrakt (Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, IPTG (Applichem A1008), Amfisilin (Applichem A0839), Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas K0513), EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pET20b(+) Ekspresyon Vektörü (Invitrogen), CaCl<sub>2</sub> (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem A10070005), Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Fosforik Asit (Merck 563.2500), BSA (NEB), Sodyum Asetat (Merck TA867065), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck A678671), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck 567300), Trizma Baz (Sigma T1503), Oat Spelt Xylan (Sigma), Nutrient Agar (MerckVL646350), SDS, Glisin (GERBU), Akrilamid (Sigma A8887), Bis-akrilamid (Promega), Bromo fenol mavisi (Gerbu 080702), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Merck), Karboksimetil Selüloz CM52 (Whatman), Laminarin (BioChemika), Lichenan (Sigma), Avicel (Fluka), Nişasta (Fluka), D (+) Ksiloz (Merck), D+Glukoz (Sigma), Etidyum Bromür (Sigma), 3'5 Dinitrosalisilik asit (Acros), Agaroz (Sigma), Potasyum Sodyum Tartarat Tetrahidrat (Merck), TEMED (Janssen Chimica), β-merkaptotanol (Merck 805740), Lizozim (Merck), Protein markır (Promega), CH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub> (Merck), Metanol, Fenol (Sigma), NaOH (JTBaker), Asetik asit (Riedel-dan Haen 27225), 1,4-β-D-ksilobioz (Megazyme), 1,4-β-D-ksilotrioz (Megazyme), 1,4-β-D-ksilotetroz (Megazyme), 1,4-β-D-ksilopentoz (Megazyme), Gliserol (Merck K40789992008), pNP-α-ksilopiranoz (Sigma), pNP-β-ksilopiranoz (MP∞BİOMEDİCALS), pNP-α-glukopiranoz (MP∞BİOMEDİCALS), pNP-β-galaktopiranoz (Sigma).

## 2.2. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> Suşunda Ksilanaz Aktivitesinin Tespiti

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşu 60 °C'de LB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra %1'lik ksilan içeren LB besiyerine inokülasyon yapılarak indüklemeye gerçekleştirildi. Büyüme 48 saat boyunca devam etti. Daha sonra, kültür santrifüjlenerek hücre dışı proteinleri elde edildi. Elde edilen kaba enzim ekstratı, ksilanaz aktivitesini belirlemek üzere kullanıldı. Çalışmada enzim aktivitesini tayin eden yöntem; ksilanazın substrat (ksilan) ile girdiği tepkime sonucu açığa çıkan indirgeyici şekerleri ölçen bir methodur. 500 µL'lik reaksiyon hacminde, %5'lik ksilan substratından (Oat Spelt Xylan) 200 µL, 200 mM'lık pH 6,5 fosfat tamponundan 125 µl, 175 µL enzim (süpernatant) konularak 20 dakika 70 °C'de bekletildi. Bir ksilanaz aktivitesi birimi (U), dakikada 1 µmol ksiloz ve eşdeğeri olan şekerleri 70 °C'lik reaksiyon sıcaklığında üreten enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. İndirgen şeker tayini ise, Dinitrosalisilik asit metodu (Miller, 1957) ile gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra örnekler, 0,5 mL Dinitrosalisilik asit (DNS) reaktifi ile karıştırılarak, 5 dakika kaynatıldı. Örnekler, spektrofotometrede 540 nm'de okunarak, örnekteki indirgen şeker miktarı, ksiloz standartı kullanılarak belirlendi.

## 2.3. Moleküler Çalışmalar

### 2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Agar ortamından alınan tek koloni, 3 mL hacimli LB ortamına aktararak *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> hücreleri bir gece boyunca 60 °C'de inkübe edildi ve ardından bu hücrelerden genomik DNA'lar Sambrook ve arkadaşlarının (1989) geliştirmiş oldukları yöntemle göre izole edildi. Hücreler çoğaldıktan sonra sıvı kültürler 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pelletlerin üzerine, 500 µL TE tamponu (10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 8,0) ilave edildi ve vortekslenerek çözüldü. Üzerine 10 µg lizozim ilave edilerek karıştırıldı ve 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 50 µL %10'luk SDS eklendi ve 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra her bir tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (pH 5,2) eklendi ve 65 °C'de 30 dakika bekletildi. Her 10 dakikada bir, tüpler alt üst edildi. Hemen sonrasında

üzerine 500 µL fenol: kloroform: izoamilalkol (25: 24: 1) ilave edildi, alt üst edilerek karıştırıldı ve 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst kısımdaki sıvı pipet yardımıyla yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve pellet kısımları atıldı. Bu tüplere 500 µL kloroform ilave edildi ve alt üst edilerek 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Bu kloroform aşaması 2 kez tekrarlandıktan sonra yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılan sıvının üzerine 1/10 hacim 3 M sodyum asetat ve 2 hacim %96’lık soğuk etil alkol ilave edildi ve -20 °C’de 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvı atıldı. Kalan pellet üzerine 500 µL %70’lik soğuk etanol ilave edildi ve 5 dakika 13.000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, üst faz döküldü ve kalan pellet 37 °C’de 10 dakika kurutuldu. Elde edilen DNA pelletleri, 100 µL TE tamponunda çözüldü. DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm’de yapılan ölçümler ile hesaplandı. DNA’lar %0,7 lik 0,5 µg/mL etidyum bromür içeren agaroz jelde yürütüldü ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak görüntülendi.

### 2.3.2. Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşunun ksilanlı besiyeri içerisinde ksilanaz aktivitesine sahip olduğu tespit edildikten sonra ksilanaz genini ortaya çıkarmak için Wu ve arkadaşlarının (2006) dizayn ettikleri XynF1 ve XynR1 dejenerat primer setlerinden yararlanılarak yapılan PCR yardımı ile genin bir bölümü elde edildi (Tablo 12). Primer setleri ve *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşunun genomik DNA’sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 4-5).

Tablo 4. Dejenerat primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşeni (50 µL)	
10X PCR tamponu	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
dNTP (1 mM)	16 µL
XynF1 (10 µM)	1 µL
XynR1 (10 µM)	1 µL
dH <sub>2</sub> O	21,75 µL
<i>Taq</i> polimeraz	0,25 µL
Kalıp DNA	1 µL

PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 0,7'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

Tablo 5. Dejenerat primerlerle PCR'ın çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	1	1
94 °C	1	36
43 °C	1.30	36
72 °C	2	36
72 °C	5	1
4 °C	15	1

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlarda gerçekleştirilerek klonlandı (Tablo 6). 16 °C'de bir gece boyunca bekletildi. Ertesi gün kompetent hücre hazırlandı ve transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

Tablo 6. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar

pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için tepkime bileşenleri (10 µL)	
10X T <sub>4</sub> DNA ligaz tamponu	5 µL
Kalıp DNA	3 µL
pGEM-T T Easy klonlama vektörü	1 µL (1:1)*
T <sub>4</sub> DNA ligaz (1 U)	1 µL

\* 1:1 sulandırılmış vektör

Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitler, plazmit izolasyon kiti (promega) ile firmanın öngördüğü şartlara göre izole edildi ve agaroz jelde yürütülerek rekombinant genler seçildi.

Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Güney Kore) belirlendi. Sekans sonuçları GenBank'taki (NCBI,

NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin bir parçası (669 bp) olduğu tespit edildi.

### 2.3.3. Ters (Inverse) PCR ile Genin Kalan Kısımlarının Bulunması ve Klonlanması

GenBank'daki karşılaştırmalar sonucunda tespit edilen 669 baz çiftlik gen parçasının diğer kısımlarının da yakalanması için ters PCR (inverse PCR) çalışması gerçekleştirildi. Bu nedenle, elde edilen bu gen parçasına ait baz dizilimi kullanılarak uç kısımlarından dış taraflara doğru olacak şekilde, 2 adet primer (GeoXylanF2 ve GeoXylanR2) dizayn edildi (Tablo 12). Daha sonra *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'e ait genomik DNA *Hind*III restriksiyon endonükleazıyla bir gece boyunca kesildi (Tablo 7). Her bir kesimin kendi üzerine yapışması için DNA ligaz enzimi ile (self-ligasyon) ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi ve DNA fragmentleri halkalaştırıldı.

Tablo 7. Genomik DNA'nın kesim şartları

Genomik DNA'nın kesim şartları (50 $\mu$ L)	
10X <i>Hind</i> III tamponu	5 $\mu$ L
Kalıp DNA	42 $\mu$ L
<i>Hind</i> III	3 $\mu$ L

Self ligasyon reaksiyonu, 2,5  $\mu$ g kesilmiş DNA, 40  $\mu$ L 10X tampon, 1 U T4 DNA ligaz enzimi içerecek şekilde 400  $\mu$ L son hacimde 16 °C'de bir gece boyunca gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası DNA'lar etanol çöktürmesi ile çöktürülerek 20  $\mu$ L TE tamponu içerisinde çözüldükten sonra PCR reaksiyonlarında kullanıldı.

Dizayn edilen GeoXylanF2 ve GeoXylanR2 (Tablo 12) primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu 200  $\mu$ L'lik PCR tüpleri içerisinde, 50  $\mu$ L'lik son hacimde gerçekleştirildi (Tablo 8-9).

Tablo 8. PCR için reaksiyon şartları

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşeni (50 µL)	
10X PCR tamponu	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µL
dNTP (1 mM)	16 µL
GeoXylanF2 (10 µM)	1 µL
GeoXylanR2 (10 µM)	1 µL
dH <sub>2</sub> O	21,75 µL
<i>Taq</i> polimeraz	0,25 µL
Kalıp DNA	1 µL

Tablo 9. PCR cihazı çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	1	1
94 °C	0.5	36
55 °C	1	36
72 °C	2	36
72 °C	4	1
4 °C	15	1

Sonuçlar % 0,7'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek sonuçlar görüntülendi. Elde edilen parçalar, baz dizilimini belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne daha önce belirtilen şartlarda klonlandı ve sekans ettirildi. Sekans sonucuna göre yapılan analiz sonucu sadece baş kısmının tamamlandığı tespit edildi. Bunun üzerine tekrar ters PCR için GeoXylanF2 ve GeoXylanR2 primerleri kullanılması maksadıyla önce genomik DNA aynı şartlar altında *BclI* enzimi ile kesilerek tekrar aynı yöntem uygulandı ve aynı şartlar altında PCR atıldı (Tablo 8-9). Oluşan PCR ürünü pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanarak sekans ettirildi. Sonuç analiz edilerek *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'e ait endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz enzim geninin tamamı elde edilmiş oldu.



### 2.3.4. Endo $\beta$ -1,4-ksilanaz Geninin pET20b(+) Vektörüne Klonlanması, Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Yapılan ters PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin bir *E. coli* ekspresyon vektörüne (pET20b(+)) klonlanması için *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'e ait endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz enzim geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan ve pET20b(+) ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği özel ekspresyon primerleri (EndoXyzF ve EndoXyzR) dizayn edildi (Tablo 12), PCR işlemi gerçekleştirildi (Tablo 10-11).

Tablo 10. Ekspresyon primerleriyle PCR için reaksiyon şartları

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR)'nin bileşenleri (50 $\mu$ L)	
10X PCR tamponu	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)	4 $\mu$ L
dNTP (1 mM)	16 $\mu$ L
EndoXyzF (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
EndoXyzR (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	21,75 $\mu$ L
Taq polimeraz	0,25 $\mu$ L
Kalıp DNA	1 $\mu$ L

Tablo 11. Ekspresyon primerleriyle PCR cihazı için çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	2	1
94 °C	1	36
59 °C	1	36
72 °C	1.30	36
72 °C	5	1
4 °C	15	1

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'e ait genomik DNA ve dizayn edilen primerler kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR sonucu elde edilen DNA fragmeti *NotI* ve *SmaI* restriksiyon

ezimleriyle kesildi. pET20b(+) vektörü de *NotI* ve *EcoRV* restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim ürünleri %0,7'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak fotoğraflandı.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve PCR ürünü DNA ligaz yardımıyla birbirine yapıştırıldı ve elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM 101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki plazmitlerin incelenmesiyle ilgilenilen geni içeren klon bulundu. Elde edilen doğru klonlu plazmit *E. coli* BL21 DE3 Lys hücresine transforme edilerek enzimin ekspresyonu gerçekleştirildi. Proteinin ekspresyonu için endoksilanaz geni klonlanmış *E. coli* BL21 hücreleri, 1 mg/mL ampisilin içeren LB besiyerinde 37 °C'de bir gece büyütüldü ve gece kültüründen optik dansitesi 0,1 (600 nm) olacak şekilde yeni ampisilinli (1 mg/mL) besiyerine hücreler aşılandı. Kültür, yaklaşık olarak, O.D. 0,6'ya ulaştığında 1 mM IPTG ile indüklenerek 20 saat boyunca indüklenmiş kültürün 37 °C'de büyümesi gerçekleştirildi. Hücreler, 13.000 rpm'de çöktürülerek His Taq takılan hücre dışı endoksilanaz proteini izole edildi. Proteine takılan His Taq'dan yararlanılarak protein MagneHis™ Protein Saflaştırma Sistem (Promega) kiti kullanılarak üretici firmanın öngördüğü şekilde saflaştırıldı ve biyokimyasal deneylerde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

Tablo 12. Klonlama sırasında kullanılan primerlerin listesi (W=A/T, Y=C/T, R=A/C)

Primerlerin ismi	Kullanılan primerler
XynF1	5'- CAY ACR YTG GTT TGG CA -3'
XynR1	5'- WCC CCA RAA YGT RAC -3'
GeoXylanF2	5'- CAA GCG GCT CGC TAT GAT CG -3'
GeoXylanR2	5'- ATT GCG GTA CTT GGC TAT GCC -3'
EndoXyzF	5'- CCC GGG AAA ACG GAA CCA TCA T -3'
EndoXyzR	5'- GCG GCC GCC TTA TGA TCG ATA ATG G -3'

## 2.4. Biyokimyasal Çalışmalar

### 2.4.1. Protein Konsantrasyon Tayini

Enzim örneklerinin protein konsantrasyonu Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. Bu metotta orijinali kırmızı olan Brilliant Blue G-250

boyasının proteinlerine bağlandığında maviye dönüşmesi esas alınmaktadır. Alınan 0,5 mL enzim örneğinin üzerine 1,0 mL Bradford solüsyonu eklenip karıştırıldıktan sonra, örneğin optik yoğunluğu (OD) 595 nm’de okunur ve protein standart grafiği kullanılarak protein konsantrasyonu hesaplandı. Protein standardı hazırlanmasında 0,04 mg protein/ml ihtiva eden Bovine Serum Albumin (BSA) solüsyonu kullanılmıştır. 100 mL boya çözeltisi hazırlamak için 10 mg Commasie Brilliant Blue G-250, 5 mL %95’lik etanol içerisinde iyice çözülerek üzerine 10 mL %85’lik fosforik asit ilave edildi ve 100 mL’ye saf su ile tamamlandı. Hazırlanan çözelti filtre kağıdı ile süzülerek temizlendi.

Hazırlanan kalibrasyon eğrisinde standart olarak bovin serum albumin (BSA) kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi için; 2, 4, 6, 10, 15, 20, 40, 60, 80 µg BSA içeren çözeltiler 0,15 M’lık NaCl ile 100 µL’ye tamamlandı. Ardından üzerine 5 ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan boya çözeltisinden ilave edildi ve vorteksenerek 15 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Örnekler için BSA yerine 10 µL enzim solüsyonu kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi. Süre sonunda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm’de ölçümler yapıldı ve protein miktarı µg/µl cinsinden hesaplandı.

#### **2.4.2. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi**

Reaksiyonlarda kullanılacak enzim miktarı, yapılan ön çalışmalar sonucunda, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 12,5 ve 15 µg protein içeren bir dizi reaksiyon serisi sonucunda belirlendi. Reaksiyonlar yukarıda belirtilen şartlarda gerçekleştirildi. Oluşturulan protein miktarı-aktivite grafiği yardımı ile daha sonraki çalışmalarda (optimum pH, optimum sıcaklık v.s) kullanılacak olan enzim miktarı belirlendi.

#### **2.4.3. Optimum Sıcaklık**

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, %5’lik substrat konsantrasyonunda (pH 6,5) 3,0 µg saf protein, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85 ve 90 °C’ye kadar ayarlanmış su banyolarında gerçekleştirilen bir seri reaksiyonlar ile belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

#### 2.4.4. Optimum pH

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz aktivitesine pH'nın etkisi, 200 mM'lık sodyum-asetat tamponu pH 4,0–5,5, 200 mM'lık fosfat tamponu pH 6,0-7,5, 200 mM'lık Tris-HCl tamponu pH 8,0–8,5, 200 mM'lık glisin tamponunda pH 9,0-12,5 kullanılarak 75 °C'de 20 dakikada gerçekleştirilen reaksiyonlarla belirlendi. Gözlenen optimum pH aktivite değeri daha sonra yapılacak olan pH ve ısıl kararlılığı, inhibitör ve aktivatör maddelerin etkisi ve kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanılmıştır.

#### 2.4.5. Enzim Kinetiği

Oat spelt xylan hidrolizi başlangıç reaksiyon hızı 0,25-4 mg ksilan/mL konsantrasyonu aralığında belirlenmiştir. Başlangıç reaksiyon hızına karşı substrat konsantrasyonu eğrisi çizilerek enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uygunluğu araştırılmıştır. Ayrıca enzimin kinetik parametreleri de doğrusal-olmayan regresyon analizi ile belirlenmiştir.

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin kinetik verileri, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen, 0,1 ve 100 mM arasındaki substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlendi. Endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz aktivitesi, 2,5  $\mu$ g saf protein içeren enzim solusyonu ile 75 °C'de, pH'sı 7,0 olan 200 mM fosfat tamponu içerisinde 20 dakikalık reaksiyon süresi sonunda reaksiyon soğuk 0,5 mL DNS ile 5 dakika kaynar suda kaynatıldıktan sonra 540 nm'de spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi. Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{maks}$ ) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk eğrisinde x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi. Michaelis-Menten grafiği çizilerek, elde edilen 12,5 mM substrat konsantrasyonu daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi.

#### 2.4.6. Isıl Kararlılığı

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin 60-90 °C arasında göstermiş olduğu ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla enzim 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 °C sıcaklıklarında inkübe edildi. İnkübasyon sırasında belli zaman aralıklarında her bir sıcaklıktaki tüpten örnekler alındı ve

bu türlerdeki aktivite standart metoda göre belirlendi. Ayrıca reaksiyon başında sıfırıncı dakikada tüplerden alınan örneklerin aktivitesi ile istenilen dakikada alınan örneklerdeki aktiviteler kıyaslarak bir sıcaklık stabilitesi grafiği çizildi.

#### **2.4.7. pH Kararlılığı**

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin pH kararlılığını belirlemek için enzim, pH'ı 5,0 olan 50 mM sodyum-asetat tamponunda; pH'sı 6,0 ve 7,0 olan 50 mM fosfat tamponlarında; pH'ı 8,0 olan Tris-HCl tamponunda ve pH'ı 9,0, 10,0 ve 11,0 olan glisin tamponlarında 55°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin bitiminde tüplerden örnekler alınarak standart aktivite testine göre ölçümler gerçekleştirildi. Aynı zamanda sıfırıncı dakikada alınan örneklerin aktiviteleri ile daha sonra belli sürelerde alınan örneklerin aktiviteleri karşılaştırılarak pH kararlılığı ortaya çıkarıldı.

#### **2.4.8. Metal İyonları ve Kimyasalların Etkisi**

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Ca<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Li<sup>1+</sup>, K<sup>1+</sup>, Mg<sup>2+</sup> metal iyonlarının klorür tuzları ile 10 mM EDTA, 10 mM β-merkaptolanol, % 2 (v/v) Tween 20, % 2 (v/v) Triton ve % 2 (v/v) DTT kimyasalları ile gerçekleştirildi. Enzim, ilave edilen 10 mM metal iyonlarıyla 20 dakikalık reaksiyon şartlarında, pH 7,0'de ve 75 °C'de inkübe edildi. Bekletilen enzimlerle Oat spelt xylan substrat olarak kullanılarak aktivite bakıldı. Enzimin metalsiz hali 100 kabul edilerek metal içeren enzimlerin % kalan aktivitesi hesaplandı.

#### **2.4.9. Substrat Spesifikliğinin Belirlenmesi**

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin substrat spesifikliğinin belirlenmesi amacıyla oat spelt xylan ve ksilooligosakkaritler olan ksilobioz, ksilotrioz, ksilotetroz ve ksilopentoz substratları kullanıldı. Reaksiyonlar oluşturulduktan sonra, reaksiyon tüpleri 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek her tüpten 3'er µL kontrol ve numuneler TLC silica jele (silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck) emdirilerek kurutuldu. Daha sonra yürütme solusyonu olarak etil

asetat, asetik asit ve su (2:1:1) olacak şekilde ayarlanarak yürütme gerçekleştirildi. Yürütme solusyonu, silika jelin en üst kısmına geldiğinde, silika jel yürütme solusyonundan çıkarılarak kurutuldu ve etanol içerisinde %5 sülfirik asit olacak şekilde hazırlanan solusyon silika jel üzerine püskürtülerek tekrar kurutuldu ve 121 °C de 10 dakika ısıtılarak spotların görünür hale gelmesi sağlandı. Bu deneyler sırasında enzim içermeyen sadece Oat Spelt Xylan ve ksilooligosakkaritleri içeren tüpler kontrol olarak kullanıldı ve TLC sonucu oluşan görüntü bütün bunlar göz önüne alınarak incelendi.

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimin bazı polisakkaritleri hidrolizleme özelliğinin ortaya çıkarılması amacıyla Karboksimetilselüloz (CMC), Nişasta, Avicel, Lichenan, Laminarin *p* NP- $\alpha$ -ksilopiranoz, *p* NP- $\beta$ -ksilopiranoz, *p* NP- $\alpha$ -glukopiranoz, *p* NP- $\beta$ -galaktopiranoz substratlarının hidrolizi dinitrosalisilik asit methoduyla gösterildi. %1'lik substratlardan hazırlanan maddelerden 650  $\mu$ L, 15  $\mu$ L saf enzim (4,0  $\mu$ g) 50 mM fosfat tamponu pH 7,0 içeren reaksiyon tüpünün son hacmi saf su ile 1 mL'ye tamamlandı. Oluşturulan reaksiyon tüpleri 16 saat süreyle 70 °C'de inkübe edildi. Her bir maddenin enzimsiz olarak hazırlanan kontrol tüpleri de reaksiyona sokuldu. Reaksiyon sonucunda tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

İlk olarak numunelerden 500  $\mu$ L alındı ve üzerine eşit hacimde dinitrosalisilik asit solüsyonu ilave edildi. Karışımlar kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi, soğutuldu ve tüplerdeki indirgen şekerler her tüp kendi körüne karşı olarak 540 nm dalda boyunda spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda belirlendi. Ayrıca herbir tüpten 3'er  $\mu$ L alınarak TLC silica jele (silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck) emdirildi ve hemen kurutuldu. Daha sonra yürütme solusyonu etil asetat, asetik asit ve su (2:1:1) olacak şekilde ayarlandı. Kurutulan silica jel yürütme solusyonuna dik bir şekilde yerleştirildi ve solusyonun TLC silika jelin sonuna kadar çıkması beklendi. Yürütme solusyonu silika jelin en üst kısmına geldiğinde silika jel yürütme solusyonundan çıkarıldı ve kurutuldu. Etanol içerisinde %5 sülfirik asit olacak şekilde hazırlanan püskürtme solusyonu silika jel üzerine püskürtülerek tekrar kurutuldu ve 121 °C de 10 dakika ısıtılarak şekerlerin oluşturduğu spotlar gözlemlendi.

#### 2.4.10. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

Protein jel elektrofrezleri Hoeffler SE 600 marka elektrofrezde %12'lik SDS-PAGE kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanazın

moleküler ağırlığı, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile proteinimizin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde birlikte yürütülmesi ile belirlendi. İşlem sırasında her bir kuyucuğa 35 µg protein yüklendi. Örneklerin üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; %4 SDS; %20 Gliserol; % 6 β-merkaptolanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 99 °C'de 2 dakika bekletilerek denatürasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra Maniatis ve arkadaşları (1982) tarafından tanımlanan %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jeline (SDS-PAGE) yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında jel Coomassie Brilliant Mavisi (%0,125 Coomassie Brilliant Mavisi R-250, %50 metanol, %10 asetik asit) boyası ile 2-4 saat boyandı ve Yıkama-I (%50 metanol, %10 asetik asit) solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra Yıkama-II (%7 asetik asit, %5 metanol) solüsyonuna aktarıldı ve bir bilgisayar tarayıcısı ile fotoğraflandı.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> Suşunda Ksilanaz Aktivitesinin Tespiti**

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşu 60 °C'de LB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra elde edilen kültürden aşılanan taze kültür ksilan ile indüklendikten sonra, besiyerinde 2 gün üremesi sonucu oluşan kültür çöktürülüp, hücre dışı protein elde edildi. Kaba enzim ekstraktı ksilanaz aktivitesini belirlemekte kullanıldı. Kaba enzim ekstraktı %5'lik substrat ile 50 mM fosfat tamponu altında 70 °C'de 20 dakika bekletildi. Çalışmada enzim aktivitesini tayin eden yöntem; ksilanazın substrat (ksilan) ile girdiği tepkime sonucu açığa çıkan indirgeyici şekerleri ölçen, Dinitrosalisilik asit metodu (Miller, 1957) ile gösterildi. İnkübasyondan sonra numune, 0,5 mL Dinitrosalisilik asit (DNS) reaktifi ile karıştırılarak, 5 dakika kaynatıldı. Örnek içindeki indirgen şeker miktarı 540 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yapılan bu çalışmalar sonucunda *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> bakterisinin ksilanaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

#### **3.2. Moleküler Çalışmalar**

##### **3.2.1. Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve Klonlanması**

###### **3.2.1.1. Dejenerat Primer Sentezi**

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> bakterisinin ksilanaz aktivitesi olduğu tespit edildikten sonra ksilanaz enzim genini ortaya çıkarmak için Wu vd., (2006) tarafından dizayn edilen XynF1 ve XynR1 degenerat primerleri sentezlettilererek reaksiyonlarda kullanıldı (Tablo 12).

###### **3.2.1.2. PCR Reaksiyonu ile Ksilanaz Gen Parçasının Çoğaltılması ve Klonlanması**

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> bakterisine ait ksilanaz genini elde etmek amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanıldı, XynF1 ve XynR1 primerleri ile PCR



reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR sonucu 0,5 mg/mL etidyum bromür içeren %1,0'lük agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntüledi. Dejenarat primerler kullanılarak elde edilen DNA parçası pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden rekombinant plazmitleri içerebilen olanları seçildi ve plazmit izolasyon yöntemine göre içerdiği plazmidler izole edildi. Gen parçasının klonlandığı doğru klon seçildi ve bir MacroGen firmasına gönderilerek (Güney Kore) sekans analizi gerçekleştirildi. Sekans sonuçları GenBank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin bir parçası (669 bp) olduğu tespit edildi.

### 3.2.1.3. Ters PCR (Invers PCR) ile Genin Tamamlanması

Gen bankasındaki karşılaştırmalar sonucunda 669 baz çiftlik bir bölgesi elde edilen genin diğer bölgelerinin yakalanması için ters PCR (Invers PCR) çalışması gerçekleştirildi. Bu nedenle, elde edilen bu gen parçasına ait baz dizilimi kullanılarak uç kısımlarından dış taraflara doğru olacak şekilde GeoXylanF2 ve GeoXylanR2 primerleri dizayn edildi (Tablo 12). Daha sonra *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> bakterisine ait genomik DNA *Hind*III restriksiyon endonükleazıyla bir gece boyunca kesildi ve dizayn edilen primerlerle ters (invers) PCR çalışması gerçekleştirildi. Ardından, kendi üzerine yapışması için DNA ligaz enzimi ile (self-ligasyon) ligasyon reaksiyonları gerçekleştirilerek DNA fragmenti halka haline getirildi. Yapılan ters PCR reaksiyonları sonucu elde edilen parça, baz dizilimini belirlenmek üzere, pGEM-T Easy klonlama vektörüne daha önce belirtilen şekilde klonlandı ve sekans ettirildi. Yapılan analiz sonucu, endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin 3' bölgesinin tamamen elde edildiği ancak 5' bölgesinin ise bir bölümünün elde edilemediği belirlendi.

Sekans sonucuna göre endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin tamamının belirlenmesi için, *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşunun genomik DNA'sı *Bcl*I enzimi ile kesilerek kendi üzerine yapıştırılması için DNA ligaz enzimi ile (self-ligasyon) ligasyon reaksiyonları gerçekleştirildi ve DNA fragmentleri halka haline getirildi. Aynı invers PCR GeoXylanF2 ve GeoXylanR2 (Tablo 12) primerleri ile DNA fragmentleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi. Oluşan PCR ürünü pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanarak sekans

ettirildi. Sekans sonucu yapılan analiz sonucu, *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'e ait endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz enzim geninin tamamının elde edildiği görüldü (Şekil 3-4) ve analiz edildi (Tablo 13-14).

```

ATGGAGAAACCATCACGAAAGCGATGATCGTTGGATTCTCGTTTATGCTGCT
GCTTCCTTTGGGGATGACGAATGTATTGGCAAAAACGGAACCATCATAACGCTA
AAAAGCCGCGAATCAGCGCATTGCACGCCCTCAATTGGATCAGCGCTACAAA
GATTCCTTCACTATTGGGGCGGCCGTTGAACCTTATCAGTTGCAAAAACGAAAA
AGACGTCCAAATGCTGAAACGCCATTTTAAACAGCATTTGTCGCTGAGAACGTTA
TGAAACCGATCAACATCCAACCCGAAGAAGGAAAATTCATTTTGTCTGAGGCG
GATCAAATCGTCCGATTTGCTAAAAAACATCATATGGATATCCGCTTCCACAC
CCTCGTTTGGCATAGCCAAGTACCGCAATGGTTCTTTCTTGACAAGGAAGGCA
AGCCGATGGTCAATGAAACGGATCCGGCAAAGCGCGAACAAAATAAACAGCTG
TTACTGAAACGGCTCGAAACCCATATTAACGATTGTGCAACGGTATAAAGA
TGACATCAAATATTGGGACGTTGTAAATGAAGTAGTCGGGGATGATGGAAAAT
TGCGCAATTCCCATGGTATCAAATCGCCGGCATCGATTATATCAAGGCAGCA
TTCAAACGGCGAGAACATATGGCGGCAACAAGATTAACGTGACATCAACGA
TTACAATACCGAAGTGGAACCGAAGCGAAGCGCTCTTTATAACTTAGTGAAAC
AATTAAGAAGAGGGCGTTCCCATTTGACGGTATTGGCCCTCAGTCTCACATC
CAAATTGGCTGGCCTTCTGAAGAGGAAATCGAAAAACGATTACCATGTTTGC
CGATCTAGGGTTAGACAATCAAATTACGGAGCTGGATGTGAGCATGTACGGCT
GGCCCGCGCGCCTACCCGTCGTATGACGCCATTCCGGAACAAAAGTTTTTG
GACCAAGCGGCTCGCTATGATCGATTGTTTAAGCTGTATGAAAACTTGGCGA
TAAAATCAGCAACGTCACCTTCTGGGGcATCGCCGACAACCATACGTGGCTCG
ACAGTCGAGCAGATGTTTACTATGACGCTGACGGGAATGTGGTGGTAGACCCG
AAAGCCCCGTACACGAGCGTGAAAAAGGGAAAAGGAAAAGACGCACCGTTTGT
GTTTCGACCCCGAATACAACGTAAAACCTGCGTATTGGGCCATTATCGATCATA
AGTGA

```

Şekil 3. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşuna ait endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin tamamı

Tablo 13. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin tamamının diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan nükleotit % benzerliği

Mikroorganizma	% Nükleotit Benzerliği
<i>Geobacillus termodenitrificans</i>	92
<i>Geobacillus</i> sp. TC-W7	92
<i>Geobacillus</i> sp. WBI	85
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	84

MEKPSRKAMIVGFSFMLLLPLGMTNVLAKTEPSYAKKPRISALHAPQLDQRYKD  
 SFTIGAAVEPYQLQNEKDVQMLKRHFNSIVAENVMKPINIQPEEGKFNFAEADQ  
 IVRFAKKHHMDIRFHTLVWHSQVPQWFFLDKEGKPMVNETDPAKREQNKQLLLK  
 RLETHIKTIVEREKDDIKYWDVVNEVVGDDGKLRNSPWYQIAGIDYIKAAFQTA  
 RTYGGNKIKLYINDYNTEVEPKRSALYNLVKQLKEEGVPIDGIGPQSHIQIGWP  
 SEEEIEKTITMFADLGLDNQITELDVSMYGWPPRAYPSYDAIPEQKFLDQAARY  
 DRLFKLYEKLGDKISNVTFWGIADNHTWLD SRADVYYDADGNVVVDPKAPYTSV  
 EKGKGDAPFVFDPEYNVKPAYWAIIDHK

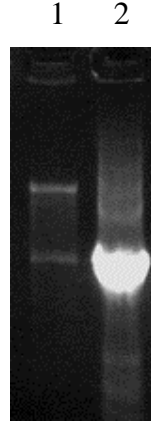
Şekil 4. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşuna ait endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz genin amino asit sırası

Tablo 14. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin tamamının diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan amino asit % benzerliği

Mikroorganizma	% Amino asit benzerliği
<i>Geobacillus</i> sp. C56-T3	93
<i>Geobacillus</i> sp. TC-W7	93
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2	93
<i>Geobacillus</i> sp. WBI	87
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	89
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	86
<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61	85
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> C56-YS93	76

#### 3.2.1.4. Endo $\beta$ -1,4-ksilanaz Geninin pET20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

Endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin pET20b(+) vektörüne klonlanması için *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> bakterisine ait genomik DNA kullanıldı ve ekspresyon primerleri olarak dizayn edilen primerler (Tablo 12) ile PCR gerçekleştirildi. PCR sonucu elde edilen DNA fragmanı *Sma*I ve *Not*I restriksiyon enzimleriyle kesildi. *Eco*RV ve *Not*I enzimleri kullanılarak pET20b(+) vektörü kesildi. Kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak fotoğraflandı (Şekil 5).



Şekil 5. pET20b(+)'ye klonlanan 7<sub>1</sub> ksilanaz geninin kesim görüntüsü, 1: klonun *NcoI/NotI* kesimi 2: PCR ürünü

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve PCR ürünü DNA ligaz yardımıyla birbirine yapıştırıldı ve elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM 101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki plazmitlerin incelenmesiyle ilgilenilen geni içeren klon bulundu ve böylece klonlama gerçekleştirildi. Ancak klonlamanın gerçekleştirildiği pET20b(+) vektörü güçlü bir promotora sahip bir ekspresyon vektörüdür ve ekspresyonun iyi bir biçimde olabilmesi için elde edilen klonun T7 promotor sistemini daha iyi bir şekilde tanıyacak olan bir hücreye aktarılması gereklidir. Bu amaçla elde edilen klon *E. coli* BL21 DE3 hücresine transforme edildi.

### 3.3. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz Enziminin Karakterizasyonu

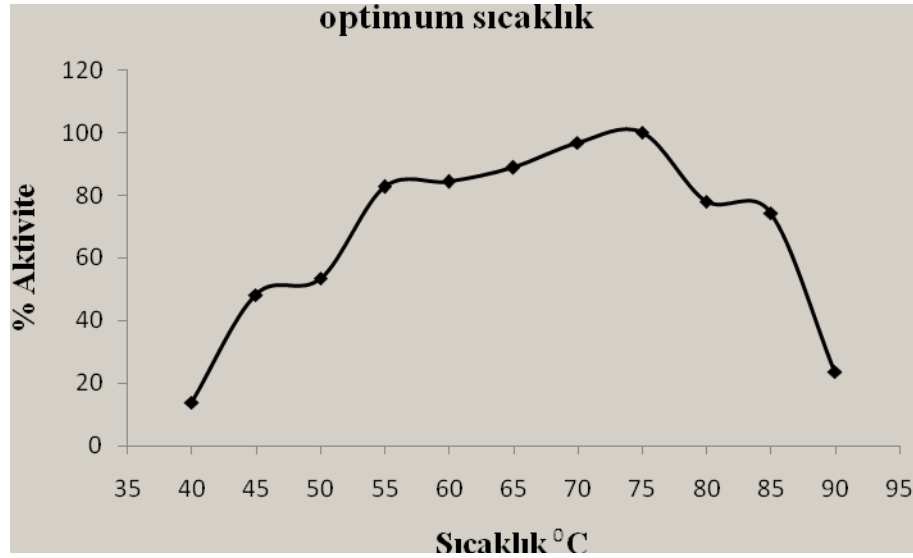
Endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin sekans sırası belirlendikten sonra ve bu gen bir ekspresyon vektörü olan pET20b(+) vektörüne klonlandı, *E. coli* BL21 DE3 hücresinde ekspresyonu gerçekleştirildi. Klonlama sırasında ekspresyon vektöründe var olan enzime takılan His Taq'dan yararlanılarak saflaştırma gerçekleştirildi. Saflaştırma MagneHis<sup>TM</sup> Protein Saflaştırma Sistem (Promega) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Ardından enzimin biyokimyasal özellikleri (optimum pH ve stabilitesi, optimum sıcaklık ve stabilitesi, inhibitör aktivatör etkisi, kinetik parametreleri v.s) incelendi. İncelemeler sırasında bütün deneyler en az üç kez tekrarlı olarak yapılmıştır.

### 3.3.1. Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi

Yapılan çalışmalarda kullanılacak olan protein miktarı 1, 2, 3, 5, 7,5 ve 10 µg gibi değişken miktarlarda enzim ve belirli miktarda substratın (%5) kullanıldığı reaksiyonlar sonucu belirlendi. Yapılan reaksiyonlar sonucu 3 µg/µL saf enzim kullanıldığında protein miktarı aktivite grafiğinde artışın durağana geçtiği görüldü. Bu sonuç dikkate alınarak endoksilanaz aktivite deneylerinde kullanılabilir olan enzim miktarının 3 µg saf protein olduğuna karar verildi.

### 3.3.2. Optimum Sıcaklık

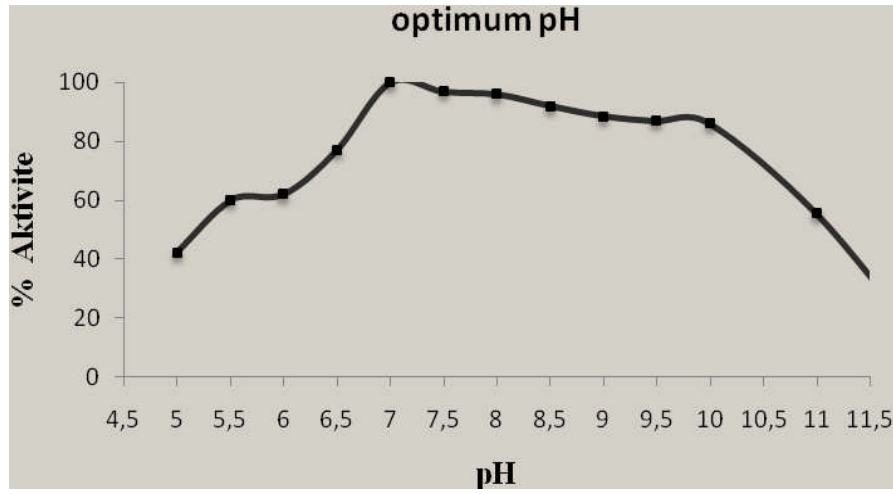
Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin en yüksek gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 40-90 °C arasındaki sıcaklıklarda aktiviteleri incelendi. Sonuçlar Şekil 6'da gösterildi. Yapılan optimum sıcaklık çalışmaları sonucunda Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin optimum sıcaklığının 75 °C olduğu belirlendi. Sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi (Şekil 6).



Şekil 6. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

### 3.3.3. Optimum pH

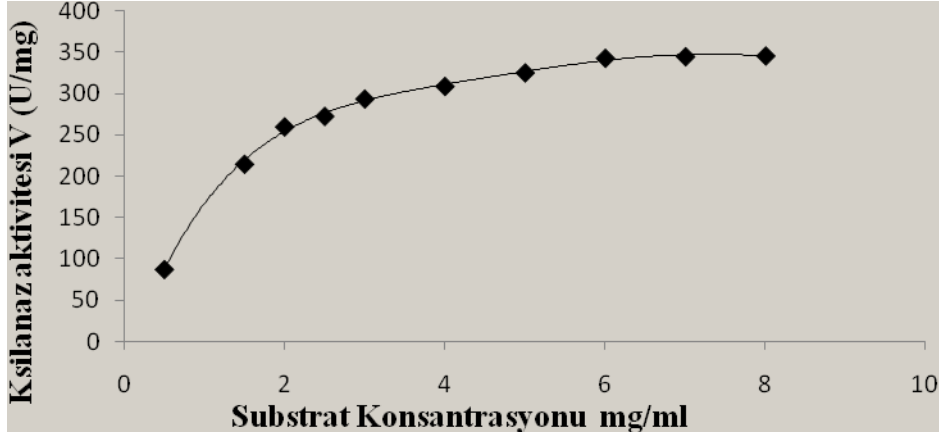
Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin optimum pH'nın saptanması için Na-Asetat (pH 4,0-5,5); Na-fosfat (pH 6,0-7,5); Tris-HCl (pH 8,0-8,5) ve Glisin-NaOH (pH 9,0-12,5) 4 farklı tampon sistemi kullanıldı. Ksilanaz enziminin pH 7,0 (nötral)'de optimum aktiviteye sahip olduğu belirlendi. Ksilanaz enziminin optimum pH'sına ait veri Şekil 7'de gösterildi. Enzim optimum pH'ı 7,0 olduğu belirlendi.



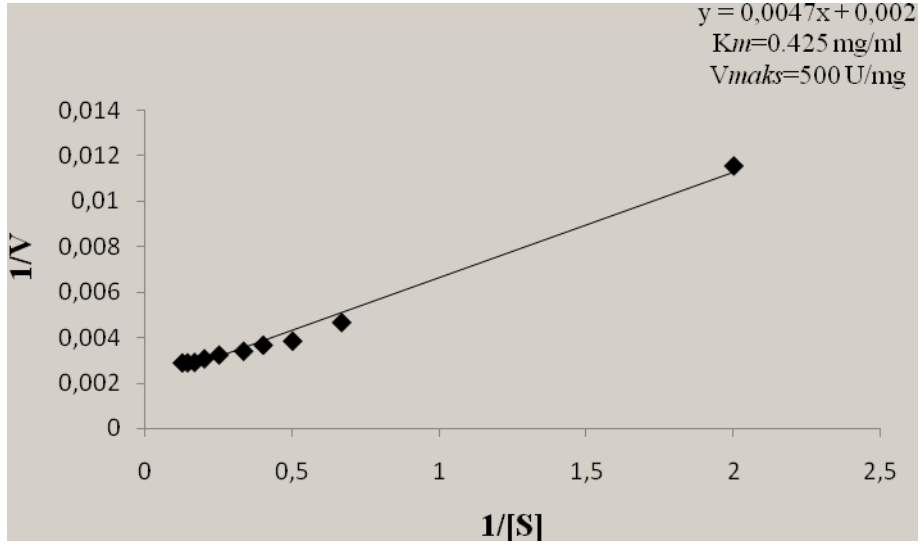
Şekil 7. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin optimum pH grafiği

### 3.3.4. Kinetik İncelemeler

Enzimin başlangıç tepkime hızı 75 °C'de 50 mM pH 7,0 fosfat tamponunda 0,25-4 mg/mL oat spelt xylan substrat konsantrasyonu aralığında ölçülmüştür. Enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu belirlendi (Şekil 8). Substrat olarak oat spelt xylan kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinin oluşturduğu doğrunun x-ksenini kestiği nokta  $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek  $K_m$  değeri 0,425 mg/mL, y-ksenini kestiği nokta ise  $1/V_{maks}$ 'a eşitlenerek  $V_{maks}$  değeri 500 U/mg olarak hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 8. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimine ait Michaelis- Menten grafiği



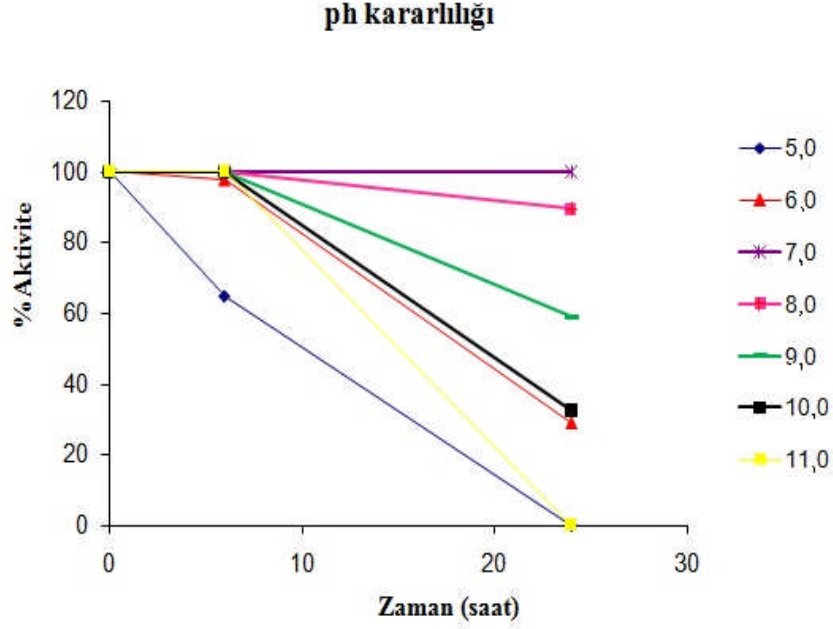
Şekil 9. Oat spelt xylan substratı için Lineweaver-Burk eğrisi

### 3.3.5. pH Kararlılığı

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin pH stabilite analizleri için, pH 5,0-11,0 arasındaki tampon çözeltilerde 6 saat ve 24 saat süreyle, 55 °C de ön inkübasyon gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 10' da gösterildi.

Enzim 6 saatlik ön inkübasyondan sonra özellikle pH 7,0-11,0 aralığında aktivitesini %100 koruduğu görüldü. İnkübasyon pH'sının 5,0 aralığındaki değerde kalan aktivite

yaklaşık %65 düzeyinde korumuştur. İnkübasyon pH'sının 6,0 aralığındaki değerlerde ise, kalan aktivite yaklaşık %97 düzeyinde korudu.



Şekil 10. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin pH kararlılığı

### 3.3.6. Isıl Kararlılığı

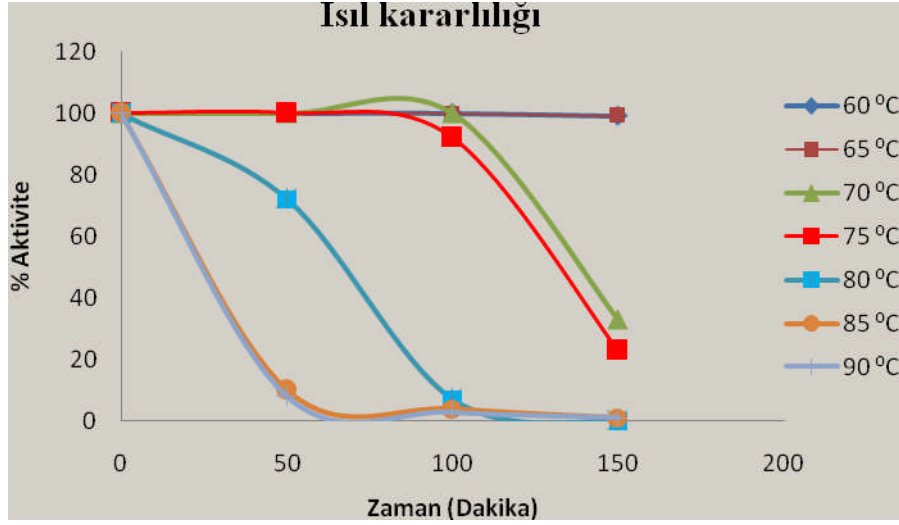
Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin ısıl kararlılığını saptamak için 60-90 °C sıcaklık aralığında 30, 120 ve 180 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirildi. Her bir sıcaklıktan alınan enzim örneklerindeki kalan aktivite standart metoda göre 75 °C'de belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 11'de verilmiştir.

Enzim 30 dakikalık ön inkübasyon sonunda 85-90 °C'de orijinal aktivitesini yaklaşık %10-8 oranına kadar düşmüştür. İnkübasyon sıcaklığı 80 °C seçildiğinde, orijinal aktivitenin %72 düzeyine düştüğü saptanmıştır. İnkübasyon sıcaklığı 60-75 °C'lik aralıklarda %100 aktivitesini korumuştur.

Ön inkübasyon süresi 120 dakika olarak uygulandığı zaman, 85-90 °C'de %4-3 aktivite gözlenirken, 80 °C'lik sıcaklık aralığında ortalama aktivite %7 düzeyinde gerçekleşti. Ön inkübasyon sıcaklığı 75 °C'ye bakıldığında kalan enzim aktivitesinin %92 düzeyine düştüğü saptanmıştır. İnkübasyon sıcaklığı 60-70 °C'lik aralıklarda %100



aktivitesini korudu. Ön inkübasyon süresi 180 dakika olarak uygulandığı zaman, 85-90 °C’de %1 aktivite gözlenirken, 80 °C’lik sıcaklık aralığında ise hiçbir aktivite gözlenmedi. Ön inkübasyon sıcaklığı 75 °C’ye bakıldığında kalan enzim aktivitesini %23 düzeyine düşüğü saptanmış, 70 °C’de %33 aktivite gözlemlendi. İnkübasyon sıcaklığı 60-65 °C’lik aralıklarda %99 aktivitesini korudu.



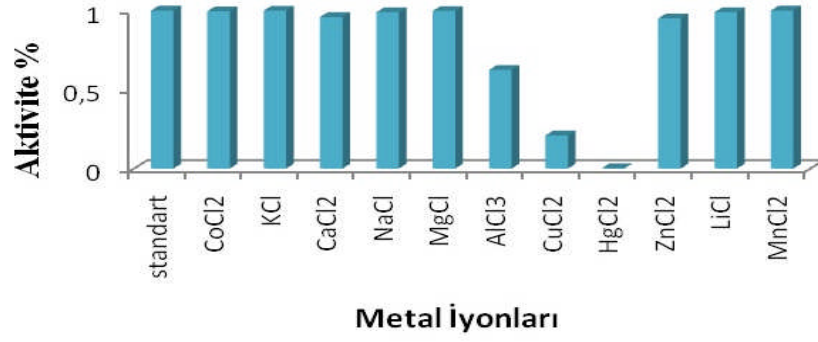
Şekil 11. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin ısıl kararlılığı

### 3.3.7. Metal İyonlarının ve Kimyasalların Etkisi

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, LiCl, AlCl<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl, ZnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> ve CoCl<sub>2</sub> metal tuzları ile gerçekleştirildi.

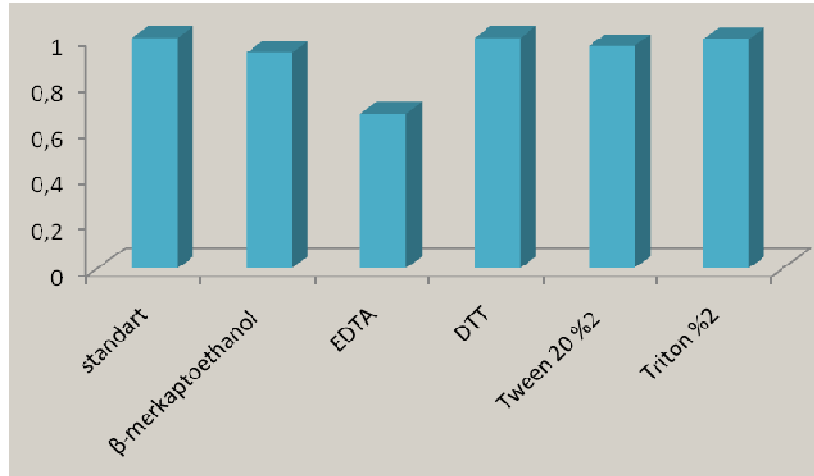
Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzim aktivitesi üzerine kimyasalların etkisi; EDTA, β-merkaptotanol, DTT, Triton %2, Tween 20 maddeleri ile gerçekleştirildi.

Reaksiyon için, %5’lik Oat Spelt Xylan substratı ve 10 mM’lık konsantrasyonlarda hazırlanan metal iyonları, β-merkaptotanol (Şekil 12) ve % 2 (v/v) konsantrasyonlarda hazırlanan kimyasalların (Şekil 13) varlığında gerçekleştirilen bir dizi reaksiyonlar ile belirlendi.



Şekil 12. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimine metal iyonlarının etkisi

Endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz aktivitesi üzerine metal iyonlarının klor veya sülfat tuzları ve çeşitli kimyasallarla yapılan deneyler sonucunda; Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> iyonlarının ve EDTA'nın Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz aktivitesi üzerine etkili bir inhibitör özelliğinin olduğu görüldü. En yüksek inhibitör etkiyi; Hg<sup>2+</sup> metal iyonu sağladı. Metal iyonlarından Mn<sup>2+</sup>, Li<sup>1+</sup> ve Mg<sup>2+</sup>'in her hangi bir etkilerinin olmadığı saptandı. Çeşitli kimyasal maddelerle yapılan deneyler sonucunda ise, Tween %20, DTT ve Triton %2'nin Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi üzerine etkileri olmadığı saptandı.



Şekil 13. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimine bazı kimyasalların etkisi

### 3.3.8. Enzimin Substrat Spesifikliği

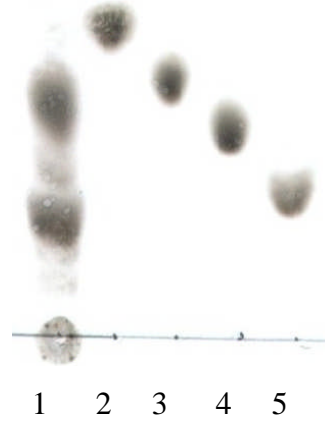
Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimiyle gerçekleştirilen çoklu reaksiyonlar sonucunda 1 mM'lık konsantrasyonlarda hazırlanan *p*NP- $\alpha$ -ksilopiranoz, *p*NP- $\beta$ -ksilopiranoz, *p*NP- $\alpha$ -glukopiranoz ve *p*NP- $\beta$ -galaktopiranoz substratları ile reaksiyona sokuldu. Enzimin bu substratları hidrolize etmediği ortaya çıkarıldı (Tablo 15).

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi %1'lik hazırlanan Oat Spelt Xylan, insoluble xylan, Karboksimetilselüloz (CMC), nişasta, Avicel, Laminarin ve Lichenan substratları ile parçalama özellikleri Dinitrosalisilik asit (Miller, 1957) metoduyla incelendi ve Lichenan'ın az oranda da olsa parçalandığı belirlendi (Tablo 15).

Tablo 15. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin substrat spesifikliği

Substratlar	% Aktivite
Oat spelt xylan	100
insoluble xylan	0
Avicel	0
Karboksimetil selüloz	0
Laminarin	0
Lichenan	10
<i>p</i> NP- $\alpha$ -ksilopiranoz	0
<i>p</i> NP- $\beta$ -ksilopiranoz	0
<i>p</i> NP- $\alpha$ -glukopiranoz	0
<i>p</i> NP- $\beta$ -galaktopiranoz	0

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin oat spelt xylan ve ksilooligosakkaritleri parçalama özellikleri Dinitrosalisilik asit (Miller, 1957) öncelikle belirlendi. Ancak parçalamanın hangi seviyede olduğunun ortaya çıkarılması için reaksiyon sonucunda oluşturulan ürünlerin TLC ile gösterilmesi gerekmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda oluşan ürünler silica gel 60 F<sub>254</sub>'e tatbik edildi ve bu plakalar üzerinde uygun çözeltiler hazırlanarak hareket etmeleri sağlandıktan sonra TLC plakaları üzerinde şekerlerin varlığı belirlendi. Yapılan alışmalar sonucunda elde edilen sonuç şekil 14'de görölmektedir.

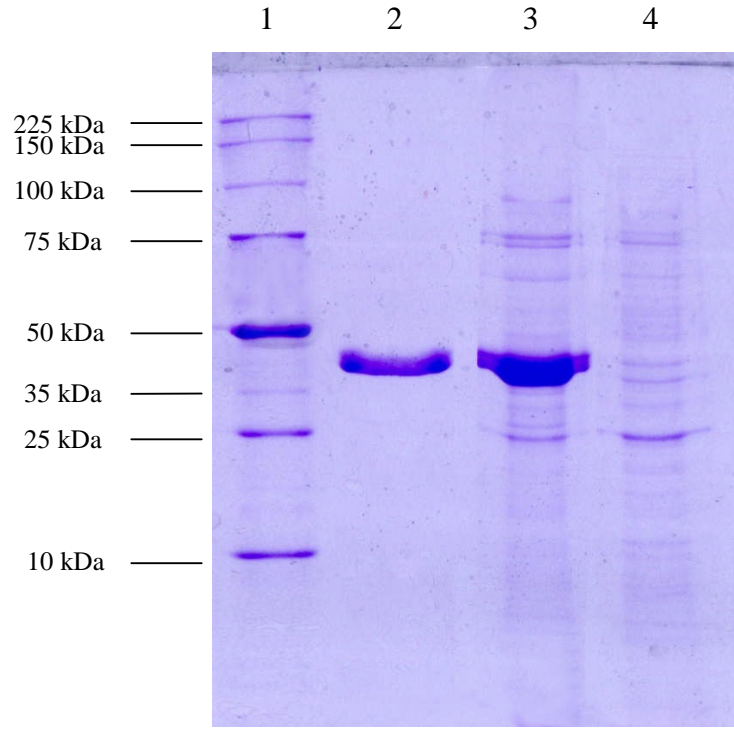


Şekil 14. İnce Tabaka Kromatografisi ile oat spelt xylan'ın parçalanması 1. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi ile muamele edilmiş oat spelt xylan hidroliz ürünleri, 2. ksiloz, 3. ksilobioz, 4. ksilotrioz, 5. ksilotetroz.

Gerçekleştirilen analiz sonucunda enzimin hidroliz ürünleri arasında ortaya çıkan en önemli ürünün, bandın yoğunluğundan da görüldüğü gibi ksilobioz olduğu saptanmıştır. Bu sonuç enzimin yüksek düzeyde aktif olduğunu ve ksilanaz endüstrisinde önemli bir yer edinebileceğini göstermektedir.

### 3.3.9. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi

pET20b(+) vektörüne klonlanan Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi Promega His Taq protein saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırıldı. Elde edilen saf protein SDS-PAGE'de tek bant olarak gösterildi (Şekil 15). %12'lik SDS-PAGE'de protein markırı ile birlikte yürütülerek fotoğraflandı ve BioDocAnalyze sistemi kullanılarak, enzimin moleküler ağırlığı 47 kDa olarak hesaplandı.



Şekil 15. Saflaştırılan endoksilanaz enziminin SDS-PAGE görüntüsü  
1: Protein markırı, 2: Saf enzim, 3: Kaba enzim ekstraktı (indüklenmiş), 4: pET20b (indüklenmiş)

#### 4. TARTIŞMA

K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma *Geobacillus* cinsine ait bir bakteriden ksilanaz enzimini kodlayan genin klonlanması ve karakterizasyonun yapılmasını kapsamaktadır.

Ksilanaz üzerinde son 4 yılda yapılan çalışmaların çoğu, ksilanaz teknolojisinin sadece tek bir yönü üzerinde odaklanmıştır. Bu çalışmaların amacı, ksilanaz enziminin biyokimyasını, genin moleküler biyolojisini ve özelliklerini tartışmaktır.

*Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşuna ait endoksilanaz geninin tüm nükleotit ve amino asit sırası belirlenerek GenBank'ta mevcut diğer ksilanazlar ile karşılaştırılmıştır. Nükleotit düzeyinde *Geobacillus* sp. TC-W7 xylanase (GQ857066.1) geni ile %92, *Geobacillus thermodenitrificans* T-2 thermostable xylanase (EU599644.1) geni ile %92, *Geobacillus* sp. WBI xylanase (xylA) (EU931582.1) geniyle %85, *Geobacillus stearothermophilus* xylanase (D28122.1) geni ile %85 oranında benzerlik belirlenmiştir. Amino asit düzeyinde *Geobacillus* sp. C56-T3 endo 1,4- $\beta$ - xylanase (YP 003671234.1) geni ile %93, *Geobacillus* sp. TC-W7 xylanase (ACX42569.1) geni ile %93, *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 xylanase (YP 001125870.1) geni ile %93, *Geobacillus* sp. WBI xylanase (xylA) (ACH43142.1) geniyle %87, *Geobacillus stearothermophilus* extracellular xylanase (ABI49951.1) geni ile % 86, *Geobacillus stearothermophilus* endo 1,4- $\beta$ - xylanase (P40943.1) geni ile %86, *Geobacillus* sp. Y412MC61 endo 1,4- $\beta$ - xylanase (YP 003253761.1) geni ile %85, *Geobacillus stearothermophilus* T-6 extracellular xylanase (1 R86 A) geni ile % 89 ve *Geobacillus thermoglucosidasius* C56-YS93 endo 1,4- $\beta$ - xylanase (ZP 06810251.1) geni ile %76 oranında benzer olduğu belirlenmiştir. Sekans analiz sonuçları, Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin tek domainli ve GH10 familyasına ait olduğunu göstermektedir.

Çoğu ksilanaz enzimlerin aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri yaklaşık olarak 40-60 °C arasındadır (Subramaniyan ve Prema 2002; Collins et al. 2005). *Geobacillus* sp. MT-1 (Wu vd., 2006), *Bacillus* sp. JB 99 (Shrinivas vd., 2010), *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 (M.Ali vd., 2004), *Streptomyces thermoviolaceus* (Tsujiyo vd., 1992) suşlarına ait ksilanaz enzimlerinin optimum sıcaklıkları 70 °C'dir. Bu enzimlerin 80 °C de yaklaşık aktiviteleri sırasıyla %50, %70, %25 ve %5'dir. Bu değerlerle karşılaştırıldığında, Geo7<sub>1</sub>

Endoksilanaz enziminin 80 °C'de %75'in üzerinde aktiviteye sahip olduğu belirlenmiş, aynı zamanda endüstriyel kullanımı düşünüldüğünde bunun bir avantaj olduğu düşünülmektedir.

Termofilik *Geobacillus* sp. (Wu vd., 2006) suşuna ait termal kararlı ksilanaz enziminin optimum sıcaklığı 70 °C, fakat 65 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda enzim ısı kararlılığını kaybetmekte, 70 °C de 10 dakikalık ön inkübasyondan sonra yalnızca %5 aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu enzimle karşılaştırıldığında, Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin ancak 80 °C ve üzeri sıcaklıklarda ısı kararlılığını kaybetmeye başladığı görülmüştür. Bu değerlendirmeler dikkate alındığında Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin iyi bir termal kararlılığa sahip olduğu görülmektedir.

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin aktivitesini Hg<sup>2+</sup> kuvvetli şekilde inhibe etmektedir. Hg<sup>2+</sup> aracılığıyla ksilanazların inaktivasyonu diğer çalışmalarda da rapor edilmiştir (Heck vd., 2006b; Wu vd., 2006; Dutta vd., 2007; Li vd., 2008). Hg<sup>2+</sup> enzimin triptofan rezidülerine bağlanarak, indol halkasını okside eder (Zhang vd., 2007). Yapılan incelemede Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin 9 adet triptofana sahip olduğu ve bunlardan 6 tanesinin korunmuş bölgeler içinde olduğu belirlenmiştir. Cu<sup>2+</sup> metal iyonu da *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>, *Anoxybacillus* sp. E2, *Geobacillus* sp. MT-1, *Streptomyces* sp. S9 suşlarına ait ksilanaz enzimlerini inhibe ettiği belirlenmiştir (Wang vd., 2009; Wu vd., 2006; Li vd., 2008). *G. thermoleovorans* ksilanaz enzimine Mg<sup>2+</sup> metal iyonunun ve Tween 80 kimyasalının, *Geobacillus* sp. MT-1 ksilanaz enzimine de Li metal iyonunun etki etmediği belirlenmiştir (Sharma vd., 2006; Wu vd., 2006). Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimine de bu maddelerin etkisi olmadığı belirlenmiştir. Metal şelatlayıcı ajan olan EDTA enzimi düşük oranda inhibe etmesi, bu enzimin kofaktör olarak metallere ihtiyaç duyduğunu göstermektedir.

*Geobacillus thermoleovorans* bakterisine ait ksilanaz enziminin optimum pH'ı 8,5 ve geniş pH aralığında (6,0-9,5) aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Sharma vd., 2006). Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin en iyi çalıştığı pH 7,0 olmasına rağmen, aynı şekilde bu enziminde geniş bir pH (6,0-9,5) aralığına sahip olduğu belirlenmiştir. Çalıştığı optimum pH bakımından Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi, alkali ortamda asidik ortamdakinden daha iyi çalışması açısından literatürdeki diğer ksilanazlara oranla büyük bir avantaja sahiptir.

Alkalofilik organizmalardan elde edilen ksilanazlarda korunmuş üçlü gruplar (Val-Val-Asn veya Val-Val-Asp) tanımlanmıştır (Kulkarni vd., 1999). *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'in dizi

analizi üzerinde her iki sıranında bulunduğu belirlenmiştir. Bu bilgi doğrultusunda, enzimimizin alkalın özellik gösterdiği tekrar olarak kanıtlanmaktadır.

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin, yüksek spesifik aktiviteye, geniş aralıklı bir pH kararlılığına ve iyi termalkararlılık özelliklerine sahip olması geniş alanlardaki uygulamalar da potensiyele sahip olabilmesi açısından umut vericidir. Oat spelt xylan, substrat olarak kullanıldığında 7<sub>1</sub> ksilanaz enziminin *K<sub>m</sub>* değeri 0,425 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değer substrat olarak oat spelt xylan'ı kullanan 1,579 mg/ml (Wu vd., 2006), 4,8 mg/ml (Shrinivas vd., 2010) *K<sub>m</sub>* değerlerine sahip *Geobacillus* sp. MT-1 ve *Bacillus* sp. JB 99 ksilanaz enzimleriyle kıyaslandığında Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin oat spelt xylan substratına çok daha fazla ilgi gösterdiğini ortaya koymaktadır.

*Thermomonospora alba* ULJB1 XylA (Blanco vd., 1997), *C. acetobutylicum* ATCC824 Xyn10B (Ali vd., 2004), *Bacillus* sp. JB 99 ksilanaz (Shrinivas vd., 2010), *Streptomyces lividans* ksilanaz (Morosoli vd., 1986) enzimleri ksilan substratını ksilobioz ve düşük miktarda ksilotetroza hidrolize etmektedir. Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi tarafından ksilanın ana hidroliz ürünü ksilobioz, ksilotetroz, düşük miktarda ksilotriozdur. Bu sonuç, enzimin endo karakterli bir enzim olduğunu göstermektedir (Shrinivas vd., 2010).

Farklı suşlara ait izolatlardan elde edilen enzimlerin moleküler ağırlıklarının 24-45 kDa arasında olması, bu enzimlerin kağıt endüstrisinde kullanabilirliği ve kağıt hamuru lifleri arasında dağılmasının gerekliliği için önemlidir (Bim ve Franco 2000). Buna dayanarak, Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enziminin 47 kDa moleküler ağırlığına sahip olması bu alanda da kullanılabilirliğini göstermektedir.

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisindeki uygulamalar için, içerisinde selüloz parçalayan enzim içermeyen ksilanaz enziminin elde edilmesi oldukça önemlidir (Gessesse vd.,1999; Bakır, 2005). Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi, karboksimetilselüloz substratıyla reaksiyona tabii tutulmuş ve substratı parçalama özelliğinin olmadığı gözlenmiştir. Sonuç olarak enzimin kağıt sanayisinde kullanılabilirliğini gösterilmiştir.

Enzimin ısı kararlılığını artıran bir özellikte disülfid köprülerinin var olmasıdır (Heck vd., 2006b). *Bacillus* sp. NG-27 endoksilanaz genin amino asit sekansı incelendiğinde hiç sistein amino asiti içermemesine rağmen, yüksek ısı kararlılık göstermektedir (Gupta vd., 2000). Aynı şekilde, *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'de amino asit sekansında hiç sistein amino asiti içermemesine rağmen, iyi bir termal kararlılık göstermektedir.



İnkübasyon sırasında reaksiyon içeriğinde DTT'in bulunması ksilanı degrade eden enzimlerin ısı kararlılığını artırmaktadır (Medeiros vd., 2003). Çünkü DTT sistein amino asitine bağlanarak disülfid köprülerinin indirgenmesini sağlar (Medeiros vd., 2008). DTT, sistein amino asiti bulunmadığından dolayı, Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi üzerine aktivatör veya inhibitör olarak rol oynamamıştır.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub>'e ait endo  $\beta$ -1,4 ksilanaz geni klonlanıp, ekspres edildi ve optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve ısıl kararlılığı, inhibitör ve aktivatörleri ve kinetik parametreleri gibi özellikleri açısından karakterizasyonları yapıldı.

Geo7<sub>1</sub> izolatın oat spelt xylan gibi tarımsal atık üzerinde çoğaltılmış ve enzim üretim profili belirlenmiştir. *Geobacillus* sp. 7<sub>1</sub> suşunun ksilanaz enziminin üretimi indüklemeye becerisi karşılaştırıldığında, oat spelt xylan'ın iyi bir karbon kaynağı olduğu belirlenmiştir. Fermentasyon çalışması sonucunda 7<sub>1</sub> suşunun en yüksek ksilanaz miktarını ~48 saatte özellikle ürettiği bulunmuştur.

Bakterinin endo  $\beta$ -1,4 ksilanaz genine ait 669 baz çiftlik DNA parçası tasarlanan dejenerat primerler yardımıyla çoğaltıldı ve p-GEMT Easy klonlama vektörüne klonlanarak baz dizilimi belirlendi. Elde edilen bölgeden yararlanılarak invers PCR primerleri dizayn edildi ve invers PCR reaksiyonları ile genin geri kalan kısımların nukleotit sırası ortaya çıkarıldı. Elde edilen bu genin 1224 baz çiftlik DNA uzunluğuna sahip olduğu bulunmuş ve gen His Taq içerecek şekilde bir ekspresyon vektörü olan pET20b(+)'ye N-terminalinde bir histidin kuyruk içerecek şekilde klonlandı ve ekspres edildi. Ekspreslenen protein MagneHis<sup>TM</sup> Protein Saflaştırma Sistem (Promega) kiti kullanılarak saflaştırıldı. SDS-PAGE sonucunda enzimin tek bir alt biriminin moleküler ağırlığı 47 kDa olarak belirlendi.

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimin optimum pH değerinin 7,0, optimum çalışma sıcaklığının ise 75 °C olduğu tespit edildi.

Enzim optimum aktivitesini pH 7,0 da gösterirken, asidik pH aralığında (4,0-7,0) ortalama enzim aktivitesi %58,4 olarak bulunmuştur. Alkali pH koşullarında ise, (7,0-12,5) ortalama enzim aktivitesi %73,5 olarak bulunmuştur (Şekil 7). Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi pH 4,0-12,5 aralığındaki 24 saat inkübe edildiğinde orijinal aktivitenin ortalama %33 düzeyinde koruduğu belirlendi (Şekil 10).

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 75 °C bulunmuştur. Enzim aktivitesi 40 °C de %13, 60 °C de %84, 80 °C de %78 iken, 90 °C de %23 düzeyinde aktivite belirlendi (Şekil 6).

Enzimin substratı olarak oat spelt xylan kullanılarak yapılan kinetik çalışmalarında substrat için  $K_m$  değeri 0,425 mg/ml ve  $V_{maks}$  değeri ise 500 U/mg olarak belirlendi.

$Zn^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ , Na,  $Co^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  metal iyonlarının endo  $\beta$ -1,4 ksilanaz enzim aktivitesi üzerine aktivator etki yaptığı ve  $Hg^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Al^{+3}$  metal iyonlarının ve EDTA'nın Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlendi.

Geo7<sub>1</sub> Endoksilanaz enzimi 16 saatlik inkübasyon uygulaması sonunda oalt spelt ksilanı ksilobioz, ksilotetroz ve ksilotrioza dönüştürdüğü bulunmuştur.

## 6. ÖNERİLER

Hemiselüloz, selülozik materyalde en fazla bulunan ikinci yenilenebilir polisakkarit molekülüdür ve her yıl yaklaşık  $10^{10}$  ton düzeyinde üretilmektedir. Ksilan, hemiselülozu meydana getiren en önemli yapı olup, heteropolimer özelliği taşır. Bu yapı ksilanaz enzimleri ile ksiloz başta olmak üzere diğer oligosakkaritlere parçalanır.

Dünyada artan nüfusla beraber ihtiyaç duyulan çevre koruma önlemleri göz önünde bulundurulursa, ksilanazların en yaygın kullanım alanı kağıt endüstrisidir. Ksilanaz enzimi toksik organik klorlu bileşiklerin kağıt endüstrisindeki kullanımını azaltmakta, selüloza zarar vermediği ve yan etkisi olmadığı için uygulamada daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

Fermentasyon ortamında üretilen enzimlerin miktarı karbon kaynağına bağlı değişim göstermektedir. Buna bağlı olarak, farklı ksilan kaynakları kullanıldığında ksilanolitik enzimlerinin üretim seviyesinde çeşitlilik gözlenmektedir. Değişik karbon kaynakları çoğaltılarak ksilanaz enzimi ve diğer enzimlerin üretimindeki indüklenme gücü saptanabilir.

Bazı kriterler ksilanazları üretebilen bir mikroorganizmanın seçimi için zorunludur. Herhangi bir selülaz aktivitesi hamurun kalitesini degrades etme, uygulamanın maliyetini artırma gibi ciddi ekonomik problemler yaratacağından seçilen mikroorganizmada selülaz aktivitesi olmamalıdır (Srinivasan ve Rele 1999; Subramanian ve Prema 2000).

Yapılan çalışmalarda, *Geobacillus* suşlarının genellikle moleküler ağırlığı küçük olan bir ksilanaza sahip olduğu görüldüğünden, ortaya çıkarılan gen ve amino asit sıralarından faydalanılarak cinsin diğer suş ve türlerinin aynı enzime ait genlerinin eldesi için prob ve primerler dizayn edilebilir. Çeşitli mutasyonlarla enzimlerin pH ve sıcaklık stabiliteleri artırılabilir. Kağıt endüstrisinde kullanımı için daha avantajlı duruma getirilebilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Adamian, L. ve Liang, J., 2002. Interhelical Hydrogen Bonds and Spatial Motif in Membrane Proteins: Polar Clamps and Serine Zippers, Proteins, 47, 209-218.
- Adams, M.W.W., 1993. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 °C, Annu. Rev. Microbiol., 47, 627-58.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry, Wiley Vch, Weinheim, 514 p.
- Andrews, S.R., Taylor, E.J., Pell, G., Vincent, F., Ducros, V.M., Davies, G.J., Lakey, J.H. ve Gilbert, H.J., 2004. The use of forced protein evolution to investigate and improve stability of family 10 xylanases the production of Ca<sup>2+</sup> independent stable xylanases, The Journal of Biological Chemistry, 279, 54, 54369-54379.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanabilirliği, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Baillet, E., Downey, G. ve Tuohy, M., 2003. Improvement of texture and volume in white bread rolls by incorporation of microbial hemicellulase preparations, in: Recent Advances in Enzymes in Grain Processing, Proceedings of the 3rd European Symposium on Enzymes in Grain Processing (ESEGP-3), 255-259.
- Bakır, U., 2005. Microbial Enzymes: Production and Applications, The Haworth Press, New York, 592 p.
- Bakır, U., Ögel, Z. ve Ersayın Yaşınok, A., 2007. Toprak İzolatı *Bacillus* sp. M-13 Ksilanaz'ın Saflaştırılması, Karakterize Edilmesi ve Ksilanaz Geninin İzolasyonu, Temel Bilimler Araştırma Grubu, TÜBİTAK.
- Bakır, U., Yavascaoglu, S., Guvenc, 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, 328-334.
- Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G. ve Markı, H., 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil, Applied Microbiology and Biotechnology, 48, 184-190.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. ve Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review, Applied Microbiology and Biotechnology, 56, 326-338.

- Belduz, A.O., Dulger, S. ve Demirbag, Z., 2003. *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1315-1320.
- Bernier, R., Desrochers, M., Jurasek, L. ve Paice, M., 1983. Isolation and Characterization of a Xylanase from *Bacillus subtilis*, Applied and Environmental Microbiology, 46, 511-514.
- Berovic, M. ve Ostroversnik, H., 1997. Production of *Aspergillus niger* pectolyticenzymes by solid state bioprocessing of apple pomace, Journal of Biotechnology, 53, 47-53.
- Biely, P., 1985. Microbial xylanolytic systems, Trends in Biotechnology, 3, 286-290.
- Biely, P. ve Petrakova, E., 1984. Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*, Journal of Bacteriology, 160, 408-412.
- Biely, P., Vranska, M., Tenkanen, M. ve Kluepfel, D., 1997. Endo- $\beta$ -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties, Journal of Biotechnology, 57, 151-166.
- Bim, M.A. ve Franco, T.T., 2000. Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching, Journal of Chromatography B, 743, 349-356.
- Blanco, J., Coque, J.R.R., Velasco, J. ve Martin, J.F., 1997. Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo- $\beta$ -1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose-binding ability, Applied Microbiology and Biotechnology, 48, 208-217.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D. ve Edelstein, S.J., 1996. Protein Methods, Wiley-Liss Press, S., Editors, USA, 414 p.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72, 248-254.
- Burg, B.V.D., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes, Current Opinion in Microbiology, 6, 213-218.
- Carmona, E.C., Pizzironi, A.A., Monterio, R.T.R. ve Jorge, J.A., 1997. Xylanase production by *Aspergillus versicolor*, Journal of Basic Microbiology, 37, 387-393.
- Claeysens, M. ve Henrissat, B., 1992. Specificity mapping of cellulolytic enzymes: classification into families of structurally related proteins confirmed by biochemical analysis, Protein Science, 1, 1293-1297.
- Claire, V. ve Gregory, J.Z., 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65, 1-43.

- Collins, T., Gerday, C. ve Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, FEMS Microbiology Review, 29, 3-23.
- Collins, T., Meuwis, M.A., Gerday, C. ve Feller, G., 2003. Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments, Journal of Molecular Biology, 328, 419-428.
- Collins, T., Meuwis, M.A., Stals, I., Claeysens, M., Feller, G. ve Gerday, C., 2002. A novel family 8 xylanase: functional and physico-chemical characterization, The Journal of Biological Chemistry, 277, 35133-35139.
- Coughlan, M.P. ve Hazlewood, G.P., 1993.  $\beta$ -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications, Biotechnology and Applied Biochemistry, 17, 259-289.
- Courtin, C.M., Gelders, G.G. ve Delcour, J.A., 2001. The use of two endoxylanases with different substrate selectivity provides insight into the functionality of arabinoxylans in wheat flour breadmaking, Journal of Cereal Science, 78, 564-571.
- Coutinho, P.M. ve Henrissat, B., 1999. Carbohydrate-active enzyme server (CAZY), <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/> CAZY 12 Aralık 2009.
- Cowan, W.O., 1996. Animal Feed. Industrial Enzymology, McMillan Press, In Godfrey T. ve West S, Editors, London, 69 p.
- Daniel, R.M. ve Cowan, D.A.C., 2000. Biomolecular Stability and Life at High Temperatures, Cell Mol. Life Sci., 57, 250-254.
- Danson, M.J. ve Hough, D.W., 1998. Structure, function and stability of enzymes from the Archaea, Trends in Microbiology, 6, 307-314.
- Duarte, J.C. ve Ferreira, M.C., 1994. *Aspergilli* and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications, FEMS Microbiology Reviews, 13, 377-386.
- Dutta, T., Sengupta, R., Sahoo, R., Sinha Ray, S., Bhattacharjee, A. ve Ghosh, S., 2007. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization, Letters in Applied Microbiology, 44, 206-211.
- Endo, K., Hakamada, Y., Takizawa, S., Kubota, H., Sumitomo, N., Kobayashi, T. ve Ito, S., 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences, Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 109-116.
- Eriksson, K.E.L., 1990. Blanchette, R.A. ve Ander, P., Microbiol and enzymatic degradation of wood and wood components, Verlag, NY.

- Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T. ve Matsuzawa, H., 1998. Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH, Protein Engineering, 11, 1121-1128.
- Gallardo, O., Diaz, P. ve Javier Pastor, F.I., 2003. Cloning and Characterization of Xylanase A from the Strain *Bacillus* sp. BP-7: Comparison with Alkaline pI-Low Molecular Weight Xylanases of Family 11, Current Microbiology, 48, 276-279.
- Galtier, N., Tourasse, N. ve Gouy, M., 1999. A Nonhyperthermophilic Common Ancestor to Extant Life Forms, Science & January, 283, 220-221.
- Gessesse, A. ve Mamo, G., 1999. High-Level Xylanase Production by an Alkaliphilic *Bacillus* Sp by using Solid-State Fermentation, Enzyme and Microbial Technology, 25, 68-72.
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J.P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., Dumont, J., Garsoux, G., Georlette, D., Hoyoux, A., Lonhienne, T., Meuwis, M.A. ve Feller, G., 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology, Trends in Biotechnology, 18, 103-107.
- Gilbert, H.J. ve Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases, Journal of General Microbiology, 139, 187-194.
- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology, Stockton Press, In Godfrey T, West S, Editors, New York.
- Gomes, J. ve Steiner, W., 2004. Extremophiles and extremozymes, Food Technol. Biotechnol., 42, 4, 223-235.
- Gosalbes, M.J., Perez-Gonzalez, J.A., Gonzalez, R. ve Navorro, A., 1991. Two  $\beta$ -glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo- $\beta$ -(1,3)-(1,4)-glucanase, Journal of Bacteriology, 173, 7705-7710.
- Gunata, Z.Y., Brillouet, J.M., Voirin, S., Baumes, R. ve Cordonnier, R., 1990. Purification and some properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*, Action on grape monoterpenly arabinofuranosyl-glucosides, Journal of Agricultural Food Chemistry, 38, 772-776.
- Gupta, N., Reddy, V.S., Maiti, S. ve Ghosh, A., 2000. Cloning, Expression, and Sequence Analysis of the Gene Encoding the Alkali-Stable, Thermostable Endoxylanase from Alkalophilic, Mesophilic *Bacillus* sp. Strain NG-27, Applied and Environmental Microbiology, 66, 2631-2635.



- Guy, R.C.E. ve Sarabjit, S.S., 2003. Comparison of effects of xylanases with fungal amylases in five flour types, in: Courtin, C.M. vd., (Ed.), *Recent Advances in Enzymes in Grain Processing*, Laboratory of Food Chemistry, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, 235-239 p.
- Gümüsel, F., 2002. *Biyoteknoloji, Genetik ve Sağlık Sektörü, Kocaeli Sanayi İçin Teknolojik Uzgörü Ortak Projesi*, 73-135 s.
- Haarhoff, J., Moes, C.J., Cerff, C., van Wyk, W.J., Gerischer, G. ve Janse, B.J.H., 1999. Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi, *Biotechnology Letters*, 21, 415-420.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R. ve Olsen, G., 1999. Thermal Adaptation Analyzed by Comparison of Protein Sequences from Mesophilic and Extremely Thermophilic *Methanococcus* species, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 3578-3583.
- Harwood, C.R., 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses, *Trends in Biotechnology*, 10, 247-256.
- Heck, J.X., de Barros Soares, L.H., Hertz, P.F. ve Ayub, M.A., 2006b. Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *Biochem. Eng. J.*, 32, 179-184.
- Henrissat, B. ve Bairoch, A., 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *The Biochemical Journal*, 316, 695-696.
- Henrissat, B. ve Coutinho, P.M., 2001. Classification of glycoside hydrolases and glycosyltransferases from hyperthermophiles, *Methods in Enzymology*, 330, 183-201.
- Herbert, R. ve Sharp, R., 1992. *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles*, Blackie & Son Ltd, New York.
- Hespell, R.B. ve Cotta, M.A., 1995. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3042-3050.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: some Applications of Their Products for Biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 735-750.
- Jaenicke, R. ve Böhm, G., 1998. The stability of proteins in extreme environments, *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 738-748.
- Joselleau, J.P., Comtat, J. ve Ruel, K., 1992. Chemical structure of xylans and their and their interaction in the plant cell walls. In: *Xylans and Xylanases* (Visser, J., Beldman, G., Kuster Van Someren, M.A., Voragen, A.G.J. editor), Elsevier, Amsterdam, 1-15 p.

- Kimura, T., Ito, J., Kawano, A., Makino, T., Kondo, H., Karita, S., Sakka, K. ve Ohmiya, K., 2000. Purification, characterization, and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 64, 1230–1237.
- Kirk, O., Borchert, T.V. ve Fuglsang, C.C., 2002. Industrial Enzyme Applications, Current Opinion in Biotechnology, 13, 345-351.
- Kormelink, F.J.M. ve Voragen, A.G.J., 1993. Degradation of different [(glucuruno)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes, Applied Microbiology and Biotechnology, 38, 688-695.
- Krahe, M., Antranikian, G. ve Markl, H., 1996. Fermentation of extremophilic microorganisms, FEMS Microbiology Reviews, 18, 271-85.
- Kristjansson, J.K., 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes, Trends in Biotechnology, 7, 349-353.
- Kristjonsson, J.K. ve Stetter, K.O., 1991. Thermophilic Bacteria, CRC Press, London, 1-13 p.
- Kubata, B.K., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T. ve Horitsu, H., 1995. Xylanase IV, an exoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which produces xylo-tetraose as the only low-molecular-weight oligosaccharide from xylan, Applied and Environmental Microbiology, 61, 1666-1668.
- Kulkarni, N., Lakshmikumaran, M. ve Rao, M., 1999. Xylanase II from an Alkaliphilic Thermophilic *Bacillus* with a Distinctly Different Structure from Other Xylanases: Evolutionary Relationship to Alkaliphilic Xylanases, Biochemical and Biophysical Research Communications, 263, 640-645.
- Kulkarni, N., Shendye, A. ve Rao, M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases, FEMS Microbiology Reviews, 23, 411-456.
- Kumar, H.D. ve Swati, S., 2001. Modern Concepts of Microbiology, Second Revised, Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Kumar, S. ve Nussinov, R., 2001. How do thermophilic proteins deal with heat? Cell and Molecular Life Sciences, 58, 1216-1233.
- La Grange, D.C., Pretorius, I.S. ve van Zyl, W. H., 1996. Cloning of the *Bacillus pumilus* *xylosidase* gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*, Applied Microbiology and Biotechnology, 47, 262-266.
- Lee Y.E. ve Lim, P.O., 2004. Purification and characterization of two thermostable xylanases from *Paenibacillus* sp. DG-22, Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 1014-1021.

- Li, N., Meng, K., Wang, Y., Shi, P., Luo, H., Bai, Y., Yang, P. ve Yao, B., 2008. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9, Applied Microbiology and Biotechnology, 80, 231-240.
- Liab, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim., J.S. ve Eriksson, J.L., 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures, Enzyme and Microbial Technology, 27, 89-94.
- Lopez, G., 1999. DNA supercoiling and temperature adaptation: a clue to early diversification of life, Journal of Molecular Evolution, 46, 439-452.
- M.Ali, K., Rudolph, F.B. ve Bennett, G.N., 2004. Thermostable xylanase10B from *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 31, 229-234.
- M.Banat, I., Marchant, R. ve J.Rahman, T., 2004. *Geobacillus debilis* sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of *Bacillus pallidus* to *Geobacillus pallidus* comb. nov., International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 2197-2201.
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., daSilva, M.J.S., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., van Garcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., van Derhondel, C. ve van Rotterdam, C., 1992. Xylanases and their application in baking In: Xylan and Xylanases, Amsterdam, 349-360 p.
- Makkonen, H.P. ve Nakas, J.P., 2005. Use of xylanase and arabinofuranosidase for arabinose removal from unbleached kraft pulp, Biotechnology Letters, 27, 1675-1679.
- Maniatis, T. ve Fritsch, E.F., 1982. Sambrook, J., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 545 p.
- Marguet, E. ve Forterre, P., 1994. DNA Stability at Temperature Typical for Hyperthermophiles, Nucleic Acids Research, 22, 1681-1686.
- Martinez-Anaya, M.A. ve Jimenez, T., 1997. Functionality of enzymes that hydrolyse starch and non-starch polysaccharide in breadmaking, European Food Research and Technology, 205, 209-214.
- Matte, A. ve Forsberg, C.W., 1992. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85, Applied and Environmental Microbiology, 58, 157-168.
- Medeiros, R.G., Coelho, L.A. ve Filho, E.X.F., 2008. Agricultural Residues as Source for Production of Hemicellulases from *Humicola grisea* var. *thermoidea*, Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology 2, 30-33.

- Medeiros, R.G., Hanada, R. ve Filho, E.X.F., 2003. Production of xylan-degrading enzymes from Amazon forest fungal species, International Biodeterioration & Biodegradation, 52, 97-100.
- McMullan, G., Christie, J.M., Rahman T.J., Banat, I.M., Ternan, N.G. ve Marchant, R., 2004. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*, Biochemical Society Transactions, 32, 214-217.
- Miller, G.L., 1951. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Analytical Chemistry, 426-428.
- Moreau, R.A., Powell, M.J., Whitaker, B.D., Bailey, B.A. ve Anderson, J.D., 1994. Xylanase treatment of plant cells induces glycosylation and fatty acylation of phytosterols, Physiologia Plantarum, 91, 575-580.
- Mozhaev, V., 1993. Mechanism-based Strategies for Protein Thermostabilization, Trends in Biotechnology, 11, 88-95.
- Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R. ve Horikoshi, K., 1993. Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1, Applied and Environmental Microbiology, 59, 7, 2311-2316.
- Nazina, T. N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. ve Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp.nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. Thermodenitrificans*, International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 433-446.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M. ve Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application, Applied Microbiology and Biotechnology, 51, 711-729.
- Orpin, C.G. ve Letcher, A.J., 1979. Utilization of cellulose, starch, xylan and other hemicelluloses for growth by the rumen phycomycete *Neocallinastix frontalis*, Current Microbiology, 3, 121-124.
- Özcan, N., 1996a. Ethidium Bromid Uygulaması ile  $\alpha$ -Amilaz Negatif *Bacillus subtilis* Mutant Suşlarının Oluşturulması ve Karakterizasyonu, Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 11, 4, 87-96.
- Özcan, B.D. ve Özcan, N., 2001. *Bacillus subtilis* RSKK243'e Ait Bifonksiyonel Ksilanaz Geninin *E. coli* ve *B. subtilis*'te Klonlanması ve Enzim Karakterizasyonu, Türk Veterinerlik ve Hayvancılık Dergisi, 25, 881-885.

- Özcan, N. ve Uyarlar, A., 1996. *Bacillus subtilis*  $\alpha$ -Amilaz Geninin *Escherichia coli*'de Klonlanarak Rekombinant  $\alpha$ -Amilaz Enziminin Üretimi, Ç.Ü.Z.F. Dergisi, 11, 4, 175-182.
- Pham, P.L., Taillandier, P., Delmas, M. ve Strehaiano, P., 1998. Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes, Industrial Crops and Products, 7, 195-203.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. ve Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications, Applied Microbiology and Biotechnology, 67, 577-591.
- Puls, J. ve Schuseil, J., 1993. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis, Portland Press, In: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P., Editors, London, 4-5 p.
- Qi Si, J. ve Drost-Lustenberger, C., 2002. Enzymes for bread, pasta and noodle products, Sheffield Academic Press, in: Whitehurst, R.J., Law, B.A. (Eds.), *Enzymes in Food Technology*, Sheffield, 19-56 p.
- Querol, E., Perez-Pons, J.A. ve Mozo-Villarians, A., 1996. Analysis of Protein Conformational Characteristics Related to Thermostability, Protein Engineering, 9, 265-271.
- Rahman, A.K.M.S., Kawamura, S., Hatus, M., Hoq, M. ve Takamizawa, K., 2001. Physicochemical properties of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1, Canadian Journal of Microbiology, 47, 767-772.
- Rani, S. ve Nand, K., 1996. Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes, Enzyme and Microbial Technology, 18, 23-28.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. ve Deshpande, W., 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 597-635.
- Remond, C., Plantier-Royon, R., Aurby, N., Maes, E., Bliard, C. ve O'Donohue, M.J., 2004. Synthesis of pentose containing disaccharides using a thermostable  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, Carbohydrate Research, 339, 2019-2025.
- Rinia, H.A., Boots, J.W., Kik, R.A., Snel, M.M., Demel, R.A., Killian, J.A., van der Eerden, J.P. ve de Kruijff, B., 2002. Domain Formation in Phosphatidylcholine Bilayers Containing Transmembrane Peptides: Specific Effects of Flanking Residues, Biochemistry, 41, 2814-2824.
- Royer, J.C. ve Nakas, J.P., 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*, Enzyme and Microbial Technology, 11, 405-410.

- Sørensen, H.R., Pedersen, S., Viksø-Nielsen, A. ve Meyer, A.S., 2005. Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in industrial ethanol fermentation residue, Enzyme and Microbial Technology, 36, 773-784.
- Sabato, D., Nucci, R., Rossi, M., Gorczynski, I., Gorczynski, Z. ve Lakowicz, J., 1999. The beta-glycosidase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: enzyme activity and conformational dynamics at temperatures above 100 °C, Biophysical Chemistry, 81, 23-31.
- Saha, B.C. ve Bothast, R.J., 1999. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber, Applied Biochemistry and Biotechnology, 76, 65-77.
- Saha, B.C., 2000.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, Biotechnology Advances, 18, 403-423.
- Samain, E., Drouillard, S., Heyraud, A., Driguez, H. ve Geremia, R.A., 1997. Gram-scale synthesis of recombinant chitooligosaccharides in *Escherichia coli*, Carbohydrate Research, 302, 35-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 2 p.
- Sambrook, J. ve Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed., New York.
- Sarıkaya, E., 1995.  $\alpha$ -amilase üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L. ve Engel, P.C., 1998. Protein Thermostability in Extremophiles, Biochimie, 80, 933-941.
- Schallmeyer, M., Singh, A. ve Ward, O.P., 2004. Developments in the Use of *Bacillus* Species for Industrial Production, Canadian Journal of Microbiology, 50, 1-17.
- Schlacher, A., Holzman, K., Hayn, M., Steiner, W. ve Schwab, H., 1996. Cloning and characterization of the gene for the thermostable xylanase XynA from *Thermomyces lanuginosus*, Journal of Biotechnology, 49, 211-218.
- Senes, A., Gerstein, M. ve Engelman, D.M., 2000. Statistical Analysis of Amino Acid Patterns in Transmembrane Helices: The Gxxxg Motif Occurs Frequently and in Association with Beta-Branched Residues at Neighboring Positions, Journal of Molecular Biology, 296, 921-936.
- Sharma, A., Adhikari, S. ve Satyanarayana, T., 2007. Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*, World J. Microbiol. Biotechnol., 23, 483-490.

- Shrinivas, D., Savitha, G., Raviranjana, K. ve Naik, G.R., 2010. A Highly Thermostable Alkaline Cellulase-Free Xylanase from Thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 Suitable for Paper and Pulp Industry: Purification and Characterization, Applied Biochemistry and Biotechnology, 10, 8980-8986.
- Singh, G., Singh, O.P., Yadava, R.A. ve Singh, R.S., 1993. Response of wheat to planting method, seed rate and fertility in late sown condition, Indian Journal of Agronomy, 38, 195-199.
- Spagna, G., Romagnoli, D., Angela, M., Bianchi, G. ve Pifferi, P.G., 1998. Simple method for purifying glycosidases:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine. Part I, Enzyme and Microbial Technology, 22, 298-304.
- Srinivasan, M.C. ve Rele, M.V., 1999. Microbial xylanases for paper industry, Current Science, 77, 137-142.
- Stetter, K.O., 1998. Hyperthermophiles: isolation, classification and properties. In *Extremophiles -Microbial Life in Extreme Environments*. Edited by Horikoshi, K., Grant, W.D., New York: Wiley-Liss, 1-24.
- Subramaniyan, S. ve Prema, P., 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms, FEMS Microbiology Letters, 183, 1-7.
- Subramaniyan, S. ve Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application, Critical Reviews in Biotechnology, 22, 33-64.
- Sun, J.Y., Liu, M.Q., Xu, Y.L., Xu, Z.R., Pan, L. ve Gao, H., 2005. Improvement of the thermostability and catalytic activity of a mesophilic family 11 xylanase by N-terminus replacement, Protein Expression and Purification, 42, 122-130.
- Sunna, A. ve Antranikian, G., 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria, Critical Reviews in Biotechnology, 17, 39-67.
- Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. ve Sasaki, K., 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review, Process Biochemistry, 38, 1327-1340.
- Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 345 s.
- Thomson, J.A., 1993. Molecular Biology of xylan degradation, FEMS Microbiology Reviews, 10, 65-82.
- URL-1, [www.chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood](http://www.chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood) (Anonymes) 14 html. 15 Aralık 2009e.

- Vehmaanpera, J., 1990. Development of *Bacillus* Strains for Industrial Enzyme Production by Gene Technology, Academic Dissertation in General Microbiology, Helsinki.
- Viikari, L., Ranva, M., Kantelinen, A., Sandquist, J. ve Linko, M., 1986. Bleaching with Enzymes, Third International Conference in biotechnology in pulp and paper industry, Stockholm, 67-69 p.
- Voget, S., Steele, H.L. ve Streit, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase, Journal of Biotechnology, 126, 26-36.
- Waino, M. ve Ingvorsen, K., 2003. Production of betaxylanase and beta-xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*, Extremophiles, 7, 87-93.
- Wang, J., Bai, Y., Yang, P., Shi, P., Luo, H., Meng, K., Huang, H., Yin, J. ve Yao, B., 2009. A new xylanase from thermoalkaline *Anoxybacillus* sp. E2 with high activity and stability over a broad pH range, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9, 254-261.
- Wejse, P.L., Ingvorsen, K. ve Mortensen, K.K., 2003. Purification and characterization of two extremely halotolerant xylanases from a novel halophilic bacterium, Extremophiles, 7, 423-431.
- Welch, S.G. ve Williams, R.A.D., 1995. Taq52 I, a novel and thermostable type II restriction endonuclease from the genus *Thermus*, recognising the pentanucleotide sequence GV(A or T) GC and cleaving DNA between the first and second bases of the recognition sequence: G ↓C(A or T)GC, Nucleic Acids Research, 23, 4573-4575.
- Wilkie, K.C.B., 1983. Hemicellulose, Chemical Technology, 13, 306-319.
- Williams, R.A.D., Smith, K.E., Welch, S.G., Micallef, J. ve Sharp, R.J., 1995. DNA relatedness of *Thermus* spp., description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori), International Journal of Systematic Bacteriology, 45, 495-499.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology, Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry, New York, 274-373 p.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. ve Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications, Microbiological Reviews, 52, 305-317.
- Wu, S., Liu, B. ve Zhang, X., 2006. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific, Appl. Microbiol. Biotechnol., 72, 1210-1216.
- Yin, L.J., Lin, H.H., Chiang, Y. ve Jiang, S.T., Bioproperties and Purification of Xylanase from *Bacillus* sp. YJ6, Journal Agricultural and Food Chemistry, 58, 557-562.



- Zhang, H.L., Yao, B., Yuan, T.Z., Wang, Y.R., Cao, S.S. ve Fan, Y.L., 2002. Purification and properties of 43 kD xylanase XYNA from *Streptomyces olivaceoviridis* A1, Journal of Agricultural Biotechnology, 10, 10-14.
- Zhou, F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T. ve Engelman, D.M., 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 2250-2255.
- Zimmerman, W., 1992. Bacterial degradation of hemicelluloses, In Metal Ions in Biological Systems. Vol 28: Degradation of Environmental Pollutans by Microorganisms and their Metalloenzymes, New York, Dekker, 357-398 p.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1985 yılında Ümraniye’de doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi İzmit’te tamamladım. 2002 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimime başlayarak 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladım ve halen devam etmekteyim.