

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK SICAKLIK ve pH'DA AKTİF YENİ BİR KİMERİK KSİLANAZIN  
OLUŞTURULMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Merve TUNÇEL**

**EYLÜL 2014  
TRABZON**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK SICAKLIK ve pH'DA AKTİF YENİ BİR KİMERİK KSİLANAZIN**  
**OLUŞTURULMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**Merve TUNÇEL**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce**  
**“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”**  
**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 09/ 09/ 2014**  
**Tezin Savunma Tarihi : 25/ 09/ 2014**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI**

**Trabzon 2014**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Biyoloji Ana Bilim Dalında**  
**Merve TUNÇEL Tarafından Hazırlanan**

**YÜKSEK SICAKLIK ve pH'DA AKTİF YENİ BİR KİMERİK KSİLANAZIN**  
**OLUŞTURULMASI ve KARAKTERİZASYONU**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 09 / 09 / 2014 gün ve 1569**  
**sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**olarak kabul edilmiştir.**

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ.....**  
**Üye :Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI .....**  
**Üye :Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN .....**

**Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, 8800 kodlu, “Yüksek sıcaklık ve pH’da aktif yeni bir kimerik ksilanazın oluşturulması ve karakterizasyonu” adlı proje kapsamında KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri biriminden sağlanan destekle, Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı’nda “Yüksek Lisans Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Lisansüstü eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek, çalışmaların yürütülmesi sırasında deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan, yardım ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve laboratuvar çalışmalarım sırasında, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e teşekkürü borç bilirim. Ayrıca, çalışmamın her aşamasında benden yardım ve bilgilerini esirgemeyerek yol gösteren Arş. Gör. Dr. Uğur UZUNER’e, Dr. Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Arş. Gör. Halil İbrahim GÜLER’e, Arş. Gör. Fulya AY ŞAL’a, Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN’a, Esmâ CEYLAN’a, tüm Biyoloji Bölümüne ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyip, bugünlere gelmemi sağlayan değerli aileme ve arkadaşlarıma da çok teşekkür ediyorum.

Merve TUNÇEL  
Trabzon, 2014

## TEZ BEYANNAMESİ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Yüksek sıcaklık ve pH’da aktif yeni bir kimerik ksilanazın oluşturulması ve karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’nın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 09 / 09 / 2014

Merve TUNÇEL

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa No</u></b>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	VIII
SUMMARY .....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER DİZİNİ .....	XII
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Termofilik Organizmalar .....	2
1.3. Termofilik Organizmaların Sıcaklığa Adaptasyon Mekanizmaları.....	3
1.4. Termostabil Enzimlerin Önemi.....	4
1.5. <i>Bacillus</i> ve <i>Geobacillus</i> Cinsleri.....	5
1.5.1. <i>Bacillus</i> Cinsi.....	5
1.5.2. <i>Geobacillus</i> Cinsi.....	5
1.6. Ksilanlar .....	5
1.7. Ksilanazlar .....	7
1.8. Farklı Ksilanaz Kaynakları .....	8
1.9. Ksilanazların Endüstriyel Kullanım Alanları.....	10
1.9.1. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisindeki Kullanım Alanları.....	10
1.9.2. Ksilanazın Gıda Endüstrisinde Kullanımı .....	11
1.9.3. Ksilanazın Diğer Endüstriyel Kullanım Alanları.....	12
1.10. Protein Mühendisliği Yaklaşımları .....	13
1.10.1. Rasyonel Dizayn .....	15
1.10.2. <i>De novo</i> Dizayn.....	15
1.10.3. Phage-display Tekniği .....	15
1.10.4. Yönlendirilmiş Mutasyon .....	16
1.10.5. Tesadüfi Mutagenез.....	16

1.10.6.	DNA Shuffling.....	16
1.11.	Çalışmanın Amacı.....	18
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	19
2.1.	Kullanılan Besiyeri, Kimyasal ve Vektörler.....	19
2.2.	Kullanılan Hücreler.....	19
2.3.	Moleküler Çalışmalar.....	20
2.3.1.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16 ve <i>Bacillus halodurans</i> C-125 Suşlarında Ksilanaz Aktivitesinin Tespiti.....	20
2.3.2.	Genomik DNA İzolasyonu.....	20
2.3.3.	Primer Sentezi.....	21
2.3.4.	<i>B. halodurans</i> C-125 Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	21
2.3.5.	<i>B. halodurans</i> C-125 Ksilanaz Geninin pET20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu.....	23
2.3.6.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16 Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	24
2.3.7.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16 Ksilanaz Proteininin Bakteriden Doğrudan Elde Edilmesi.....	25
2.3.8.	Kimerik Genler İçin Primerlerin Dizayn Edilmesi.....	27
2.3.9.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16 ve <i>Bacillus halodurans</i> C-125 Ksilanaz Genleri Kullanılarak Kimerik Genlerin Oluşturulması.....	27
2.3.10.	Kimerik Genlerin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	32
2.3.11.	Kimerik Genlerin pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu.....	32
2.4.	Biyokimyasal Çalışmalar.....	33
2.4.1.	Amonyum Sülfat Çöktürmesi.....	33
2.4.2.	İyon Değişimi Kolon Kromatografisi.....	33
2.4.3.	Protein Konsantrasyon Tayini.....	34
2.4.4.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi.....	35
2.4.5.	Optimum Sıcaklık.....	35
2.4.6.	Optimum pH.....	35
2.4.7.	Enzim Kinetiği.....	35
2.4.8.	Isıl Kararlılığı.....	36
2.4.9.	pH Kararlılığı.....	36
2.4.10.	SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi.....	37

3.	BULGULAR.....	38
3.1.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16, <i>Bacillus halodurans</i> C-125 ve Kimerik Genleri İçeren Suşlarda Ksilanaz Aktivitesinin Tespiti.....	38
3.2.	Moleküler Çalışmalar.....	38
3.2.1.	Primer Sentezi.....	38
3.2.2.	PCR Reaksiyonu ile Ksilanaz Genlerinin Çoğaltılması ve Klonlanması .....	39
3.2.3.	PCR Reaksiyonu ile Kimerik Ksilanaz Genlerinin Çoğaltılması ve Klonlanması .....	40
3.2.4.	<i>B. halodurans</i> C-125, <i>Geobacillus</i> sp. TF16 ve Kimerik Ksilanazların Üç Boyutlu Yapıları.....	41
3.2.5.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16, <i>Bacillus halodurans</i> C-125 ve Kimerik Ksilanaz Genlerinin pET20b(+) ve pET28a(+)’a Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu .....	42
3.3.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16, <i>Bacillus halodurans</i> C-125 ve Kimerik Ksilanaz Enzimlerinin Karakterizasyonu .....	43
3.3.1.	Reaksiyonlarda Kullanılacak Enzim Miktarının Belirlenmesi .....	43
3.3.2.	Optimum Sıcaklık .....	44
3.3.3.	Optimum pH .....	45
3.3.4.	Kinetik İncelemeler.....	47
3.3.5.	Isıl Kararlılığı.....	48
3.3.6.	pH Kararlılığı .....	50
3.3.7.	SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	50
4.	TARTIŞMA .....	51
5.	SONUÇLAR.....	57
6.	ÖNERİLER.....	59
7.	KAYNAKLAR .....	61
8.	EKLER.....	67
	ÖZGEÇMİŞ	



Yüksek Lisans

ÖZET

YÜKSEK SICAKLIK ve pH'DA AKTİF YENİ BİR KİMERİK KSİLANAZIN  
OLUŞTURULMASI ve KARAKTERİZASYONU

Merve TUNÇEL

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI  
2014, 66 Sayfa, 12 Ek Sayfa

Bu çalışmada, *Bacillus halodurans* C-125 ve *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz genleri PCR'la çoğaltıldı. Bu genler PGEMT-Easy vektörüne klonlandı ve sekans analizi yapılarak istenen gene ait diziler oldukları belirlendi. Daha sonra *B. halodurans* C-125 bakterisine ait ksilanaz geni *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET20b(+)'ye aktarıldı. Fakat *B. halodurans* C-125 ksilanazında ekspresyon görülmedi. *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz geni ise pET20b(+) vektörüne aktarılamadığından, ksilanaz proteini bakteriden doğrudan elde edildi. TF16 ksilanazı amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişimi kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. TF16 ksilanaz enzimi optimum pH, optimum sıcaklık ve kinetik parametreler açısından değerlendirildi. Enzimin optimum pH'sı; 9,0, optimum sıcaklığı; 70 °C, *K<sub>m</sub>*; 6,86± 0,615 mg/ml, *V<sub>max</sub>*; 720,24± 22,99 U/mg olarak hesaplandı.

*B. halodurans* C-125 ve *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz genleri kullanılarak DNA shuffling yöntemini temel alan bir yaklaşımla kimerik ksilanaz genleri oluşturuldu. Bu kimerik genler; GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 olarak isimlendirildi. Kimerik genler pET28a(+) ekspresyon vektörüne aktarılarak, *E. coli* BL21 (DE3) suşu içerisinde çoğaltıldı. Aktarım sonucunda GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4'de ekspresyon görülürken, GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2'de ekspresyona rastlanmadı. GeoIntraH2Int3'ün optimum sıcaklığı 60 °C, pH'sı 8,0, GeoIntraH2Int4'ün optimum sıcaklığı 50-60 °C, optimum pH'sı ise 8,0-10,0 olarak bulundu.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus halodurans* C-125, *Geobacillus* sp. TF16, DNA shuffling, Kimerik gen

Master Thesis

SUMMARY

CONSTRUCTION and CHARACTERIZATION OF A NEW CHIMERIC XYLANASE  
ACTIVE AT HIGH TEMPERATURE and pH

Merve TUNÇEL

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI  
2014, 66 Pages, 12 Appendix Pages

In this study, the xylanase genes of *Bacillus halodurans* C-125 and *Geobacillus* sp. TF16 were amplified with PCR. These genes were cloned into the pGEMT Easy cloning vector and the sequences of the genes were revealed. After that the *B. halodurans* C-125 xylanase gene was cloned into pET20b(+) expression vector, but there was no expression in *B. halodurans* C-125 xylanase gene. Because *Geobacillus* sp. TF16 xylanase gene can't transferred into pET20b(+) vector, the protein harvested directly from bacteria. The purification of TF16 xylanase has been performed by ammonium sulphate precipitation and ion-exchange column chromatography. Optimum pH, optimum temperature and kinetic parameters of the enzyme were determined. Optimum pH was 9.0, optimum temperature was 70 °C and  $K_m$ ,  $V_{max}$  values were  $6,86 \pm 0,615$  mg/ml,  $720,24 \pm 22,99$  U/mg, respectively.

Chimeric xylanase genes were constructed from *B. halodurans* C-125 and *Geobacillus* sp. TF16 genes with a method based on DNA shuffling. These chimeric genes were named as GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2, GeoIntraH2Int3 and GeoIntraH2Int4. Chimeric genes were cloned into pET28a(+) expression vector. GeoIntraH2Int3 and GeoIntraH2Int4 were successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3), but there was no expression for GeoInH2CTer and GeoInH2CTer2. Optimum temperature of GeoIntraH2Int3 and GeoIntraH2Int4 were 60 °C, 50-60 °C and optimum pH of them were 8,0 and 8,0-10,0, respectively.

**Key Words:** *Bacillus halodurans* C-125, *Geobacillus* sp. TF16, DNA shuffling, Chimeric gene

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1.	Mısır kabuğuna ait heteroksilan yapısı ..... 6
Şekil 2.	Ksilan parçalayıcı enzimlerin ksilan omurgasındaki etki noktaları..... 8
Şekil 3.	DNA shuffling metodunun şematik gösterimi..... 17
Şekil 4.	GeoInH2CTer kimerik gen oluşumunun şematik gösterimi..... 29
Şekil 5.	GeoInH2CTer2 kimerik gen oluşumunun şematik gösterimi..... 29
Şekil 6.	GeoIntraH2Int3 kimerik gen oluşumunun şematik gösterimi ..... 30
Şekil 7.	GeoIntraH2Int4 kimerik gen oluşumunun şematik gösterimi ..... 30
Şekil 8.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16, <i>B. halodurans</i> C-125 ve kimerik genlere ait agaroz jel görüntüsü ..... 41
Şekil 9.	Ksilanaz proteinlerinin üç boyutlu gösterimi ..... 42
Şekil 10.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16 ksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği ..... 44
Şekil 11.	GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği..... 45
Şekil 12.	GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği..... 45
Şekil 13.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16 ksilanaz enziminin optimum pH grafiği..... 46
Şekil 14.	GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanaz enziminin optimum pH grafiği ..... 46
Şekil 15.	GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz enziminin optimum pH grafiği ..... 47
Şekil 16.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4'e ait Michaelis- Menten grafikleri ve Lineweaver-Burk eğrileri..... 48
Şekil 17.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4'ün ısı kararlılığı grafikleri ..... 49
Şekil 19.	<i>Geobacillus</i> sp. TF16'nın pH kararlılığı grafiği ..... 50
Şekil 20.	İyon değişimi kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılan ksilanaz enzimlerinin SDS-PAGE görünümü..... 51

## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması.....	3
Tablo 2. <i>Bacillus</i> suşlarına ait ksilanazların fizikokimyasal özellikleri.....	9
Tablo 3. Protein mühendisliğinde kullanılan farklı metodlar .....	14
Tablo 4. <i>B. halodurans</i> C-125 ksilanazının primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları.....	22
Tablo 5. <i>B. halodurans</i> C-125 ksilanaz PCR'ının çalışma programı .....	22
Tablo 6. pGEM-T Easy klonlama vektörüne ligasyon için gereken şartlar.....	23
Tablo 7. <i>Geobacillus</i> sp. TF16 ksilanaz primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları .....	24
Tablo 8. <i>Geobacillus</i> sp. TF16 ksilanaz PCR çalışma programı .....	25
Tablo 9. PCR ve klonlama sırasında kullanılan primerlerin listesi.....	26
Tablo 10. Kimerik gen fragmentlerini oluşturmak için kullanılan PCR reaksiyon şartları .....	28
Tablo 11. Kimerik gen fragmentlerinin PCR çalışma programı.....	28
Tablo 12. Kimerik genlerin primersiz PCR reaksiyon şartları.....	31
Tablo 13. Primersiz PCR (Birinci PCR) için cihazın çalışma programı.....	31
Tablo 14. Primerli PCR (İkinci PCR) için cihazın çalışma programı.....	32
Tablo 15. <i>Bacillus halodurans</i> C-125 ksilanaz geninin diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan nükleotit % benzerliği.....	39
Tablo 16. <i>Geobacillus</i> sp. TF16 suşuna ait ksilanaz geninin diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan nükleotit % benzerliği.....	40

## SEMBOLLER DİZİNİ

APS	Amonyum peroksit sülfat
DEAE	Dietilaminoetanol
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNS	3'5 Dinitrosalisilik asit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HisTag	Histidin kuyruğu
IPTG	İzopropil $\beta$ -D-1- tiyogalaktopiranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-bertoni broth
M	Molar
ml	Mililitre
mg	miligram
mM	Milimolar
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodyum dihidrojen fosfat
NEB	New England Biolabs
NB	Nutrient broth
nm	Nanometre
ng	Nanogram
OD	Optik yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Substrat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
V <sub>max</sub>	Maksimum hız
U	Ünite
$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ g	Mikrogram

# 1. GENEL BİLGİLER

## 1.1 Giriş

Reaksiyonları hızlandıran ve kolaylaştıran biyolojik katalizörler olan enzimler, hücreler tarafından genetik kontrol altında hücre içinde sentezlenen organik moleküllerdir (Zaborsky, 1973).

Enzimler, canlı için yaşamsal önemi olan pek çok fonksiyonun kontrolünde rol alırken, bir yandan da organizmada hemen hemen bütün kimyasal tepkimelere katılarak, katalizledikleri reaksiyonlardan da değişmeden çıkarlar. Bu nedenle, her enzim bir biyokatalizördür. Kuramsal olarak enzimler belli bir tepkimeye girip, bir değişikliğe uğramadan çıktıkları için, enzimlerin sürekli olarak aynı türden tepkimelere katılabileceği düşünülmese de gerçekte durum böyle değildir, çünkü enzimlerin de bir ömrü vardır (Sağiroğlu, 1999; Tokgöz, 2013).

Binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde varlığı ve görevi bilinmeden kullanılan enzimlerle ilgili ilk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Yakın tarihte ise Doğu'da birçok gıda fermentasyonu için ipliksi mantarlar enzim kaynağı olarak kullanılırken, Batıda 1896'da gerçek modern mikrobiyal enzim teknolojisi 'takadiastase'ın ticaretinin yapılmasıyla başlamıştır (Smith, 1996).

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 (Cevher, 2010).

Böylelikle endüstriyel boyutta üretimi ve kullanımı giderek önem kazanan enzimler, günümüzde bitkisel ve hayvansal dokulardan ve genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla beraber, daha hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrolünün kolay olması ve üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması gibi nedenlerle mikroorganizmalar ticari enzimlerin üretiminde tercih edilen önemli kaynaklar haline gelmişlerdir (İnce, 2006). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilmektedir (Godfrey ve West, 1996; Aygan, 2008).

Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenlerinin başında; mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve daha ucuz olmaları, büyük miktarlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmalarıdır (Cevher, 2010).

Lignoselülozik materyaller selüloz, hemiselüloz ve lignin olmak üzere üç temel bileşenden oluşmaktadır. Hemiselülozun büyük bir çoğunluğunu ksilanlar oluşturmakla birlikte, arabinan, galaktan ve mannan bileşenlerini de içermektedir. Heteropolisakkarit yapıdaki ksilanın temel bileşenini  $\beta$ -1,4 bağlı monomer ksiloz birimleri olmakla birlikte, arabinoz, mannoz, glikoz ve ramnoz gibi monosakkaritler de yapı oluşumuna katılmaktadırlar (Erdoğan ve Akpınar, 2008).

Biyoteknolojide ve endüstriyel alanlarda ksilanazlar, klor kullanımını en aza indirerek kağıt hamurunun biyobeyazlatılmasında; hayvan yem endüstrisinde hayvanın yemden daha iyi yararlanarak performansını artırarak kilo artışını sağlamada; ekmeğin hacimsel artışında; meyve suyu, bira gibi içeceklerin berraklaştırılması amacıyla gıda endüstrisinde; lignoselülozik materyallerin dönüşümü sonucunda biyoyakıt üretilmesi gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Subramaniyan ve Prema, 2002; Güder, 2014).

## 1.2. Termofilik Organizmalar

Son yıllarda yapılan analizler ve bilgiler ışığında dünya üzerinde yaşayan canlılar arkealar, bakteriler ve ökaryotlar olmak üzere üç ana domain altında toplanmaktadır (Wosse vd., 1990). Termofilik bakteriler genellikle arkea sınıfına aittirler.

1970'li yılların sonunda keşfedilen arkealar, aşırı ısı, aşırı tuz gibi çok ekstrem koşullarda yaşayabilme özelliğine sahiptirler. Çoğu arkea, ekstremofildir. Arkealar tercih ettikleri habitatlarına göre beş gruba ayrılırlar. Bunlar tuzsevenler (halofiller), metanojenler, sülfür indirgeyenler, termofiller ve psikrofillerdir (URL-1).

Bakteriler üreyebildikleri uygun sıcaklıklara göre sınıflandırıldığında ise üç grup altında toplanırlar. Psikrofiller -10 ila 15 °C gibi düşük sıcaklıklarda yaşayabilirken, mezofiller normal ortam sıcaklıklarında (15-50 °C) çoğalabilen bakterilerdir. Termofiller ise genel olarak 50 °C'nin üzerinde yaşayabilen bakterileri kapsayan gruptur (Tokgöz, 2013). Termofilik organizmalar yüksek sıcaklıklarda yaşamaya adapte olup kendi aralarında zorunlu termofiller (45-65 °C) ve ekstremtermofiller (85 °C) şeklinde de ayrılırlar.

Tablo 1. Mikroorganizmaların minimal, optimal ve maksimal üreme sıcaklıklarına göre sınıflandırılması (Arda, 2000).

Mikroorganizma	Minimum °C	Optimum °C	Maksimum °C
Psikrofiller	-5- 5	15-30	19-35
Mezofiller	10-15	30-45	35-47
Fakültatif Termofiller	37	45-55	70
Zorunlu Termofiller	40-45	55-75	60-80
Ekstrem Termofiller	60	75-80	85-110

### 1.3. Termofilik Organizmaların Sıcaklığa Adaptasyon Mekanizmaları

Genellikle ekstrem şartlarda yaşayan termofilik bakteriler, yüksek sıcaklıkta yaşayabilme yeteneğine sahip, oksijen isteklerine göre anaerob veya fakültatif anaerob olabilen, çubuk, disk yada eliptik morfolojilere sahip mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (URL-2). Termofilik bakterilerin yapısında yüksek sıcaklığa uyum sağlamak için bazı yapısal değişiklikler meydana gelmiştir. Bu değişiklikleri de DNA, protein ve hücre membran yapılarında farklı mekanizmalar geliştirerek ortama adaptasyon sağlamışlardır.

Termofilik organizmaların hücresel elemanları (hücre membranı) ve bileşenleri (enzimler, proteinler, nükleik asitler vb.) yüksek sıcaklığa dayanıklıdır (65-85 °C). Termofil bakterilerde DNA giraz (reverse giraz) adı verilen DNA'da pozitif süpersarmallar oluşturan bir enzim bulunur (URL-3). Bu enzim DNA'nın erime noktasını yükselterek, bakteriyi termal denatürasyona karşı daha dirençli hale getirir. Ayrıca DNA'ya bağlanan histon ve histon benzeri proteinler de, DNA'nın yüksek sıcaklıklarda çift zincirli yapıda kalmasında etkilidir (Lopez vd., 1999; Tokgöz, 2013). DNA'larının yanı sıra RNA'larında yapılarında ve nükleotid sıralarında meydana gelen bazı değişikliklerle kararlılık kazanır. Çoğu termofilik organizmanın RNA'larındaki G+C çiftleşmesi fazladır ve bunlarda G-U çiftleşmesi, yanlış eşleşmeler, çıkıntılar ve diğer bazı düzensizlikler görülmez. Bu gibi yapılar mezofillerin RNA'larına esneklik kazandırır. Termofillerin RNA'ları genellikle ilave dizilere sahip değildir ve kısadır. Bu şekildeki daha kısa diziler çıkıntılarının olma



ihtimalini azaltır. Ayrıca baz modifikasyonları ve protein bağlanma bölgelerindeki değişimler RNA'ları kararlı hale getirebilirler (Çanakçı, 2003).

Bunun yanında termofiller non-termotolerant organizmaların kullandığı elektrostatik disülfid köprüsü ve hidrofobik etkileşimler gibi artan etkileşimleri kullanarak yüksek sıcaklıklara tolerans göstermektedirler (Fujiwara, 2002). Tuz köprüleri sayısındaki artışın yanı sıra termofilik bakteri proteinlerinde yüklü aminoasit (Arg, Lys, His, Asp ve Glu) içeriğinde artış görülürken, denatürasyona sebep olan asparagin ve glutamin içeriğinde azalma görülür (Haney vd., 1999).

#### **1.4. Termostabil Enzimlerin Önemi**

Termostabilite, bütün proteinlerde bulunan elektrostatik etkileşimler (hidrojen bağları, iyon çiftleri), hidrofobik etkileşimler ve bazı aminoasitlerin değişimiyle elde edilen birçok küçük yapısal modifikasyonlar ile kazanılan özellikler olarak tanımlanmaktadır (Scandurra vd., 1998). Protein termostabilitesi, hem bilimsel hem de endüstriyel alanlarda büyük öneme sahip olmasına, teorik ve deneysel araştırmaların temelini oluşturmasına rağmen, henüz aydınlatılmamış birçok nokta bulunmaktadır (Vogt vd., 1997). Bu nedenle son yıllarda proteinlerin kararlılığını ve termostabilitesini arttırmaya yönelik pek çok çalışma yapılmaktadır.

Termofilik mikroorganizmaların hücre bileşenlerinin termal kararlı olmalarının yanında, aşırı derecede asidik ve alkali şartların denatürasyonuna karşı da dirençli olmaları biyoteknolojik önemlerinin günden güne artmasına neden olmaktadır (Haki ve Rakshit, 2003). Termofillerden elde edilen termostabil enzimlerin, mikroorganizmaların gelişme sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda bile kararlı oldukları ve termofil enzimlerinin daha sağlam oldukları Sabato ve ark. (1999) tarafından belirlenmiştir.

Yüksek sıcaklıklarda polimerik substratların çözünürlüklerinin artması ve istenmeyen komplikasyonlara yol açan kontaminasyon riskinin yüksek sıcaklıklarda azalması gibi nedenler dolayısıyla da biyoteknoloji ve endüstride termofilik organizmaların kullanımı artmıştır (Gül-Güven, 2004).

## 1.5. *Bacillus* ve *Geobacillus* Cinsleri

### 1.5.1 *Bacillus* cinsi

*Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Carl Woese tarafından Eubakteri domaini içerisine dahil edilmiştir (Woese 1999; Tekin, 2008). *Bacillus* cinsi Gram pozitif, spor oluşturabilen, çubuk şeklinde, aerob veya fakültatif aerob, katalaz pozitif mikroorganizmalardır (Claus ve Berkeley, 1986).

### 1.5.2. *Geobacillus* Cinsi

*Geobacillus* cinsi, önceleri *Bacillus* cinsi içerisinde yer alırken, yapılan fizyolojik ve genetik araştırmalar ışığında farklı bir cinse ait olduğu ortaya çıkmıştır. Bu cins Nazina ve ark. tarafından 2001 yılında bakteri sistematığıne kazandırılmıştır.

Bu cinse ait bakteriler Gram pozitif, aerobik veya fakültatif aerobik, hareketli, endosporlu ve termofilik bakterileri içermektedir. Bu cinsin üyeleri, dünya üzerinde termofilik ve mezofilik coğrafik bölgelerde geniş yayılım gösterirler (McMullan vd., 2004; Cevher, 2010).

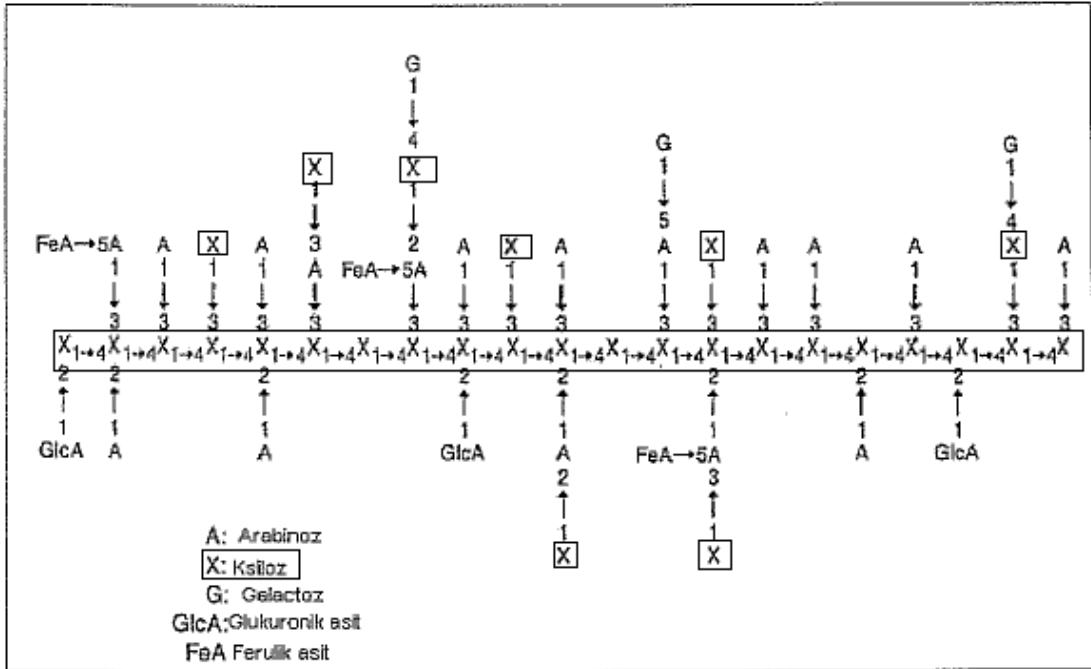
*Geobacillus* cinsini *Bacillus* cinsinden ayıran en önemli özellik 16S rRNA gen sıralarıdır. 16S rRNA gen dizin analizlerini temel alan çalışmalara göre, *Geobacillus* cinsi ile *Bacillus* cinsi üyeleri arasında % 95'den daha az bir benzerlik bulunmaktadır. Fakat *Geobacillus* cinsi kendi üyeleri arasındaki 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 (Banat, 2004; Cevher, 2010).

## 1.6. Ksilanlar

Doğadaki temel depolanmış karbon kaynağını içeren bitki hücre duvarları, selüloz ( $\beta$ -1,4-glukan'dan oluşan çözünmeyen fibriller), hemiselüloz (mannan ve ksilan gibi selülozik olmayan polisakkaritler) ve ligninden oluşmaktadır. Bu yapılar genel olarak lignoselüloz olarak isimlendirilmektedir (Thomson, 1993; Altun, 2012).

Hemiselüloz, tabiatta selülozdan sonra en yaygın bulunan polisakkarit olup lignoselülozik yapıda kuru ağırlığın % 22'sini oluşturur (Biely, 1984; Puls ve Schseil, 1993). Hemiselülozların yapısını oluşturan temel polisakkaritlerden olan ksilanlar, selüloz ve lignin ile beraber bitki hücre duvarlarının ana kompozisyonunu oluştururlar. Ksilanın ya da hemiselülozun lignin ve selüloz arasına yerleşmesi selülozun bütünlüğünün devamı ve selülaz degradasyonuna karşı liflerin korunması açısından önemlidir (Beg vd., 2001; Cevher, 2010).

Esas olarak  $\beta$ -1,4 bağlı D-ksilopiranoz ünitelerinden oluşmuş olan ksilanlar, çoğunlukla zincir yapıda farklı gruplar içeren, çok dallanmış polimerik heteropolisakkaritlerdir (Beg vd., 2001; İnce, 2006). Asetil, arabinozil, galaktozil ve glukuronozil grupları ksilanın omurgasını oluşturan temel yapıya bağlı gruplardan en yaygın olanlarıdır (Wong vd., 1988; Beg vd., 2001; İnce, 2006) (Şekil 1). Ksilan, esparto çimeni ve tütünde homoksilan olarak bulunur. Bundan başka, bazı deniz alglerinde  $\beta$ -1,3 bağlı ksiloz omurgasına sahip olan ksilanların bulunduğu; çimenlerde ve yıllık bitkilerdeki ksilanın ise arabinoksilan yapısında olduğu bildirilmiştir (Beg vd., 2001). Ksilan bunun dışındaki bütün bitkilerde heterojen yapıdadır.



Şekil 1. Mısır kabuğuna ait heteroksilan yapısı (Saha, 2000; Cevher, 2010)

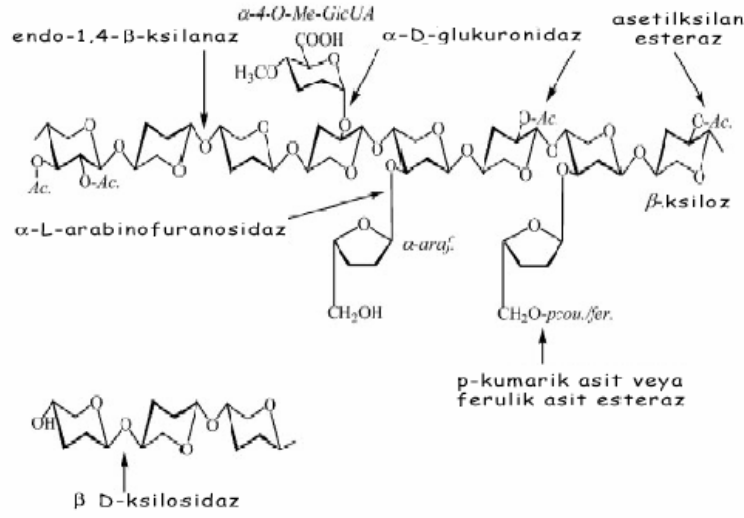
Ksilanların yapısı, yumuşak odundan sert oduna ve bitki türlerine göre değişiklik göstermektedir (Seyis, 1997). Sert odunlarda ksilan oranı toplam kuru ağırlığın % 15- 30'u arasında ve 'asetil-4-o-metilglukuronoksilan' yapısındadır. Yapıda asetil grupların olması, suda çözünürlüğü etkilemektedir ve alkali ile ekstraksiyonla asetil grupları giderilebilmektedir (Beg vd., 2001; İnce, 2006). Yumuşak odunlarda, ksilan oranı daha azdır ve toplam kuru ağırlığın % 7-12'si kadardır. Yumuşak odun ksilanı, 'arabino-4-o-metilglukuroksilan' ünitelerinden oluşmuştur, yumuşak odun ksilanı sert odun ksilanlarından daha çok 4-ometilglukuronik asite sahiptirler (Wong vd., 1988, Seyis, 1997; İnce, 2006). Ayrıca yumuşak odun ksilanları sert odun ksilanlarından daha kısa zincirli ve daha az dallanmışlardır (Beg vd., 2001).

### 1.7. Ksilanazlar

Ksilanaz enzimleri, ksilandaki  $\beta$ -1,4-D-ksilozidik bağlarını zincirin iç kısımlarından hidrolizleyen glikosidazlardır (o-glikozid hidrolazlar; E.C. 3.2.1). Aminoasit benzerliklerine bakıldığında, ksilanazların glikozil hidrolaz 10 ve 11 ailesine ait olduğu görülür (Shibuya vd., 2000). Bunlar, hücre metabolizması için karbon kaynağının sağlanmasında ve bitki patojenlerince bitki hücresinin enfeksiyonunda gerekli olan enzimlerdir ve doğada yaygın olarak bulunurlar (Collins vd., 2004; İnce, 2006).

Ksilanın kompleks yapısı sebebiyle hidrolizinde pek çok farklı enzim görev alır. Ksilan parçalayıcı enzimlerinden bazıları şunlardır (Gilbert ve Hazlewood 1993; Collins vd., 2004; İnce, 2006) (Şekil 2);

- $\beta$ -1,4-endoksilanazlar ( $\beta$ -1,4-D-ksilanazlar;  $\beta$ -1,4-D-ksilan ksilanohidrolazlar; E.C. 3.2.1.8),
- $\beta$ -D-ksilozidazlar ( $\beta$ -1,4-D-ksilozid ksilohidrolazlar; E.C.3.2.1.37 ),
- $\alpha$ -L-arabinofuranosidazlar (E.C. 3.2.1.55),
- $\alpha$ -D-glukuronidazlar (E.C. 3.2.1.139 ),
- Asetil-ksilan esterazlar (E.C.3.1.1.72)
- Ekzo- $\beta$ -1,4-ksilanazlar ( $\alpha$  - 1,4-D-ksilan ksilohidrolazlar ).



Şekil 2. Ksilan parçalayıcı enzimlerin ksilan omurgasındaki etki noktaları (Collins vd., 2004).

Bu enzimlerden en önemlisi  $\beta$ -1,4-endoksilanazlar'dır. Endoksilanazlar, ksilan omurgasındaki iç glikozid bağlarını hidroliz eder ve ksilan ana iskeletindeki  $\beta$ -1,4 bağımlı kırarak ksilooligosakkaritleri üretir. Bu oligosakkaritler de daha sonraki hidroliz sürecinde  $\beta$ -1,4-ksilosidaz enzimi ile D-ksiloza dönüştürülür (Cevher, 2010). Ekzoksilanazlar ise endoksilanazların etkisi sonucunda oluşan ksilooligosakkaritleri hidrolize ederler ve bu yolla ksilanın hidroliz oranı yükseltilmiş olur (Wong vd., 1988). Asetil ksilan esteraz,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidaz,  $\alpha$ -D-glukuronidaz ve galaktozidazlar ise ksilanın yan gruplarını ana zincirden kopartarak serbest kalmalarını sağlar (Aygan, 2008; Altun, 2012).

### 1.8. Farklı Ksilanaz Kaynakları

Ksilanazların en önemlilerinden olan endoksilanaz enzimi, genel olarak bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmalar tarafından üretilir. Ksilanazların; L-sorboz, bazı ksilooligosakkaritler, ksiloz ve lignoselüloz birimleri gibi bileşiklerle indüklendikleri ve bakteriler, funguslar, protozoalar, algler, karındanbacaklılar ve antropodları da içine alan bir grup organizma tarafından üretildikleri bildirilmiştir (Beg vd., 2001).

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 bilinmektedir (Cevher, 2010). Ksilanaz üreten birçok ksilanolitik mantar (*Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp.) ve bakteri türleri (*Bacillus* spp.) tanımlanmıştır. *Thermomyces lanuginosus* (Schlacher vd., 1996), *Clostridium thermocellum* (Royer vd., 1989) ve aktinomiset *Thermomonaspora alba* (Blanco vd., 1997) tarafından üretilen termofilik ksilanazlar da bulunmaktadır.

Endüstriyel fermentasyonlarda kullanım yaygınlığı açısından en çok çalışılan bakteriyel ksilanaz üreticisi Bacillacea'dır (Pham vd., 1998) (Tablo 2). Bacillacea fermentasyonlarından yüksek miktarda ksilanaz üretimini sağlamak, bu mikroorganizmanın endüstriyel uygulamalarda kullanımını açısından önemlidir.

Tablo 2. *Bacillaceae* familyasına ait ksilanazların fizikokimyasal özellikleri (Cevher, 2010).

<i>Mikroorganizma</i>	<i>Mw (kDa) (SDS-PAGE)</i>	<i>Opt. Sıcaklık</i>	<i>Opt. pH</i>
<i>Bacillus halodurans</i> C-125 (Akita ve ark., 2005)	31 kDa	60 °C	6.0- 8.0
<i>Geobacillus</i> sp. 7 <sub>1</sub> (Cevher, 2010)	45 kDa	70 °C	7.5
<i>Anoxybacillus</i> sp. E <sub>2</sub> (Wang ve ark., 2009)	38.8 kDa	65 °C	7.8
<i>Geobacillus</i> sp. MT-1 (Wu ve ark., 2006)	62 kDa	70 °C	7.0
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> (Sharma ve ark., 2006)	–	70 °C	7.0
<i>Bacillus</i> sp. C-14 (Aygan, 2008)	61 kDa	50 °C	11.0
<i>Bacillus circulans</i> BL53 (Xandro Heck ve ark., 2006)	22-45 kDa	40-80 °C	5.0- 8.0
<i>Bacillus</i> sp. (Kim ve ark., 2005)	80 kDa	50 °C	10.0
<i>Bacillus subtilis</i> B10 (Huang ve ark., 2005)	–	50 °C	6.0
<i>Bacillus sphaericus</i> JS1 (Singh ve ark., 2004)	42 kDa	60 °C	8.0
<i>Bacillus</i> sp. BP-7 (Gallardo ve ark., 2003)	24 kDa	60 °C	6.0
<i>Bacillus</i> sp. KSM- N252 (Endo ve ark., 2001)	50 kDa	55 °C	10
<i>Bacillus</i> spp. CH43	40 kDa	65 °C	5.0- 6.5

## 1.9. Ksilanazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Pek çok enzimin hücre içinde üretildikten sonra hücre dışına salındığında da çalışmaya devam etmesi, enzimlerin endüstriyel uygulamalarda da kullanılabilceği fikrini doğurmuştur. Özellikle mikroorganizmalardan elde edilen ksilanolitik enzimler, birçok endüstriyel işlemlerde biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur.

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkalın proteaz % 25, diğer proteazlar % 21, amilaz % 18, Renin % 10, Trypsin % 3, Lipaz % 3, diğer karbonhidrat parçalayıcı enzimler (selülaz ve ksilanaz gibi) % 10, analitik ve farmasötik enzimlerin % 10 'unu oluşturduğu görülmüştür (Rao vd., 1998) .

Mikrobiyal ksilanazlar, biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı birçok endüstriyel alanda büyük bir ilgi odağı olmuştur. Bilindiği gibi ksilanazlar endüstrinin çeşitli alanlarında kullanım alanı olan enzimler olup aynı zamanda termofilik karakterli olanlarına ilgi ise gün geçtikçe artmaktadır. Bu alanları şu şekilde sıralamak mümkündür:

### 1.9.1. Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisindeki Kullanım Alanları

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde enzimatik uygulamalar 1980'den sonra başlamış, kağıt hamuru ve kağıt üretimini geliştirmek için sellobiyohidrolaz, endoglukanaz, endoksilanaz, endomannanaz, galaktanaz, poligalakturonaz vb. gibi pek çok farklı enzimin kullanılabilceği; ksilanazların kağıt hamurunun ağartılmasında uygulanabildiği açıklanmıştır (Aehle, 2004).

Kağıt hamurundan ligninin giderilmesi ile yapılan ağartma işlemi genel olarak klor ve hipoklorit (klor dioksit) gibi kimyasallar ile yapıldığından, bu tür kimyasalların kullanımı sonucu oluşan klorlanmış organik bileşiklerin toksik, mutajenik ve karsinojenik gibi çok sayıda tehlikeleri olduğu bildirilmiştir. Kağıt endüstrisinde ağartma amacıyla klor yerine ksilanazların kullanımının, kağıt hamurlarından ligninin ayrılmasını kolaylaştırdığı ve bu yolla çok daha az klor kullanımının sağlandığı saptanmıştır (Beg vd., 2001).

Kağıt hamuru ürünü, artan lignin ve lignin bileşenleri içerdiğinden kahverengi renktedir. Hamur renginin yoğunluğunu artan ligninin miktarı ve kimyasal durumu belirler. İmal edilen kağıtların iyi kalitede, beyaz ve daha parlak renkte kağıt hamuruna dönüştürülebilmesi için lignin veya bileşenlerini meydana getiren ürünleri uzaklaştırmak

gerekir. Kağıt hamurunu biyolojik olarak 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 oksidantlar aracılığıyla artan ligninin uzaklaştırılması kolaylaşır (Subramaniyan vd., 2002). Ksilanazın kağıt hamurunun ağartılabilirliği üzerine etkisinin, pek çok durumda enzimin orijininden bağımsız olduğu ve hem fungal hem de bakteriyel ksilanazların kağıt hamuru ksilanı üzerine etki ettiği ve bu etkinin kağıt ağartılabilirliğini arttırdığı ifade edilmiştir (Aehle, 2004).

Ksilanazlar günümüzde endüstriyel olarak uygulanan hem ECF (Elemental Chlorine Free) hem de TCF (Totally Chlorine Free) denilen ağartma yöntemlerinde kullanılmaktadır. TCF uygulaması ile kağıt parlaklığının arttığı, lif uzunluğunun korunduğu ve ağartma masraflarında azalma olduğu belirtilmiştir (Aehle, 2004). Son zamanlarda, enzimlerle birlikte O<sub>2</sub> (oksijen), O<sub>3</sub> (ozon) veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit)'in de kullanıldığı TCF ağartma yöntemleri geliştirildiği bildirilmiştir.

Kağıt endüstrisinde ksilanazlar, ağartma dışında farklı saflıktaki selüloz hamurlarının ve kağıt ürünlerinin üretiminde de kullanılabilir. Selülozun saflaştırılmasında ksilanazların uygulanabilirliğinin; enzimlerin yapısal seçiciliği, selüloolitik aktivitelerinin olmayışı ve enzim preparatlarının büyük hacimlerde ve ucuz olarak elde edilebilirliklerine bağlı olduğu ifade edilmiştir. Kağıt endüstrisinde etkili enzim kullanımını arttırmak için, daha etkili ksilanaz üreten suşları ve teknolojileri uygun bir şekilde bir araya getirerek, hem çevresel hem de ekonomik olarak avantaj sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Kulkarni vd., 1999; İnce, 2006).

### **1.9.2. Ksilanazın Gıda Endüstrisinde Kullanımı**

Ksilanazlar bu endüstride en çok fırıncılıkta kullanılmaktadır ve unda bulunan, suda çözünmeyen hemiselülozu çözünür hemiselüloza dönüştürdüğü; çözünür hemiselülozun ise hamurda ağırlığının yaklaşık 10 katı su bağladığı ve bu yolla hamurun sağlamlığını arttırdığı, makineye yapışmasını önlediği bilinmektedir. Ksilanaz ilave edilmiş hamurla yapılan ekmeklerin somun hacminin arttığı, daha yumuşak ekmek elde edilebildiği, tazeliğin de uzun süre korunduğu saptanmıştır (Kulkarni vd.,1999; Beg vd., 2001).



Ksilanazın ekmek kalitesine etkisinin amilaz ile kombine olarak kullanıldığında daha da arttığı belirlenmiştir (Beg vd., 2001).

Kraker hamurunda ise ksilanazların hamurun su bağlamasını azalttığı, makinede işlenebilirliği daha az suyla geliştirdiği ve fırınlama ya da kurutma zamanını kısalttığı (İnce, 2006), ayrıca bazı gıdalarda tekstür oluşturucu olarak kullanılan dekstran preparatlarının hazırlanmasında da kullanılabilirliği bilinmektedir (Hongpattarakere, 2002).

### **1.9.3. Ksilanazın Diğer Endüstriyel Kullanım Alanları**

1. Ksilanazlar meyve suyu şarap ve biranın berraklaştırılmasında (Kulkarni vd.,1999; Beg vd., 2001); aroma ve tat bileşenlerinin, pigmentlerin, bitkisel yağların, nişastanın ve kahvenin ekstraksiyonunda (Kulkarni vd., 1999) kullanılabilir.

2. Bununla birlikte, buğday ve arpa nişastalarından glutenin ayrılmasında (İnce, 2006) bazı tarımsal ürünlerin ve hububatların besin değerini arttırmada (Beg vd., 2001), antimikrobiyal ajanlar veya antioksidantlar olarak kullanımda farmakolojik olarak aktif polisakkaritlerin üretiminde (Collins vd., 2005), sürfaktantlar olarak kullanılmak üzere alkil glikozidlerin üretiminde (Beg vd., 2001; Collins vd., 2005), tarım ve gıda endüstrisinde atık arıtımında (Wong vd., 1988; Gilbert ve Hazlewood, 1993), bitkisel hücre protoplastlarının elde edilmesinde ksilanaz enzimlerinden yararlanıldığı ifade edilmiştir.

3. Meyve ve sebzelerin sıvılaştırılması (eritilmesi) ve meyve sularının berraklaştırılması amacıyla pektinaz ve selülaz ile birlikte aynı anda kullanılır. Ayrıca kompostlamayı ve ruminantların beslenmesinde sindirimi artırmak amacıyla yem bitkilerinin ön işleminde kullanılmaktadır (Gilbert ve Hazlewood, 1993; Cevher, 2010).

4. Yukarıda açıklanan kullanım alanlarına ek olarak ksilanazların; deterjan endüstrisinde deterjanların temizleme etkilerini arttırmada, tarımsal atıkların biyo-dönüşüm işlemlerinde, lignoselülozdan hidrolizle basit şekerlerin elde edilmesinde ve bu şekerlerden fermentatif mikroorganizmalar aracılığıyla sıvı yakıt, tek hücre proteini ve sitrik asit, fumarik asit, glikolaldehit, izopropil alkol gibi çeşitli kimyasalların üretiminde ve çeşitli amaçlarla tekstil endüstrisinde kullanıldığı belirtilmiştir (İnce, 2006).

### **1.10. Protein Mühendisliği Yaklaşımaları**

Protein mühendisliği, yeni ve istenen özelliklere sahip proteinlerin veya enzimlerin düzenlenmesini sağlar. İstenecek özelliklere sahip moleküllerin meydana getirildiği bu alan protein mühendisliği olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ve yüksek verimli tarama tekniklerindeki gelişime bağlı olarak, protein mühendisliği metod ve uygulamaları aşırı derecede önemli ve yaygın hale gelmiştir. Biyolojik bilimlerdeki hızlı gelişim sonucunda birçok protein mühendislik metodu mevcuttur.

Tablo 3. Protein mühendisliğinde kullanılan farklı metodlar (Turanlı-Yıldız vd., 2012)

Metod ismi	Referans (lar)
Rasyonel dizayn	(Arnold, 1993)
Bölge hedefli mutagenез	(Arnold, 1993), (Antikainen ve Martin, 2005)
Evrimsel metodlar/ doğrudan evrim	(Arnold, 1993)
Tesadüfi mutagenез	(Antikainen ve Martin, 2005), (Wong vd., 2006), (Jackson vd., 2006), (Labrou, 2010)
DNA shuffling	(Antikainen ve Martin, 2005), (Jackson vd., 2006)
Moleküler dinamikler	(Anthonsen vd., 1994)
Homoloji modelleme	(Anthonsen vd., 1994)
'MolCraft' <i>in vitro</i> protein evolüsyon sistemleri	(Shiba, 2004)
Computational metodlar (Computational protein dizaynı)	(Jackson vd., 2006), (Van der Sloot vd., 2009), (Golynskiy ve Seelig, 2010)
Reseptör-temelli QSAR metodları	(Lushington vd., 2007)
NMR	(Anthonsen vd., 1994)
X-ray kristallografisi	(Jackson vd., 2006)
Peptidomimetiks	(Venkatesan ve Kim, 2002)
Phage display teknolojileri	(Antikainen ve Martin, 2005), (Sidhu ve Koide, 2007), (Chaput vd., 2008)
Hücre yüzeyi display teknolojileri	(Antikainen ve Martin, 2005), (Gai ve Wittrup, 2007), (Chaput vd., 2008)
Flow sitometri/ Cell sorting	(Mattanovich ve Borth, 2006 )
Cell-free translasyon sistemleri	(Shimizu vd., 2006)
Designed divergent evolüsyon	(Yoshikuni ve Keasling, 2007)
Uyaran-tepki peptit sistemleri	(Chockalingam vd., 2007)
Elastomerik proteinlerin mekanik mühendisliği	(Li, 2008)
Ekstraselüler matriks varyantları mühendisliği	(Carson ve Barker, 2009)
Traceless Staudinger ligasyonu	(Tam ve Raines, 2009)
<i>De novo</i> enzim mühendisliği	(Golynskiy ve Seelig, 2010)
mRNA display	(Golynskiy ve Seelig, 2010)

Protein mühendisliğindeki yaklaşımlar genel olarak altı grupta toplanmaktadır: Bunlar; rasyonel dizayn, *de novo* dizayn, phage-display tekniği, yönlendirilmiş mutasyon, tesadüfi mutagenез ve DNA shuffling'dir.

### **1.10.1. Rasyonel Dizayn**

Rasyonel dizayn, yapı ve fonksiyon arasındaki ilişkiden yararlanılarak bölge spesifik mutasyon gerçekleştiren bir metoddur. Bölge hedefli mutagenез en bilinen metodlardan birisidir. Rasyonel dizayn (rational design) metodu, proteinin yapısı ve mekanizması tam olarak bilindiğinde daha etkili olan bir yaklaşımdır. Fakat çoğu durumunda, proteinin mekanizması ve yapısı hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bu yüzden, istenen protein özellikleri için tesadüfi mutagenезi de içeren evrimsel metotlar kullanılarak alternatif metotlar geliştirilmiştir (Arnold, 1993).

### **1.10.2. *De novo* Dizayn**

Bu metodda, yapay olarak katlanmış proteinler oluşturulur ve yeni aktiviteler bu proteine aktarılır. *De novo* dizayn metodunda; enzimler herhangi bir protein ailesi substratıyla veya reaksiyon mekanizmasıyla ilişkili değildir. *De novo* enzimleri; in silico rasyonel düzenleme, katalitik antibadiler aracılığıyla immün sistem çeşitliliği ve reaksiyon mekanizmasının anlaşılmasını sağlar ve mRNA display yöntemi kullanılarak büyük protein kütüphanelerinin ampirik araştırmasının yapılmasını mümkün kılar (Golynskiy ve Seelig, 2010).

### **1.10.3. Phage-Display Tekniği**

Bu yöntemde ise bakteriyofaj genomlarından kütüphane meydana getirilir. Daha sonra bakteriyofaj yüzeyi ekspres edilen proteinler ile muamele edilir. Bu bakteriyofajlar, bağlama ya da enzimatik yöntemler ile taranır. Faj display teknolojisi; özellikle sentetik bağlanma proteinlerinin üretilmesinde kullanılır. Sentetik bağlanma proteinlerden oluşan kütüphaneler, insan yapımı antijen bağlanma bölgelerinden geliştirilmiştir. Faj display teknolojisine benzer olan yeast surface display tekniği, protein mühendisliği ve karakterizasyonu için oldukça kullanışlı bir metoddur. Bu metot kullanılarak maya sekretuar (salgı) biyosentetik sisteminin etkili bir şekilde N-linked glikolizasyon ve oksidatif protein katlanmasını teşvik edilebilir. FACS analiziyle hızlı bir kütüphane taraması yapılır ve proteinlerin saflaştırılması ve ekspresyonu gerekmeden mutantların

karakterizasyonun yapılması bu metodun en önemli avantajıdır (Zaccolo ve Malavasi, 1993).

#### **1.10.4. Yönlendirilmiş Mutasyon**

Yönlendirilmiş mutasyon da ise her mutasyondaki en iyi özelliklere sahip olan varyantlar seçilerek mutagenез ya da DNA shuffling'te kullanılması yoluna gidilir.

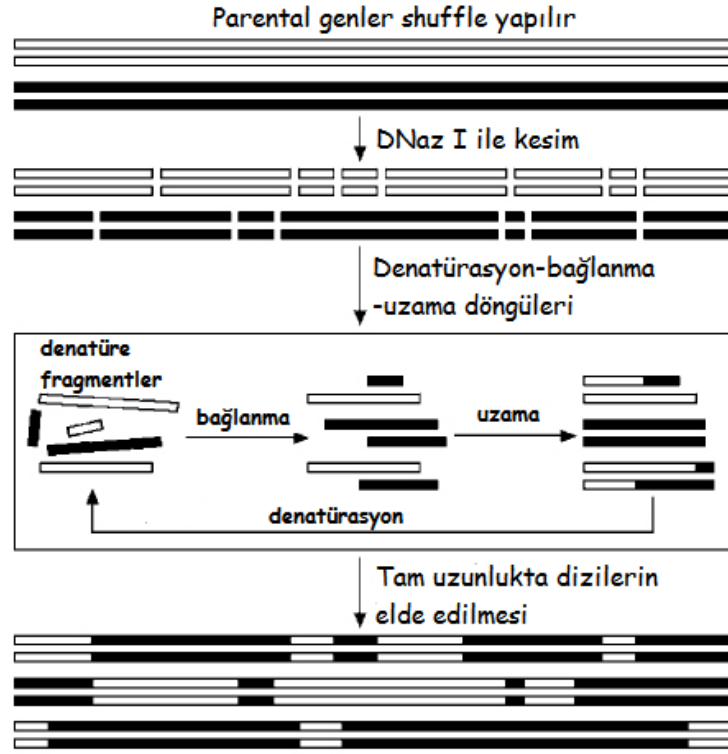
#### **1.10.5. Tesadüfi Mutagenез**

Hataya meyilli PCR ve mutator suşlar kullanılarak özel bölgeleri bir araya getiren evrensel bir metottur. Tesadüfi mutagenезdeki yaygın ve basit bir metot, saturasyon mutagenезidir. Saturasyon mutagenезi; spesifik bir bölgede ya da genin küçük bir kısmında tüm muhtemel mutasyonları oluşturmak için kullanılan bir tekniktir. Diğer bir metot olan lokalize ya da bölge spesifik tesadüfi mutagenез ise, protein mühendisliğindeki rasyonel ve tesadüfi yaklaşımların bir kombinasyonudur. Bu teknik; yeni özelliklere sahip proteinler elde etmek için spesifik bir bölge içindeki birkaç amino asitin eşzamanlı olarak yer değiştirmesini sağlar (Antikainen ve Martin, 2005).

#### **1.10.6. DNA Shuffling**

Bu metodda, bir protein ailesindeki üyeler arasında *in vitro* rekombinasyon meydana getirme temeline dayanır. DNA shuffling W.P.C. Stemmer tarafından keşfedilen, homolog genlerin *in vitro*'da rekombinasyonunu içeren bir metoddur. Bu teknikle genler rekombine edilerek hibrit ya da kimerik formlar elde etmek mümkündür. DNA shuffling metodunun kullanılmasıyla, hiçbir orijinal sekansın kodlamadığı eşsiz özellikler ya da aktiviteler gösteren genler elde edilebilir. Ayrıca, hibrit proteinlerin bazılarında orijinal proteinlerin iki ya da daha fazla özelliğini bir araya getirilebilir; örneğin, yüksek aktivite ve termostabilite gibi. Bu metodda; genler rekombinasyon oluşturmak için DNaz I tarafından tesadüfi olarak parçalara ayrılır ve farklı büyüklükteki fragmentler agaroz jelden çıkarılarak elde edilir.

Fragmentler saflaştırılır ve termostabil bir DNA polimeraz varlığındaki PCR'da yeniden bir araya getirilir. Bu PCR fragmentleri primer olarak kullanılır. Bu aşamaya primersiz PCR da denir ve bundan sonra oligonükleotid primerlerine ihtiyaç yoktur. Rekombinasyon yüksek sekans benzerliği olan bir bölgede, farklı gen ailelerinden gelen fragmentler olduğu zaman gerçekleşir. Bu yeniden bir araya gelme reaksiyonunu takiben, primerlerle yapılan PCR, bir ekspresyon vektörünün içine klonlanabilecek uzunlukta (full-length) uygun kimeralar üretmek için kullanılır (Antikainen ve Martin, 2005).



Şekil 3. DNA shuffling metodunun şematik gösterimi. Parental genler bir fragment havuzu oluşturmak için DNaz I kullanılarak tesadüfi olarak kesilir. Bu fragmentler özel bir termocycling metoduna sahip PCR tekniği kullanılarak bir araya getirilir. Fragmentler yüksek sıcaklıklarda denatüre edilip, ardından diğer fragmentlerle uzama yapılmasına izin verilir. Bu uzama aşamalarının bazılarında, iki homolog aileden gelen fragmentler heterodupleks meydana getirebilir. 3' uçlar bağlandıktan sonra polimerazla uzama gerçekleştirilir. 20-50 döngüden sonra tam uzunlukta diziler elde edilir.

### **1.11. Çalışmanın Amacı**

Gerçekleştirilen çalışmada, ısı kararlı ksilanaz aktivitesi gösteren bir bakteri ile alkalın pH kararlı ksilanaz aktivitesi gösteren bir bakterinin ilgili gen bölgelerinin DNA shuffling benzeri bir metod ile bir araya getirilmesi ve bu sayede yüksek sıcaklık ve pH'da aktif olan yeni bir ksilanaz enziminin üretilmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede, endüstriyel alanda oldukça geniş bir kullanıma sahip olan ksilanaz enziminin aynı anda hem yüksek sıcaklıkta hem de alkalın pH ortamında aktif olacak şekilde geliştirilmesi ve geliştirilen bu enzimin endüstrinin birçok alanında istenilen özelliklere kavuşturulması planlanmıştır.

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Besiyeri, Kimyasal ve Vektörler

*BamHI* (Thermoscientific), *EcoRI* (NEB), *NotI* (Promega), *NcoI* (Promega), *XhoI* (Promega), T4 DNA Ligaz (Promega), Taq DNA polimeraz (Fermentas), Pfu DNA polimeraz (NEB), DNA ladder (NEB), Protein ladder (NEB), Genomik DNA İzolasyon Kiti (Promega A1125), Tripton (Merck V441613949), Yeast Ekstrakt(Merck VM175053), NaCl (Merck K34243404), Etil alkol, IPTG (Applichem A1008), Ampisilin (Applichem A0839), Jelden Çıkarma Kiti (Fermentas K0513), EDTA (Merck 84211000), dNTP seti (Promega), pGEM-T Easy Klonlama Kiti (Promega A1360), pET20b(+) Ekspresyon Vektörü, CaCl<sub>2</sub> (Aktar Kimya), X-Gal (Applichem A10070005), NaHCO<sub>3</sub> (Merck), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck), Commassie Brillant Blue G-250, Commassie Brillant Blue R-250 (Merck 2C2133453), Etanol, İzopropanol, Fosforik Asit (Merck 563.2500), Nutrient Broth (Merck VM560743), 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 (Fluka), Nutrient Agar (Merck VL646350), SDS, Glisin (GERBU), Acrylamide (Sigma A8887), Bis-acrylamide (Promega), Amonyum Sülfat (Merck A0448117), Bromo phenol blue (Gerbu 080702), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (Merck), 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-mercaptoethanol (Merck 805740), Lizozim (Merck), Methanol, Fenol (Sigma), NaOH (JTBaker), Acetic acid (Riedel-dan Haen 27225), Gliserol (Merck K40789992008).

### 2.2. Kullanılan Hücreler

*Escherichia coli* BL21 (DE3), *Escherichia coli* JM101, *Bacillus halodurans* C-125 (DSM 18197), *Geobacillus* sp. TF16.



### 2.3. Moleküler Çalışmalar

#### 2.3.1. *Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125 Suşlarında Ksilanaz Aktivitesinin Tespiti

*Geobacillus* sp. TF16 suşu 55 °C’de LB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra % 0.5’lik ksilan içeren LB besiyerine inokülasyon yapılarak indüklemeye gerçekleştirildi. *Bacillus halodurans* C-125 suşu ise 30 °C ’de Na-sesquicarbonate içeren NB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra aynı besiyeri kullanılarak inokülasyon yapıldı. 72 saatlik inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyonları ardından kültürler 10.000 rpm’de 10 dk. santrifüjlenerek süpernatantlar elde edildi. Elde edilen kaba enzim ekstratı, ksilanaz aktivitesini belirlemek amacıyla kullanıldı. Bu çalışmada enzim aktivitesini tayin etmek için kullanılan yöntem; ksilanazın substratı olan ksilan ile girdiği tepkime sonucu açığa çıkan indirgeyici şekerleri ölçen bir metoddur. 500 µL’lik reaksiyon hacminde, %5’lik ksilan substratından (Oat Spelt Xylan) 100 µL, 100 mM’lık pH 7,0 fosfat tamponundan 125 µl, 100 µL enzim (süpernatant) ve 175 µL dH<sub>2</sub>O konularak 20 dakika bekletildi. *Geobacillus* sp. TF16 70 °C ‘de inkübe edilirken, *Bacillus halodurans* C-125 30 °C’de inkübe edildi.

Bir ksilanaz aktivitesi birimi (U), dakikada 1 µmol ksiloz ve eşdeğeri olan şekerleri optimum reaksiyon sıcaklığında üreten enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. İndirgen şeker tayini ise, Dinitrosalisilik asit metodu (Miller, 1951) ile gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra örnekler, 500 µl Dinitrosalisilik asit (DNS) reaktifi ile karıştırılarak, 5 dakika kaynatıldı. Örnekler, spektrofotometrede 540 nm’de okunarak, örnekteki indirgen şeker miktarı, ksiloz standartı kullanılarak belirlendi.

#### 2.3.2. Genomik DNA İzolasyonu

*Geobacillus* sp. TF16 bakterisi, LB besiyerinde bir gece 55 °C’de, *Bacillus halodurans* C-125 ise Na-sesquicarbonate’lı NB besiyerinde bir gece 30 °C’de inkübe edildi. Daha sonra Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak genomik DNA’lar izole edildi. Elde edilen sıvı kültürler 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 13.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Süpernatant kısımları dökülerek pellet kısımları alındı. Pellet üzerine, 480 µl 50 mM EDTA ilave edilerek

vortekslendi. 10 mg/ml'lik konsantrasyondaki lizozimden 120 µl ilave edildikten sonra pipetaj yapılarak pellet çözüldü. Ardından pelletler 37 °C'de 60 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 14.800 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant döküldü. Pellet üzerine 600 µl Nuclei Lysis solüsyonu ilave edilerek pipetleme ile çözüldü. Pelletler 80 °C'de 5 dk inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulularak 3 µl RNaz solüsyonu eklendi. Tüp, 2-5 kez alt üst edildikten sonra 37 °C'de 60 dk inkübe edildi. Ardından 200 µl Protein Precipitation solüsyonu eklenip 20 sn vorteksledikten sonra 5 dk buzda bekletildi. Bu süre sonunda 14.800 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp üzerine 600 µl izopropanol eklendi. Pellet oluşuncaya kadar tüpler alt üst edilerek, 14.800 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında %70'lik etanol eklenip alt üst edilip, 13.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant döküldükten sonra etanolün tamamen uzaklaştırılması için mikrosantrifüj tüpü 15-20 dk 37 °C'de bekletildi. Etanol tamamen uzaklaştırıldığında, pellet üzerine 100 µl DNA Rehydration solüsyonu eklendi ve 65 °C'de 1 saat inkübe edildi. Elde edilen genomik DNA kullanılacağı zamana kadar +4 °C'de saklandı.

### 2.3.3. Primer Sentezi

*Geobacillus* sp. TF16 suşunun ksilanaz genini amplifiye etmek için XylF3 ve XylR3 primerleri dizayn edildi. Primerler dizayn edilirken pET20(b)+ vektörüne klonlama yapılacak şekilde, *Bam*HI ve *Not*I restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri dizayn edilen primerlere eklendi.

*Bacillus halodurans* C-125 suşunun ksilanaz genini elde etmek için dizayn edilen AxylexF ve AxylexR primerlerine *Nco*I ve *Xho*I restriksiyon enzimi kesim bölgeleri eklendi. Primerler pET20(b)+ vektörüne klonlama yapılacak şekilde dizayn edildi.

### 2.3.4. *B. halodurans* C-125 Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

*B. halodurans* C-125 suşunun ksilanaz besiyeri içerisinde ksilanaz aktivitesine sahip olduğu tespit edildikten sonra ksilanaz genini ortaya çıkarmak için, GenBank/NCBI 'da bulunan *Bacillus halodurans* C-125' e ait olduğu düşünülen ksilanaz gen bölgesi için AxylexF ve AxylexR primerleri kullanıldı (Tablo 9). Primerler ve *B. halodurans* C-125

suşunun genomik DNA'sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 4-5).

Tablo 4. *B. halodurans* C-125 ksilanazının primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşeni (50 µL)	
5X PCR tamponu	10 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µL
dNTP mix (1 mM)	16 µL
AxyIexF (10 µM)	1 µL
AxyIexR (10 µM)	1 µL
dH <sub>2</sub> O	17,7 µL
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0,3 µL
Kalıp DNA	1 µL

PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 0,8'lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

Tablo 5. *B. halodurans* C-125 ksilanaz PCR'inin çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	2	1
94 °C	1	36
52 °C	1	36
72 °C	1,30	36
72 °C	7	1
4 °C	15	1

PCR ile çoğaltılan parçalar, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlarda gerçekleştirilerek klonlandı (Tablo 6). Ligasyon ürünü 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 Easy klonlama vektörü (50 ng /µL )	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 klonlar seçildi.

Bu şekilde doğruluğu teyit edilen klonların baz dizini, otomatik dizi analizatörleri aracılığı ile (Macrogen, Hollanda) belirlendi. Sekans sonuçları GenBank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın *B. halodurans* C-125 endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geni (1191 bç) olduğu tespit edildi.

### 2.3.5. *Bacillus halodurans* C-125 Ksilanaz Geninin pET20b(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

Yapılan PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geninin bir *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET20b(+)'ye klonlanması için, *B. halodurans* C-125 ksilanaz geninin içerisinde kesim bölgesi olmayan restriksiyon enzimleri belirlendi. pET20b(+) ekspresyon vektöründe kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği ve daha önce bu duruma uygun olarak dizayn edilen primerler (Axy1exF, Axy1exR) ekspresyon primeri olarak kullanıldı (Tablo 9) ve PCR işlemi gerçekleştirildi (Tablo 4-5).

PCR sonucu elde edilen DNA fragmeti *Nco*I ve *Xho*I restriksiyon enzimleriyle kesildi. pET20b(+) vektörü de *Nco*I ve *Xho*I restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim ürünleri % 0,8'lik agaroz jelde yürütüldü.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve PCR ürünü DNA ligaz yardımıyla birbirine yapıştırıldı ve elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki rekombinant plazmitlerin incelenmesiyle ilgilenilen geni içeren

klon bulundu. Elde edilen doğru klonlu plazmit *E. coli* BL21 (DE3) 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 yoğunluğu 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 inkübasyonu gerçekleştirildi.

### 2.3.6. *Geobacillus* sp. TF16 Ksilanaz Geninin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi ve pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

*Geobacillus* sp. TF16 suşunun ksilanlı besiyeri içerisinde ksilanaz aktivitesine sahip olduğu tespit edildikten sonra dizayn edilen XylF3 ve XylR3 primerleri ve *Geobacillus* sp. TF16 suşunun genomik DNA’sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi (Tablo 7-8).

Tablo 7. *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR şartları

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşeni (50 µL)	
5X PCR tamponu	10 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µL
dNTP mix (1 mM)	16 µL
XylF3 (10 µM)	1 µL
XylR3 (10 µM)	1 µL
dH <sub>2</sub> O	17,7 µL
Taq DNA polimeraz	0,3 µL
Kalıp DNA	1 µL

PCR sonucunda oluşan DNA fragmentleri, 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 0,8’lik agaroz jelde yürütülerek BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

Tablo 8. *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz PCR çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	2	1
94 °C	1	36
62 °C	1	36
72 °C	1.30	36
72 °C	7	1
4 °C	15	1

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

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, Hollanda) belirlendi. Sekans sonuçları GenBank’taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansın *Geobacillus* sp. TF16 endo  $\beta$ -1,4-ksilanaz geni (996 bç) olduğu tespit edildi.

### **2.3.7. *Geobacillus* sp. TF16 Ksilanaz Proteininin Bakteriden Doğrudan Elde Edilmesi**

TF16 ksilanaz geni pET20b(+) ekspresyon vektörüne aktarılamadığından, ksilanaz enzimi bakteriden doğrudan elde edildi. Proteini elde etmek için *Geobacillus* sp. TF16 bakterisi 30 ml LB besiyerinde 55 °C’de bir gün büyütüldü. Bu kültürden, 2 litrelik bir erlen içerisindeki 200 ml LB besiyerine O.D.’si 0,1 olacak şekilde taze ekim yapıldı ve hücreler O.D.’si 0,6-0,9 oluncaya kadar 55 °C’de üremeye bırakıldı. Hücrelerin O.D. değeri 0,6-0,9 olunca, kültüre son konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde steril edilmiş ksilan substratı ilave edilerek hücreler, ksilanaz proteini üretmek için uyarıldılar. Bu şekilde 55 °C’de 4 saat kadar üremeye bırakılan hücreler 7500 rpm’de 15 dakika santrifüj edilerek

çöktürüldü. Çöken hücreler Tris-HCl (pH: 8.0) tamponunda yıkanarak temizlendi ve sonrasında tekrar 7500 rpm'de santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler yukarıda belirtilen tamponun 15 ml'si içerisinde tekrar çözülerek 1 µg/ml lizozim ilavesiyle 37 °C'de 30 dakika kadar inkübe edildi. Daha sonra 10 dakika sonikatör kullanılarak % 80 güçte 1 döngü aralığında patlatılan hücreler 15.300 rpm de 20 dk santrifüj edildi. Pellet kısmı atılarak sıvı kısmı oluşturan hücre özütü ile saflaştırma işlemlerine devam edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi Bölüm 2.4.1'de anlatıldığı gibi, İyon değişimi kolon kromatografisi ise Bölüm 2.4.2'de anlatılan şartlar kullanılarak enzim saflaştırıldı.

Tablo 9. PCR ve klonlama sırasında kullanılan primerlerin listesi

Primer Adı	Primer Baz Sıraları
XylF3	5'- Cgg ATC CgA TgA ACA gCT CCC TCC CC-3'
XylR3	5'- gCg gCC gCg ACA CTC ACT gCC CTC C- 3'
AxylexF	5'- CCC ATg gAT ATT ACA CTT TTT AgA AAg CC-3'
AxylexR	5'- CCT CgA gAT CAA TAA TTC TCC AgT AAg C-3
H2CTerF	5'- TTA Agg AgT ATC gCg ATg ATA TTA gCA gTg TAA C -3'
H2CTerR	5'- gCT CgA gTg Cgg CCg CAT CAA TAA TTC TCC Ag -3'
TF16CTerR	5'- gTT ACA CTg CTA ATA TCA TCg CgA TAC TCC TTA A-3'
H2CTer2F	5'- TgT ATC TAT gTT TgA ATg gCC ACC gAC Agg gg -3'
TF16CTer2R	5'- CCC CTg TCg gTg gCC ATT CAA ACA TAg ATA CA -3'
H2Int3F	5'- TTT CgT CAg TCg ggA TCT gTT ATT AgA gCg CA -3'
H2Int3R	5'- CgA TgA TTT gTC gCC ATT CCg ATT CAC gCA gg -3'
TF16Int3F	5'- CCT gCg TgA ATC ggA ATg gCg ACA AAT CAT Cg -3'
TF16Int3R	5'- TgC gCT CTA ATA ACA gAT CCC gAC TgA CgA AA -3'
H2Int4F	5'- TTT TgC TTg TTC gCA CAA CAT ggA gCT TCg CT -3'
H2Int4R	5'- CAA gCA ACA CAT CCC gAT TCg CTT CAC gTT TA -3'
TF16Int4F	5'- TAA ACg TgA AgC gAA TCg ggA TgT gTT gCT Tg -3'
TF16Int4R	5'- AgC gAA gCT CCA TgT TgT gCg AAC AAg CAA AA -3'

### 2.3.8. Kimerik Genler İçin Primerlerin Dizayn Edilmesi

*Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz genlerinden yüksek sıcaklık ve pH'da aktivite gösterebilecek yeni bir kimerik ksilanaz elde edebilmek için DNA shuffling metoduyla benzerlik gösteren bir metod kullanıldı. İki farklı özelliğe sahip ksilanaz geni kullanılarak 4 tane kimerik gen dizayn edildi. Bu metodda ksilanaz genlerinde pH ve sıcaklık üzerinde etkisi olduğu düşünülen gen bölgeleri bulundu. Bu bölgeler Tablo 9'da verilen primerlerle çoğaltıldı.

### 2.3.9. *Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125 Ksilanaz Genleri Kullanılarak Kimerik Genlerin Oluşturulması

Kimerik genleri elde etmek için *Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz genleri kullanıldı. Kimerik genleri oluştururken Mamo vd. (2009)'nin yaptığı çalışmadan yararlanıldı. Bu çalışmada negatif yüklü aminoasitlerin pozitif yüklü amino asitlere oranları arasındaki korelasyon bulunarak, ksilanaz enzimlerinde pH ve sıcaklık aktivitesini artırabileceğini düşünülen bölgeler bulundu. Bu bölgeler baz alınarak temelde DNA shuffling'e benzeyen bir metod kullanıldı. Bu metodda, DNA shufflingten farklı olarak genin tamamı DNaz I ile parçalanmadan, sadece *Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125'e ait olan genlerde çoğaltılacak olan bölgelere özel primerler dizayn edildi. pH ve sıcaklık için önem arz eden bu parçalar çoğaltılıp birleştirilerek kimerik genler oluşturuldu. Bu işlem sonucunda 4 adet kimerik gen elde edildi. Bu kimerik genler; GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 olarak isimlendirildi.

Kimerik genleri elde etmek için öncelikle kimerik genleri oluşturan parçalar tek tek PCR'la çoğaltıldı. *GeoInH2CTer* için; Axy1 (*B. halodurans* C-125 ksilanaz geni) geninden H2CTerF ve H2CTerR primerleri, TF16 (*Geobacillus* sp. TF16) geninden de XylF3 ve TF16CTerR primerleri kullanılarak iki gen bölgesi elde edildi (Şekil 4). Aynı şekilde *GeoInH2CTer2* için; Axy1 için H2CTer2F ve H2CTer2R primerleri, TF16 için XylF3 ve TF16CTer2R primerleri kullanılarak iki gen bölgesi çoğaltıldı (Şekil 5). *GeoIntraH2Int3* için; H2Int3F ve H2Int3R primerleri kullanılarak Axy1 geninden 1 parça, TF16Int3F-Xyl3R ve TF16Int3R- Xyl3F primerleri kullanılarak 2 parça gen bölgesi elde edildi (Şekil 6). Aynı şekilde *GeoIntraH2Int4* için; H2Int4F ve H2Int4R primerleri kullanılarak Axy1 geninden 1 parça, TF16Int4F- Xyl3R ve TF16Int4R- Xyl3F primerleri kullanılarak 2 parça



gen bölgesi elde edildi (Şekil 7). PCR reaksiyon şartları ve PCR cihazının çalışma programı Tablo 10 ve 11’de gösterilmiştir.

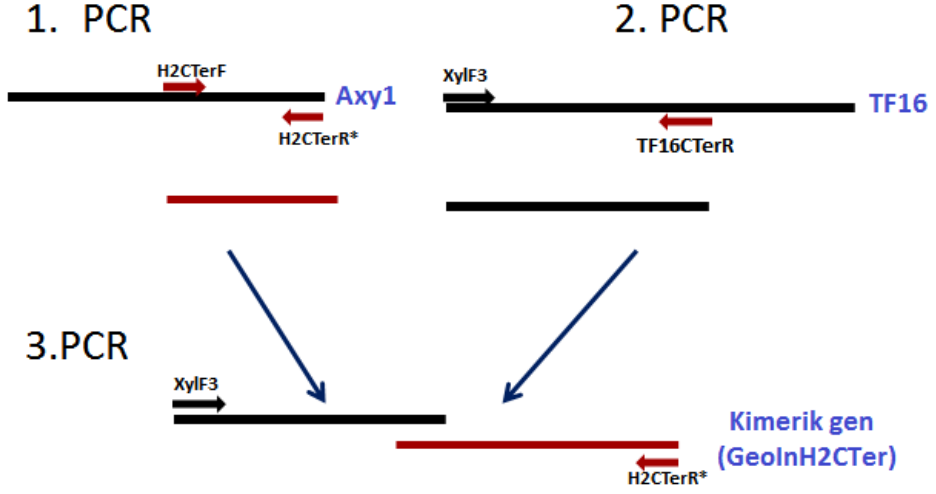
Tablo 10. Kimerik gen fragmentlerini oluşturmak için kullanılan PCR reaksiyon şartları

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR)’nin bileşenleri (50 µL)	
5X PCR tamponu	10 µL
MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)	3 µL
dNTP (1 mM)	16 µL
XylF3, H2CTerF, H2CTer2F, H2Int3F, TF16Int3F, H2Int4F TF16Int4F (10 µM)	1 µL
XylR3, H2CTerR, TF16CTerR, H2CTer2R, TF16CTer2R, H2Int3R, TF16Int3R, H2Int4R, TF16Int4R (10 µM)	1 µL
dH <sub>2</sub> O	18,1 µL
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0,3 µL
Kalıp DNA	0,6 µL

Tablo 11. Kimerik gen fragmentlerinin PCR çalışma programı

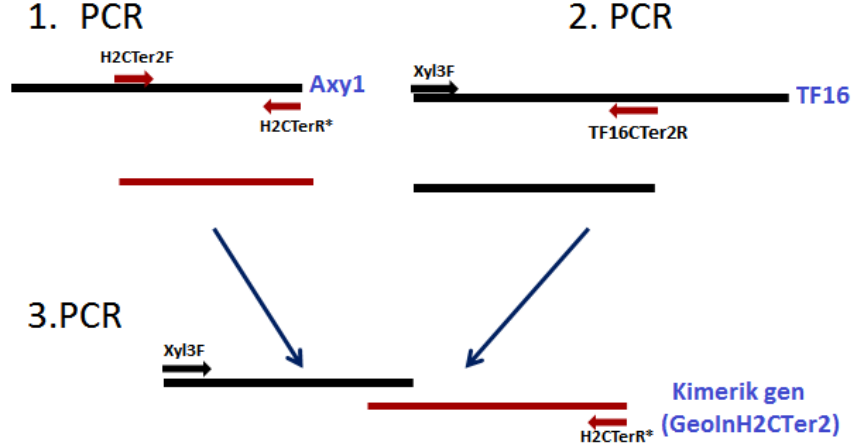
Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	2	1
94 °C	1	36
59 °C	1	36
72 °C	1,30	36
72 °C	5	1
4 °C	15	1

## GeoInH2CTer



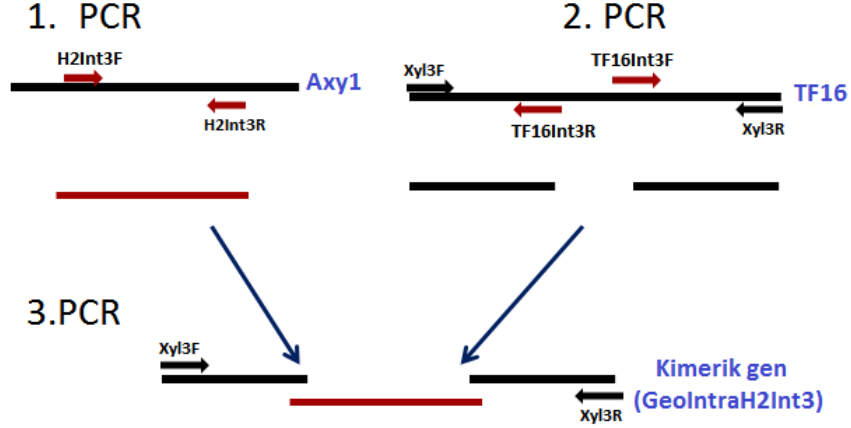
Şekil 4. GeoInH2CTer kimerik gen oluşumunun Şematik gsterimi. Axy1; *B. halodurans* C-125'i, TF16; *Geobacillus* sp. TF16 'yı gstermektedir. H2CTerF, H2CTerR; Axy1 ksilanaz gen bglgesinin oğaltılmasında, XylF3, TF16CTerR; TF16 gen bglgesinin çoğaltılmasında kullanılmıştır.

## GeoInH2CTer2



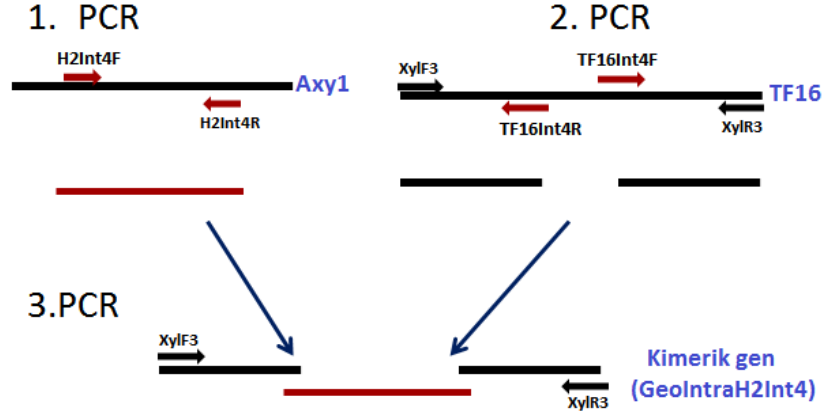
Şekil 5. GeoInH2CTer2 kimerik gen oluşumunun Şematik gsterimi. Axy1; *B. halodurans* C-125 ve TF16; *Geobacillus* sp. TF16 'yı gstermektedir. H2CTer2F, H2CTerR; Axy1 ksilanaz gen bglgesinin oğaltılmasında, Xyl3F, TF16CTer2R; TF16 gen bglgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerleri gstermektedir.

### GeoIntraH2Int3



Şekil 6. GeoIntraH2Int3 kimerik gen oluşumunun şematik gösterimi. Axy1; *B. halodurans* C-125 ve TF16; *Geobacillus* sp. TF16 'yı göstermektedir. H2Int3F, H2Int3R; Axy1 ksilanaz gen bölgesinin çoğaltılmasında, Xyl3F, Xyl3R, TF16Int3F, TF16Int3R; TF16 gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerleri göstermektedir.

### GeoIntraH2Int4



Şekil 7. GeoIntraH2Int4 kimerik gen oluşumunun şematik gösterimi. Axy1; *B. halodurans* C-125 ve TF16; *Geobacillus* sp. TF16 'yı göstermektedir. H2Int4F, H2Int4R; Axy1 ksilanaz gen bölgesinin çoğaltılmasında, XylF3, XylR3, TF16Int4F, TF16Int4R; TF16 gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primerleri göstermektedir.

Kimerik genler oluşturulurken iki aşamalı PCR kullanıldı. Birinci aşamada; son hacim 50 µl olacak şekilde PCR karışımı hazırlandı. Fakat karışıma primer eklenmedi.

Kalıp fragmentler GeoInH2CTer ve GeoInH2CTer2’de 1:1 oranında, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4’de ise 1:2:1 oranında PCR içeriğine eklendi. Primerler hazırlanırken, parçaların birbirine yapışabilmesi için sarkık uçlar eklendi. Böylelikle farklı fragmentlerin birbirlerine istenen yerlerden bağlanması sağlandı. Dolayısıyla yüksek sıcaklıkta oluşabilecek rastgele birleşmelerin önüne geçilerek tüm fragmentler lineer bir şekilde elde edildi (Tablo 12,13 ve 14).

Tablo 12. Kimerik genlerin primersiz PCR reaksiyon şartları

Primersiz PCR’ın bileşenleri (48 µL)	
10X PCR tamponu	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)	3 µL
dNTP (1 mM)	16 µL
dH <sub>2</sub> O	x* µL
<i>Taq</i> DNA polimeraz	0,3 µL
Kalıp fragmentler	1:1/ 1:2:1 µL

x\*: Kalıp fragmentlerin kullanım miktarına göre dH<sub>2</sub>O miktarı ayarlandı.

Tablo 13. Primersiz PCR (Birinci PCR) için cihazın çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	2	1
95 °C	0,30	10
72 °C	1	10

Primersiz PCR aşamasından sonra, PCR tüplerine GeoInH2CTer ve GeoInH2CTer2 için Xyl3F, H2CTerR primerleri, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 için ise Xyl3F, Xyl3R primerlerden 1’er µl ilave edildi. Primerlerin ilavesinden sonra ikinci PCR aşamasına geçilerek istenen uzunlukta fragmentler elde edildi (Tablo 18).

Tablo 14. Primerli PCR (İkinci PCR) için cihazın çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
95 °C	0,30	35
67 °C	0,30	35
72 °C	1,25	35
72 °C	5	1
4 °C	15	1

### 2.3.10. Kimerik Genlerin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

PCR reaksiyonu ile çoğaltılan 4 farklı kimerik gen, pGEM-T Easy Klonlama Kiti kullanılarak pGEM-T Easy klonlama vektörüne, firmanın öngördüğü konsantrasyonlar ve şartlar gerçekleştirilerek klonlandı (Tablo 6). Ligasyon ürünü 16 °C’de bir gece boyunca bekletildi. Ertesi gün kompetent hücre hazırlandı ve transformasyonla *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

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, Hollanda) belirlendi. Sekans sonuçları, elimizdeki gen sıralarıyla karşılaştırılarak istenilen kimerik genlerin elde edildiği tespit edildi.

### 2.3.11. Kimerik Genlerin pET28a(+) Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

Yapılan PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen kimerik genlerin bir *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET28a(+)’ye klonlanması için kimerik genlerin içinde restriksiyon kesim bölgeleri bulunmayan ve pET28a(+) ekspresyon vektörünün çoklu klonlama bölgesinde kesim bölgesi bulunan restriksiyon enzimlerinin çalışabildiği ve daha önce bu duruma uygun olarak dizayn edilen primerler (XylF3, XylR3: H2CTerR), ekspresyon primeri (Tablo 9) olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi.

PCR sonucu elde edilen kimerik genler *NotI* ve *BamHI* restriksiyon ezimleriyle kesildi. pET28a(+) vektörü de *NotI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim ürünleri % 0,8'lik agaroz jelde yürütüldü.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve PCR ürünü DNA ligaz yardımıyla birbirine yapıştırıldı ve elde edilen ligasyon ürünü *E. coli* JM101 suşuna aktarıldı ve bu suş içindeki plazmitlerin incelenmesiyle, ilgilenilen geni içeren klonlar bulundu. Elde edilen doğru klonlu plazmit *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine transforme edilerek enzimin ekspresyonu gerçekleştirildi. Proteinin ekspresyonu için ksilanaz geni klonlanmış *E. coli* BL21 hücreleri, 1 mg/mL ampisilin içeren LB besiyerinde 37 °C'de bir gece büyütüldü ve gece kültüründen optik yoğunluğu 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 37 °C'de inkübe edildi.

## 2.4. Biyokimyasal Çalışmalar

### 2.4.1. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Amonyum sülfat çöktürmesi için, indüklenme sonucu elde edilen kültür 10.000 rpm de 20 dk çöktürüldü. Elde edilen 120 ml süpernatant bir beher içerisine alınarak buzda saklandı. Çöktürme için (56 g/100 ml, % 80'lik), çok yavaş bir şekilde karıştırılmakta olan özüte 67,2 g kristal haldeki amonyum sülfat azar azar ilave edildi. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra özüt 1 saat daha karıştırılmaya bırakıldı. 1 saat sonunda karışım, 10.000 rpm'de ve 4 °C'de 30 dk santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, and 20 mM imidazol (pH 8.0) içeren solüsyonla protein 1 gece yıkandı ve amonyum sülfat tuzu uzaklaştırıldı.

### 2.4.2. İyon Değişimi Kolon Kromatografisi

İyon Değişimi Kromatografisi için 50 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak anyonik iyon değiştirici olan DEAE-Sepharose kullanıldı. Hareketli faz olarak 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum

pompasında alındı ve sonrasında bir pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 500 ml 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu ile dengeye getirildi. Proteinin içinde bulunduğu süpernatant kolondan geçirilerek içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Sonrasında kolondan 50 ml daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Daha sonra kolonun tuz (NaCl) içeriği 0 molardan 0,6 molara kadar çıkarıldı. Bunun için 200 ml'lik NaCl gradient köprüsü kullanıldı. Tamponun akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar cam tüpler içerisinde 3,5 ml olacak şekilde toplandı. Alınan tüm tüplerde DNS (Miller, 1951) yöntemi kullanılarak ksilanaz taraması yapıldı. En fazla enzim bulduran tüpler seçilerek birleştirildi ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. Elde edilen protein liyofilizatör kullanılarak yoğunlaştırıldı.

### **2.4.3. Protein Konsantrasyon Tayini**

Enzim örneklerinin protein konsantrasyonu Bradford'un (1976) geliştirmiş olduğu metoda göre gerçekleştirildi. Bu metodda orijinali kırmızı olan Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlandığında maviye dönüşmesi esas alınmaktadır. Protein standardı hazırlanmasında 0,04 mg protein/ml ihtiva eden Bovine Serum Albumin (BSA) solüsyonu kullanıldı. 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.

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

Reaksiyonlarda kullanılacak enzim miktarı, yapılan ön çalışmalar sonucunda 1, 2, 3, 5, 10, 12, 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) kullanılacak olan enzim miktarı belirlendi.

#### **2.4.5. Optimum Sıcaklık**

*Geobacillus* sp. TF16 ksilanazı, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri, % 5'lik substrat konsantrasyonunda, belirlenen miktarda saf protein, 50, 60, 65, 70, 75, 80 ve 90 °C'ye kadar ayarlanmış ısıtıcı bloklarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon ile belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimlerin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

#### **2.4.6. Optimum pH**

*Geobacillus* sp. TF16 ksilanazı, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının aktivitesine pH'nın etkisi, sodyum-asetat tamponu pH 4,0-5,5, fosfat tamponu pH 6,0-7,5, Tris-HCl tamponu pH 8,0-8,5, glisin tamponu pH 9,0-12,5 kullanılarak, belirlenen optimum sıcaklıkta 20 dakika ısıtıcı bloklarda gerçekleştirilen reaksiyonlarla belirlendi.

#### **2.4.7. Enzim Kinetiği**

Oat spelt ksilan hidrolizi başlangıç reaksiyon hızı TF16 ksilanazı için 1-30 mg ksilan/mL, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 ksilanazları için ise 0,5- 35 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.

*Geobacillus* sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 ksilanaz enzimlerinin kinetik verileri, yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenen substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlendi. TF16 ksilanaz aktivitesi, saf protein içeren enzim solusyonu ile 70 °C'de, pH 9,0'da; GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 ksilanaz aktiviteleri ise sırasıyla 60 °C ve 50 °C'de, pH 8,0'de, 100 mM fosfat tamponu içerisinde 20 dakikalık reaksiyon süresi sonunda soğuk 0,5 mL DNS ile 5 dakika kaynar suda kaynatıldı ve daha sonra 540 nm'de ksiloz standardı kullanılarak spektrofotometrik ölçümlerle belirlendi. Michaelis-Menten sabiti ( $K_m$ ) ve maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerleri hazırlanan Lineweaver-Burk eğrisinde x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi. Michaelis-Menten grafiği çizilerek, elde edilen substrat konsantrasyonları daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kullanılacak substrat konsantrasyonu olarak belirlendi.

#### **2.4.8. Isıl Kararlılığı**

TF16 ksilanaz enziminin 60-90 °C arasında, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının ise sırasıyla 45-70 °C ve 35-60 °C aralığında göstermiş oldukları ısıl kararlılığını belirlemek amacıyla 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 kıyaslanarak bir sıcaklık stabilitesi grafiği çizildi.

#### **2.4.9. pH Kararlılığı**

TF16 ksilanazı, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının 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 sırasıyla 70 °C, 60 °C ve 50 °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.

#### **2.4.10. SDS Poliakrilamid Jel Elektroforezi**

Protein jel elektroforezleri, % 15' lik SDS- PAGE kullanılarak 15 mA'lık akım altında gerçekleştirildi. Ksilanaz enzimlerinin moleküler ağırlığı, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile ilgili proteinlerin SDS poliakrilamid jel elektroforezinde birlikte yürütülmesi ile belirlendi. Örneklerin üzerlerine eşit miktarlarda muamele (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; % 4 SDS; % 20 Gliserol; % 6  $\beta$ -merkaptoetanol) tamponu ilave edildi ve sonrasında 95 °C'de 5 dakika bekletilerek denatürasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra Maniatis ve ark. (1982) tarafından tanımlanan % 15'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 1 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. TF16, *Bacillus halodurans* C-125 ve Kimerik Genleri İçeren Suşlarda Ksilanaz Aktivitesinin Tespiti

*Geobacillus* sp. TF16 suşu 55 °C’de LB besiyerinde, *Bacillus halodurans* C-125 ise 30 °C ’de Na-sesquicarbonate içeren NB besiyerinde bir gece büyütüldükten sonra elde edilen kültürden aşılanan taze kültür ksilanlı besiyerinde 72 saat indüklendikten sonra, oluşan kültür öktürölüp hücre dıőı enzim elde edildi. Kaba enzim ekstraktı ksilanaz aktivitesini belirlemekte kullanıldı. *E. coli* BL21’e (DE3) klonlaması yapılan GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik enzimlerinin aktivitesine ise pelletten bakıldı. Elde edilen ekstraktlar, % 5’lik substrat ile 100 mM fosfat tamponu ilave edilerek TF16 suşu 65 °C, *B. halodurans* 30 °C, GeoIntraH2Int3 60 °C ve GeoIntraH2Int4 ise 50 °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, 1951) ile gösterildi. İnkübasyondan sonra örnekler, 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 çalışmada kullanılacak olan iki bakterinin ve kimerik enzimlerin ksilanaz aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

#### 3.2. Moleküler alıőmalar

##### 3.2.1. Primer Sentezi

*Geobacillus* sp. TF16, *Bacillus halodurans* C-125 bakterilerinin ksilanaz genlerinin tespiti ve bu ksilanaz genlerinden oluşturulan kimerik genler olan GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4’nın genlerinin PCR’la çoğaltılabilmesi için Tablo 9’da belirtilen primerler dizayn edilip sentezlettilerilerak sonraki PCR reaksiyonlarda kullanıldı.

### 3.2.2. PCR Reaksiyonu ile Ksilanaz Genlerinin oğaltılması ve Klonlanması

*Geobacillus* sp. TF16 bakterisine ait ksilanaz genini elde etmek amacıyla, bu bakterinin genomik DNA'sı kalıp olarak kullanıldı, XylF3 ve XylR3 primerleri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Aynı şekilde *Bacillus halodurans* C-125 bakterisinin ksilanaz geninin tespiti amacıyla bu bakterinin genomik DNA'sı ve Axy1exF-Axy1exR primer çifti kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR sonucu 0,5 mg/mL etidyum bromür içeren % 1,0'lük agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Elde edilen DNA parçaları pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlama sonunda oluşan kolonilerden mavi-beyaz koloni ayrımı yapılarak beyaz koloniler seçildi ve plazmit izolasyon yöntemine göre plazmidler izole edildi. Gen parçasının klonlandığı doğru klonlar seçildi ve MacroGen (Hollanda) firmasına gönderilerek sekans analizi gerçekleştirildi. Sekans sonuçları GenBank'taki (NCBI, NIH, Washington, DC) verilerle karşılaştırıldı ve bu sekansların *Geobacillus* sp. TF16 (996 bç) ve *Bacillus halodurans* C-125 (1191 bç) ksilanaz genlerine ait olduğu tespit edildi (*Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125'in nükleotit ve amino asit dizinleri Ek1., Ek2., Ek3. ve Ek4.'te gösterilmiştir).

Tablo 15. *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz geninin diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan nükleotit % benzerliği

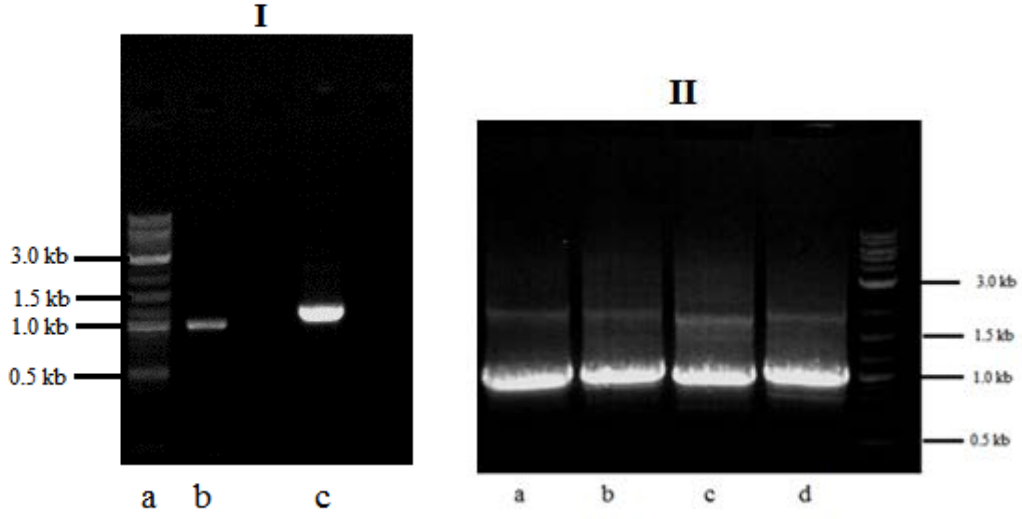
Mikroorganizma	% Nükleotit benzerliği
<i>Bacillus halodurans</i> TSEV1	99
<i>Bacillus</i> sp. JB 99	95
<i>Bacillus firmus</i> BH2133	95
<i>Bacillus</i> sp. N16-5	87
<i>Bacillus</i> sp. NG-27	73
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> JK1	69

Tablo 16. *Geobacillus* sp. TF16 suşuna ait ksilanaz geninin diğer mikroorganizmalara ait ksilanazlara olan nükleotit % benzerliği

Mikroorganizma	% Nükleotit benzerliği
<i>Geobacillus</i> sp. C56-T3	97
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	96
<i>Bacillus thermantarcticus</i>	82
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 1A05583	79
<i>Anoxybacillus</i> sp. E2	72
<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	68

### 3.2.3. PCR Reaksiyonu ile Kimerik Ksilanaz Genlerinin Çoğaltılması ve Klonlanması

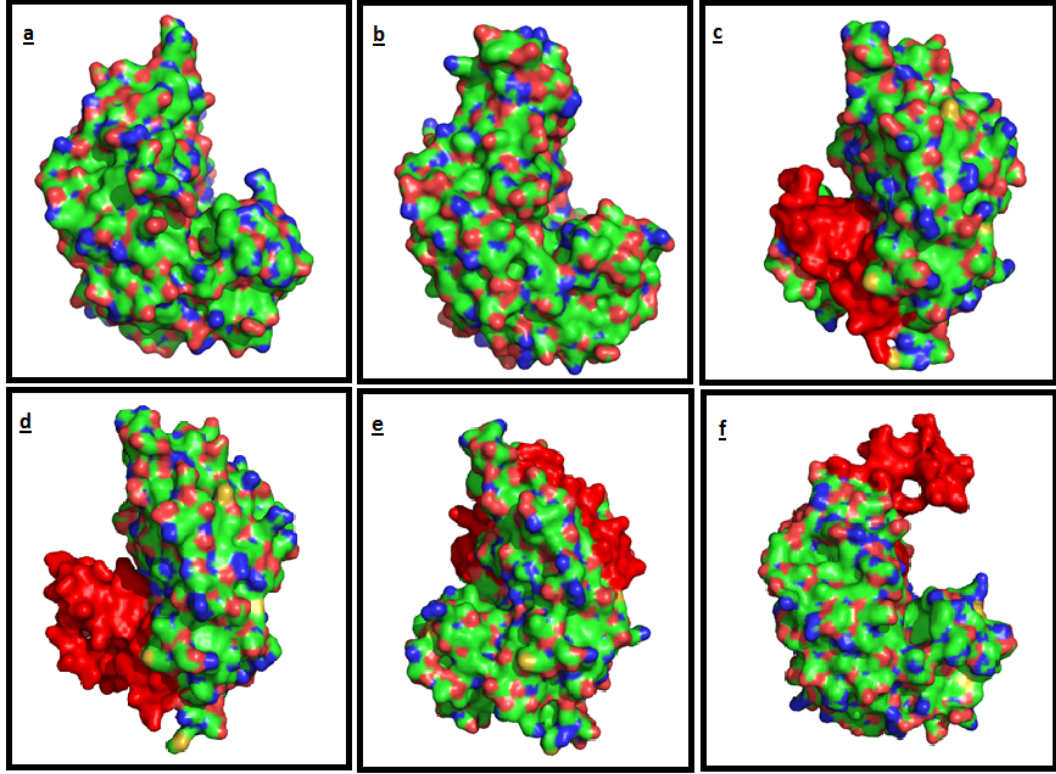
*Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125 suşlarına ait ksilanazlar arasında fragment değişimi yapılarak 4 adet kimerik gen elde edildi. Kimerik genleri oluştururken, Tablo 9'da belirtilen primerler ve TF16 ve C-125 suşlarına ait genomik DNA'lar kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR sonucu 0,5 mg/mL etidyum bromür içeren % 1,0'lük agaroz jelde yürütüldü ve sonuçlar BioDocAnalyze jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Elde edilen DNA parçaları pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı. Klonlama sonunda oluşan mavi-beyaz kolonilerden beyaz koloniler seçildi ve plazmit izolasyon yöntemine göre plazmidler izole edildi. Gen parçasının klonlandığı doğru klonlar seçildi ve MacroGen (Hollanda) firmasına gönderilerek sekans analizi gerçekleştirildi. Sekans sonuçları elimizdeki verilerle karşılaştırıldığında, sonuçların dizayn edilen kimerik genlere ait olduğu tespit edildi. Oluşturulan kimerik genlerin GeoInH2CTer (1002 bç), GeoInH2CTer2 (1008 bç), GeoIntraH2Int3 (987 bç) ve GeoIntraH2Int4 (1023 bç) olduğu bulundu (Kimerik genlerin nükleotit ve amino asit dizinleri Ek5., Ek6., Ek7., Ek8., Ek9., Ek10., Ek11. ve Ek12.'de gösterilmiştir).



Şekil 8. *Geobacillus* sp. TF16, *B. halodurans* C-125 ve kimerik genlere ait agaroz jel görüntüsü. I- a) 0.1-10 kb markır (NEB) b) *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz geni (998 bç) c) *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz geni (1191 bç). II- a) GeoInH2CTer (1002 bç), b) GeoInH2CTer2 (1008 bç), c) GeoIntraH2Int3 (987 bç) d) GeoIntraH2Int4 (1023 bç)

### 3.2.4. *B. halodurans* C-125, *Geobacillus* sp. TF16 ve Kimerik Ksilanazların Üç Boyutlu Yapıları

DNA shuffling'e benzer bir yaklaşım kullanılarak pET28a(+) vektörüne klonlanan kimerik proteinlerin amino asit dizileri ExpASy programı kullanılarak belirlendi ve elimizde bulunan verilerle karşılaştırılarak proteinlerin doğruluğu tespit edildi. Proteinlerin üç boyutlu yapısı PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.) programı kullanılarak oluşturuldu (Şekil 9).



Şekil 9. Ksilanaz proteinlerinin üç boyutlu gösterimi. a) *Geobacillus* sp. TF16 b) *Bacillus halodurans* C-125 c) GeoIntraH2CTer d) GeoIntraH2CTer2 e) GeoIntraH2Int3 ve f) GeoIntraH2Int4'ün üç boyutlu yapısını göstermektedir. Yeşil kısım *Geobacillus* sp. TF16'yı, kırmızı kısım ise *Bacillus halodurans* C-125 proteinini göstermektedir.

### 3.2.5 *Geobacillus* sp. TF16, *Bacillus halodurans* C-125 ve Kimerik Ksilanaz Genlerinin pET20b(+) ve pET28a(+)’a Vektörüne Klonlanması ve Ekspresyonu

*Bacillus halodurans* C-125 ve kimerik ksilanaz genlerinin pET20b(+) ve pET28a(+) vektörlerine klonlanması için bakterilere ait olan genomik DNA’lar kullanıldı ve ekspresyon primerleri olarak dizayn edilen primerler (Tablo 9) ile PCR gerçekleştirildi. PCR sonucu elde edilen DNA fragmanı *Bacillus halodurans* C-125 ksilanazında *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon enzimleriyle, kimerik genlerde ise *NotI* ve *BamHI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. pET20b(+) vektörü *B. halodurans* C-125’in klonlanmasında, pET28a(+) ise, kimerik genlerin klonlanmasında kullanıldı. Vektörler her bir PCR fragmenti için kullanılan restriksiyon enzimleriyle kesildi. Kesim ürünleri % 1’lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak fotoğraflandı.

Yapılan kesim reaksiyonları sonucunda elde edilen lineer vektör ve PCR ürünleri 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 belirlendi ve böylece klonlama gerçekleştirildi. Ancak klonlamanın gerçekleştirildiği pET20b(+) ve pET28a(+) vektörleri güçlü bir promotora sahip ekspresyon vektörleridir 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 klonlar *E. coli* BL21 (DE3) hücresine transforme edildi.

*Geobacillus* sp. TF16 ksilanazı ise pET20b(+) vektörüne klonlanamadığından, protein doğrudan bakterinin kendisinden elde edildi.

### **3.3. *Geobacillus* sp. TF16, *Bacillus halodurans* C-125 ve Kimerik Ksilanaz Enzimlerinin Karakterizasyonu**

*Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz geninin sekans sırası belirlendikten sonra, ksilanaz geni bir ekspresyon vektörü olan pET20b(+) vektörüne klonlanamadı. Bu yüzden protein doğrudan *Geobacillus* sp. TF16 hücresi indüklenerek elde edildi. Protein üretimi *Geobacillus* sp. TF16 hücresinde gerçekleştirildikten sonra, proteini çok miktarda elde etmek için amonyum sülfat çöktürmesi yapıldı. Daha sonra iyon değişimi kolon kromatografisi (DEAE-Sepharose) kullanılarak saflaştırma gerçekleştirildi. Ardından enzimin biyokimyasal özellikleri (optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametreleri v.s) incelendi. İncelemeler sırasında bütün deneyler en az üç tekrarlı olarak yapıldı.

*Bacillus halodurans* C-125 ve oluşturulan kimerik ksilanaz genleri GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 gen sıraları belirlendikten sonra pET20b(+) ve pET28a(+) ekspresyon vektörlerine klonlandı ve *E. coli* BL21 (DE3) hücresine aktarıldı. GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 proteinlerinde SDS-PAGE analizi sonucunda ekspresyon bantları görüldü. Ayrıca bu iki proteinin DNS reaktifi kullanılarak aktivite analizi yapıldığında ksilanaz aktivitesine sahip oldukları görüldü. Ancak *Bacillus halodurans* C-125, GeoInH2CTer ve GeoInH2CTer2’de ekspresyon bandına ve aktiviteye rastlanmadı.

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

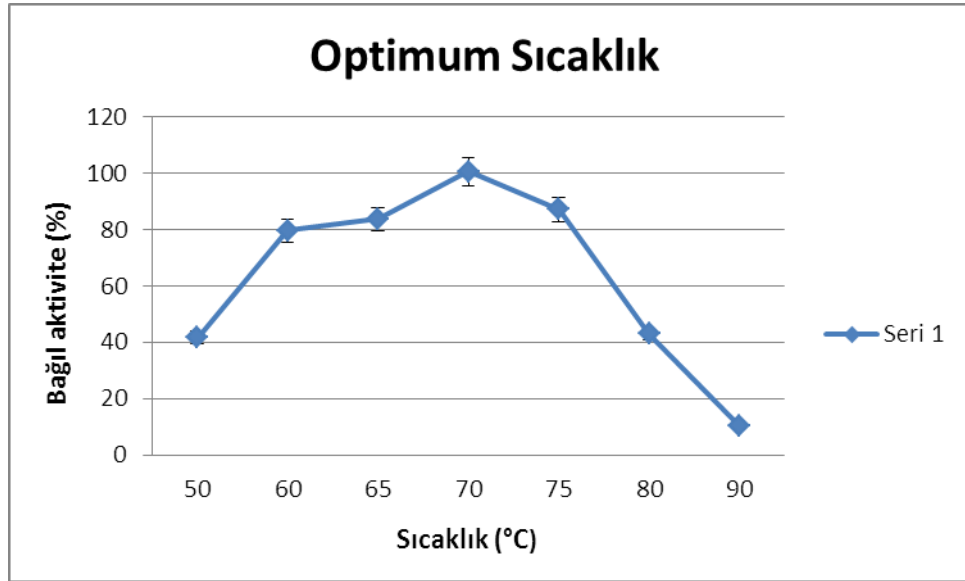
*Geobacillus* sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 için yapılan çalışmalarda kullanılacak olan protein miktarı değişken miktarlarda enzim ve belirli miktarda substratın



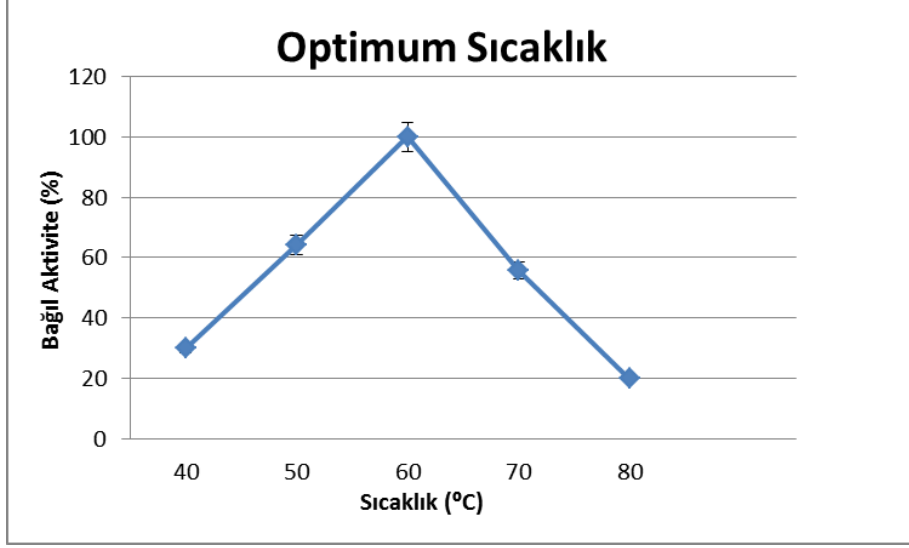
(% 5) kullanıldığı reaksiyonlar sonucu belirlendi. Yapılan reaksiyonlar sonucu TF16 enzimi için 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , GeoIntraH2Int3 için 3,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ve GeoIntraH2Int4 için 2,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  saf enzim kullanıldığında protein miktarı aktivite grafiğinde artışın durağana geçtiği görüldü. Bu sonuçlar dikkate alınarak, ksilanaz aktivite deneylerinde kullanılacak olan enzim miktarlarının sırasıyla 2,5, 5,0 ve 2,0  $\mu\text{g}$  saf protein olduğuna karar verildi.

### 3.3.2. Optimum Sıcaklık

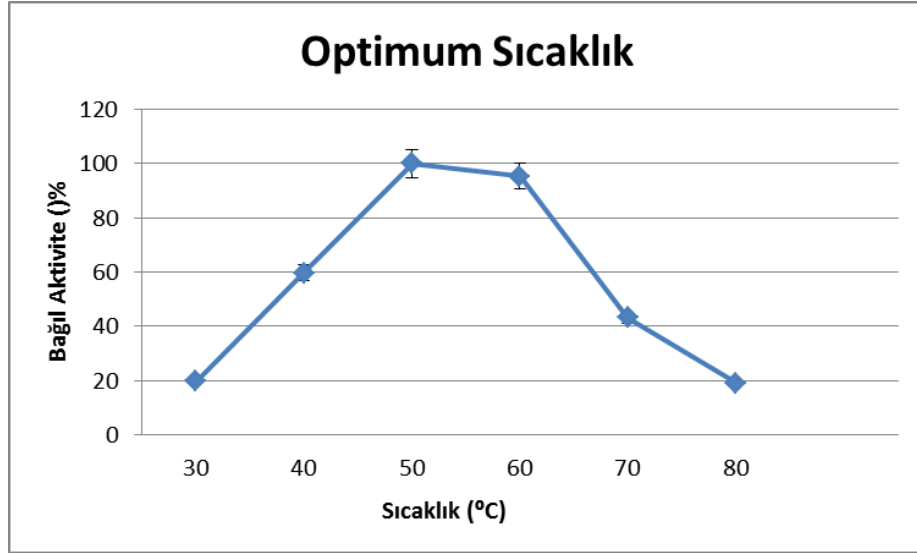
*Geobacillus* sp. TF16 ksilanazı, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 40-90 °C arasındaki sıcaklıklarda aktiviteleri incelendi. Yapılan çalışmalar sonucunda ksilanaz enzimlerinin optimum sıcaklıklarının sırasıyla 70 °C, 60 °C ve 50-60 °C olduğu belirlendi (Şekil 10, Şekil 11 ve Şekil 12).



Şekil 10. *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği



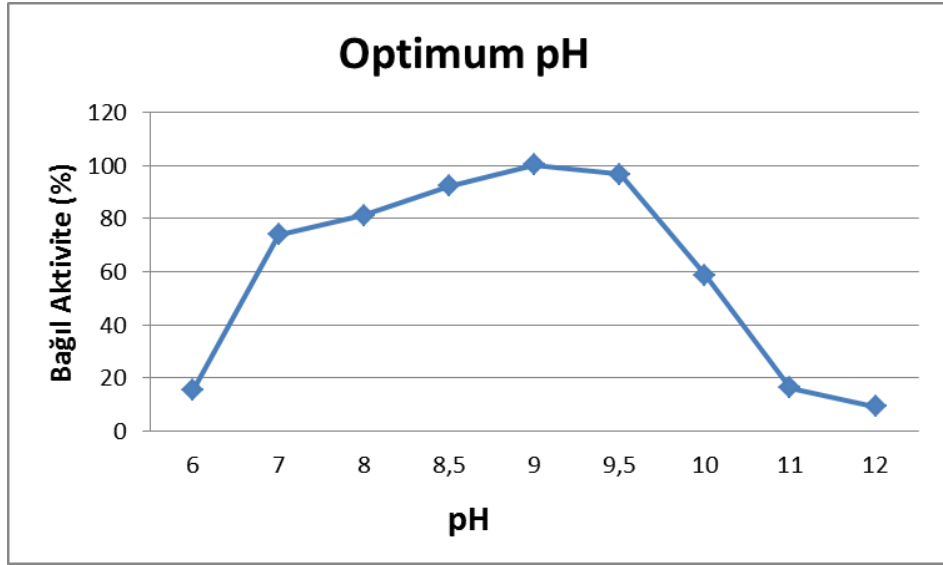
Şekil 11. GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği



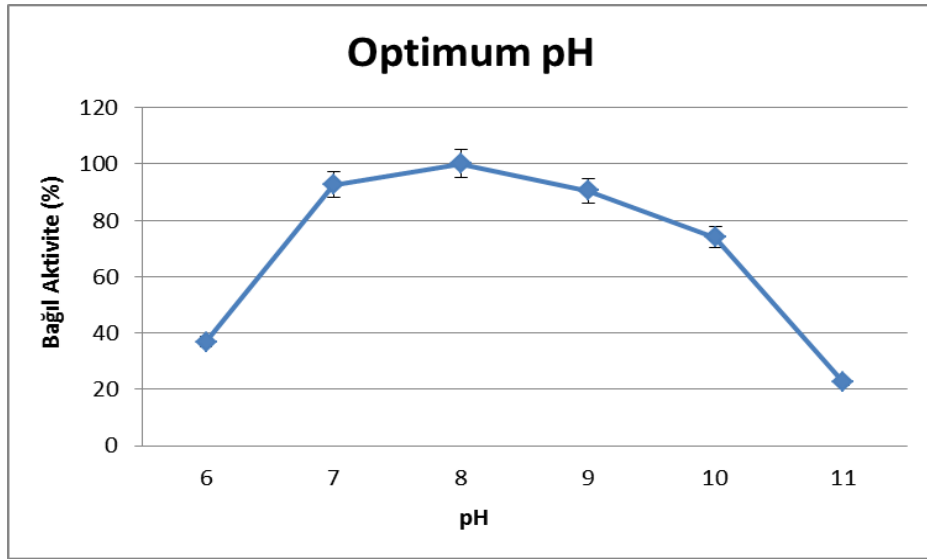
Şekil 12. GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz enziminin optimum sıcaklık grafiği

### 3.3.3. Optimum pH

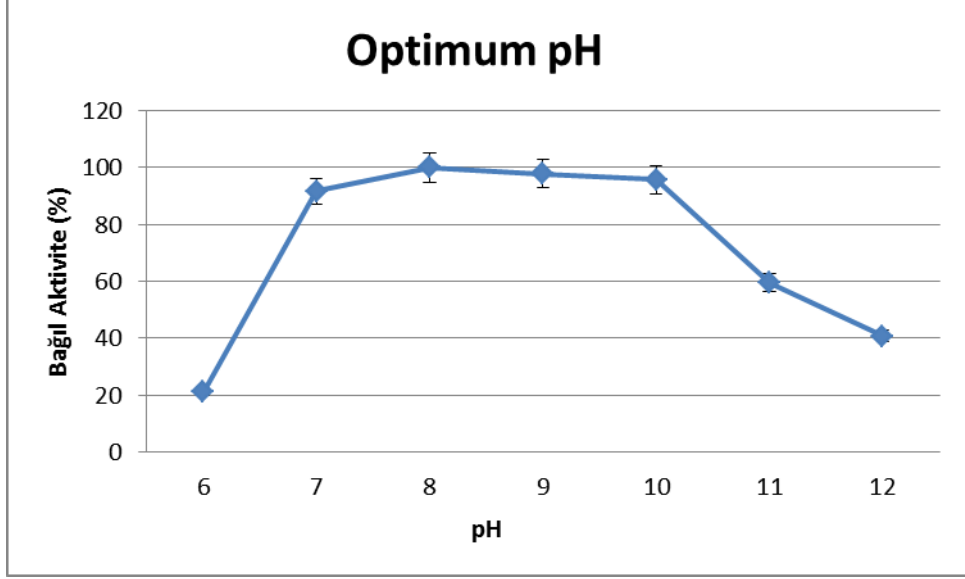
*Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz ve diğer iki kimerik ksilanaz enziminin optimum pH'sının saptanması için Na-Asetat (pH 4,0-5,5); Na-fosfat (pH 6,0-7,5); Tris-HCl (pH 8,0-8,5) ve Glisin-NaOH (pH 9,0-12,5) olmak üzere 4 farklı tampon sistemi kullanıldı. Ksilanaz enzimlerinin sırasıyla 9,0, 8,0 ve 8,0-10,0 optimum pH aralıklarına sahip oldukları belirlendi (Şekil 13, Şekil14 ve Şekil 15).



Şekil 13. *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz enziminin optimum pH grafiği



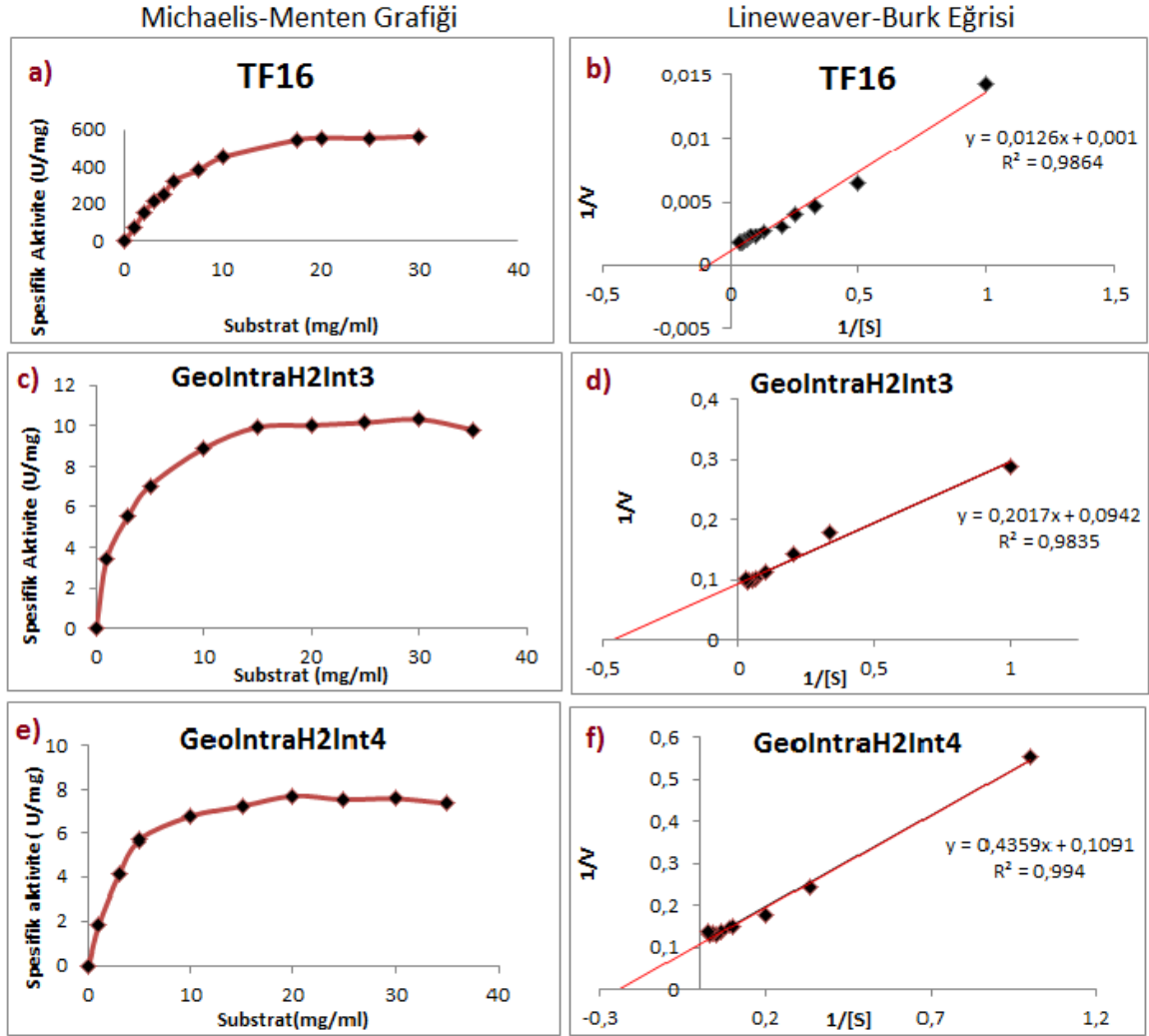
Şekil 14. GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanaz enziminin optimum pH grafiği



Şekil 15. GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz enziminin optimum pH grafiği

### 3.3.4. Kinetik İncelemeler

TF16 ksilanaz enziminin başlangıç tepkime hızı 70 °C'de, 100 mM pH 9,0 Glisin-NaOH tamponunda 1-30 mg/mL oat spelt ksilan substrat konsantrasyonu aralığında, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının ise başlangıç tepkime hızları ise sırasıyla 60 °C ve 50 °C'de, 100 mM pH 8,0'de fosfat tamponunda 0,5-35 mg/mL oat spelt ksilan substrat konsantrasyonu aralığında ölçülmüştür. Enzimlerin oat spelt ksilan varlığında substrat-aktivite grafiği çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Substrat olarak oat spelt ksilan kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk eğrisinin oluşturduğu doğrunun x-ksenini kestiği nokta  $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek  $K_m$  değerleri sırasıyla  $6,86 \pm 0,615$  mg/ml, 2,14 mg/ml ve 3,995 mg/ml, y-ksenini kestiği nokta ise  $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek  $V_{max}$  değerleri sırasıyla  $720,24 \pm 22,99$  U/mg, 10,615 U/mg ve 9,165 U/mg olarak hesaplandı (Şekil 16).



Şekil 16. *Geobacillus* sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4'e ait Michaelis-Menten grafikleri ve Lineweaver-Burk eğrileri

### 3.3.5. Isıl Kararlılığı

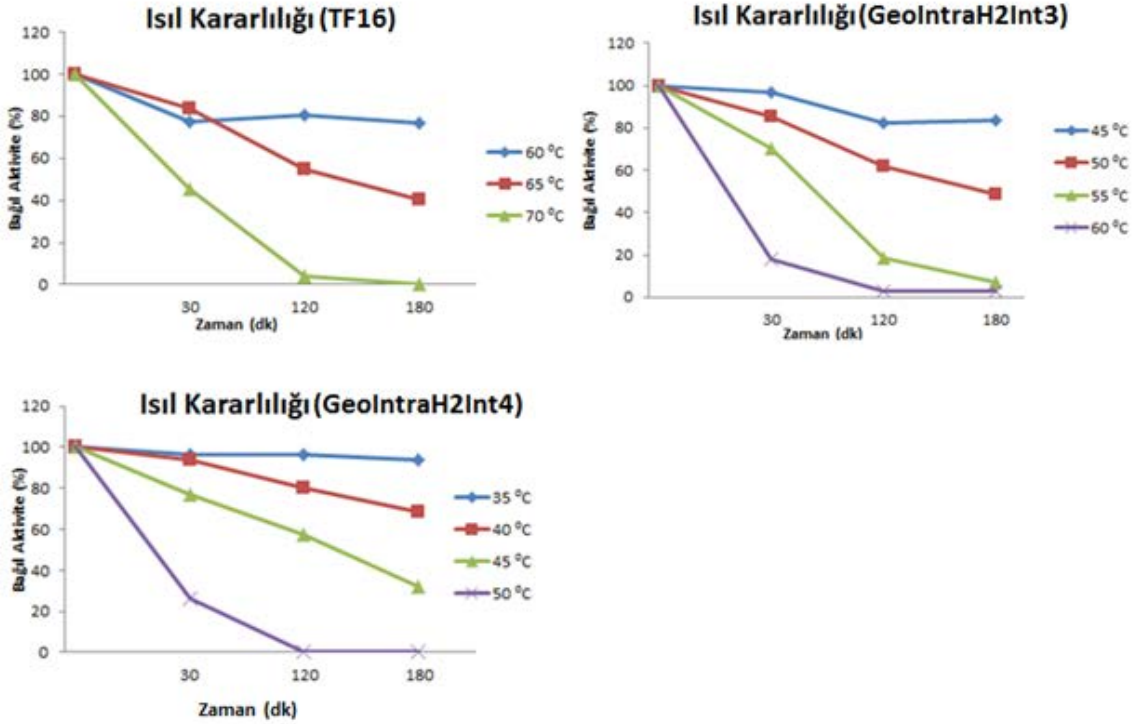
TF16 ksilanazı, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz enzimlerinin ısı kararlılıklarını saptamak için sırasıyla 60-90 °C, 45-70 °C ve 35-60 °C'de aralıklarında 30, 120 ve 180 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirildi. Her bir sıcaklıktan alınan enzim örneklerindeki kalan aktivite standart metoda göre sırasıyla 70 °C, 60 °C ve 50 °C'de belirlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 17'de verilmiştir.

TF16 ksilanaz enzimi, aktivitesini 180 dakika sonunda 60 °C 'de % 80 oranında, 65 °C 'de % 35 oranında korumuştur. 70 °C de ise, enzim aktivitesini 30 dakika sonra % 43 oranında korumuş, fakat 180 dakika sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. 75, 80, 85

ve 90 °C'de belirtilen sürelerde yapılan ölçümler sonucunda aktivitenin tamamen kaybolduğu saptanmıştır.

GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanazı, aktivitesini 180 dakika sonunda 45 °C'de % 90 oranında, 50 °C'de % 50 oranında korumuştur. 30 dakika sonunda 55 °C'de % 70 oranında, 60 °C'de ise % 20 oranında korurken, 180 dakika sonunda bu sıcaklıklarda enzim aktivitesini kaybetmiştir. 65 ve 70 °C'de yapılan ölçümler sonucunda enzimin belirtilen sürelerde bu sıcaklıklarda aktivitelerini tamamen kaybettikleri görülmüştür.

GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazının ise, aktivitesini 180 dakika sonunda 35 °C'de % 100 oranında, 40 °C'de % 80 oranında ve 45 °C'de ise % 35 oranında koruduğu saptanmıştır. 50 °C'de 30 dakika sonunda % 25 aktivitesini korurken, 120 dakika inkübasyondan sonra aktivitesini tamamen kaybetmiştir. 55 ve 60 °C'lerde yapılan ölçümlerde enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği saptanmıştır.

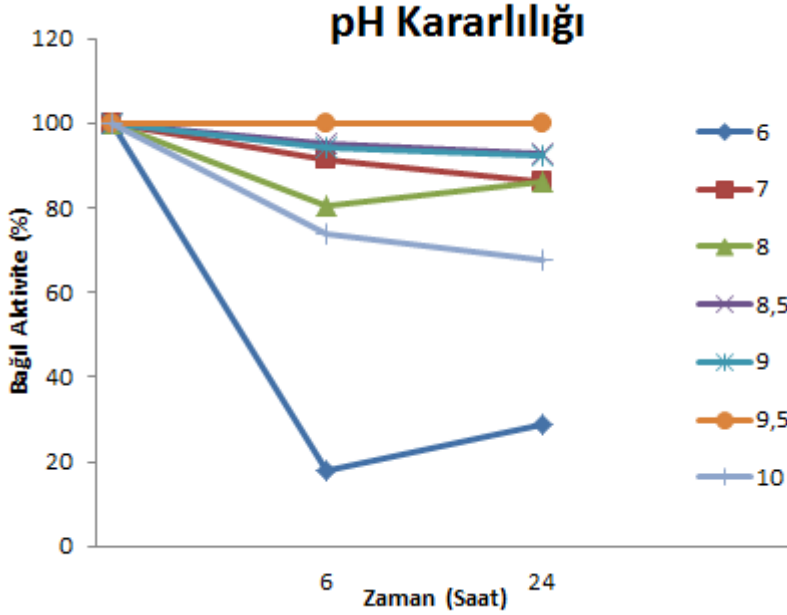


Şekil 17. *Geobacillus* sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4'ün ısıl kararlılığı grafikleri

### 3.3.6. pH Kararlılığı

TF16 ksilanaz enziminin pH stabilite analizi için, pH 6,0-10,0 arasındaki tampon çözeltilerde 6 saat ve 24 saat süreyle, 70 °C de ön inkübasyon gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 18’de gösterildi. Enzimin 6 saatlik ön inkübasyondan sonra pH 9,0-9,5’da aktivitesini %100’e yakın koruduğu görülmüştür. pH 7,0-8,5 aralığında ise enzimin 6 saat sonunda % 80 civarında aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. 24 saat sonunda ise enzimin pH 6 dışındaki diğer pH’larda önemli bir aktivite düşüklüğüne rastlanmamıştır.

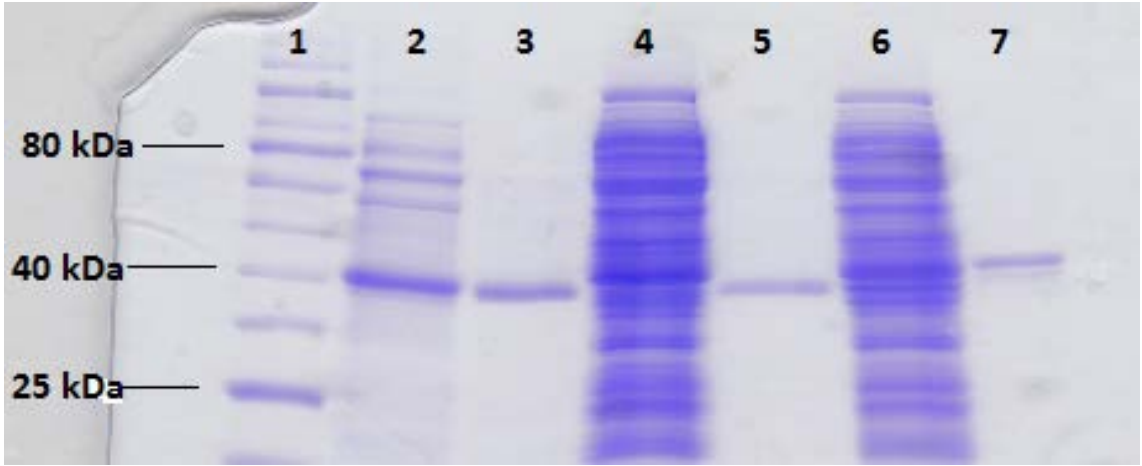
GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının ise pH 6,0-11 aralığında 6 ve 24 saatlik ön inkübasyon sonunda aktivitelerini tamamen kaybettikleri saptanmıştır.



Şekil 18. *Geobacillus* sp. TF16’nın pH kararlılığı grafiği

### 3.3.7. SDS Poliakrilamid Jel Elektrofrez

*Geobacillus* sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 ksilanaz enzimleri amonyum sülfat çöktürmesi yapılarak yoğunlaştırıldı ve iyon değişimi kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Elde edilen saf proteinler SDS-PAGE’de tek bant olarak gösterildi. % 15’lik SDS-PAGE’de protein markırı ile birlikte yürütülerek fotoğraflandı ve Protein Molecular Weight Calculator (URL-4) kullanılarak, enzimlerin moleküler ağırlığı sırasıyla 38,66, 38, 3 ve 40,1 kDa olarak hesaplandı (Şekil 20).



Şekil 19. İyon değişimi kolon kromatografisi kullanılarak saflaştırılan ksilanaz enzimlerinin SDS-PAGE görünümü.1) Protein markır (10-250 kDa) 2) *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz kaba ekstraktı 3) TF16 ksilanaz saf enzimi 4) GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanaz kaba ekstraktı 5) GeoIntraH2Int3 saf enzimi 6) GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz kaba ekstraktı 7) GeoIntraH2Int4 saf enzimi



#### 4. TARTIŞMA

K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışma yüksek sıcaklık ve pH'da aktif yeni bir kimerik ksilanazın oluşturulması ve karakterizasyonunu kapsamaktadır. Bu çalışma, 8800 No'lu BAP projesiyle desteklenmiştir.

Bilindiği gibi ksilanazlar endüstrinin çeşitli alanlarında kullanım alanı olan enzimler olup aynı zamanda termofilik ve alkali karakterli olanlarına ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarında hem yüksek seviyede ısı kararlı hem de alkali kararlılık özelliğinin doğal ksilanazlarda aynı anda olduğu durumlara az rastlanılmaktadır.

Bu çalışmada DNA shuffling metodu kullanılarak kimerik ksilanazlar elde edilmeye çalışıldı. Protein mühendisliği kapsamında bu konu ile ilgili çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Shibuya ve ark. (2000) random DNA shuffling yöntemi ile ksilanazın hidrolitik aktivitesinin ve ısı kararlılığının artırılması üzerinde çalışmıştır. Çalışmada *Thermomonospra fusca* XylA ile *Streptomyces lividans* XylB üzerinde durulmuş ve tesadüfi fragment oluşumu, PCR ile tekrar birleştirme metodu ve kimerik ksilanaz havuzu meydana getirmek için *Streptomyces lividans*'tan XylB ve *Thermomonospra fusca*'dan XylA'nın katalitik domainlerinden DNA kodlanması yöntemi izlenmiştir. Daha sonra meydana getirilen enzimin özellikleri ile parental enzimin özellikleri karşılaştırılmıştır. Meydana getirilen kimerik enzimlerden iki tanesinde ısı kararlılığın yaklaşık olarak 20 °C arttığı bulunmuştur. Wang ve ark. (2008) yönlendirilmiş evolüsyon ile *Thermobifida fusca* (ya da önceki adıyla *Thermomonospora fusca*) ksilanaz A'sının alkalik pH kararlılığının ve aktivitesinin artırılmasını, bir diğer çalışmada da module shuffling ile *Thermomonospora alba* XylA ile *Cellulomonas fimi* arasında, GH10 ksilanazın hidrolitik aktivitesinin ve ısı kararlılığının artırılmasını (Wang vd., 2007) çalışmışlardır. Gibs ve ark. (2001) yaptıkları bir çalışmada dejenerat oligonükleotit DNA shuffling metodu ile β-ksilanazın optimum pH değerinin değiştirilerek bu noktada kararlılığının artırılması üzerine çalışmışlardır. Stemmer, sefotaksim antibiyotiğine dirençlilik için seleksiyon ile TEM-1 β-laktamaz DNA shufflingini gerçekleştirmiştir (Stemmer, 1994; Cramer vd., 1996; Zhang vd., 1997; Patten vd., 1997). Stemmer (1994), β-laktamaz model sisteminde moleküler evolüsyon için mutajenik DNA shuffling metodunu denemiştir. Patten ve ark. (1997) farmasotiklerin ve aşılardan geliştirilmesi amacı ile DNA shuffling ile seçici üretim

gerçekleştirmişler ve istenmeyen özelliklere sahip proteinlerin elenmesini, istenen özelliklere sahip olanların geliştirilmesini sağlamışlardır. Cramer ve ark. (1996) GFP'nin floresans aktivitesinin geliştirilmesi amacı ile gelişmiş kodon kullanan sentetik *gfp* geni üretmişler ve parlak *E. coli* kolonileri için tarama yaparak tekrarlayan DNA shuffling döngüsü gerçekleştirmişlerdir. Yeşil floresans protein (GFP) gen regülasyonunda geniş bir kullanıma sahiptir ve ökaryotlar başta olmak üzere çoğu organizma için güçlü bir floresans sinyali istenmektedir. Bunlar dışında DNA shuffling endüstriyel enzimlerin optimize edilmesinde (Arnold vd., 1997; Shao ve Arnold, 1998), fonksiyonel olmayan mutasyonlardan fonksiyonel olanları ayırt etmede (Zhao ve Arnold, 1997), galaktozidazdan etkili bir  $\beta$ -fukozidaz geliştirilmesinde (Zhang vd., 1997) ve yapay evolüsyonların yapılmasında (Harayama, 1998) kullanılmıştır.

Yüksek pH aktivitesine sahip pek çok enzim mevcuttur. Nakamura ve ark. (1993) yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. 41M-1 bakterisinin ksilanaz enziminin aktivite gösterdiği optimum pH'nın 9,0 olduğunu belirledi. Fakat enzimin optimum sıcaklığı 50 °C'dir. Hauli ve ark. (2013)'nin yaptığı diğer bir çalışmada, *Anoxybacillus* sp. Ip-C den elde edilen ksilanazın optimum pH'sının 9,0, optimum sıcaklığının ise 70 °C olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada kullandığımız *Geobacillus* sp. TF16 ksilanazı da aynı sıcaklık ve pH değerlerini göstermektedir. Fakat bu çalışmada amaç, farklı bakterilerin ksilanazlarının DNA shuffling yöntemiyle birleştirilerek pH'sı 9-12 arası olabilecek ve yüksek sıcaklarda stabil kalabilecek bir kimerik enzim üretmektir.

İlk defa bu çalışmada kullanılan *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz enziminin, optimum sıcaklığı 70 °C olarak bulundu. Çoğu ksilanaz enzimlerinin aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri yaklaşık olarak 40-60 °C arasındadır (Subramaniyan ve Prema 2002; Collins vd., 2005). *Bacillus megaterium* SV1 ksilanazının optimum sıcaklığı 40 °C (Vijayalakshmi vd., 2013), *Bacillus pumilus*'un 50 °C (Poorna, 2011) ve *Penicillium expansum* 40 °C (Querido vd., 2006) olması çoğu ksilanazın düşük sıcaklıklarda aktif olduğunu göstermektedir. *Geobacillus* sp. TF16 ksilanazını sıcaklık bakımından literatürle karşılaştırdığımızda enzimin optimum sıcaklığının 70 °C olması, bu enzimin optimum sıcaklığının çoğu ksilanaz enziminden yüksek olduğunu ve endüstri alanında verimli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu enzimin kimerik ksilanaz oluşturmada kullanılma amacı yüksek sıcaklıkta aktivite göstermesidir. Böylelikle yüksek sıcaklık ve pH'da aktif kimerik ksilanazlar elde edilmeye çalışıldı.

*Geobacillus* sp. TF16 ksilanazını kinetik parametreler açısından incelediğimizde  $K_m$   $6,86 \pm 0,615$  mg/ml,  $V_{max}$  ise  $720,24 \pm 22,99$  U/mg olarak bulundu. Substrat olarak oat spelt ksilanı kullanan  $1,579$  mg/ml (Wu vd., 2006),  $4,8$  mg/ml (Shrinivas vd., 2010)  $K_m$  değerlerine sahip *Geobacillus* sp. MT-1 ve *Bacillus* sp. JB 99 ksilanaz enzimleriyle *Geobacillus* sp. TF16 ksilanazının  $K_m$ 'sini karşılaştırdığımızda, ksilanaz enziminin  $K_m$ 'sinin diğer enzimlere göre yüksek olduğu bulunmuştur. Bu durum TF16 ksilanaz enziminin oat spelt ksilan substratına affinitesinin düşük olduğunu göstermektedir.  $V_{max}$  açısından literatür taraması yapıldığında, çoğu enzimin  $V_{max}$  değerininin TF16 ksilanazından düşük olduğu görüldü. Örneğin; *Cereus pterogonus* (Vikramathithan vd., 2010), *Trichoderma harzianum* (Ahmed vd., 2012) ve *Bacillus mojavensis* UEB-FK (Kallel vd., 2014)  $V_{max}$  değerlerinin sırasıyla  $216.2$  U/mg,  $0,526$  U/mg ve  $250,02$  U/mg olduğu gösterilmiştir. Bu değerler karşısında TF16 ksilanazının  $V_{max}$ 'ının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Kimerik ksilanazlar olan GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4'ün ise  $K_m$  değerleri sırasıyla  $2,14$  mg/ml ve  $3,995$  mg/ml,  $V_{max}$  değerleri ise  $10,615$  U/mg ve  $9,165$  U/mg olarak bulundu. Yaban tip TF16 ile kimerik ksilanazları karşılaştırdığımızda, kimerik enzimlerin  $K_m$  değerlerinde düşüş olduğu görüldü. Bu da bu enzimlerin ksilan substratına karşı affinitelerinin artmış olduğunu göstermektedir. Fakat kimerik enzimlerin  $V_{max}$  değerlerinin TF16'ya göre oldukça düştüğü görüldü.

Bu çalışmada *Geobacillus* sp. TF16 ve *Bacillus halodurans* C-125 suşları yeni bir kimerik ksilanazın elde edilmesi için kullanıldı. TF16 suşunun  $70$  °C'de aktivite verdiği bu çalışmayla belirlendi. C-125 suşu ise, yüksek pH'da aktivite gösteren bir ksilanaz enzimine sahiptir. Honda ve ark.(1985), *B. halodurans* C-125 suşunun iki tane ksilanaz genine sahip olduğunu bulmuştur. Bu enzimlerden biri sadece pH 6-7 aralığında aktifken, diğer ksilanaz enziminin pH aktivite aralığının 6-10 arasında değiştiğini bulmuş, hatta bu enzimin pH 12'de hala aktif olduğunu göstermişlerdir. Kimerik genler oluşturulurken, *B. halodurans* C-125'in yüksek pH aktivitesine sahip olan geni belirlendi ve çalışmada bu gen kullanıldı.

*B. halodurans* C-125 ksilanaz geni pET20b(+) ekspresyon vektörüne klonlandı ve BL21 (DE3) hücrelerine transformasyonu yapılarak indüklendi. Fakat indüklenme sonucunda süpernatanttan elde edilen özütte ksilanaz aktivitesine rastlanmadı. Elde edilen özüt SDS-PAGE'e yüklendiğinde de beklenen boyutta protein bandının olmadığı görüldü. Bu durum, *E. coli* hücrelerinde ekspres edilen bazı proteinlerin inklüzyon cisimciği oluşturmasıyla açıklanabilir. Baek ve ark. (2012), *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 ksilanazını pET26b(+) vektörüne klonlayıp *E. coli* BL21 (DE3) ekspresyon hücrelerine

aktarmış, fakat çözünmeyen protein yapısı (inklüzyon cisimciği) oluşması sebebiyle süpernatantta ksilanaz aktivitesi saptanamamıştır. Bu durum çoğu ksilanaz enziminde inaktif inklüzyon cisimciklerinin oluşmasıyla açıklanmıştır. Bu yüzden, *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz geni sadece kimerik genlerin oluşturulmasında yüksek pH aktivitesine sahip olduğu için kullanıldı.

TF16 ve C-125 suşlarının ksilanazlarının kullanılmasıyla 4 tane kimerik gen elde edildi. Kimerik genler GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 olarak isimlendirildi. Kimerik genler pET20b(+) vektörüne klonlanıp, *E. coli* BL21 (DE3) hücresine transforme edildi. Fakat yapılan aktivite deneyleri ve SDS-PAGE sonucunda herhangi bir sonuç elde edilemedi. Bu durum ekspresyon hücresinde oluşan bir problemden dolayı meydana gelmiş olabilir. Kimerik genlerin atası olarak kabul edebileceğimiz *B. halodurans* C-125 suşunun ksilanaz geninde de aynı ekspresyon problemi gözlemlenmişti. Bu nedenle kimerik genler, diğer bir ekspresyon vektörü olan pET28a(+)’ya klonlandı. Klonlama sonucunda sadece GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarında aktivite görüldü. GeoInH2CTer ve GeoInH2CTer2 kimerik ksilanazlarında aktiviteye rastlanmadı. Yapılan çalışmalar sonucunda GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanazının optimum sıcaklığı 60 °C, GeoIntraH2Int4 ksilanazının ise 50-60 °C olduğu bulundu. Optimum pH ise sırasıyla 8,0 ve 8,0-10,0 arasında olduğu bulundu.

TF16 ve kimerik ksilanazlar karşılaştırıldığında; GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanazlarının ısı kararlılıklarında tolere edilebilir azalmalar gözlenmesine karşın her iki rekombinant enzimin de pH alkalinitesinin yaban tipe göre daha gelişmiş olduğu görüldü. Ayrıca pH 10,0’da yaban tip % 60 aktivite gösterirken, aynı pH’da GeoIntraH2Int3 % 80, GeoIntraH2Int4 ise % 100’e yakın aktivite gösterdiği görüldü. Yine TF16 ksilanazı pH 10,0’da % 60 aktivite gösterirken, GeoIntraH2Int4 ise % 60 aktivitesini pH 11,0’e kadar koruduğu, hatta pH 12,0’de de % 40 oranında aktivite göstermeye devam ettiği saptandı. Yapılan analizler ışığında, hem GeoIntraH2Int3 hem de GeoIntraH2Int4’ün yüksek pH’larda aktivitesinin yaban tipe göre daha yüksek olduğu da ortaya konulmuş oldu.

TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4’ü ısı kararlılıkları bakımından karşılaştırdığımızda, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4’ün TF16’ya göre ısı kararlılıklarının daha düşük olduğu görüldü. TF16 optimum sıcaklığı olan 70 °C’de 30. dakikada % 43 aktivitesini korurken, GeoIntraH2Int3’ün 60 °C’de % 20, GeoIntraH2Int4’ün ise 50 °C’de % 25 aktivitesini koruduğu görüldü. Diğer sıcaklıklarda

ortak nokta bulunamadığı için karşılaştırma yapılamadı. TF16'nın pH 9,0-9,5 aralığında pH kararlılığının neredeyse % 100'e yakın olduğu görülürken, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4'ün pH kararlılığını 6 saat ve 24 saatlik ön inkübasyondan sonra tamamen kaybettikleri görüldü. Kimerik enzimlerin üç boyutlu yapılarında meydana gelmiş olan değişiklikler, enzimlerin pH kararlılığını tamamen kaybetmelerinde etkili olmuş olabilir.

Nishimoto ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, *Bacillus halodurans* C-125 ksilanazı (XynA) ve *Clostridium stercorarium* F9 ksilanazı (XynB) kullanılarak 6 tane kimerik ksilanaz elde edilmiştir. Fakat bu kimerik genlerin 4 tanesinden inklüzyon cisimciği oluştuğu için sonuç elde edilememiştir. Diğer iki kimerik ksilanazın da pH ve sıcaklık stabilitelerinin orijinal genlerden çok az da olsa düşük olduğu bulunmuştur. Nishimoto ve ark. (2002)'nin yaptıkları çalışmayla bu çalışma karşılaştırıldığında, iki çalışma arasında oldukça büyük benzerlikler olduğu görüldü. Fakat, bu çalışmayla elde edilen kimerik ksilanazların pH açısından yaban tip ksilanaza göre önemli derecede artış göstermesi, yapılan çalışmanın literatüre büyük ölçüde katkı sağlayacağını açıkça göstermektedir.

## 5. SONUÇLAR

Bu çalışmada *Bacillus halodurans* C-125 ve *Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz genleri, DNA shuffling yöntemini temel alan bir teknik aracılığıyla kimerik genlerin oluşturulmasında kullanıldı. *Bacillus halodurans* C-125 ksilanazı ve kimerik genler, *E. coli* ekspresyon vektörü olan pET20b(+) ve pET28a(+)’ya aktarıldı. *Geobacillus* sp. TF16 ksilanazının eldesi doğrudan bakteri hücresi indüklenerek sağlandı. Saflaştırılan *Geobacillus* sp. TF16 ksilanazı ile elde edilen iki kimerik ksilanaz optimum pH, optimum sıcaklık, pH ve sıcaklık stabilitesi ve  $Km/V_{max}$  parametreleri açısından özellikleri araştırıldı.

*Geobacillus* sp. TF16 ksilanaz geni PCR aracılığıyla çoğaltılarak elde edildi ve genin uzunluğunun 996 bç olduğu tespit edildi. Ksilanaz geni pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlanarak sekans ettirildi ve istenen gen olduğu tespit edildi. Bu gen pET20b(+) vektörüne klonlanamadığından, ksilanaz enzimi doğrudan bakterinin indüklenmesiyle yabancı hücreden elde edildi. Amonyum sülfat çöktürmesi ve iyon değişimi kolon kromatografisi (DEAE-Sepharose) kullanılarak protein saflaştırıldı.

*Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz geni PCR ile elde edildi ve uzunluğu 1191 bç olarak bulundu. Bu gen öncelikle pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve sekans edilerek ksilanaz proteinini kodlayan gen olduğu belirlendi. Bu gen daha sonra pET20b(+) vektörüne klonlandı ve *E. coli* BL21 (DE3) hücresine transformasyonu sağlandı. Fakat transformasyon sonucunda protein ekspres edilemediğinden sonuç elde edilemedi. Ksilanaz proteini elde edilemediğinden enzim optimum pH, optimum sıcaklık ve diğer parametreler açısından değerlendirilemedi.

*Bacillus halodurans* C-125 ve *Geobacillus* sp. TF16 ksilanazlarından DNA shuffling’i temel alan bir yaklaşım kullanılarak 4 adet kimerik gen elde edildi. GeoInH2CTer, GeoInH2CTer2, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 olarak isimlendirilen kimerik genler, orijinal ksilanaz enzimlerinin pH ve sıcaklık stabilitesini arttıracak şekilde dizayn edildi. Sırasıyla 1002, 1008, 987 ve 1023 bç uzunluğunda genler elde edildi. Kimerik genler önce pET20b(+)’ye, daha sonra da pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlandı ve *E. coli* BL21 (DE3) hücresine transformasyonu sağlandı. pET28a(+) vektörüne klonlanan kimerik ksilanazlardan sadece GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 ‘de protein ekspresyonuna rastlandı.

*Geobacillus* sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 ksilanazlarının optimum pH ve sıcaklıklarının sırasıyla; 9,0, 70 °C; 8,0, 60 °C; 8,0-10,0, 50-60 °C olduğu belirlendi. Kimerik ksilanazlar optimum pH ve sıcaklık açısından TF16 ksilanazıyla karşılaştırıldığında, sıcaklıkta düşüş görülmesine karşın kimerik ksilanazların pH aralığı ve yüksek pH'larda gösterdikleri aktiviteler bakımından büyük ölçüde artış sağlandığı görüldü. Enzim substratı olarak oat spelt ksilan kullanıldı ve ksilanazın ksilan substratını parçalamasıyla oluşan ksiloz şekeri ile enzimin aktivitesi tespit edildi. Kinetik parametreler açısından enzim incelendiğinde enzimlerin sırasıyla  $K_m$ 'si  $6,86 \pm 0,615$  mg/ml, 2,14 mg/ml ve 3,995 mg/ml,  $V_{max}$  ise  $720,24 \pm 22,99$  U/ mg, 10,615 U/mg ve 9,165 U/mg olarak hesaplandı.

*Geobacillus* sp. TF16, GeoIntraH2Int3 ve GeoIntraH2Int4 ksilanazlarının moleküler ağırlığı, amino asit dizini ve SDS-PAGE analizi kullanılarak sırasıyla 38,66 kDa, 38,3 kDa ve 40,1 kDa olarak belirlendi.

## 6. ÖNERİLER

Son yıllarda ticari olarak kullanılan enzimlerin büyük bir kısmının mikroorganizma kaynaklı enzimler olduğu görülmektedir. Bu enzimlerden en önemlilerinden olan ksilanazların enzimatik hidrolizinin ekonomik potansiyeli ve çevreci uygulamaları gün geçtikçe artmaktadır. Ksilanazlar, başta kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi olmak üzere endüstride birçok alanda kullanılmaktadır. Ksilanaz enziminin özelliklerinin daha da iyileştirilerek endüstriye kazandırılması, ekonomik olarak ve çevresel açıdan büyük önem taşımaktadır. Çünkü ksilanaz enzimi kullanılarak kağıt endüstrisinde kullanımı oldukça yaygın olan toksik klorlu bileşiklerin kullanımı azaltılmış olacak, aynı zamanda kağıdın hammaddesini oluşturan selüloza zarar vermediğinden kağıt endüstrisi uygulamalarında daha olumlu sonuçlar elde edilebilecektir.

Ülkemizin en önemli eksikliklerinden bir tanesi de endüstriyel alanlarda kullanılacak enzim üretiminin azlığıdır. Ülkemizde gerçekleştirilen endüstriyel çaptaki işlemlerde enzimler yurt dışından getirilmekte ve bu konuda dışa bağımlılığımız devam etmektedir. Enzim üretiminin pahalı olması sebebiyle dışarıdan enzim satın almak ekonomik bir kayıp meydana getirmektedir. Yapılacak olan çalışmalarla seri enzim üretimleri gerçekleşir ve patent hakları alınır, ülkemiz için ekonomik açıdan önemli bir gelişme sağlanmış olacaktır.

Bu çalışmada *Geobacillus* TF16 suşuna ait ksilanaz geninin *E. coli* hücresi içerisinde ekspresyonu sağlanmış, optimum sıcaklık ve pH'sı belirlenerek kinetik parametreler yönünden incelenmiştir. Elde edilen bulgular TF16 ksilanaz enziminin endüstriyel kullanıma uygun olduğunu göstermektedir.

Tez kapsamında *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz geni ile TF16 ksilanaz genlerinin belirli bölgeleri birleştirilerek kimerik genler oluşturulmuş ancak ekspresyona rastlanmamıştır. Bu çalışmanın devamında aynı yöntemle bu genlere ait farklı bölgeler birleştirilerek, doğru katlanma yapabilecek proteinler oluşturulabilir. Kimerik gen oluşturulmasının hedefi, enzimin kararlılığını ve verimini artırmak olduğundan, yeni dizayn edilecek kimeralarla enzim daha kararlı hale getirilebilir.

Ksilanaz enzimini daha kararlı hale getirmek için, kimerik gen oluşturmanın haricinde bölge özgün mutasyon yöntemi kullanılabilir. Bu yöntemle, enzimin substrat



spesifikliği ve ısıl kararlılığı artırılabilir ve bu Şekilde endüstride kullanıma daha uygun hale gelebilir.

Ksilanaz enzimi kağıt endüstrisinde yoğun olarak kullanılan bir enzimdir. Bu enzimin selülaz, lignin peroksidaz, pektinaz gibi kağıt endüstrisinde kullanılan diğer enzimlerle birlikte klonlanarak aktivitesinin artırılması hedeflenebilir.

## 7. KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry; Production and Applications. Wiley-Vch Verlag GwbH & Co. KgaA, Weinhelm, 484, Netherlands.
- Ahmed, S., Imdad, S.S. ve Jamil, A., 2012. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*, Electron. J. Biotechnol., 15, 2-3.
- Altun, H., 2012. Ksilanaz Enzimi xynA-7'nin Enzimatik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kağıt Hamuru Ağartma Endüstrisi'nde Kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Antikainen, N.M. ve Martin, S.F., 2005. Altering protein specificity: techniques and applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 8, 2701- 2716.
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayın Serisi No:46, Ankara.
- Arnold, F.H., 1993. Engineering proteins for non-natural environments, The FASEB Journal, 9, 744-749.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selüloz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- 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.
- Biely, P. ve Petrakova, E., 1984. Novel inducers of the xylan-degrading enzyme system of *Cryptococcus albidus*, Journal of Bacteriology, 160, 408-412.
- 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.
- 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.
- Canakcı, S., Cevher, Z., Inan, K. ve Tokgoz, M., 2012. Cloning, purification and characterization of an alkali-stable endoxylanase from thermophilic *Geobacillus* sp. 71, World J Microbiol Biotechnol, 28, 1981-1988.
- Claus, D. ve Berkeley, C.W., 1986. The genus *Bacillus* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, Sneath pHA (Ed.).

- Collins, T., Gerday, C. ve Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews, 29, 1, 3-23.
- Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. ve Stemmer, W.P.C., 1996. Improved Green Fluorescent Protein by Molecular Evolution Using DNA Shuffling, Nature Publishing Group, 2, 100-102.
- Çanakçı, S., 2003. Gönen, Kestanel ve Diyardın Kaplıcalarından Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle Karakterizasyonu ve Tanımlanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Erdoğan, K. ve Akpınar, Ö., 2008. Ksilooligosakkaritlerin Önemi, Üretim Yöntemleri ve Kullanım Alanları. Akademik Gıda, 6, 4, 14-20.
- Fujiwara, S., 2002. Extremophiles: Developments of Their Special Functions and Potential Resources. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94, 518-525.
- Gibbs, M. D., Nevalainen, K. M. H. ve Bergquist, P. L., 2001. Degenerate oligonucleotide gene shuffling (DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling, Gene, 271, 13-20.
- Gilbert, H.J. ve Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases. Journal of General Microbiology, 139, 187-194.
- Golynskiy, M.V. ve Seelig, B., 2010. De novo enzymes: from computational design to mRNA display, Trends in Biotechnology, 7, 340-345.
- Godfrey, T. ve West, S., 1996. Introduction to Industrial Enzymology. (T. Godfrey and S. West editör) Industrial Enzymology, 2nd Edition, Stockton Press, New York.
- Güder, S., 2014. *Scytalidium thermophilum* Ksilanazının Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karaman.
- Gül-Güven, R., 2004. *Alicyclobacillus acidocaldarius* subspecies *ritmannii*'nin  $\beta$ -Galaktozidaz Enzimi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Haki, G., D. ve Rakshit, S., 2003. Developments in industrially Important Thermostable Enzymes: a Review, Bioresource Technology, 89, 17-34.
- Haney, P., J., Badger, J., H., Buldak, G., L., Reich, C., I., Woese, C., R. ve Olsen, G., J., 1999. Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species, Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 3578-3583.
- Haramaya, S., 1998. Artificial Evolution by DNA Shuffling, Trends Biotechnol, 16, 76-82.

- Hauli, I., Sarkar, B., Mukherjee, T. ve Mukhopadhyay, K.S., 2013. Purification and characterization of a thermoalkaline, cellulase free thermostable xylanase from a newly isolated *Anoxybacillus* sp. Ip-C from hot spring of Ladakh. Research in Biotechnology, 4,4, 30-43.
- Honda, H., Kudo, T., Ikura ve Horikoshi Y.K., 1985. Two types of xylanases of alkalophilic *Bacillus* sp. No. C-125. Canadian Journal of Microbiology, 31, 6, 538-542.
- Hongpattarakere, T., 2002. Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications, Songklanakarin J. Sci. Technol., 24, 3, 481-491.
- İnce, E., 2006. Ksilanaz Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin İzolasyonları ve Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kallel, F., Driss, D., Bouaziz, F., Neifer, M., Ghorbel, R. ve Chaabouni, S.E., 2014. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their *in vitro* evaluation as prebiotics, Food Bioprod Process, 521, 11.
- Kulkarni, N., Shendye, A. ve Rao, M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases, FEMS Microbiology Reviews, 23, 411-456.
- Lopez-Garcia, P., 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life, J. Mol. Evol., 49, 4, 439-452.
- Mamo, G., Thunnissen, M., Hatti-Kaul, R. ve Mattiasson, B., 2009. An alkaline active xylanase: Insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation, Biochimie, 91, 1187–1196.
- Maniatis, T. ve Fritsch, E.F., 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 545.
- 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.
- 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.

- Moore, J. C., Jin, H. M., Kuchner, O. ve Arnold, F. H., 1997. Strategies for the *in vitro* Evolution of Protein Function: Enzyme Evolution by Random Recombination of Improved Sequences, J. Mol. Biol., 272, 336-347.
- Antikainen, N. M. ve Martin, S. F., 2005. Altering protein specificity: techniques and applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 13, 2701–2716.
- 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, 2311-2316.
- Nishimoto, M., Kitaoka, M. ve Hayashi, K., 2002. Employing Chimeric Xylanases to Identify Regions of an Alkaline Xylanase Participating in Enzyme Activity at Basic pH. Journal of Bioscience and Bioengineering, 5, 395 -400.
- Patten, P. A., Howard, R. J. ve Stemmer, W. P. C., 1997. Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines, Current Opinion in Biotechnology, 8, 724-733.
- 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.
- Poorna, C.A., 2011. Purification and Biochemical Characterization of Xylanases from *Bacillus pumilus* and their Potential for Hydrolysis of Polysaccharides, Ferment Technol., 1, 101.
- Puls, J. ve Schuseil, J., 1993. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis, Portland Press, (Editors: Coughlan, M.P., Hazlewood, G.P.), London, 4-5.
- Querido, A.L.S, Coelho, J.L.C., Araújo, E.F. ve Chaves-Alves, V.M., 2006. Partial purification and characterization of xylanase produced by *Penicillium expansum*, Braz. arch. biol. technol., 49, 3.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M. Gathe, M.S. ve Deshpande, W., 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 3, 597-635.
- 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.
- Sağiroğlu, A.K., 1999. Enzim Teknolojisi, Bilim ve Teknik, 383, 74-80.
- Saha, B.C., 2000. L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, Biotechnology Advances, 18, 403-423.

- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Peliti, L. ve Engel, P.C., 1998. Protein thermostability in extremophiles. Biochimie, 80, 933-941.
- 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.
- Seyis, I. 1997. Fungal Kaynaklardan Ksilanaz Eldesi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Shibuya, H., Kaneko, S. ve Hayashi, K., 2000. Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of xylanase by random gene shuffling, Biochem. J., 349, 651-656.
- 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.
- Smith, J.E., 1996. Biotechnology. Chambridge University Pres, Cambridge, 233.
- Stemmer, W. P. C., 1994. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling, Letters to Nature.
- Subramaniyan, S. ve Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology and application. Critical Reviews in Biotechnology, 22, 1, 33-46.
- Tekin, N., 2008. Türkiye Kaynaklı *Bacillus* spp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Thomson, J.A., 1993. Molecular biology of xylan degradation, FEMS Microbiol., 4, 65-82.
- Tokgöz, M., İnan, K., Beldüz, A.O., Gedikli, Ö. ve Çanakçı, S., 2014. Cloning, purification, and characterization of a thermophilic ribulokinase from *Anoxybacillus kestanbolensis* AC26Sari, Turkish Journal of Biology, 38, 633-639.
- Turanlı-Yıldız, B., Alkim, C. ve Cakar, P., 2012. Protein Engineering, (Edit. Pravin Kaumaya).
- URL-1, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Arkea>. 15 Ağustos 2014.
- URL-2, <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702040403.pdf> . 5 Haziran 2014.
- URL-3, <http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110101.pdf>. 5 Haziran 2014.
- URL-4, <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>. 10 Ağustos 2014.

- Vikramathithan, J., Kumar, G.N., Muthuraman, P. ve Srikumar, K., 2010. Purification and characterization of thermophilic xylanase isolated from the xerophytic-*Cereus pterogonus* sp., Protein J, 29, 7, 481-6.
- Vogt, G., Woell, S. ve Argos, P., 1997. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. J. Mol. Biol., 269, 631-643.
- Wang, Q. ve Xia, T., 2007. Enhancement of the thermostability and hydrolytic activity of GH10 xylanase by module shuffling between *Cellulomonas fimi* Cex and *Thermomonospora alba* XylA, World J Microbiol Biotechnol, 23, 1047-1055.
- Wang, Q. ve Xia T., 2008. Enhancement of the activity and alkaline pH stability of *Thermobifida fusca* xylanase A by directed evolution, Biotechnol Lett, 30, 937-944.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. ve Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. Microbiological Reviews, 3, 305-317.
- Wosse, C.R., Kandler, O. ve Wheelis, M.L., 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, an Eucarya. Poc. Natl. Acad. Sci. USA., 87, 4576-4579.
- 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.
- Zaborsky, O. 1973. Immobilized Enzymes (Edited: Zaborsky), CRC Press.
- Zaccolo, M. ve Malavasi, F., 1993. From cells to genes – how to make antibodies useful in human diagnosis and therapy, International Journal of Clinical & Laboratory Research, 4, 192-198.
- Zhang, J. H., Dawes, G. ve Stemmer, W. P. C., 1997. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening, Proc. Natl. Acad., 4504-4509.
- Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A. ve Arnold, F. H., 1998. Molecular Evolution by Staggered Extension Process (StEP) *in vitro* Recombination, Nature Biotechnology, 16, 258-261.

## 8. EKLER

### Ek 1. *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz geni

ATGATTACACTTTTTAGAAAGCCTTTTGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGAG  
GGGGGATCGGCAATGTAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAAATCCGGAGTCTTTGGAGA  
AAATGAAAAAAGAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTCTTTCTGAGCGATAT  
CAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGGTTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAAGCCC  
AAATTTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAATCACT  
CCAGCCAAGAGAAGGTGAGTGGAAGTGGGAAGGCGCTGACAAAATTGTGGAGTTTGCCCGC  
AAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTTGGCACAGCCAAGTACCAGAATGGT  
TTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGATAAACGTGAAGC  
GAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAACCATATTTAAAACGGTTGTTGAACGTTAT  
AAAGATGATGTGACTTCATGGGACGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGC  
GTGAATCGGAATGGTATCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTTTGAAACCGC  
AAGAAAATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAAGTTCCT  
TCAAAAAGAGATGACCTTTACAACCTGGTGAAAGACTTATTAGAGCAAGGAGTGCCAATTG  
ACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCCATTGAAGATACAAGAGC  
TTCTTTTGAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAATCAAGTAACTGAGCTAGACATGAGT  
CTCTATGGCTGGCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGACATTCCAGCAGAACTCC  
TTCAAGCCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTCGAGTTATACGAAGAATTAGCTGCTGA  
TATTAGCAGTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACATGGCTTGATGGCCGCGCT  
AGAGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTTGTTTTTTGATCATAACTATCGAG  
TGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATTGATTAG



**Ek 2. *Bacillus halodurans* C-125 ksilanaz proteinine ait amino asit dizini**

MITLFRKPFVAGLAISLLVGGGIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRNDQPFAWQVASLSERY  
QEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPESLQPREGEWNWEGADKIVEFAR  
KHNMELRFHTLVWHSQVPEWFFIDEDGNRMVDETDPKREANKQLLLERMENHIKTVVERY  
KDDVTSWDVVNEVIDDGGGLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGGEEAKLYINDYNTEVP  
SKRDDLYNLVKDLLEQGVPIDGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVTELDMS  
LYGWPPTGAYTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVTFWGIADNHTWLDGRA  
REYNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID

**Ek 3. *Geobacillus* sp. TF16 suşuna ait ksilanaz geni**

ATGAACAGCTCCCTCCCCTCCCTCCGCGATGTATTCGCGAACGATTTCCGCATCGGGGCGG  
 CGGTCAATCCTGTGACAATTGAGATGCAAAAACAGTTGTTGATCGATCATGTCAACAGTAT  
 TACGGCAGAGAACCATATGAAGTTTGAGCATCTTCAGCCGGAAGAAGGGAAATTTACCTTT  
 CAGGAAGCGGATCGGATTGTTGATTTTGCTTGTTCGCACCGAATGGCGGTTTCGAGGGCACA  
 CACTTGTATGGCACAACCAGACTCCGGATTGGGTGTTTTCAAGATGGTCAAGGCCATTTTCGT  
 CAGTCGGGATGTGTTGCTTGAGCGGATGAAATGTCACATTTCAACTGTTGTACGGCGATAC  
 AAGGGAAAAATATATTGTTGGGATGTCGTCAACGAAGCGGTAGCCGACGAAGGAGACGAAT  
 TGTTGAGGCCGTCGAAGTGGCGACAAATCATCGGGGACGATTTTATTGAACAAGCATTCT  
 CTACGCTTATGAAGCTGACCCAGATGCACTGCTTTTTTTACAATGACTATAATGAATGTTTT  
 CCGGAAAAGAGAGAAAAAATTTTTGCACTTGTCAAATCGCTGCGTGACAAGGGCATTCCGA  
 TTCATGGCATCGGGATGCAAGCGCACTGGAGTTTGACCCACCCATCGTTGGATGAAATTCG  
 TGCGGCCATTGAACGATATGCATCCCTTGATTTGTTCTCCATATCACGGAACTCGATGTA  
 TCTATGTTTTGAATTTTCATGATCGTCGAAACGATTTAGCTGCTCCTACGAACGAAATGATCG  
 AACAGCAAGCAGAGCGGTATGGGCAAATTTTTGCTTTGTTTAAGGAGTATCGCGATGTTAT  
 TCAAAGTGTACATTTTGGGGAATTGCTGATGACCATACATGGCTCATAACCTTCCAGTGC  
 AGGGGGAGAAAAAAGTGGCCGCTTTTGTTCGATGAACAGCATAAACCGAAACCAGCCTTTT  
 GGAGGGCAGTGAGTGTCTGA

**Ek 4. *Geobacillus* sp. TF16 suşuna ait ksilanaz proteinine ait amino asit dizini**

MNSSLPSLRDVFANDFRIGAAVNPVTIEMQKQLLIDHVNSITAENHMKFEHLQPEEGKFTF  
QEADRIVDFACSHRMAVRGHTLVVHNQTPDWVFQDGQGHFVSRDVLLERMKCHISTVVRRY  
KGKIYCWDVVNEAVADEGDELLRPSKWRQIIGDDFIEQAFLYAYEADPDALLFYNDYNECF  
PEKREKIFALVKSLRDKGIPIHGIGMQAHWSLTHPSLDEIRAAIERYASLGIVLHITELDV  
SMFEFHDRRNDLAAPTNEMIEQQAERYGQIFALFKEYRDVIQSVTFWGIADDHTWLITFQC  
RGRKNWPLLFDEQHKPKPAFWRAVSV

**Ek 5. GeoInH2CTer kimerik ksilanaz genine ait nükleotit dizisi**

ATGAACAGCTCCCTCCCCTCCCTCCGCGATGTATTGCGGAATGATTTCCGCATCGGGGCGG  
 CGGTCAATCCTGTGACAATTGAGATGCAAAAACAGTTGCTGATCGATCATGTCAACAGTAT  
 TACGGCAGAGAACCATATGAAGTTTGAGCATCTTCAGCCGGAAGAAGGGAAATTTACCTTT  
 CAGGAAGCGGATCGGATTGTTGATTTTGCTTGTTCGCACCGAATGGCGGTTTCGAGGGCACA  
 CACTTGTATGGCACAACCAGACTCCGGATTGGGTGTTTTCAAGATGGTCAAGGCCATTTTCGT  
 CAGTCGGGATGTGTTGCTTGAGCGGATGAAATGTCACATTTCAACTGTTGTACGGCGATAC  
 AAGGGAAAAATATATTGTTGGGATGTCGTCAACGAAGCGGTAGCCGACGAAGGAGACGAAT  
 TGTTGAGGCCGTCGAAGTGGCGACAAATCATCGGGGACGATTTTATTGAACAAGCATTCT  
 CTACGCTTATGAAGCTGACCCAGATGCACTGCTTTTTTTACAATGACTATAATGAATGTTTT  
 CCGGAAAAGAGAGAAAAAATTTTTGCACTTGTCAAATCGCTGCGTGACAAAGGCATCCCGA  
 TTCATGGCATCGGGATGCAAGCGCACTGGAGTTTGACCCACCCATCGTTGGATGAAATTCG  
 TGCGGCCATTGAACGATATGCATCCCTTGGTATTGTTCTCCATATCACGGAACTCGATGTA  
 TCTATGTTTGAATTTTCATGATCGTCGAAACGATTTAGCTGCTCCTACGAACGAAATGATCG  
 AACAGCAAGCAGAGCGGTATGGGCAAATTTTTGCTTTGTTTAAGGAGTATCGCGATGATAT  
 TAGCAGTGTAACTTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACATGGCTTGATGGCCGCGCTAGA  
 GAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTTGTTTTTTGATCATAACTATCGAGTGA  
 AACCTGCTTACTGGAGAATTATTGAT

**Ek 6. GeoInH2CTer kimerik ksilanaz proteinine ait amino asit dizini** (Altı çizili amino asitler değiştirilen kısımları göstermektedir)

MNSSLPSLRDVFANDFRIGAAVNPVTIEMQKQLLIDHVNSITAENHMKFEHLQPEEGKFTF  
QEADRIVDFACSHRMAVRGHTLVWHNQTDPDWFQDGQGHFVSRDVLLERMKCHISTVVRRY  
KGKIYCWVNEA VADEGDELLRPSKWRQIIGDDFIEQAFLYAYEADPDALLFYNDYNECF  
PEKREKIFALVKSLRDKGIP IHGIGMQAHWSLTHPSLDEIRAAIERYASLGIVLHITELDV  
SMFEFHDRRNDLAAPTNEMIEQQAERYGQIFALFKEYRDDISSVTFWGIADNHTWLDGRAR  
EYNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID

**Ek 7. GeoInH2CTer2 kimerik ksilanaz genine ait nükleotit dizini**

ATGAACAGCTCCCTCCCCTCCCTCCGCGATGTATTTCGCGAATGATTTCCGCATCGGGGCGG  
 CGGTCAATCCTGTGACAATTGAGATGCAAAAACAGTTGTTGATCGATCATGTCAACAGTAT  
 TACGGCAGAGAACCATATGAAGTTTGAGCATCTTCAGCCGGAAGAAGGGAAATTTACCTTT  
 CAGGAAGCGGATCGGATTGTTGATTTTGCTTGTTTCGCACCGAATGGCGGTTTCGAGGGCACA  
 CACTTGTATGGCACAACCAGACTCCGGATTGGGTGTTTCAAGATGGTCAAGGCCATTTTCGT  
 CAGTCGGGATGTGTTGCTTGAGCGGATGAAATGTCACATTTCAACTGTTGTACGGCGATAC  
 AAGGGAAAAATATATTGTTGGGATGTCGTCAACGAAGCGGTAGCCGACGAAGGAGACGAAT  
 TGTTGAGGCCGTCGAAGTGGCGACAAATCATCGGGGACGATTTTATTGAACAAGCATTCT  
 CTACGCTTATGAAGCTGACCCAGATGCACTGCTTTTTTACAATGACTATAATGAATGTTTT  
 CCGGAAAAGAGAGAAAAAATTTTTGCACTTGTCAAATCGCTGCGTGACAAAGGCATTCCGA  
 TTCATGGCATCGGGATGCAAGCGCACTGGAGTTTGACCCACCCATCGTTGGATGAAATTCG  
 TGCGGCCATTGAACGATATGCATCCCTTGATTGTTCTCCATATCACGGAACTCGATGTA  
 TCTATGTTTTGAATGGCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGACATTCCAGCAGAAC  
 TCCTTCAAGCCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTCGAGTTATACGAAGAATTAGCTGC  
 TGATATTAGCAGTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACATGGCTTGATGGCCGC  
 GCTAGAGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTTGTTTTTGATCATAACTATC  
 GAGTGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATTGAT

**Ek 8. GeoInH2CTer2 kimerik ksilanaz proteinine ait amino asit dizini** (Altı çizili amino asitler değiştirilen kısımları göstermektedir)

MNSSLPSLRDVFANDFRIGAAVNPVTIEMQKQLLIDHVNSITAENHMKFEHLQPEEGKFTF  
QEADRIVDFACSHRMAVRGHTLVWHNQTDPDWFQDGQGHFVSRDVLLERMKCHISTVVRRY  
KGKIYCWDVVNEAVADEGDELLRPSKWRQIIGDDFIEQAFLYAYEADPDALLFYNDYNECF  
PEKREKIFALVKSLRDKGIPIHGIGMQAHWSLTHPSLDEIRAAIERYASLGIVLHITELDV  
SMFEWPPTGAYTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVTFWGIADNHTWLDGR  
AREYNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID

**Ek 9. GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanaz genine ait nükleotit dizini**

ATGAACAGCTCCCTCCCCTCCCTCCGCGATGTATTTCGCGAATGATTTCCGCATCGGGGCGG  
CGGTCAATCCTGTGACAATTGAGATGCAAAAACAGTTGTTGATCGATCATGTCAACAGTAT  
TACGGCAGAGAACCATATGAAGTTTGAGCATCTTCAGCCGGAAGAAGGGAAATTTACCTTT  
CAGGAAGCGGATCGGATTGTTGATTTTGCTTGTTTCGCACCGAATGGCGGTTTCGAGGGCACA  
CACTTGTATGGCACAACCAGACTCCGGATTGGGTGTTTTCAAGATGGTCAAGGCCATTTTCGT  
CAGTCGGGATCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAACCATATTTAAAACGGTTGTTGAACGTTAT  
AAAGATGATGTGACTTCGTGGGACGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGC  
GTGAATCGGAATGGCGACAAATCATCGGGGACGATTTTATTGAACAAGCATTCTCTACGC  
TTATGAAGCTGACCCAGATGCACTGCTTTTTTTACAATGACTATAATGAATGTTTTCCGGAA  
AAGAGAGAAAAAATTTTTGCACTTGTCAAATCGCTGCGTAACAAAGGCATTCCGATTCATG  
GCATCGGGATGCAAGCGCACTGGAGTTTGACCCACCCATCGTTGGGTGAAATTCGTGCGGC  
CATTGAACGATATGCATCCCTTGGTATTGTTCTCCATATCACGGAECTCGATGTATCTATG  
TTTGAATTTTCATGATCGTCGAAACGATTTAGCTGCTCCTACGAACGAAATGATCGAACAGC  
AAGCAGAGCGGTATGGGCAAATTTTTGCTTTGTTTAAGGAGTATCGCGATGTTATTCAAAG  
TGTACATTTTGGGGAATTGCTGATGACCATAACATGGCTCGATAATTTTCCAGTGCAGGGG  
AGAAAAAACTGGCCGCTTTTTGTTTCGATGAACAGCATAAACCGAAACCAGCCTTTTGGAGGG  
CAGTGAGTGTC



**Ek 10. GeoIntraH2Int3 kimerik ksilanaz proteinine ait amino asit dizini** (Altı çizili amino asitler değiştirilen kısımları göstermektedir)

MNSSLPSLRDVFANDFRIGAAVNPVTIEMQQLLIDHVNSITAENHMKFEHLQPEEGKFTF  
 QEADRIVDFACSHRMAVRGHTLVWHNQTDPDWFQDGQGHFVSRDLLLERMENHIKTVERY  
KDDVTSWDVVNEVIDDGGGLRESEWRQIIGDDFIEQAFLYAYEADPDALLFYNDYNECFPE  
 KREKIFALVKSLRNKGIPIHGIGMQAHWSLTHPSLGEIRAAIERYASLGIVLHITELDVSM  
 FEFHRRNDLAAPTNEMIEQQAERYGQIFALFKEYRDVIQSVTFWGIADDHTWLDNFPVQG  
 RKNWPLLFDEQHKPKPAFWRAVSV

**Ek 11. GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz genine ait nükleotit dizini**

ATGAACAGCTCCCTCCCCTCCCTCCGCGATGTATTTCGCGAATGATTTCCGCATCGGGGCGG  
 CGGTCAATCCTGTGACAATTGAGATGCAAAAACAGTTGTTGATCGATCATGTCAACAGTAT  
 TACGGCAGAGAACCATATGAAGTTTGAGCATCTTCAGCCGGAAGAAGGGAAATTTACCTTT  
 CAGGAAGCGGATCGGATTGTTGATTTTGCTTGTTTCGCACAACATGGAGCTTCGCTTCCACA  
 CGCTCGTTTTGGCACAGCCAAGTACCAGAATGGTTTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGAT  
 GGTGGATGAAACAGACCCAGATAAACGTGAAGCGAATCGGGATGTGTTGCTTGAGCGGATG  
 AAATGTCACATTTCAACTGTTGTACGGCGATAACAAGGGAAAAATATATTGTTGGGATGTCG  
 TCAACGAAGCGGTAGCCGACGAAGGAGACGAATTGTTGAGGCCGTCGAAGTGGCGACAAAT  
 CATCGGGGACGATTTTATTGAACAAGCATTCTCTACGCTTATGAAGCTGACCCAGATGCA  
 CTGCTTTTTTTACAATGACTATAATGAATGTTTTTCCGAAAAGAGAGAAAAAATTTTTGCAC  
 TTGTCAAATCGCTGCGTGACAAAGGCATTCCGATTCATGGCATCGGGATGCAAGCGCACTG  
 GAGTTTGACCCACCCATCGTTGGATGAAATTCGTGCGGCCATTGAACGATATGCATCCCTT  
 GGTATTGTTCTCCATATCACGGAACTCGATGTATCTATGTTTGAATTTTCATGATCGTCGAA  
 ACGATTTAGCTGCTCCTACGAACGAAATGATCGAACAGCAAGCAGAGCGGTATGGGCAAAT  
 TTTTGCTTTGTTTAAGGAGTATCGCGATGTTATTCAAAGTGTACATTTTGGGGAATTGCT  
 GATGACCATACATGGCTCGATAATTTTCCAGTGCAGGGGAGAAAAAACTGGCCGCTTTTGT  
 TCGATGAACAGCATAAACCGAAACCAGCCTTTTGGAGGGCAGTGAGTGTC

**Ek 12. GeoIntraH2Int4 kimerik ksilanaz proteinine ait amino asit dizini** (Altı çizili amino asitler değiştirilen kısımları göstermektedir)

MNSSLP SLRDVFANDFRIGAAVNPVTIEMQQLLIDHVNSITAENHMKFEHLQPEEGKFTF  
 QEADRI VDFACSHNMELRFHTLVWHSQVPEWFF IDEDGNRMVDETDPDKREANRDVLLERM  
 KCHISTVRRYKGIYCWDVVNEAVADEGDELLRPSKWRQIIGDDFIEQAFLYAYEADPDA  
 LLFYNDYNECFPEKREKIFALVKSLRDKGIPIHGIGMQAHWSLTHPSLDEIRAAIERYASL  
 GIVLHITELDVSMFEFHDRRNDLAAPT NEMIEQQAERYGQIFALFKEYRDVIQSVTFWGIA  
 DDHTWLDNFPVQGRKNWPLLFDEQHKPKPAFWRAVSV

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Düzce'de doğdu. İlkokulu Düzce Işık İlköğretim Okulunda, ortaokulu Ankara Hasan Ali YÜCEL İlköğretim Okulunda okudu. Lise eğitimini, 2005 yılında Yenimahalle Mobil Lisesi'nde tamamladı. 2006-2007 öğretim yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliğini 2011 yılında tamamladı. 2011 yılında K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI danışmanlığında yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen burada Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. İyi derecede İngilizce bilmektedir.