

2007-8



**TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU**

THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

104 T473

TOPRAK İZOLATI *Bacillus* M-13 KSİLANAZ'ININ
STİRLİMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE KSİLANAZ

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Committee

2007-73323



TÜBİTAK

TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA
KURUMU

THE SCIENTIFIC AND
TECHNOLOGICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

104 T 473

TOPRAK İZOLATI *Bacillus* M-13 KSİLANAZ'ININ
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE KSİLANAZ
GENİNİN İZOLASYONU

104T473

Temel Bilimler Araştırma Grubu

Basic Sciences Research Grant Group

TOPRAK İZOLATI *Bacillus* M-13 KSİLANAZ'ININ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE KSİLANAZ GENİNİN İZOLASYONU

PROJE NO: 104T473

PROF. DR. UFUK BAKIR
PROF. DR. ZÜMRÜT ÖGEL
DR. AYŞEGÜL ERSAYIN YAŞINOK

ŞUBAT 2007
ANKARA

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, iyi bir ksilanaz üreticisi olduğu laboratuvarımızda yapılan çalışmalarla belirlenen, toprak izolatu *Bacillus* M-13 suşu, öncelikle mikrobiyolojik ve biyokimyasal metodlar kullanılarak *Bacillus pumilus* olarak tanımlanmış ve *B. pumilus* SB-M13 olarak isimlendirilmiştir.

Çalışmanın ikinci ve ana bölümünde de *B. pumilus* SB-M13'e ait, ksilan hidrolizinde görev alan ksilanolitik enzim sistemi incelenmiş ve bu sistemde görev alan enzimlerin endüstriyel kullanıma uygunluğu araştırılmıştır. Bu kapsamda *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz enzimi saflaştırılmış ve saf enzim biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise, *B. pumilus* SB-M13'e ait ksilanaz geni izole edilmiştir. Proje TÜBİTAK Temel Bilimler Araştırma Grubu (TBAG) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
ÖZ	vii
ABSTRACT	ix
KISALTMALAR	xi
BÖLÜMLER	
1. GİRİŞ	1
1.1 Ksilan	1
1.2 Ksilanın enzimlerle parçalanması.....	3
1.3 Ksilanazın yapısı ve ksilanolitik enzimlerin aktivitesi arasındaki ilişki.....	5
1.4 Ksilanaz üreten mikroorganizmalar	5
1.5 Ksilanolitik enzimlerinin endüstriyel kullanımı	10
1.6 Ksilanaz enziminin moleküler biyolojisi.....	11
2. DENEYSEL YÖNTEMLER	
2.1 Toprak izolatı Bacillus suşunun izolasyonu ve saklanması	12
2.1.2 Toprak izolatı Bacillus suşunun tanımlanması	12
2.1.2.1 Endospor boyama.....	13
2.1.2.2 API 50 CH-API 50 CHB/E ortam kit analizi.....	13
2.1.2.3. Yağ asit analizi.....	14
2.2 <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanolitik sistemi.....	14
2.2.1 <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanolitik enzimlerinin üretimi	14
2.2.2 Ksilanolitik enzimlerin aktivite ölçümü	15

2.3. <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz enzimi saflaştırma ve karakterizasyonu.....	16
2.3.1 Ksilanaz üretimi.....	16
2.3.2 Ksilanaz aktivite ölçümü	16
2.3.3 Protein derişiminin saptanması.....	17
2.3.4 Ksilanaz enziminin saflaştırması.....	17
2.3.4.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi	18
2.3.4.1.1 Hidrofobik etkileşim mini-test kolonlarının testi	19
2.3.4.1.2 Ksilanazın fenil sefaroze yüksek performans kolonu ile saflaştırılması	20
2.3.5 Analitik jel elektroforezi ve izoelektrik noktalama	20
2.3.6 Zimogram analizi.....	21
2.3.7 pH ve sıcaklığın ksilanaz aktivitesine etkisi.....	21
2.3.8 pH ve sıcaklığın ksilanaz dayanıklılığına etkisi	22
2.3.9 Kinetik çalışmalar.....	22
2.4 <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz geni izolasyonu ve klonlanması.....	22
2.4.1 Kromozomal DNA izolasyonu	22
2.4.2 Polimeraz zincir tepkimesi	23
2.4.3 PCR ürünlerinin temizlenmesi	25
2.4.4 DNA dizin analizi	26
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	
3.1 Toprak izolatı <i>Bacillus</i> SB-M13'ün tanımlanması.....	27
3.2 <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanolitik sistemi.....	27
3.2.1 <i>B. pumilus</i> SB-M13 hücre dışı ksilanolitik enzimlerinin zamana bağlı üretimi	28
3.2.2 Karbon kaynaklarının ksilanolitik enzim üretimine etkisi	34

3.2.2.1 Tarımsal atıkların etkisi	34
3.2.2.2 L-arabinozun etkisi	44
3.3 <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu.....	49
3.3.1 Ksilanaz enziminin saflaştırması.....	49
3.3.1.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi	49
3.3.1.1.1 Hidrofobik etkileşim mini-test kolonlarının testi	50
3.3.1.1.2 Ksilanazın fenil sefaroze yüksek performans kolonu ile saflaştırılması	50
3.3.2 Analitik jel elektroforezi ve izoelektrik noktalama	53
3.3.3 pH ve sıcaklığın ksilanaz aktivitesine etkisi.....	54
3.3.4 pH ve sıcaklığın ksilanaz dayanıklılığına etkisi	57
3.3.5 Kinetik çalışmalar.....	57
3.4 <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz geni izolasyonu	60
4. SONUÇ	68
KAYNAKÇA	71
EKLER	83
RAPOR ÖZETİ	86

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İzole edildiği bitkisel kaynağa bağlı olarak ksilan kompozisyonundaki çeşitlilik	2
Tablo 2. Mantar ksilanazlarının fizikokimyasal özellikleri	7
Tablo 3. Bakteriyel ksilanazların fizikokimyasal özellikleri	8
Tablo 4. Farklı mikroorganizmalarda ksilanaz aktivitelerinin karşılaştırılması	9
Tablo 5. Hidrofobik etkileşim mini test kolon tiplerinin özellikleri	19
Tablo 6. <i>B. pumilus</i> SB-M13 kaba enzim özütünde ksilanolitik enzim aktiviteleri.....	35
Tablo 7. Farklı hidrofobik etkileşim kolonlarının (1ml) küçük ölçekte ksilanaz saflaştırma performansı.....	52
Tablo 8. Farklı deneysel şartlarda 20 ml'lik fenil sefaroze kolon kromatografisi ksilanaz saflaştırma performansı.....	52
Tablo 9. <i>Bacillus pumilus</i> ksilanazları fizikokimyasal özellikleri.....	60
Tablo 10. <i>Bacillus</i> suşlarının ksilanaz gen benzerliklerinin karşılaştırılması	66

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mısır kabuğuna ait heteroksilan yapısı	2
Şekil 2. Bitkisel ksilan yapısı ve ksilan hidrolizinde etkili hidrolitik enzimlerin ksilan yapısındaki etki noktaları	4
Şekil 3. <i>B. pumilus</i> SB-M13 suşu ksilanaz geni (AF220528) ve primer bölgeleri	24
Şekil 4. <i>Bacillus pumilus</i> SB-M13 endospor boyama resmi	28
Şekil 5. %3 mısır koçanı üzerinde çoğaltılan <i>B. pumilus</i> SB-M13 kaba enzim özütünde bulunan ksilanolitik enzim aktiviteleri	29
Şekil 6. %3 buğday kabuğu üzerinde çoğaltılan <i>B. pumilus</i> SB-M13 kaba enzim özütünde bulunan ksilanolitik enzim aktiviteler	31
Şekil 7. %3 pirinç kabuğu üzerinde çoğaltılan <i>B. pumilus</i> SB-M13 enzim özütünde bulunan ksilanolitik enzim aktiviteleri	33
Şekil 8. Karbon kaynaklarının <i>Bacillus pumilus</i> SB-M13 AF üretimine etkisi	36
Şekil 9. Karbon kaynaklarının <i>Bacillus pumilus</i> SB-M13 XYN üretimine etkisi	36
Şekil 10. Karbon kaynaklarının <i>Bacillus pumilus</i> SB-13 GAL üretimine etkisi	37
Şekil 11. L-arabinozun <i>B. pumilus</i> SB-M13 kultivasyonuna etkisi	45
Şekil 12. L-arabinozun <i>B. pumilus</i> SB-M13 AF üretimine etkisi	46
Şekil 13. L-arabinozun <i>B. pumilus</i> SB-M13 XYN üretimine etkisi.....	47
Şekil 14. L-arabinozun <i>B. pumilus</i> SB-M13 GAL üretimine etkisi	48
Şekil 15. <i>Bacillus pumilus</i> SB-M13 ksilanazının fenil sefaroz yüksek performans kolonu (20 ml) ile saflaştırma kromatogramı ve ksilanaz aktivite profili.....	51

Şekil 16. Tek basamak fenil sefaroz kolonu ile saflaştırma ardından 20 kat konsantre edilmiş ksilanaz enziminin; A- SDS-PAGE ve B- aktivite zimogramı	53
Şekil 17. pH'ın <i>B. pumilus</i> SB-M13 saf ksilanazının aktivite ve dayanıklılığına etkisi	55
Şekil 18. Sıcaklığın <i>B. pumilus</i> SB-M13 saf ksilanazının aktivite ve dayanıklılığına etkisi	56
Şekil 19. <i>B. pumilus</i> SB-M13 saf ksilanazının Michaelis-Menten grafiği	58
Şekil 20. <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz geni agaroz jel (% 1) resimleri	62
Şekil 21. Signal peptid içermeyen <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz gen diziliminin 560 bp'lik kısmı	63
Şekil 22. <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz genin 560 bp'lik kısmı ve bu gene % 94 benzeyen <i>B. pumilus</i> suşu ksilanaz genine (AF220528) ait sekansların karşılaştırılması	64
Şekil 23. <i>B. pumilus</i> ksilanazının kısmi amino asit dizilimi	65

ÖZ

104T473

**TOPRAK İZOLATI *Bacillus pumilus* M-13 KSİLANAZ'ININ SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZE EDİLMESİ VE KSİLANAZ GENİNİN İZOLASYONU**

Prof. Dr. Ufuk Bakır, Prof. Dr. Zümrüt Ögel,

ve Dr. Ayşegül Ersayın Yaşınok

O.D.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

01/06/05-01/12/2006

Endo- β -1,4 ksilanazlar (EC. 3.2.1.8) tipik olarak β -1,4-ksilosidaz (EC. 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidaz (EC. 3.2.1.55), ve ferulik asit esteraz (EC 3.1.1.73) gibi farklı hidrolitik enzimler ile birlikte kompleks olarak üretilirler ve doğada ağaç ve tarımsal atıkların ağırlığının % 20-30 'lık kısmını oluşturan ksilan molekülünü hidrolize ederler. Dolayısıyla, ksilanolitik enzimler yardımı ile, geri dönüşümü olan ksilan molekülü substrat olarak kullanılarak, yakıt, çözücü ve kozmetik gibi değişik ürünler üretilebilir. Ayrıca, ksilanolitik enzimler gıda, yem, tekstil ve kağıt endüstrisinde de kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, iyi bir ksilanaz üreticisi olan toprak izolatu *Bacillus* M-13 suşu, mikrobiyolojik ve biyokimyasal testler kullanılarak *Bacillus pumilus* SB-M13 olarak tanımlanmış ve *B. pumilus* SB-M13'ün ksilanolitik enzim sistemi araştırılmıştır. Ksilanolitik

enzimlerin tipi, çeşitliliği ve üretim seviyesi karbon kaynağına bağlı olarak değiştiği ve ksilanolitik enzimlerin sentezinin sırasal, sinerjik ve karbon katabolit engellemesi altında olduğu bulunmuştur. Ayrıca, karbon katabolit baskılama süresi ve etki derecesi, arabinozun başlangıç konsantrasyonuna da bağlıdır.

Çalışmamızda ayrıca, *B. pumilus* SB-M13 β -1,4 ksilanaz enzimi saflaştırılıp biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Enzim alkali pH'larda dayanıklı olup, enzime ait en yüksek aktivite 60°C ve pH 7.5'ta gözlenmiştir. Enzime ait K_m ve k_{cat} değerleri sırasıyla 1.87 mg/ml ksilan ve $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Son aşamada ise, *B. pumilus* SB-M13 β -1,4 ksilanaz ksilanaz geni (600 bp, xyn A) PCR yöntemi ile kromozomal DNA'dan izole edilmiş ve sekans analizi yapılmıştır. Genin 560 bp'lik kısmının dizin analizi belirlenmiş ve dizinin diğer *Bacillus pumilus* suşlarına ait ksilanaz geni ile %88-94 benzerlik gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: *Bacillus pumilus*, ksilanolitik sistem, ksilanaz, ksilanaz geni.

Projeden Kaynaklanan Yayınlar: Ksilanaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu içeren bir makale hazırlanarak basılması için uluslararası bir dergiye gönderilmiştir.

Bakterinin Ksilanolitik sistemi ile ilgili bir makale de hazırlanmaktadır.

ABSTRACT

104T473

**PURIFICATION, CHARACTERIZATION OF XYLANASE AND CLONING OF
XYLANASE GENE from SOIL ISOLATE *Bacillus pumilus* M-13**

Prof. Dr. Ufuk Bakır, Prof. Dr. Zümürüt Ögel,

ve Dr. Ayşegül Ersayın Yaşınok

M.E.T.U. Chemical Engineering Department, Biotechnology Laboratory

The Scientific and Technological

Research Council of Turkey

01/06/05-01/12/2006

Endo- β -1,4 xylanases (EC. 3.2.1.8) are typically produced as a mixture of different hydrolytic enzymes such as β -1,4-xylosidase (EC. 3.2.1.37) , α -L-arabinofuranosidases (EC. 3.2.1.55), and ferulic acid esterase (EC 3.1.1.73) that hydrolyze xylan molecule, which constitutes 20-30% of the dry weight of wood and agricultural wastes. Thus, xylan, renewable biomass, can be utilized as a substrate for the preparation of many products such as fuels, solvents and pharmaceuticals. Besides xylanolytic enzymes themselves are also used in food, feed, textile industries and pre-bleaching of kraft.

In this study, soil isolate *Bacillus* M-13, high level xylanase producer, was identified as *Bacillus pumilus* SB-M13 using both microbiological and biochemical methods and

xylanolytic system of *B. pumilus* SB-M13 was investigated. Xylanolytic enzyme type and production degree varied depending on the carbon source. Xylanolytic enzyme production was found to be sequential, in synergy and under the control of carbon catabolite repression. Duration and degree of suppression was dependent on initial arabinose concentration.

Moreover, in this study *B. pumilus* SB-M13 β -1,4 xylanase was purified and biochemically characterized. Enzyme was stable at alkaline pHs and highest activity was observed at 60°C and pH 7.5. Enzyme K_m and k_{cat} values were determined as 1.87 mg/ml and $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, respectively.

In the last part, *B. pumilus* SB-M13 xylanase gene (600 bp, xynA) was isolated from chromosomal DNA using PCR and sequenced. The 540 bp of the gene was sequenced and sequence showed 89-94% homology to xylanase genes of other *B. pumilus* strains.

Key words: *Bacillus pumilus*, xylanolytic system, xylanase and xylanase gene.

Publications: An article, regarding to xylanase purification and characterization studies, was prepared and submitted to international journal. Moreover, another manuscript related with *B. pumilus* SB-M13 xylanolytic enzyme investigation has been prepared.

KISALTMALAR

DNSA	Dinitrosalisilik asit
AF	α -L-Arabinofuranosidaz
GAL	β -galaktosidaz
XYL	β -ksilosidaz
GLU	β -glukosidaz
XYN	Endo- β -1,4-ksilanaz (ksilanaz)
p-NPAraf	p-Nitrofenil- α -L-arabinofuranosid
p-NP	p-Nitrofenol
A/H	Ağırlık/hacim

BÖLÜM 1

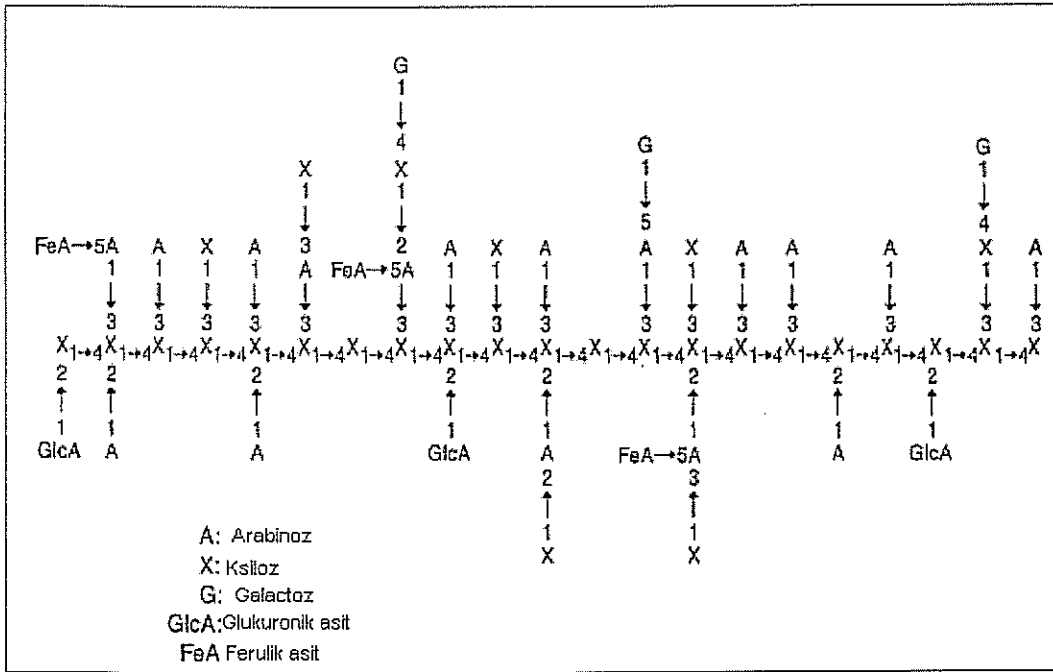
GİRİŞ

1.1 Ksilan

Bitki hücre duvarları doğadaki en önemli fikse edilmiş karbon kaynağı olup üç farklı polimerik yapıdan oluşur: Selüloz, hemiselüloz ve lignin (Thomson, 1993). Bu üçlü yapı lignoselüloz olarak isimlendirilir. Hemiselüloz, selülozun hemen ardından gelen en yaygın polisakkarit olup lignoselülozik yapıda kuru ağırlığın %22' sini oluşturur (Biely, 1984, Puls ve Schseil, 1993).

Ksilan, bitkide ana hemiselülozik yapı olup doğada yeniden dönüştürülebilir biyokütlenin üçte birini oluşturur. Bitki kuru ağırlığının ksilan yüzdesi bitki kaynağına göre değişir. Buna göre, sert ağaç, kozalaklı ağaç ve yıllık bitkilerde ksilan yüzdesi sırasıyla 15-10, 7-10 ve 30 aralığında değişmektedir (Bakır, 2005).

Ksilan, esparto çimeni ve tütün dışındaki bütün bitkilerde heterojen yapıdadır. Ksilan polimeri çoğunlukla β -D-1,4- bağıyla birleşmiş D-ksiloz iskeletinden oluşmuştur. Bu ana iskelete bağlanan asetil, arabinosil, ve glukuronosil yan grupları ksilan molekülünü dallanmış ve heterojen bir yapıya dönüştürmektedir (Şekil 1). Tablo 1'de görüldüğü gibi yan zincirlerin kompozisyonu ve frekansı ksilan kaynağına bağlı olarak değişim göstermektedir.



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

Tablo 1. İzole edildiği bitkisel kaynağa bağlı olarak ksilan kompozisyonundaki çeşitlilik (Saha, 2000).

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

Sert ağaç ksilanının (asetil-4-O-metilglukuronoksilan) polimerizasyon derecesi 200 civarındadır. Ksilan ana iskeletindeki D-ksilopiranosit üniteleri, C-2 ve/veya C-3 pozisyonunda asetik asit ve C-2 pozisyonunda asetil-4-O-metilglukuronik asit ile bağ oluşturmaktadır. Ayrıca, bir çok sert ağaç ksilanında az miktarda D-galakturonik asit ve D-ramnoz da bulunmaktadır (Eriksson ve ark., 1990; Komerlink ve Voragen, 1993; Coughlan ve Hazlewood, 1993).

Kozalaklı ağaç ksilanının (arabino-4-O-metilglukuronoksilan) polimerizasyon derecesi 120'den fazladır. Ksilan iskeleti, C-2 pozisyonunda 4-O-metil- α -D-glukuronik asit ve C-3 pozisyonunda ise L-arabinoz ile dallanmış yapı oluşturmaktadır. Bundan başka, bir çok kozalaklı ağaç ksilanı, D-galakturonik asit, ve D-ksiloz gibi gruplara sahiptir.

Çimen ksilanı küçük miktarda, 70 polimerizasyon derecesinde 4-O-metil- α -D-glukuronik asit içermektedir. Ayrıca, ksilanın yapısında C-2 ve/veya C-3 pozisyonunda yüksek miktarda L-arabinosil ve az miktarda O-asetil yan grupları da bulunmaktadır (Coughlan ve Hazlewood, 1993).

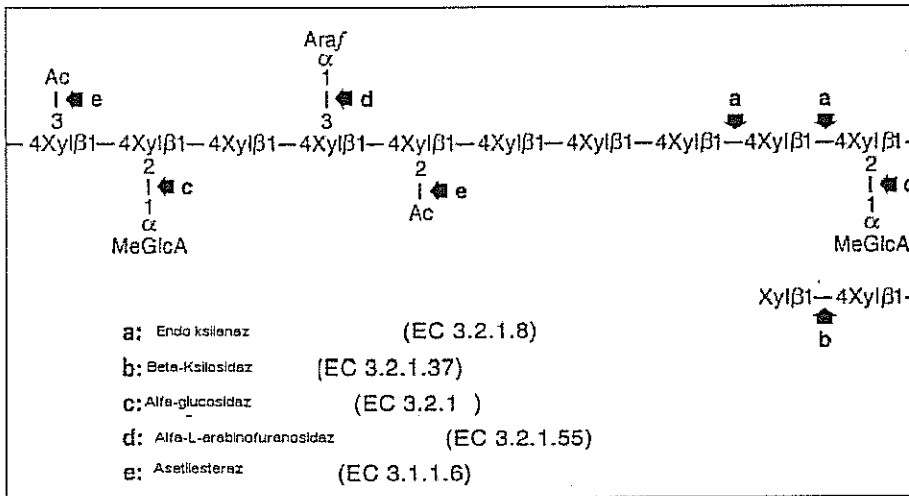
Arabinoksilan molekülünün kompozisyonu ve ksilan bileşenlerinin nispi oranları türden türe, dokudan dokuya değişmektedir (Caoughlan ve Hazlewood, 1993).

1.2 Ksilanın enzimlerle parçalanması

Hemiselülozların en yaygını olan ksilan, kompleks bir yapıya sahiptir ve bu yapının hidroliz edilmesi için farklı hidrolitik enzimlerin birlikte çalışması gerekir (Şekil 2). Hidrolizde en etkili enzim olan endo- β -1,4-ksilanaz (β -ksilanaz ya da ksilanaz) ksilan ana iskeletindeki β -

1,4 bağına kırarak ksilooligosakkaritleri üretir. Bu oligosakkaritler de, daha sonraki hidroliz sürecinde β -1, 4-ksilosidaz enzimi ile D-ksiloza dönüştür.

Ksilanaz ve ksilosidaz enzimlerine ek olarak, ksilan molekülünde yan gruplara etki ederek, ksilanın tamamen parçalanmasında etkili yardımcı enzimler de oldukça önemlidir. α -L-arabinofuranosidaz (EC 3.2.1.55, AF) ve α -glukuronidaz (EC 3.2.1.131) enzimleri bu yardımcı enzimlerden olup, ksilan molekülünde yan grup olarak bulunan arabinoz ve 4-O-metil glukuronik asiti ana iskeletten kırarak yapıdan uzaklaştırırlar. Esteraz (asetilksilan esteraz, EC 3.1.1.72.6) ise, ksilan molekülünde bulunan ksiloz ve asetik asit arasındaki ester bağına kırmakla görevlidir. Ayrıca, arabinoz yan zinciri ve ferulik asit arasındaki bağ ferulik asit esteraz (EC 3.2.2.73), arabinoz yan zinciri ve p-kumarik asit arasındaki bağ ise p-kumarik asit esteraz enzimleri ile hidroliz edilmektedir (EC 3.1.1.-).



Şekil 2. Bitkisel ksilan yapısı ve ksilan hidrolizinde etkili hidrolitik enzimlerin ksilan yapısındaki etki noktaları (Saha, 2000).

1.3 Ksilanazın yapısı ve ksilanolitik enzimlerin aktivitesi arasındaki ilişki

Genel olarak, ksilanazlar, farklı ksilan yapılarına karşı farklı aktiviteler gösterir. Ksilan hidroliz oranı, ksilan zincir uzunluğu ve dallanma derecesine bağlıdır. *Aureobasidium pullulans*' ın ürettiği grup 11 ksilanazı uzun ksilan zincirlerinin hidrolizinde (19 ksiloz ünitesinden fazla) daha etkilidir. Ayrıca enzim aktivitesi, zincirde bulunan dallanmalardan etkilenmemektedir (Liab ve ark., 2000). Bundan başka, *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazı, 8 ksiloz ünitesinden daha uzun ksilan zincirlerini hızla hidrolize ederken, iskelet üzerindeki dallanmalar enzimin hidrolitik oranını belirgin bir şekilde azaltmaktadır.

Ayrıca, bazı ksilanazların, 4 ya da 5 ksiloz ünitesini içine alabilen bir substrat bağlanma bölgesine sahip olduğu ve yapıda yan grup olarak bulunan arabinosil ünitelerinin de ksilanazın ksilan iskeletine bağlanmasını engelleyebileceği düşünülmektedir (Biely ve ark, 1992). Gerçekten de *Polyporus tulipiferae* ksilanazı, etrafında birkaç arabinoz yan grubu bulunduran ksilan bölgelerini hidroliz edememektedir (Brillouet ve ark., 1987). *P. tulipiferae*' in tersine, *Butyrovibrio fibrisolvens* H17c ksilanaz aktivitesi, arabinoz yan ünitelerinden etkilenmemektedir ve enzim, ksilan iskeletini arabinoz ünitesinin olduğu bölgelerden de hidroliz edebilmektedir (Hespell ve Cotta, 1995).

1.4 Ksilanaz üreten Mikroorganizmalar

Ksilanaz üreten birçok ksilanolitik mantar (*Trichoderma* spp, *Aspergillus* spp.), ve bakteri türleri (*Bacillus* spp.) tanımlanmıştır. Mantar (Tablo 2) ve bakteriyel kaynaklı (Tablo 3) ksilanolitik enzimlerin kapsamlı biyokimyasal analizi yapılmış, büyük sayıda enzim saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca literatürde ksilanaz geninin klonlanması, sekanslanması ve ekspresyonuna ait çalışmalar da bulunmaktadır.

Bacillus polymyxa, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium acetobutylicum*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces flavogriseus*, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma viride*, *Pichia stipitis*, ve *Candida shehatae* mezofilik büyüme ortamında ksilanaz üretmektedir (Gosalbes ve ark., 1991; Wong ve ark., 1988).

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

Tablo 2. Mantar ksilanazların fizikokimyasal özellikleri.

Mikroorganizma	M _w (kDa) (SDS-PAGE)	pI	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH
<i>Rhizopus oryzae</i> (Bakir ve ark., 2001)	22	n.d	55	4.5
<i>Trichoderma reesei</i> (Törrenen ve ark., 1992)	19-20	5.2-9.0	-	-
<i>Fusarium oxysporum f.sp.</i> <i>lycopersici</i> (Ruiz ve ark., 1997)	40	3.7	40	3.7
<i>Acrophialophora nainiana</i> (Cardoso ve Filho, 2003)	27.5	n.d	55	6.5
<i>Sporotrichum thermophile</i> (Tokapas, 2003)	90-120	4.0	70	5.0
<i>Trichoderma harzianum</i> E58 (Tan ve ark., 1987; Tan ve ark., 1985; Wong ve ark., 1986, Wong ve ark., 1988'da referans verilmiştir)	20, 22, ve 29	9.4, 8.5, 9.5	50, 45-50, 60	5.0, 4.5-5.0, 5.0
<i>Trichoderma koningii</i> IMI 73022 (Wood ve McCrae, 1986)	17.7, 29.0	7.3, 7.2	50, 60	4.5-5.5, 4.5-6.0
<i>Aspergillus oryzae</i> (Kitanono ve ark., 1999)	35	n.d.	60	5.0
<i>Humicola grisea</i> var. <i>thermoidea</i> (Neto ve Filho, 2004)	29	n.d	55-60	4.5-6.5

Tablo 3. Bakteriyeel ksilanazların fizikokimyasal özellikleri.

Mikroorganizma	M _w (kDa) (SDS-PAGE)	pI	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH
<i>Bacillus pumilus</i> SB-M13 (Bu çalışma)	24.8	9.2	60	7.5
<i>Bacillus stearothernophilus</i> T-6 (Khasin ve ark., 1993)	43.0	9.0	n.d	6.5
<i>Bacillus</i> sp. suş 41M-1 (Nakamura ve ark., 1993)	36.0	5.3	50	9.0
<i>Bacillus circulans</i> WL-12 (Esteban ve ark.,1982, Wong ve ark., 1988'da referans verilmiştir)	15.0*, 85.0*	9.1, 4.5	n.d	5.5-7
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 (Lee ve Fosberg, 1987)	29	8.5	60	5.5-6.0
<i>Streptomyces</i> sp. suş KT-23 (Nakajima, ve ark., 1884)	44.0	6.9	55	5.5

* M_w jel filtrasyon kromatografisi ile belirlenmiştir, n.d: tanımlanmamıştır.

Ksilanazların 50°C ve alkali pH'da kullanılabilir olması, kağıt endüstrisi için oldukça önemlidir. Mantar ksilanazlarının nötral ve asidik pH'da aktif olmasına rağmen, bakteriyel ksilanazlar daha yüksek pH değerlerinde (alkali ortamda) daha aktiftir ve kağıt endüstrisi için daha uygundur.

Tablo 4'de Erikson ve arkadaşlarının (1990) farklı ksilanaz üreticileri ve ksilanaz üretim seviyelerinin karşılaştırmasına ait çalışmanın sonucu verilmiştir. Bu tabloda *Trichoderma*

reesei isimli küfün diğerlerine göre en yüksek ksilanaz aktivitesi verdiği ve bu aktivitenin 130 U/ml olduğu görülmektedir.

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

Tablo 4: Farklı mikroorganizmalarda ksilanaz aktivitelerinin karşılaştırılması (Eriksson ve ark., 1990; Poutanen ve ark., 1987).

Mikro-organizma	Ksilanaz aktivitesi, kat/ml	Ksilanaz aktivitesi, U/ml
<i>Trichoderma reesei</i>	2170	130
<i>Aspergillus awamori</i>	200	12
<i>Fusarium oxysporum</i>	62	4
<i>Bacillus subtilis</i>	311	19
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	90	5

1 nkat: 0,06 U

Laboratuvarımızda yapılan çalışmalar sonucu, toprak izolatu olan *B. pumilus* SB-M13 suşunun iyi bir ksilanaz üreticisi olduğu bulunmuştur (Biran, 2001). Fermentasyon ortamı optimizasyonu yapılmadan bile, 108 U/ml ksilanaz aktivitesi bulunmuştur. Bu sonuç literatürde belirtilen miktarlarla kıyaslığında oldukça ümit vericidir.

1.5 Ksilanolitik enzimlerinin endüstriyel kullanımı

Tarımsal bitki atıklar doğada kirliliğe sebep olmaktadır. Ksilanın doğada yaygınlığı, ksilanazların biyo-dönüştürme işleminde kullanımını ve bu atıkların yakıt, tek hücre proteini, ksiloz ve ksitol gibi yararlı ürünlere dönüştürülmesini gerektirir.

Ksilanaz molekülünün hidrolizinde, ksilanaz, ksilosidaz ve yan gruplarının kırılmasında etkili yardımcı enzimler sinerjik çalışırlar. Yardımcı enzimler dallanmaları ortadan kaldırarak, ana iskelette ksilanaz enzimi için yeni etki alanları oluştururlar. Gerçekten de, arabinoksilan molekülünün monosakkaritlere dönüşmesi, yan grupları kıran yardımcı enzimler ve ana iskelete etkili enzimlerin sinerjik çalışması ile mümkündür (Sørensen ve ark., 2005).

Ksilan hidrolizinde etkili enzimlerin, hemiselülozik biyokütlenin yakıt ve kimyasal ürünlere dönüştürülmesi, kağıt hamurunda ligninin uzaklaştırılması, meyve sularının berraklaştırılması, hayvan yemi sindiriminin ve besin değerinin artırılması, meyve suyu ve şarap aromasının artırılması, pentoz içeren disakkaritlerin sentezlenmesi gibi işlemlerde kullanılması, bu enzimleri endüstriyel olarak değerli kılmaktadır. (Rahman ve ark., 2001; Makkonen ve ark., 2005; Wong ve ark., 1988; Gunata ve ark., 1990 ; Spagna ve ark., 1998; Rémond ve ark., 2004).

1.6 Ksilanaz enziminin moleküler biyolojisi

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

BÖLÜM 2

DENEYSEL YÖNTEMLER

2.1 Toprak izolatu *Bacillus* suşunun izolasyonu ve saklanması

Çalışmamızda kullanılan toprak izolatu *Bacillus* SB-M13 suşu, Türkiye'nin farklı bölgelerine ait toprak örneklerinden izole edilen yüzlerce izolat içerisinde seçilen, iyi bir ksilanaz üreticisidir. Toprakten izolasyon, Avcioğlu ve arkadaşlarının (2005) yayımladığı makalede belirttiği yöntem kullanılarak yapılmıştır ve izolat bu proje kapsamında API 50 CH-API 50 CHB/E kiti (BioMérieux), yağ asit ve FAME profil belirleme çalışmaları ardından (Sasset ve ark., 1990, ve Khoodoo ve ark. , 2005) *Bacillus pumilus* olarak tanımlanmıştır.

Bacillus pumilus, 30 °C'de içerisinde (A/H): % 1.0 glukoz, % 0.5 pepton, % 0.5 maya özütü, % 0.1 KH₂PO₄, % 0.02 MgSO₄, % 2.0 agar ve ortama ayrıca steril edilerek eklenen % 0.01 Na₂CO₃ bulunduran katı besi yerinde çoğaltıldıktan sonra 4 °C'de saklanmıştır. Ayrıca, sıvı ortamda çoğaltılan mikroorganizma, % 30'luk gliserol içerisinde -20 °C ve -80 °C'de uzun süre depolanmıştır.

2.1.2 Toprak izolatu *Bacillus* suşunun tanımlanması

Mikroskobik değerlendirme, gram boyama ve hareketlilik testlerinin (Biran, 2001) ardından, toprak izolatu *Bacillus* SB-M13, aşağıda ayrı başlıklarda belirtilen diğer mikrobiyolojik ve biyokimyasal teknikler kullanılarak tanımlanmıştır.

2.1.2.1 Endospor boyama

Toprak izolatu *Bacillus* SB-M13 suşunun endospor üretme yeteneği, en yaygın endospor boyama tekniği olan Schaeffer-Fulton metodu kullanılarak test edilmiştir (<http://howie.myweb.uga.edu/staining.html>). Bu metoda göre, bakteri yayması temiz mikroskop camı üzerinde hazırlanarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve ısı ile sabitlenmiştir. Üzeri kağıt havlu ile kapatılan mikroskop camı su banyosuna yerleştirilen boyama rafı üzerine koyulmuştur. Daha sonra kağıt havlu Malaşit yeşili (ilk boyama) ile doyurulup, mikroskop camı buharda 5 dakika tutulmuştur. Kağıt havlunun kaldırılması ardından, mikroskop camı distile su ile yıkanarak fazla boya ortamdan uzaklaştırılmıştır. Fazla suyun uzaklaştırılmasının ardından, safranin (karşı boya) mikroskop camı üzerine uygulanarak, 2 dakika beklenmiştir. Fazla boyanın su ile yıkanarak uzaklaştırılmasının ardından, mikroskop camı kağıt havlu ile kurulanmıştır. Son basamakta ise, mikroskop camı yağa daldırma metodu kullanılarak ışık mikroskopunda incelenmiştir.

2.1.2.2 API 50 CH-API 50 CHB/E ortam kit analizi

Bacillus türleri için önerilen “API 50 CH-API 50 CHB/E ortam” kiti (BioMérieux), üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. Kit sistemi kullanılarak yapılan tanımlama, toprak izolatu *B. pumilus* SB-M13 suşunun, kit şeritleri üzerinde bulunan 49 farklı karbonhidratı fermente edebilme yetisine bağlıdır (Ek A ve B). Karbonhidratların fermente edilmesine bağlı pH değerindeki değişim, indikatörler sayesinde renk değişimi olarak gözlemlenerek, sonuçlar +/- renk değişimi şeklinde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmenin ardından, O.D.T.Ü. Sağlık Merkezinde bulunan Veri Bankası (V3.0) kullanılarak, izolata ait biyokimyasal profil belirlenmiştir.

2.1.2.3. Yağ asit analizi

Yeditepe Üniversitesi tarafından, izolata ait yağ asiti özütlenmesi yapılmış, gaz kromatografisi kullanılarak yağ asiti metil ester (FAME) profili belirlenmiş, ve bu profil standart profil kütüphanesindeki veriler ile karşılaştırılarak, toprak izolatu net olarak tanımlanmıştır.

2.2 *B. pumilus* SB-M13 ksilanolitik sistemi

2.2.1 *B. pumilus* SB-M13 ksilanolitik enzimlerinin üretimi

Bacillus pumilus SB-M13 ksilanolitik enzim üretimi, içerisinde 100 ml sıvı besi yeri bulunan 250 ml'lik erlenlerde çalkalamalı inkübatörde 30°C, 175 rpm'de 7 gün boyunca yapılmıştır. Agar üzerinden tek koloni alınarak ön sıvı besi yerine (5 ml) transfer edilmiş ve hücreler bir gece çoğaltılmıştır. Daha sonra ön sıvı besi yerinde çoğaltılan hücreler (5 ml), 100 ml sıvı besi yerine aktarılarak hücreler 7 gün çoğaltılmıştır.

Sıvı besi yeri içerisinde (A/H):, % 0.5 NaCl, % 0.25 maya özütü, % 0.1 KH₂PO₄, % 0.02 MgSO₄, ortama ayrı steril edilerek eklenen % 0.01 Na₂CO₃, ve tek karbon kaynağı ve indükleyici olarak da % 3.0 tarımsal atık (mısır koçanı, buğday ve pirinç kabuğu) kullanılmıştır. Tarımsal atıklar, mekanik yollarla öğütülüp, küçük tanecikli yapıya dönüştürülmüş ve buhar hidrolizine tabi tutulmuştur. Buhar hidrolizi için, tarımsal atıklar 121°C' de 30 dakika otoklavda bekletilmiştir. Daha sonra, bir gece 100°C'de kurutulan atıklar %3 oranında besi yerinde kullanılmıştır (Bakır ve ark., 2001).

Deney sırasında, belirtilen fermentasyon ortamlarında, ksilanolitik enzimlerin (α -L-arabinofuranosidaz, β -galaktosidaz, endo- β -ksilanaz, ve β -ksilosidaz) zaman bağlı üretimi 7 gün boyunca takip edilmiştir. Çalışmada ksilanolitik enzimlere ek olarak, β -glukosidaz

enziminin fermentasyon ortamlarında üretiminin zamana bağlı değişimi de incelenmiştir. β -glukosidaz enzimi, selüloz molekülünün sonunda bulunan indirgemeyen β -D-glikozu serbest bırakarak selüloz hidrolizinde rol alan bir enzimdir.

Ayrıca, arabinozun ksilanolitik enzimlerin üretimine etkisini belirlemek amacıyla arabinoz, konsantrasyonu %1.0 ve %0.5 (A/H) olacak şekilde, içerisinde öğütülmüş %3 mısır koçanını tek karbon kaynağı ve indükleyici olarak bulunduran fermentasyon ortamına eklenmiş ve enzimlerin üretimi takip edilmiştir.

Fermentasyon ortamından alınan örnekler 11,000 x *g*'de 40 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant, kaba enzim özütü olarak kullanılmıştır. *Bacillus pumilus* SB-M13 enzim üretim profili, 7 gün boyunca her gün fermentasyon ortamından alınan kaba enzim özütü örneklerinde enzim aktivitesi ölçümü ile belirlenmiştir.

2.2.2 Ksilanolitik enzimlerin aktivite ölçümü

AF (α -L-arabinofuranosidaz), GAL (β -galaktosidaz), XYL (β -ksilosidaz), ve GLU (β -glukosidaz) aktiviteleri sırasıyla sentetik *p*-nitrofenol glikosid- *p*-nitrofenil- α -L-arabinonofuranosid, *p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranosid, *p*-nitrofenil- β -D-ksilopiranosid, ve *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranosid substratları kullanılarak ölçülmüştür. Aktivite ölçümü için *p*-nitrofenil- α -L-arabinonofuranosid (*p*-NPAraf) 2 mM ve diğer substratlar 10 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımı; 0.5 ml 2 mM *p*-NPAraf solüsyonu (Kaneko ve ark., 1998) ya da 10mM diğer substratlar, 0.4 ml of 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu ve 0.1 ml enzim solüsyonu ile

karıştırılmış ve 40°C’ de tutularak ilgili enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Enzimlerin başlangıç reaksiyon hızları, enzim aktivitesi sonucu oluşan serbest *p*-nitrofenol (p-NP) miktarının, spektrofotometrik olarak 5 dakika boyunca her 15 saniyede bir 410 nm’ de takip edilmesiyle belirlenmiştir. Bir ünite enzim aktivitesi (U); belirtilen aktivite ölçüm şartlarında bir dakikada, 1 µmol p-NP üretebilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

Çalışmalarda bütün deneyler en az iki kez tekrarlanmış ve ortalamaları verilmiştir.

2.3. *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu

2.3.1 Ksilanaz üretimi

Hücre tarafından dışa salınan bir enzim olan ksilanazın üretimi, *Bacillus pumilus* SB-M13 suşunun, içerisinde 100 ml sıvı besi yeri bulunan 250 ml’lik erlenlere aşılması ile çalkalamalı inkübatörde 30°C, 175 rpm’de gerçekleştirilmiştir. Sıvı besi yeri içerisinde (A/H): % 3.0 mısır koçanı (tek karbon kaynağı ve indükleyici olarak), % 0.5 NaCl, % 0.25 maya özütü, % 0.1 KH₂PO₄, % 0.02 MgSO₄, ve ortama ayrı steril edilerek eklenen % 0.01 Na₂CO₃ bulunmaktadır. Mekanik yollarla parçalanan ve elekten geçirilen mısır koçanı, 121°C’ de 30 dakika otoklavlanıp, bir gece 100°C’de kurutulduktan sonra besi yerinde kullanılmıştır (Bakır ve ark., 2001). Fermentasyon ortamından alınan örnekler 11,000 x g’de 40 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant, kaba enzim özütü olarak kullanılmıştır. *Bacillus pumilus* SB-M13 ksilanaz üretim profili, her gün fermentasyon ortamından alınan kaba enzim özütü örneklerinde ksilanaz aktivitesi ölçümü ile belirlenmiştir.

2.3.2 Ksilanaz aktivite ölçümü

Ksilanaz aktivitesi, 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içinde hazırlanmış ve % 1.0’lik huş ağacı ksilanı substrat olarak kullanılarak 40 °C’de ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı (enzim: substrat; 1:10) 40 °C’de inkübe edilmiştir. Her on beş saniyede bir 11 ml’lik reaksiyon

karişimından alınan 1.0 ml'lik örnekler, 1.5 ml Dinitrosalisilik asit (DNSA) reaktifi ile kariştırarak, 5 dakika kaynatılmıştır. Soğutulan örnekler spektrofotometrede 540 nm de okunarak, örneklerdeki indirgen şeker miktarı, ksiloz standartları kullanılarak belirlenmiştir. Aktivite hesaplamalarında başlangıç reaksiyon hızı baz alınmıştır. Bir ünite ksilanaz aktivitesi (U); belirtilen aktivite ölçüm şartlarında, bir dakikada 1 µmol ksiloz dengi indirgen şeker üretebilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.3.3 Protein Derişiminin Saptanması

Örneklerdeki protein konsantrasyonu Bradford (1976) yöntemi ile bovin serum albumin (BSA) standardı kullanılarak belirlenmiştir.

2.3.4 Ksilanaz enziminin saflaştırması

Enzim saflaştırma çalışmaları, orta basınç sıvı kromatografisi sistemi ve önceden doldurulmuş hazır kolonlar (ÄKTAprime saflaştırma sistemi ve kolonları; GE Healthcare, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweeden) kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Kromatografi sonunda saflaştırma kat sayısı hesabı, saflaştırma kromatogramı baz alınarak bilgisayar programı ile yapılmıştır.

Ayrıştırma prensibi birbirinden farklı olan jel filtrasyon, iyon değişim ve değişik hidrofobik etkileşim kolonlarının ksilanaz enziminin saflaştırmasındaki performansı ön deneylerde denenerek belirlenmiştir. Hidrofobik etkileşim kolon çalışmalarının ilk aşamasında, içinde farklı ligand tipinde dolgu maddesi bulunduran hidrofobik etkileşim mini kolonlarının (Tablo 5), küçük ölçekte ksilanaz saflaştırma performansı denenmiştir. Hiload 16/10 Fenil sefaroz yüksek performans hidrofobik kolonu, (20 ml, 1.6 cm x 10 cm) saflaştırma çalışmalarında NaCl konsantrasyonu 3.5 M sabit tutularak farklı pH aralığının (pH 6.0-7.5) saflaştırmaya

etkisi araştırılmıştır. Bu ön denemelere göre, fenil sefroz hidrofobik etkileşim kolonundan, diğer hidrofobik kolon tiplerine, jel filtrasyon ve iyon etkileşim kolonlarına göre çok daha iyi sonuç elde edilmiş ve ksilanaz enzimi tek aşamada % 31 aktivite geri kazanımı ile 186 kat saflaştırılmıştır. Fenil sefroz hidrofobik kromatografi kolonu ile tek aşamada iyi bir saflaştırma yapılabildiğinden, bundan sonraki çalışmalarda bu kolon tipi kullanılmıştır.

2.3.4.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

Hidrofobik etkileşim kolonuna uygulanacak örnekler ön-muameleye tabii tutulmuştur. Ön muamele sırasıyla; oda sıcaklığında, kaba enzim özütüne direkt olarak tuz (amonyum sülfat yada sodyum klorür) eklenerek özütün hidrofobisitenin artırılması, karışımın pH'ının ayarlanması ve 0.45-mikron-gözenek-büyükliğünde şırınga filtreleriyle süzülmesidir. Bu işlemler ardından, kaba enzim özütü, kendisi ile aynı pH, tuz tip ve konsantrasyonuna sahip başlangıç tamponuyla dengelenmiş olan kolona uygulanmıştır. Kolona bağlanmayan proteinler, ilk yıkama aşamasında başlangıç tamponu içinde kolondan hemen atılırken, dolgu maddesine bağlanmış daha hidrofobik proteinler azaltılmış tuz gradienti (%100-0 tuz) uygulanmasıyla, farklı tuz konsantrasyonunda gradyent elusyon aşamasında elue edilmiştir. Daha sonra, ikinci yıkama aşamasında 0 M tuz konsantrasyonunda kolona çok kuvvetli bağlanan proteinlerin elue edilmesi sağlanmıştır.

Çalışmalarda amonyum sülfat ve NaCl hidrofobisiteyi arttırmak amaçlı kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan tampon konsantrasyonu 50 mM olup, kullanılan tampon tipi ve pH aralığı şöyledir: sodyum fosfat tamponu (pH 6.0-8.5), glisin-NaOH (pH 9.0-10.0).

2.3.4.1.1 Hidrofobik etkileşim mini-test kolonlarının testi

Çalışmanın ilk aşamasında, içinde farklı ligand tipinde dolgu maddesi bulunduran hidrofobik etkileşim mini kolonlarının, küçük ölçekte ksilanaz saflaştırma performansı denenmiştir. Tablo 5’ de özellikleri verilen, 1 ml hacmindeki her kolon tipinin saflaştırmadaki verimliliği farklı tuz tipi ve konsantrasyonunda ve farklı pH larda denenmiştir. Kolona 0.8-1.0 ml hacminde ön-muameleye tabii tutulmuş kaba enzim özütü uygulanmış, akış hızı 1 ml/dakika’ya ayarlanmıştır. Saflaştırma çalışmasında basınç 0.25 MPa olarak sabitlenmiş ve her tüpte 1 ml eluate toplanarak gradyent elusyon (% 100-% 0 tuz) 20 ml hacimde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5. Hidrofobik etkileşim mini test kolon tiplerinin özellikleri.

Kolon tipi	Fenil sefaroze yüksek performans kolonu	Fenil sefaroze yüksek akış kolonu (az bağlanım)	Fenil sefaroze yüksek akış kolonu (çok bağlanım)	Butil sefaroze yüksek akış kolonu	Oktil sefaroze yüksek akış kolonu
Ligand	Fenil	Fenil	Fenil	n-Butil	n-Oktil
Ligand dansite	25 µmol/ml jel	20 µmol/ml jel	40 µmol/ml jel	50 µmol/ml jel	5 µmol/ml jel
Ortalama tanecik büyüklüğü	34 mm	90 mm	90 mm	90 mm	90 mm
Tanecik yapısı	% 6 çaprazlanmış agaroz	% 6 çaprazlanmış agaroz	% 6 çaprazlanmış agaroz	% 4 çaprazlanmış agaroz	% 4 çaprazlanmış agaroz

2.3.4.1.2 Ksilanazın fenil sefaroz yüksek performans kolonu ile saflaştırılması

Farklı mini kolon tiplerinin küçük ölçekte denenmesinin ardından, en iyi sonucun fenil sefaroz yüksek performans kolonu ile elde edildiği görülmüştür. Bu sonuca göre sonraki saflaştırma deneylerinde aynı kolon tipinin daha büyük hacmi olanı (Hiload 16/10 Fenil sefaroz yüksek performans kolonu, (20 ml, 1.6 cm x 10 cm)) kullanılmıştır. Kolona 15 ml önmuameleye tabii tutulmuş kaba enzim özütü yüklenmiş, akış hızı 3 ml/dakika olarak ayarlanmış, gradyen elusyonu (3.5 M-0 M NaCl) 250 ml hacimde yapılmıştır. Basınç 0.35 MPa değerinde tutulmuş ve her tüpte 3 ml örnek toplanmıştır. Deney sonucunda elde edilen saf enzim daha sonraki enzim karakterizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca enzimin saflık derecesi SDS-PAGE, IEF ve zimogram analizleri ile test edilmiştir.

2.3.5 Analitik jel elektroforezi ve izoelektrik noktalama

SDS-PAGE çalışmaları Laemmli ve ark. 'nın (1970) metoduna göre % 4 yükleme ve % 12'lik ayrıştırma jelleri kullanılarak yapılmıştır. Moleküler ağırlık standartları olarak 14.4, 18.4, 25, 35, 45, 66.2, ve 116 kDa büyüklüğünde proteinler kullanılmıştır (Fermentas). Jeller elektroforezin ardından ya gümüş ya da Komasi mavi boyama tekniği ile boyanmıştır.

Enzimin izo-elektrik noktası, içerisinde pH 3.5-10.0 (Sigma) aralığında amfolit bulunduran IEF jellerinde Biorad 111 Mini IEF cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Kullanılan IEF standard karışımı pI aralığı 4.45-9.6 (BioRad) olup, boyamaya gerek kalmadan izlenen standard proteinleri içermektedir. % 3 C monomer derişimine sahip olan jel, BioRad IEF metoduna göre hazırlanmıştır. Ksilanaz örnekleri zimogram analizine tabii tutularak aktif ksilanaz bandı ve enzimin pI noktası saptanmıştır.

2.3.6 Zimogram analizi

Aktif ksilanaz bantları SDS-PAGE jeli üzerinde Nakamura ve ark.'nın (1993) zimogram tekniği bazı değişikliklerle uygulanarak görüntülenmiştir ve jel üzerine uygulanan ksilanaz örnekleri, normal SDS-PAGE uygulamasında olduğu gibi örnek tamponu ile karıştırılarak 5 dakika kaynatılmıştır. Zimogram analizinde ksilanaz örnekleri Laemmli metodu ile hazırlanan SDS-PAGE jelleri üzerinde yürütülmüştür. Ardından jel ve örneklerdeki SDS, uzaklaştırılarak proteinler renature edilmiştir. Bu işlem sırasıyla; yürütülmüş SDS-PAGE jellerinin 30 dakika boyunca, dört kez 4°C'de 50 mM pH 7.0 fosfat tamponunda yıkanması (ilk iki yıkamada tampon % 25 (v/v) izopropil alkol içermektedir), ve jelin 10 dakika boyunca 40 °C'de inkübasyonunu içermektedir. İki saat boyunca 40 °C' de % 0.1 ksilan solüsyonunda inkübe edilmiş olan jel, % 0.1 Kongo kırmızısı solüsyonu içerisinde 15 dakika oda sıcaklığında boyanmıştır. Jel en az 15 dakika 1M NaCl solüsyonu içinde yıkanarak fazla boyalar uzaklaştırılmış, aktif ksilanaz bantlarının ortaya çıkması sağlanmıştır. Jel en son olarak 1 M HCl ile muamele edilmiş, böylece aktif ksilanaz bantlarının koyu lacivert fonda aktif beyaz bant olarak gözlenmesi sağlanmıştır.

2.3.7 pH ve sıcaklığın ksilanaz aktivitesine etkisi

Ksilanazın pH bağımlılığı pH 6.0-11.0 aralığında, 50 mM konsantrasyonunda tamponlar kullanılarak 40 °C' de standart enzim aktivite testi ile belirlenmiştir. İstenen pH değerine göre, sitrik asit- Na_2HPO_4 (pH 6.0), sodyum fosfat (pH 7.0-8.0), glisin-NaOH (pH 9.0-10.0) ve karbonat-bikarbonat (pH 11.0) tamponları kullanılmıştır. Sıcaklığın ksilanaz aktivitesine etkisi ise 40-70 °C arasında 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içinde standart aktivite testi ile çalışılmıştır.

2.3.8 pH ve sıcaklığın ksilanaz dayanıklılığına etkisi

Enzimin pH ve sıcaklık dayanıklılığını belirlemek amacıyla, ksilanaz örneklerinin pH 6.0-10.0 aralığında 100 dakika ve 19 saat, ve 40-70 °C sıcaklık aralığında ise 15 ve 45 dakika inkübe edilmiş ve enzimin kalan aktivitesi pH 7.0 ve 40 °C'de standart aktivite testi ile ölçülerek belirlenmiştir.

2.3.9 Kinetik çalışmalar

Huş ağacı ksilan hidrolizi başlangıç reaksiyon hızı 2-40 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 (Sigma plot) ile belirlenmiştir.

2.4 *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni izolasyonu ve klonlanması

2.4.1 Kromozomal DNA izolasyonu

Katı ortamdan alınan tek koloni, 2 ml hacimli LB ortamında aktarılarak *B. pumilus* SB-M13 hücreleri bir gece boyunca çoğaltılmıştır. Daha sonra 2 ml'lik kültür, 30 ml hacimli LB ortamına transfer edilerek hücreler 30°C'de bir gece daha çoğaltılmıştır. Hücreler çoğaldıktan sonra ortam 3000 xg'de 10 dakika santrifüjlenerek sıvı kısım atılmış ve hücreler 5 ml SET tamponu (75 mM NaCl ve 25 mM EDTA) içinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir. Son derişimi 1 mg/ml olacak şekilde ortama lizozim enzimi eklenmiş ve 37°C'de 60 dakikada hücre duvarı parçalanmıştır. Ortama 1/10 hacimsel oranda %10'luk SDS eklenmiş ve tüpler iki saat süreyle -ara sıra çalkalanarak- 4°C'de inkübe edilmiştir. Çözelti hacminin 1/3'ü kadar 5M NaCl ve çözelti hacmi kadar kloroform eklenmiş ve tüpler oda sıcaklığında karıştırılarak 30 dakika daha inkübe edilmiştir. İki fazlı karışım 4500 xg'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve sulu faz Pasteur pipetiyle yeni tüplere alınmıştır. Sulu fazdaki kromozomal DNA üzerine,

hacmi kadar izopropanol eklenip karıştırıldıktan sonra süspansiyon 4500 xg'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. DNA %70 etanol ile tekrar yıkandıktan sonra kurutulmuştur. Son olarak, DNA uygun miktarda TE (10mM Tris-HCl ve 1mM EDTA, pH 7.5) tamponu içinde çözülmüş ve -20°C'de saklanmıştır (Posprech ve Neumann 1995). İzole edilen genomik DNA'nın saflığı spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. Saf DNA'nın OD_{260/280} değeri 1.7-1.9 aralığında olmalıdır.

2.4.2 Polimeraz zincir tepkimesi

B. pumilus SB-M13 ksilanaz geni, *B. pumilus* SB-M13 genomik DNA'sı, ve 'ileri 1/geri 2' ve 'ileri 5/geri 2' primer setleri kullanılarak polimeraz zincir tepkimesi ile izole edilmiştir.

Ksilanaz geni PCR ile çoğaltılması ardından, genin iç kısmından dizayn edilmiş primer (iç ileri ve iç geri) seti kullanılarak "nested PCR" yapılmıştır.

İleri 1: 5'-GG CTCGAG ATG AAT TTG AAA AGA TTG AGG CTG TTG-3'

XhoI cut site

İleri 5: 5'- G CT CGA GGA AAC GAT TTA TGA TAA TAG GAT AGG GAC -3'

XhoI cut site

Geri 2: 5'-CTG CAG TTA TCG GAT CAT CAG CTG ATT CGT CAT GAC-3'

PstI cut site

İç ileri: 5'- TGT CTA TGG CTG GAC ACA ATC-3'

İç geri: 5'- GCT TTG GTA GCC TTC TAC AGT-3'

1 **ATGAATTGA AAAGATTGAG GCTGTGTTT GTGATGTGTATTGGATTTGTCTGACACTG**

İleri 1 primer

61 **ACGGCTGTGC CAGCTCATGC** **GGAAACGATT TATGATAATA GGATAGGGAC** CACAGCGGA

İleri 5 primer

121 TACGATTTTG AATTATGGAA GGATTACGGA AATACCTCGA TGACACTCAA TAACGGCGGG

181 GCATTTAGTG CAAGCTGGAA CAATATTGGA AATGCCTTAT TTCGAAAAGG AAAGAAGTTT

241 GATTCCACTA AAACATCA TCAACTTGGC AACATCTCCA TCAACTACAA CGCAGCCTTT

301 AACCCGGGCG GGAATTCCTA TTTATG **TGTC TATGGCTGGACACAATC** TCC ATTAGCTGAA

İç ileri

361 TACTACATTG TTGAGTCATG GGGCACATAT CGTCCAACAG GAACGTATAA AGGATCATTT

421 TATGCCGATG GAGGCACATA TGACATATAT GAAACGCTCC GTGTCAATCA GCCTTCTATC

481 ATTGGGGACG CTACCTTCAA ACAATATTGG AGTGTACGTC AAACAAAACG CACAAGCGGA

541 ACTGCTTCCG TCAGTGAGCA TTTTAAAAA TGGGAAAGCT TAGGCATGCC AATGGGAAAA

601 ATGTATGAAA CAGCATTAAC **TGTAGAAGGC TACCGAAGCA** ACGGAAGTGC GAAT**GTCATG**

İç geri**

661 **ACGAATCAGC TGATGATTCG ATAA**

Geri 2 primer

Şekil 3. *B. pumilus* SB-M13 suşu ksilanaz geni (AF220528) ve primer bölgeleri. Koyu renkte ve altı çizili bazlar signal peptid bölgesini göstermektedir. ** İç geri primer bölgesinde sadece koyu renkte gösterilen baz farklıdır.

Polimeraz zincir tepkimesi (PCR) için tepkime bileşimi (50µl)

10x PCR tamponu	5µl
MgCl ₂ (25 mM)	4µl
dNTP (1mM)	10µl
İleri primer (10µM)	1µl
Geri primer (10µM)	1µl
Template DNA	2.5µl
dH ₂ O	26µl
Taq polimeraz	0.5µl

PCR cihazı çalışma programı

Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü sayısı
T1: 94°C	5	1
T1: 94°C	1	30
T2: 65°C /*55°C	1/*0.5	30
T3: 72°C	1	30
T3: 72°C	15	1
T4: 4°C	15	1

* : İçerden dizayn edilen primer seti için kullanılan şartlar.

2.4.3 PCR ürünlerinin temizlenmesi

PCR ürünleri agaroz jeli üzerinden Gene Mark'jel elusyon kiti' kullanılarak saflaştırılmıştır. Metoda göre, ilgili PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelinde yürütülerek, ilgili PCR bantı jelden kesilip steril 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine koyulmuştur. Her bir tüp içerisine, jelin ağırlığı kadar 'bağlama çözeltisi' eklenmiştir. Daha sonra tüpler, içerisindeki jel tamamen eriyene kadar 65 °C'de inkübe edilmiştir. Eriyen jel-DNA solüsyonu, santrifüj kolonuna yüklenerek kolon-mikrosantrifüj tüpü kompleksi 13.000 rpm'de 4 °C'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen alt faz atılarak, 700 µl 'yıkama çözeltisi' kolona yüklenmiş ve kolon-mikrosantrifüj tüpü kompleksi 13.000 rpm'de 4 °C'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yine alt faz atılarak, kolon-mikrosantrifüj tüpü kompleksi 13.000 rpm'de 4 °C'de 3,5 dakika daha santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne takılarak, üzerine sıcaklığı önceden 60 °C'ye ayarlanmış steril su eklenerek, kolon 13.000 rpm'de 4 °C'de 1 dakika daha santrifüj edilmiştir. Böylece, PCR ürünü saf olarak elde edilmiş ve örneklerin konsantrasyonu (OD₂₆₀) ve saflığı (OD_{260/280}) UV spektrofotometrede belirlendikten sonra örnekler -20°C'de saklanmıştır.

2.4.4 DNA dizin analizi

İleri 5/geri 2 primer seti kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılan *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni ve nested PCR sonucu elde edilen ksilanaz gen parçası jelden saflaştırılarak gen dizin analizine gönderilmiştir. Gen dizin analizi, iç ileri/iç geri primer seti kullanılarak Refgen (ODTÜ Kent, Ankara) laboratuvarında yapılmıştır. Böylece, 603 bp'lik ksilanaz geninin 560 bp'lik kısmı ve 314 bp'lik nested PCR ürüntüne ait DNA dizilimi belirlenmiştir.

BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Toprak izolatu *Bacillus* SB-M13'ün tanımlanması

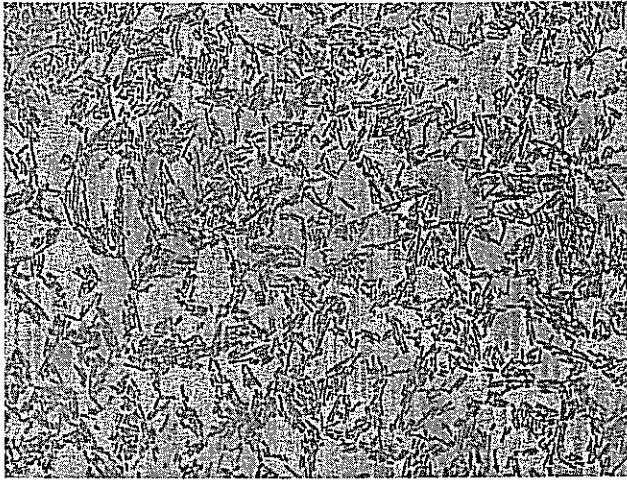
Toprak izolatu *Bacillus* M-13 laboratuvarımızda daha önce katalaz pozitif, hareketli ve Gr (+) basil olarak kısmen tanımlanmıştır (Biran, 2001). Bu çalışmada da *Bacillus* M-13 suşunu daha ileri derecede tanımlamak amacıyla, endospor boyama tekniği, API 50 CH-API 50 CHB/E ortam kiti (BioMérieux), yağ asiti analizi ve FAME profili (Sasser ve ark., 1990, ve Khoodoo ve ark., 2005) kullanılmıştır. Sonuç olarak, *Bacillus* SB-M13 suşunun sporlanan bir bakteri olduğu (Şekil 4) ve yapılan biyokimyasal testler sonucunda (Ek A ve B), suşun kesin olarak *Bacillus pumilus* olduğu belirlenmiş ve suş *Bacillus pumilus* SB- M13 olarak isimlendirilmiştir.

3.2 *B. pumilus* SB-M13 ksilanolitik sistemi

B. pumilus SB-M13 içerisinde tek karbon kaynağı ve indükleyici olarak %3 öğütülmüş mısır koçanı, buğday kabuğu veya pirinç kabuğu gibi tarımsal atık içeren fermentasyon ortamında çalkalamalı erlen biyoreaktörlerde çoğaltılarak, 7 gün boyunca kültürden alınan kaba enzim özütü örneklerinde, hücre dışı ksilanolitik enzimlerin üretimi araştırılmıştır. Buna ek olarak, %1.0 ve %0.5 final konsantrasyonundaki arabinozun, içerisinde %3 mısır koçanını tek karbon kaynağı olarak bulduran fermentasyon ortamında, ksilanaz enzimlerinin üretimine indükleme etkisi de incelenmiştir.

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisindeki uygulamalar için, içerisinde selüloz parçalayan enzim buldurmayan ksilanaz enziminin hazırlanması oldukça önemlidir. *B. pumilus* SB-M13

0.003 FPU gibi oldukça az selüloz aktivitesine sahip olduğu için kağıt sanayi inde, kağıt hamurunun beyazlatılmasında kullanılma olasılığı vardır. (Biran ve ark., 2006; basıma yollandı). Bu nedenle, çalışmamızda ksilanolitik enzimlere ek olarak, selüloz hidrolizinde görev alan diğer bir enzim olan β -glukosidaz üretimi de araştırılmıştır.

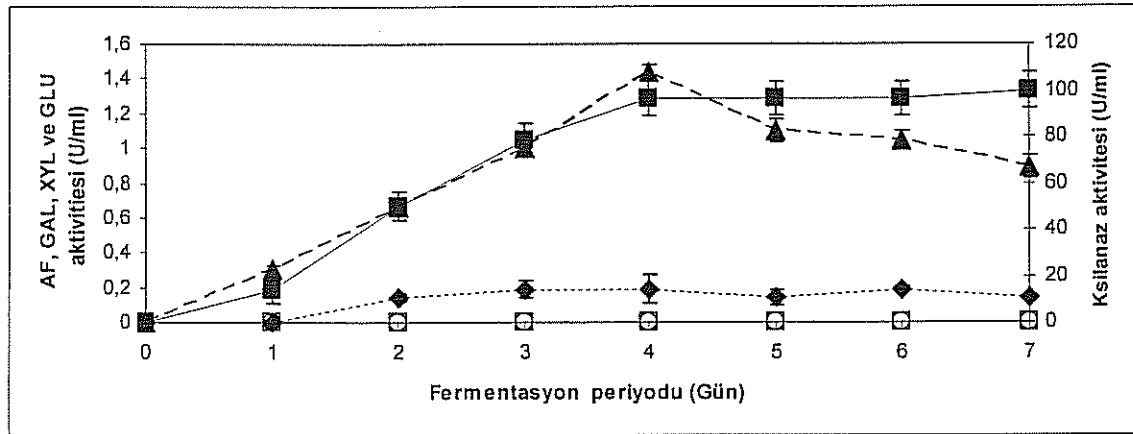


Şekil 4. *Bacillus pumilus* SB-M13 endospor boyama resmi. (Yeşil yapılar endosporlar, ve pembe yapılar vejetatif hücreler).

3.2.1 *B. pumilus* SB-M13 hücre dışı ksilanolitik enzimlerinin zamana bağlı üretimi

B. pumilus SB-M13, %3'lük mısır koçanı üzerinde çoğaltıldığında, Şekil 5'te görüldüğü gibi AF, XYN ve GAL enzimlerini üretmiştir. AF ve XYN sentezi fermentasyonun ilk gününden başlayarak hızla artmış ve 4. günde maksimum seviyeye ulaşmıştır. Böylece, XYN ve AF aktiviteleri, 4. günde sırasıyla maksimum aktivite olan 1.3 U/ml ve 108 U/ml değerlerine ulaşmıştır. Daha sonraki günlerde AF aktivitesi sabit olarak 1.3 U/ml civarında kalırken, muhtemelen proteaz enzimlerinin miktarındaki artış ve enzim deaktivasyonundan dolayı XYN aktivitesi yavaş yavaş azalarak 7. günün sonunda 67 U/ml olmuştur.

AF ve XYN'in tersine, GAL sentezi ilk gün başlamamış ancak üretim fermentasyonun 2. gününde başlamıştır. Ayrıca, AF ve XYN ile karşılaştırıldığında, kaba enzim özütünde GAL miktarının fark edilebilir derecede az olduğu ve maksimum GAL aktivitesi olan 0.2 U/ml'nin 4. günde elde edildiği görülmüştür. Bunlara ek olarak, şekilde görüldüğü gibi, kaba enzim özütünde XYL ve GLU aktiviteleri bulunmamıştır.

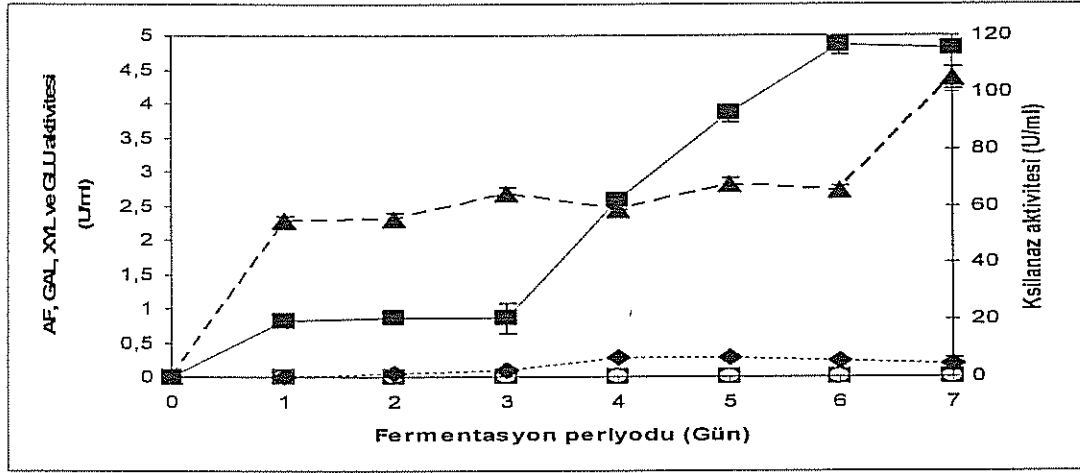


Şekil 5. %3 mısır koçanı üzerinde çoğaltılan *B. pumilus* SB-M13 kaba enzim özütünde bulunan ksilanolitik enzim aktiviteleri. Bakteri üretimi çalkalamalı inkübatörde 37°C, 175 rpm'de 7 gün boyunca yapılmıştır. Enzim aktiviteleri standart ölçüm metotları ile 40°C ve pH 7.0' de ölçülmüştür. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir. (Enzim aktiviteleri; ■ : AF, ◆ :GAL, ▲ :XYN, ○ : XYL □ : GLU).

Özet olarak, enzimlerin zamana bağlı üretim profili değerlendirildiğinde, AF ve XYN sentezinin fermentasyonun başında başladığı, fakat GAL sentezinin daha sonraki günde gerçekleşmeye başladığı gözlenmiştir. Bütün enzimler maksimum seviyeye 4. günde

ulaşmıştır. Fermentasyonun ilk 4 gününde XYN enzimi üretimindeki artış, AF üretiminde belirgin bir artışa sebep olmuştur. Bu da iki enzimin arasında muhtemel sinerjiyi gösteren bir durum olarak düşünülmüştür. Buna göre, i) AF enziminin ksilan ana iskeletine bağlı arabinoz molekülünü uzaklaştırdığı, oluşan yeni yapının XYN için daha iyi bir substrat ve indükleyici olduğu ve XYN üretimini arttırdığı, iii) XYN miktarındaki artışa bağlı olarak XYN'ın ksilan ana iskeletine etki ederek daha fazla ksilooligosakkarit ürettiği ve oluşan ksilooligosakkaritlerin AF üretiminde daha etkili indükleyici olduğu düşünülmüştür.

Fermentasyon ortamında tek karbon kaynağı olarak %3 buğday kabuğu kullanıldığında ortaya çıkan ksilanolitik enzim üretim profili, mısır koçanı kullanıldığında elde edilen profilden biraz farklıdır (Şekil 6). Mısır koçanının kullanıldığı fermentasyondaki gibi, AF ve XYN üretimi kultivasyonun ilk günü başlamasına rağmen, GAL üretimi fermentasyonun 2. gününde başlamıştır. Maksimum GAL aktivitesi (0.3 U/ml) fermentasyonun 4. gününde gerçekleşirken, maksimum AF (5.0 U/ml) ve XYN (105 U/ml) aktivitelerine sırasıyla fermentasyonun 6. ve 7. gününde ulaşılmıştır. Fermentasyonun ilk 3 günü için AF üretimi aynı seviyededir, fakat bu dönem boyunca XYN miktarında görülen küçük bir artış, muhtemelen daha sonraki günlerde AF üretiminde artışa neden olmuştur. Gerçekten de 3. günden başlayarak AF üretimi hızla artarak maksimum AF aktivitesi olan 5 U/ml fermentasyonun 6. gününde elde edilmiştir. Diğer yandan XYN aktivitesi 3 ve 6. günler arasında sabit kalmıştır ve bu dönemde AF miktarındaki artış, muhtemelen fermentasyonun 6. gününden sonra XYN üretiminde artışa sebep olmuştur. Bunlara ek olarak, GAL üretimi AF ve XYN üretimine göre oldukça az olmuş ve fermentasyon süresince kaba enzim özütü örneklerinde XYL ve GLU aktivitelerine ise rastlanmamıştır.



Şekil 6. %3 buğday kabuğu üzerinde çoğaltılan *B. pumilus* SB-M13 kaba enzim özütünde bulunan ksilanolitik enzim aktiviteleri. Bakteri çalkalamalı inkübatörde 37°C, 175 rpm'de 7 gün boyunca çoğaltılmıştır. Enzim aktiviteleri standart ölçüm metotları ile 40°C ve pH 7.0' de ölçülmüştür. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir. (Enzim aktiviteleri; ■ : AF, ◆ :GAL, ▲ :XYN, ○ : XYL □ : GLU).

Kısaca, ksilanolitik enzimlerin zamana bağlı üretimi değerlendirildiğinde, AF ve XYN enzimlerinin buğday kabuğu içeren fermentasyon ortamında üretilen ön enzimler olduğu ve bu üretimin daha sonraki aşamalarda GAL ile takip edildiği görülmüştür. AF, XYN ve GAL enzimlerinin üretiminde bir paralellik olmamasına rağmen, enzim üretim profili bu enzimlerin arasında muhtemel bir sinerjinin olabileceğini göstermiştir. Başlangıç AF ve XYN üretimi, daha sonraki aşamalarda GAL üretimini arttırdığı ve GAL üretimindeki artışın, yine takip eden günlerde AF ve/veya XYN üretimini arttırabileceği düşünülmüştür. GAL ve AF enzimlerinin maksimum seviyede üretimi fermentasyonun 4. ve 6. gününde gerçekleşip bu seviyenin fermentasyonun sonuna kadar (7. gün) sabit kaldığı görülmüştür. Fakat, XYN üretimi fermentasyon periyodu arttıkça artmış ve fermentasyonun son günü olan 7. günde maksimum seviyeye ulaşmıştır. Sonuç olarak, fermentasyon ortamında biriken AF ve GLU

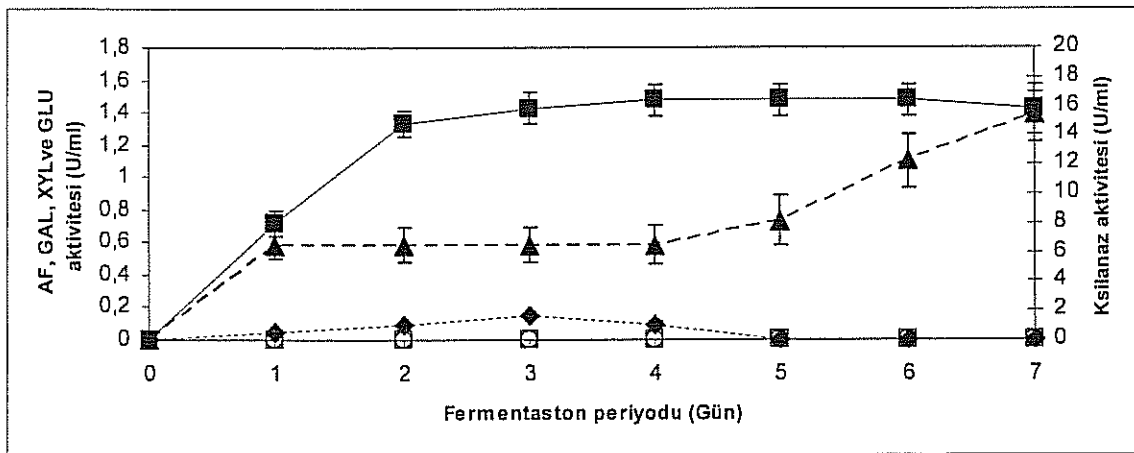
aktivitelerinden dolayı, ksilan molekülü değişmiş ve oluşan yeni yapının XYN üretimini daha fazla indükleyen, dolayısıyla XYN üretiminde artışa sebep olan bir substrat olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, Şekil 6'de görüldüğü gibi, AF ve XYN üretimleri belirgin bir ilişkiye sahiptir. Belirli bir dönemde XYN aktivitesindeki çoğalma, arabinoz içeren arabino-oligosakkaritlerin miktarında artışa sebep olarak, muhtemelen, daha sonraki basamakta AF üretim miktarında artışa sebep olmaktadır. AF miktarındaki artışın da, ksilan ve/veya ksilooligosakkarit yapısından arabinozu uzaklaştırarak, yeni yapının XYN üretimi için daha etkili yeni substrat olduğu ve bunun da XYN üretiminde artışa sebep olduğu düşünülmüştür. Buğday kabuğu üzerinde AF üretimi mısır koçanı üzerindeki üretime göre daha fazla olmuştur.

Mikroorganizma pirinç kabuğu üzerinde çoğaltıldığında, kultivasyonun hemen ardından AF ve XYN, sonrasında da nispeten az seviyede GAL ürettiği (Şekil 7), fakat enzimlerin maksimum değerlerine birbiri ardından ulaştığı görülmüştür. Maksimum AF aktivitesi olan 1.5 U/ml fermentasyonun 2. gününde elde edilmiş ve bu seviye fermentasyonun sonuna kadar (7gün) sabit kalmıştır. Daha sonra, maksimum GAL aktivitesi olan 0.1 U/ml fermentasyonun 3. gününde gerçekleşmiş, enzim aktivitesi sonraki günlerde azalmış ve 5. günde tamamen bitmiştir. XYN aktivitesi ilk dört gün boyunca sabit olup, enzim üretimi zamanla artmış ve 7. günde maksimum seviyeye (16 U/ml) ulaşmıştır. Ayrıca, pirinç kabuğu içeren kaba enzim özütü diğer substratlarda olduğu gibi, ne XYL ne de GLU aktivitesi göstermemiştir.

Hiçbir fermentasyonda hücre dışı XYL ve GLU aktivitesine rastlanmamıştır. Gerçekten de, *B. pumilus* XYL enzimi hücre içi enzimdir (Grange, 1999) ve dolayısıyla *B. pumilus* SB-M13 enzim özütünde, XYL aktivitesinin olmaması normaldir. Üstelik, *Bacillus circulans* subsp. *alkalophilus*'un da hücre içi GLU ürettiği bulunmuştur (Paavilainen ve ark., 1976). Bu

nedenle, *B. pumilus* SB-M13 'un hücre dışı GLU üretmemesinin normal olduğu ve bu özelliğinin de kaba ksilanaz özütünün kağıt hamurunun beyazlatılmasında kullanabileceği düşünülmektedir.

Kısaca, enzimlerin maksimum seviyeye ard arda ulaşması (AF, GAL ve sonra XYN) AF, GAL ve XYN enzimleri arasında muhtemel sinerjiyi göstermektedir. Bir enzimin üretimini diğerlerinin üretimini ve/veya iki enzimin birleştirilmiş etkisinin, 3. enzimin üretimini arttırabileceği düşünülmüştür. Varsayımlarımıza göre, fermentasyon boyunca AF, arabinoksilan (AX) molekülünden arabinozları uzaklaştırarak (yan dallarını parçalayarak) ksilan molekülünü XYN için daha etkili bir substrat haline getirmektedir. Bu da XYN üretiminin neden belli bir dönem sonunda belirgin bir şekilde arttığını açıklamaktadır.



Şekil 7. %3 pirinç kabuğu üzerinde çoğaltılan *B. pumilus* SB-M13 enzim özütünde bulunan ksilanolitik enzim aktiviteleri. Bakteri çalkalamalı inkübatörde 37°C, 175 rpm'de 7 gün boyunca çoğaltılmıştır. Enzim aktiviteleri standart ölçüm metotları ile 40°C ve pH 7.0' de ölçülmüştür. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir. (Enzim aktiviteleri; ■ : AF, ◆ :GAL, ▲ :XYN, ○ : XYL □ : GLU).

3.2.2 Karbon kaynaklarının ksilanolitik enzim üretimine etkisi

3.2.2.1 Tarımsal atıkların etkisi

B. pumilus SB-M13, % 3'lük mısır koçanı, buğday kabuğu ve pirinç kabuğu gibi değişik karbon kaynaklarında çoğaltılarak, bu karbon kaynaklarının, ksilanolitik enzim üretimindeki indüklenme gücü saptanmıştır (Tablo 6).

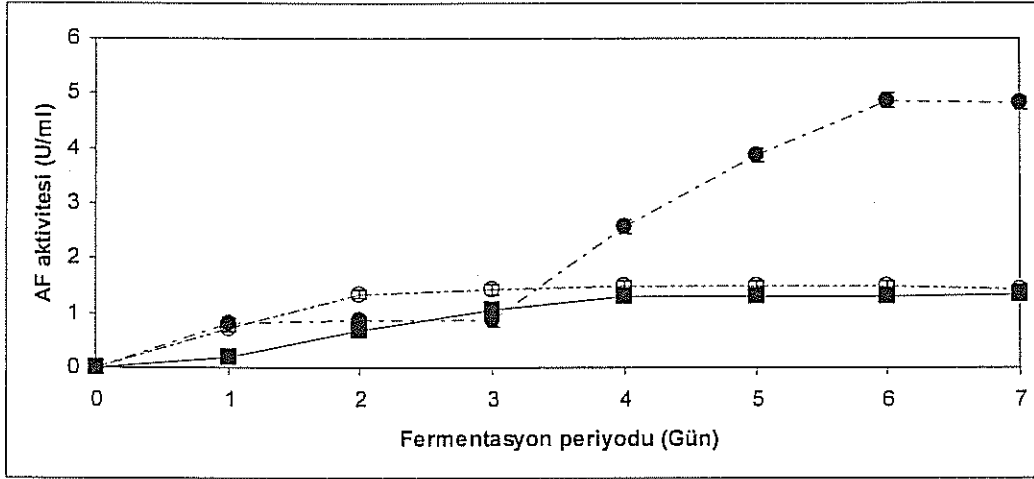
Çalışmamıza göre, bütün karbon kaynakları AF üretimini indüklemiş ve maksimum AF aktivitesi olan 5.0 U/ml'nin buğday kabuğu içeren fermentasyon ortamında 6. günde gerçekleşmiştir (Şekil 8). Karbon kaynağı mısır koçanı ve pirinç kabuğu ile değiştirildiğinde, hem AF miktarı, hem de fermentasyon periyodu azalmıştır. Gerçekten de, mısır koçanı ve pirinç kabuğu için, maksimum AF aktivitesi 1.3 U/ml ve 1.5 U/ml olarak sırasıyla fermentasyonun 4. ve 5. gününde gerçekleşmiştir.

Ksilan ana iskeletini parçalayan XYN, bütün fermentasyon ortamlarında üretilen, asıl ve en önemli enzimdir (Şekil 9). Mısır koçanı ve buğday kabuğunun XYN üretimini indüklenme gücü benzer olup, bu değer pirinç kabuğuyla elde edilen değerinkinin yaklaşık 7 katıdır (Tablo 7). Mısır koçanı ve buğday kabuğu için, maksimum XYN aktivitesi sırasıyla 108 U/ml (4. gün) ve 105 U/ml (7. gün) ölçülürken, maksimum aktivite pirinç kabuğu için 16 U/ml'dir (7. gün).

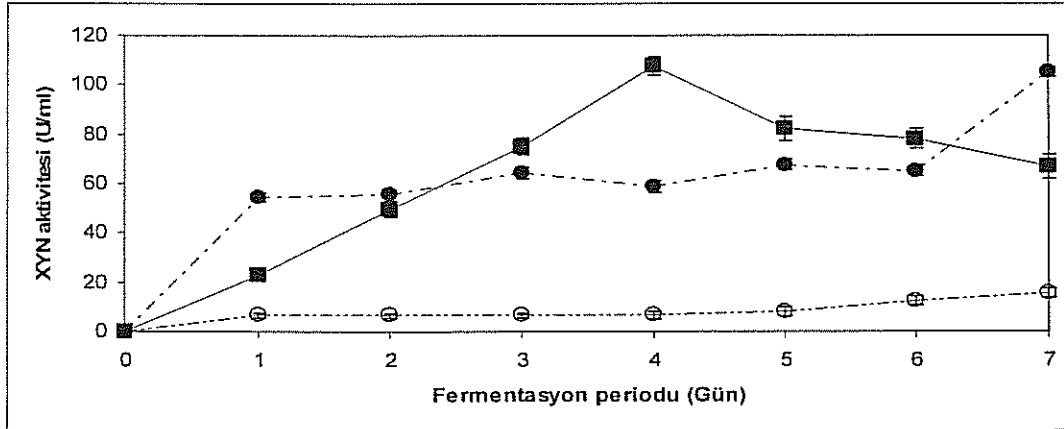
Tablo 6. *B. pumilus* SB-M13 kaba enzim özütünde ksilanolitik enzim aktiviteleri

Enzimler	Enzim üretimi başlangıcı (Gün)	Maksimum enzim üretimi (Gün)	Maksimum enzim aktivitesi (U/ml)
α-L-arabinofuranosidaz			
<i>Mısır koçanı</i>	1	4	1.3 \pm 0.0
<i>Buğday kabuğu</i>	1	5	5.0 \pm 0.1
<i>Pirinç kabuğu</i>	1	5	1.5 \pm 0.1
β-galaktosidaz			
<i>Mısır koçanı</i>	2	2	0.2 \pm 0.0
<i>Buğday kabuğu</i>	2	4	0.3 \pm 0.0
<i>Pirinç kabuğu</i>	1	3	0.1 \pm 0.0
Endo-β-ksilanaz			
<i>Mısır koçanı</i>	1	4	108.0 \pm 4.0
<i>Buğday kabuğu</i>	1	7	105.0 \pm 2.0
<i>Pirinç kabuğu</i>	1	7	16.0 \pm 1.5
β-ksilosidaz			
<i>Mısır koçanı</i>	-	-	0.0
<i>Buğday kabuğu</i>	-	-	0.0
<i>Pirinç kabuğu</i>	-	-	0.0
β-glukosidaz*			
<i>Mısır koçanı</i>	-	-	0.0
<i>Buğday kabuğu</i>	-	-	0.0
<i>Pirinç kabuğu</i>	-	-	0.0

* Enzim selüloz hidrolizinde görev almaktadır. Enzim aktivite ölçümleri kaba enzim özütünde, standart ölçüm metodu kullanılarak standart şartlarda gerçekleştirilmiştir

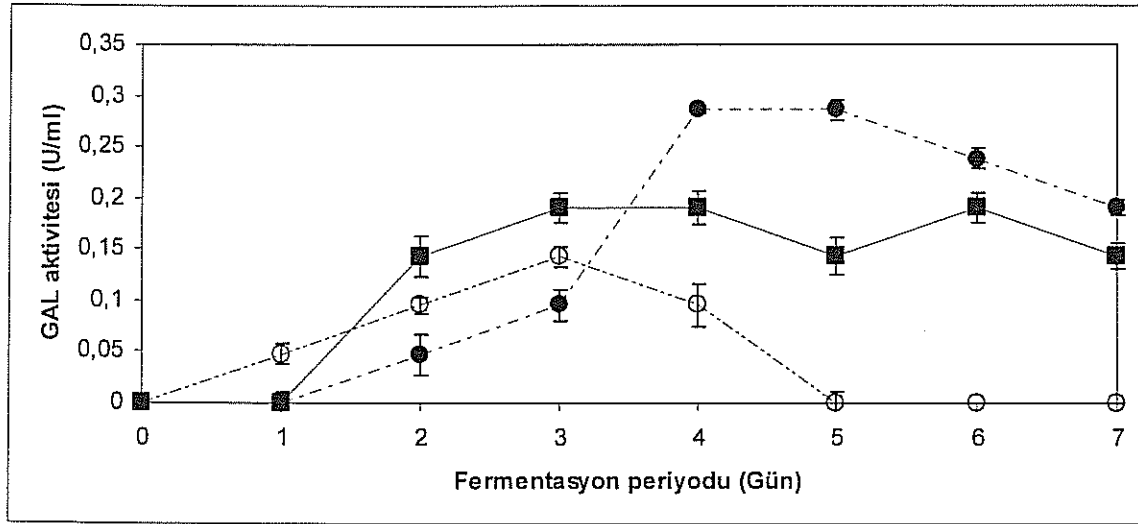


Şekil 8. Karbon kaynaklarının *Bacillus pumilus* SB-M13 AF üretimine etkisi. (■ : 3% mısır koçanı, ● : 3% buğday kabuğu, ○ : 3% pirinç kabuğu). AF aktivitesi 40°C, pH 7.0'de standart aktivite ölçüm metodu kullanılarak ölçülmüştür. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir.



Şekil 9. Karbon kaynaklarının *Bacillus pumilus* SB-M13 XYN üretimine etkisi. (■ : 3% mısır koçanı, ● : 3% buğday kabuğu, ○ : 3% pirinç kabuğu). XYN aktivitesi 40°C, pH 7.0'de standart aktivite ölçüm metodu kullanılarak ölçülmüştür. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir.

GAL için, 0.3 U/ml aktivite ile buğday kabuğu en iyi indükleme etkisi olan karbon kaynağıdır, bunu 0.2 U/ml ile mısır koçanı ve 0.1 U/ml ile pirinç kabuğu takip etmektedir (Şekil 10 ve Tablo 6). *Bacillus* türlerinde hücre içi GAL üretilmekte olduğu değişik raporlarda belirtilmiştir (Rahim ve Lee, 1992; Kocabas ve Dizbay, 1999; Mabrouk ve ark., 2002). Bu çalışmalarda bazı türlere ait kaba fermentasyon özütünde çok az seviyede hücre dışı GAL aktivitesine de rastlanmıştır. Çalışmamızda da , hücre dışı GAL aktivitesi bütün fermentasyon ortamlarında çok az seviyede ölçülmüştür.



Şekil 10. Karbon kaynaklarının *Bacillus pumilus* SB-13 GAL üretimine etkisi. (■ : 3% mısır koçanı, ● : 3% buğday kabuğu, ○ : 3% pirinç kabuğu). GAL aktivitesi 40°C, pH 7.0'de standart aktivite ölçüm metodu kullanarak ölçülmüştür. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir.

AF, XYN ve GAL enzimleri dışında hiç bir fermentasyon ortamına ait kaba enzim özütünde ne XYL ne de GLU aktivitesi gözlenmiştir. Aslında, *B. pumilus* XYL enzimi bir hücre içi enzimdir (Grange, 1999) ve bu enzimin *B. pumilus* SB-M13 kaba enzim özütünde bulunmaması da bu sonucu doğrulamaktadır. Son olarak, hiç bir fermentasyon ortamında hücre dışı GLU aktivitesinin bulunmaması, fermentasyon ortamlarından elde edilen kaba enzim özütlerinin, kağıt hamuru beyazlatma işleminde direkt olarak kullanımını mümkün kılmaktadır.

GLU selüloz parçalama işleminde görev alan enzimlerden biridir. Endo-1,4- β -glukanaz (EC 3.2.1.4) ve ekzo-1,4- β -glukanaz (EC 3.2.1.91), selüloz lifine direk olarak etki ederek, farklı büyüklükte oligosakkaritler ve selülobioz üretirler. β -gluksidaz (GLU, EC 3.2.1.21) selülozları hidrolize ederek glukoz oluşturur (Zanoelo ve ark, 2004). *Bacillus circulans* subsp. alkalophilus'un hücre içi GLU ürettiği bulunmuştur (Paavilainen ve ark., 1976). Çalışmamızda, hücre dışı GLU aktivitesi bulunmadığı gözlenmiştir. Ancak, literatürde verildiği gibi, *B. pumilus* SB-M13 hücre içi GLU üretebilir.

Duarte ve arkadaşları (2003), asidik ve bazik şartlarda, *B. pumilus* CBMAI 0008'un içerisinde huş ağacı, *Eucalyptus grandis*, ve yulaf tanesi gibi farklı ksilan kaynakları bulunduran fermentasyon ortamlarında hücre dışı ürettiği ksilanolitik enzimleri araştırmıştır. Bu çalışmaya göre, *B. pumilus* CBMAI 0008 çeşitli karbon kaynaklarında, değişen miktarlarda β -ksilanaz, mannanaz, α -glukuronosidaz, β -ksilosidaz, β -glukosidaz, arabinosidaz, α -galaktosidaz ve selülaz üretmiştir. Maksimum ksilanaz aktivitesi 328 U/ml, huş ağacı ksilanı ile pH 9.0 şartlarında elde edilmiştir. *Eucalyptus grandis*' i yapısında tek karbon kaynağı olarak bulunduran fermentasyon ortamında (pH 4.0), maksimum mannanaz ve α -glukuronosidaz aktiviteleri, sırasıyla 6.0 U/ml ve 1.5 U/ml olarak ölçülmüştür. Üstelik, hem

huş ağacı ksilanı hem de *Eucalyptus grandis* kullanıldığında pH 9.0'da, *B. pumilus* CBMAI 0008 maksimum 0.02 U/ml β -glukosidaz üretmiştir. Yulaf tanesi ksilanazı kullanıldığında, maksimum arabinosidaz, α -galaktosidaz ve filtre kağıdı selülaz aktiviteleri 0.07 U/ml, 5.0 U/ml, ve 0.01 U/ml'dir.

Bizim çalışmamızda fermentasyon pH 7.0'de yapılmış ve enzim aktiviteleri ölçümü, standart şartlarda gerçekleştirilmiştir. Buna göre, buğday kabuğu üzerinde maksimum XYN, AF, ve GAL aktiviteleri 105 ± 2.0 U/ml, 5 ± 0.1 U/ml, ve 0.3 ± 0.0 U/ml olarak ölçülmüştür. *B. pumilus* CBMAI 0008 ile karşılaştırıldığında, *B. pumilus* SB-M13 daha az miktarda XYN, aynı seviyede AF, fakat daha yüksek miktarda GAL üretmektedir.

Özet olarak, çalışmamızda *B. pumilus* SB-M13 farklı karbon kaynakları üzerinde, yüksek seviyede XYN ve AF ve az seviyede GAL üretmektedir. Ayrıca, üretilen enzimlerin miktarı karbon kaynağına bağlı değişim göstermektedir. Çalışmada, yaygın bir hemiselülozik yapı olan arabinoksilanın (AX), ksilanolitik enzim üretimini indükleyen bir kaynak olduğu düşünülmektedir. Ksilan molekülü üzerindeki dallanmaların yapısı, frekansı ve pozisyonu, ksilan molekülü kaynağına göre farklılık taşımaktadır. Buna bağlı olarak, farklı ksilan kaynağı kullanıldığında, ksilanolitik enzimlerinin üretim seviyesinde çeşitlilik gözlenmiştir.

B. pumilus SB-M13, yapısında tek karbon kaynağı olarak %3 oranında mısır koçanı, buğday kabuğu ve pirinç kabuğunu bulunduran fermentasyon ortamında farklı seviyelerde hücre dışı ksilanolitik enzim üretmektedir. Hemiselüloz ve ksilan miktarı, ksilan yapısı, enzimlerin ksilana ulaşılabilirliği; karbon kaynağının tane büyüklüğü, lignin ve ksilan yapısı, arabinoksilan molekülünün çözünürlüğü, ve fermentasyon ortamının viskozitesi, enzim üretim profilini belirleyen anahtar parametrelerdir.

Buğday kabuğunun tersine, pirinç kabuğu ve mısır koçanı öğütülmüştür. Buğday kabuğu küçük ve parçacıklar şeklinde olduğundan, kullanım öncesi ekstra öğütme muamelesine tabii tutulmamıştır. Karbon kaynaklarının formu göz önünde bulundurulduğunda, buğday kabuğu ve pirinç kabuğu kepeksi, fakat mısır koçanı granül yapıdadır. Mısır koçanının granül halinde olmasının, enzimin karbon kaynağına difüzyonunu engelleyen bir durum olabilir. Üstelik, karbon kaynaklarındaki toplam çözünür polisakkarit içeriğindeki farklılık, fermentasyon ortamında yoğunluk, viskozite farklılığına sebep olmuştur (görsel bulgu). Buğday kabuğu ve pirinç kabuğu içeren fermentasyon ortamlarının viskozitesi ve yoğunluğu, mısır koçanı içeren fermentasyon ortamına göre belirgin bir şekilde yüksek görülmektedir. Bu da, enzim üretim profilinde çeşitliliğe sebep olabilir.

Mısır kabuğu (Saulnier *ve ark.*, 1994, Saha, 2000'de referans edilmiştir), buğday kabuğu (Schooneveld-Bergmans *ve ark.*, 1999a) ve pirinç kabuğu (Choct ve Annison, 1990, William *ve ark.*, 2000'de referans edilmiştir) arabinoksilan (AX) içeriği detaylı incelenmiştir. Bu çalışmalara göre, belirtilen karbon kaynakları oldukça kompleks olup, her birinde ksilan molekülü farklı yan grup tipleri ve kompozisyonuna sahiptir.

Schooneveld-Bergmans ve arkadaşları (1999a) buğday kabuğundaki su ile ayrıştırılmayan (glukurono)arabinoksilanın yapısını bulmuşlardır. Bu çalışmada, yapıda en yaygın olan arabinoz yan gruplarının ksiloza O-3 pozisyonunda bağlandığı belirtilmiştir. Yarıdan fazla arabinoksilan molekülünde arabinoz, ksiloza sadece O-3 pozisyonunda tek dallanma şeklinde değil, aynı zamanda O-2 ve O-3 pozisyonunda çift dallanma ile de bağlanmıştır. Ayrıca, arabinoksilan molekülünde arabinoz dimerik formda da yer almaktadır. Buğday

arabinoksilanın da bulunan dallanmalar (arabinoz, ksiloz, glukuronik asit) rasgele dağılım göstermekte olup, yan gruplar ard arda en az 6 dallanmamış ksiloz ile bölünmüştür. Yan grupların varlığı, hemiselülozların sıvı ortamda çözünürlüğünü pozitif yönde etkileyen önemli bir faktördür (Grange, 1999). Pirinç kabuğu arabinoksilan yapısı, buğday kabuğununkine oldukça benzemektedir. Fakat daha fazla yan grup ve dallanmadan dolayı buğday kabuğu arabinoksilanı, pirinç kabuğuna göre sulu ortamda daha fazla çözünmektedir (William ve ark., 2000).

Mısır koçanı arabinoksilan molekülü kompleks bir yapıdır. Bu yapıda ana yan grup olan arabinoz monomerleri ksilan iskeletine O-2 ve/veya O-3 pozisyonunda bağlanmaktadır. Fakat buğday kabuğu arabinoksilanında, arabinoz oligomerleri bulunmaktadır ve bu oligomerler ksilan iskeletine 1-2, 1-3, ve 1-4 bağı ile bağlanmaktadır (Sandra ve ark., 2003). Mısır koçanının çözünürlük derecesi, buğday kabuğu ve pirinç kabuğu arasında bir noktadadır.

Genel olarak, buğday kabuğu ve pirinç kabuğu arabinoksilan yapıları birbirine benzemektedir ve fermentasyon ortamına eklendiklerinde her ikisi de ortamı daha yoğun ve viskoz hale getirmektedir. Fakat çalışmamızda, buğday kabuğu ile karşılaştırıldığında, pirinç kabuğu kullanıldığında ksilanolitik enzim üretimi oldukça azdır. Bu da, iki arabinoksilan arasındaki çözünürlük farklılığı ile açıklanabilir. Daha fazla çözünür olmasından dolayı buğday kabuğu arabinoksilanı, fermentasyon ortamında çözünür olarak daha fazla miktarda bulunmaktadır. Böylece arabinoksilan hidrolizinde görev alan enzimler daha fazla indükleyici varlığında daha çok üretilmiştir. Viskozite ve yoğunluk hem buğday kabuğu, hem de pirinç kabuğu için problem olmasına rağmen, daha çözünür olan buğday kabuğu arabinoksilanı, viskozite probleminin üstesinden gelerek ksilanolitik enzimlerinin üretimini indüklemiştir. Çözünürlüğün dışında, buğday kabuğu arabinoksilan yapısı (arabinooligo yan zincirlerinin

bulunması) da enzim üretimini etkilemektedir. Gerçekten de, en yüksek AF aktivitesi, yapısında daha fazla tekli ve çift arabinooligo yan zincirleri bulunduran buğday kabuğu ile elde edilmiştir.

Ayrıca, mısır koçanı ve buğday kabuğun XYN üretimi indüklenme gücü benzerdir ve maksimum XYN aktivitesi 108 U/ml (4. gün) ve 105 U/ml (7. gün) sırasıyla mısır koçanı ve buğday kabuğu içeren fermentasyon ortamında elde edilmiştir. Buğday kabuğu kullanıldığında maksimum XYN üretim seviyesine daha geç ulaşılmıştır. Bu da yoğunluk ve muhtemelen viskoz fermentasyon ortamı ve buna bağlı enzimin diffüzyon zorluğundan kaynaklanmıştır.

Mısır koçanı içeren fermentasyon ortamında viskozite oldukça düşük olup, viskoziteye bağlı enzim diffüzyon sorunu bulunmamaktadır. Böylece, diğer fermentasyon ortamlarına göre, ksilanolitik enzimler mısır koçanı içeren fermentasyon ortamında maksimum değerlerine daha kısa sürede ulaşmaktadır. Fakat, mısır koçanının granüllü yapıda olması muhtemelen, enzimin substrata diffüzyonuna limit koyarak, ksilan hidrolizi ve ksilanolitik enzim üretimini negatif yönde etkilemiştir.

Genel olarak, az seviyede üretilen hidrolitik enzimler, polimerik yapıyı hidroliz ederek küçük çözümlü 'sinyal' moleküller oluştururlar. Bu moleküller hücre içine girerek ilgili polimerin hidrolizinde gerekli enzimlerin üretimini indüklerler. Buna bağlı olarak az (konstitütif) seviyede üretilen ksilanaz, ksilan molekülü parçalayarak ksilooligosakkarit ve ksilobioz üretir. Bunun yanı sıra hidroliz ürünleri hücre içine alınarak, diğer ksilanaz genlerini indükler. Ayrıca, farklı ksilanazlar ve ksilanolitik enzimler, farklı ksilanlara karşı farklı aktivite gösterir (substrat seçiciliği çeşitliliği). Bu nedenle, substrat seçiciliği ve ksilanolitik enzimlerin

fizikokimyasal özellikleri de arabinoksilan hidrolizi ve ksilanolitik enzimlerin üretim seviyesinde etkili diğer parametrelerdir. Böylece, ksilanolitik enzimlerinin substrat seçiciliği, çeşitli ksilan moleküllerinin farklı derecede hidroliz olmasına sebep olmaktadır. Örneğin, *Aureobasidium pullulans* ve *Trichoderma longibrachiatum* ksilanazları uzun ksilan zincirlerinin (8 ve 19 ksiloz) hidrolizinde daha etkilidir. Daha fazlası, ksilan molekülünde yan grupların varlığı ksilan hidroliz oranını etkilememektedir. Fakat, *Thermotoga maritima* ksilanazı, uzun ksilan zincirlerine (19 ksilozdan daha uzun) daha aktif olmasına rağmen, yan zincirlerin varlığı ksilanın hidroliz oranını belirgin bir şekilde azaltmaktadır (Liab ve ark., 2000).

Enzimlerin fizikokimyasal özellikleri de enzimlerin substrata ulaşımını etkileyen bir faktördür. Gerçekten de, viskoz ortamda dahi kolaylıkla diffüz edebilen (muhtemelen daha küçük) bir enzim kolayca substratına ulaşarak enzim indüklemeye-üretme işlemini başlatmaktadır.

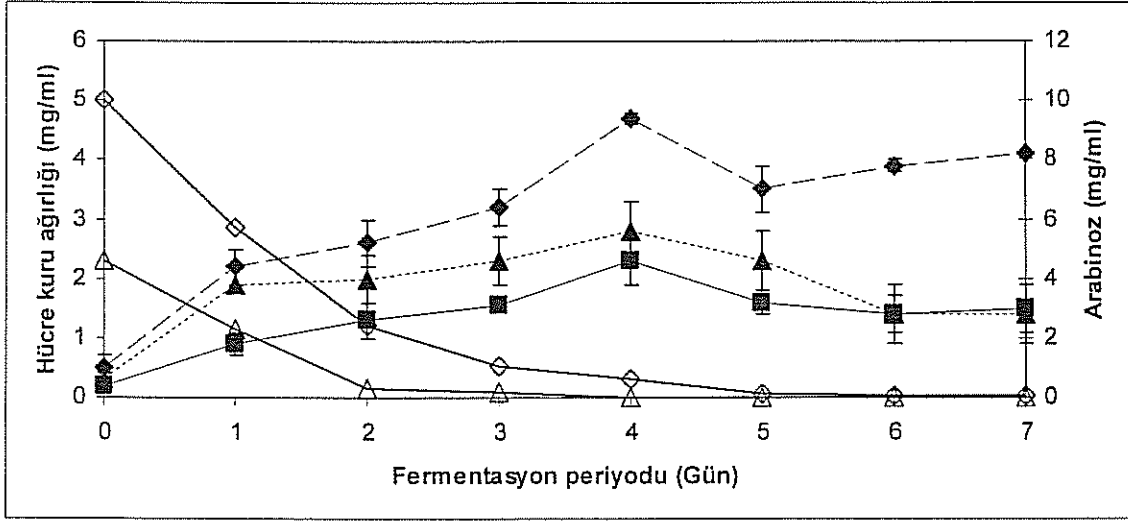
Bütün bu parametrelerin üzerine, tarımsal atıkların lignin kompozisyonu da enzim üretim yoğunluğunu etkileyebilir. Tenkanen ve arkadaşları (1999) özel enzim muamele çalışmaları ile huş ve çam ağacı kağıt hamurundaki kalıntı lignin ile diğer polisakkaritlerin arasındaki kovalent bağı bulmuştur. Bu çalışmaya göre, huş ağacı kağıt hamurunda kalıntı lignin, en az ksilan moleküle bağlanmış ve minör kısmı aynı zamanda selüloza da bağlanmıştır. Çam ağacı kağıt hamurunda ise, kalıntı lignin selüloz, glukomannan ve ksilan moleküle bağlanmaktadır. Lignin molekülünün diğer polisakkaritler ile birlikte sıkı bir yapı oluşturması, bu polisakkaritleri hidroliz eden enzimlerin yapıya ulaşmasını engellemektedir. Dolayısıyla, lignin, bitki polisakkaritlerin hidrolizini sınırlayabilecek bir moleküldür.

3.2.2.2 L-arabinozun etkisi

L-arabinozun ksilanolitik enzim üretimine etkisi, içerisinde %3 mısır koçanı bulunduran fermentasyon ortamı için araştırılmıştır. Bu amaçla arabinoz, konsantrasyonu % 0.5 ve %1.0 olacak şekilde ortama eklenmiş ve ksilanolitik enzimlerin (AF, XYN, ve GAL) sentezi incelenmiştir. Daha sonra sonuçlar içerisinde arabinoz bulundurmeyen kontrol deneyleri ile karşılaştırılmıştır.

Şekil 11’de görüldüğü gibi arabinoz bakteri tarafından etkili bir şekilde tüketilmiştir. Hücreler ortamda bulunan bütün arabinozu, başlangıç arabinoz konsantrasyonlarına bağlı olarak 3 ve 5 gün içinde tüketmiştir. En yüksek bakteri kuru ağırlığı kullanılan arabinoz yüzdelerinden 1% arabinoz konsantrasyonunda elde edilmiştir.

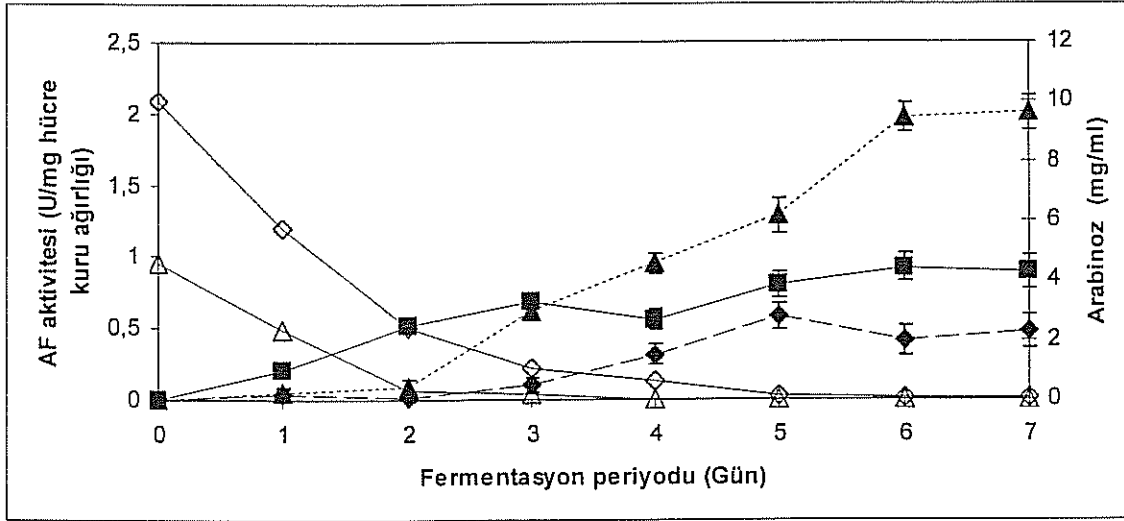
Arabinoz *B. pumilus* SB-M13 tarafından etkili ve çabuk tüketilmektedir. Çalışmamızda, arabinozun, kompleks karbon kaynağı (mısır koçanı) ile birlikte fermentasyon ortamında bulunduğu ilk tercih edilen karbon kaynağı olduğu gözlenmiştir. Bunun sonucunda, Şekil 12-14’ de görüldüğü gibi, kompleks karbon kaynağını kullanmak için gerekli ksilanolitik enzimlerin sentezi bloke edilmiştir. Zamanla bakteriyel tüketim sebebiyle ortamdaki arabinoz miktarı azalmıştır. Bu da mikroorganizmanın kompleks karbon kaynağını kullanımını zorunlu kılarak, ksilanolitik enzimlerin sentezini sağlamıştır.



Şekil 11. L-arabinoxun *B. pumilus* SB-M13 kultivasyonuna etkisi. Kultivasyon 37°C, 175 rpm'de 7 gün süreyle gerçekleştirilmiştir. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir. (■ : %3 mısır koçanı, ◆ : %3 mısır koçanı + %1.0 arabinoxun, ▲ : %3 mısır koçanı + %0.5 arabinoxun, fermentasyon ortamındaki arabinoxun; ○ : %1.0, ve △ : %0.5).

Arabinoxun *B. pumilus* SB-M13 AF üretime etkisi Şekil 12 de gösterilmektedir. Şekle göre, fermentasyon periyodunun 2-3. gününde AF çok az seviyede üretilmiştir. %0.5 arabinoxun içeren fermentasyon ortamında, bakteri ortamdaki bütün arabinoxunu ilk 2-3 gün içerisinde tüketmiş ve buna bağlı olarak AF üretiminde keskin bir artış gerçekleşmiştir.

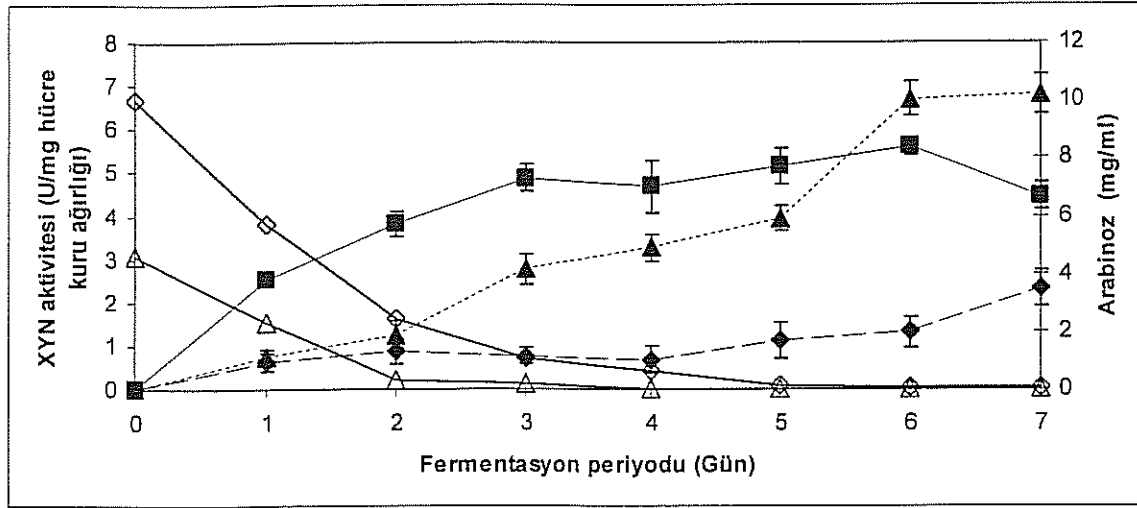
Fermentasyonun 3. gününde AF üretim seviyesi hem %0.5 arabinoxun içeren hem de arabinoxun içermeyen kontrol fermentasyon ortamında aynı seviyededir. Fermentasyonun 3. gününden sonra, %0.5 arabinoxun içeren fermentasyon ortamında AF sentezi, arabinoxun içermeyen ortama göre dikkate değer seviyede daha fazladır. Fakat, fermentasyon boyunca, %0.1 arabinoxun içeren fermentasyon ortamında AF üretimi, arabinoxun içermeyen ve %0.5 arabinoxun içeren ortama göre oldukça düşüktür.



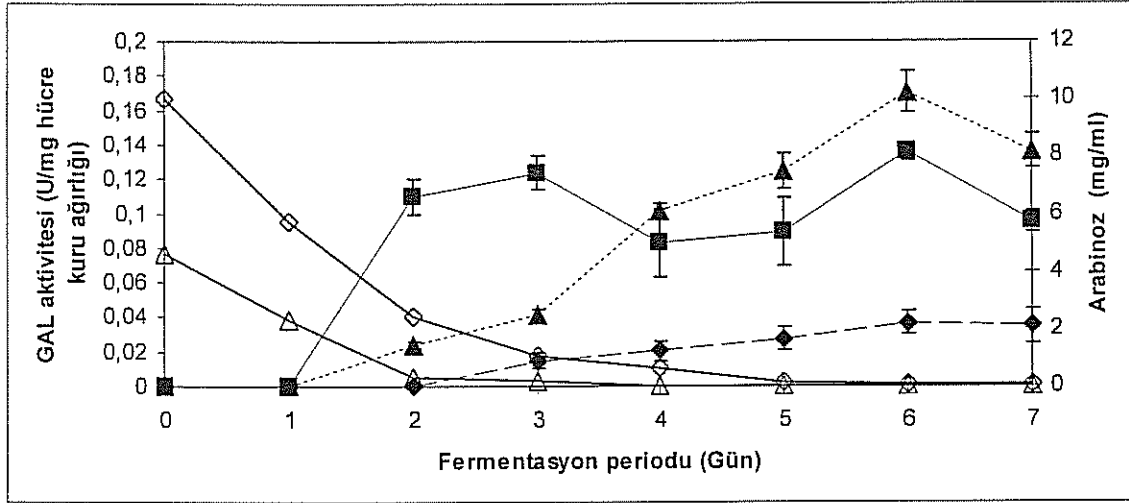
Şekil 12. L-arabinozun *B. pumilus* SB-M13 AF üretimine etkisi. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir. (■ : %3 mısır koçanı, ◆ : %3 mısır koçanı + %1.0 arabinoz, ▲ : %3 mısır koçanı + %0.5 arabinoz, fermentasyon ortamındaki arabinoz; ◇ : %1.0, ve Δ : %0.5). AF aktivitesi 40°C, pH 7.0'de standart aktivite ölçüm metodu kullanarak ölçülmüştür.

Şekil 13, arabinozun *B. pumilus* SB-M13 XYN üretim seviyesine etkisini göstermektedir. Fermentasyonun başlangıcında arabinoz içermeyen kontrol ortamı ile karşılaştırıldığında, %0.5 ve 1.0% arabinoz içeren fermentasyon ortamında oldukça az miktarda XYN üretilmiştir. Mikrobiyal tüketim sonucu arabinoz miktarı azaldıkça, XYN üretimi artmıştır. Fermentasyon periyodu boyunca, % 1.0 arabinoz içeren fermentasyon ortamında XYN üretimi, arabinoz içermeyen ortama göre azdır. Fakat, fermentasyonunun 6. gününde, içerisinde % 0.5 arabinoz bulunduran fermentasyon ortamında XYN üretimi ise, arabinoz içermeyen kontrol ortama göre daha fazladır.

Arabinozun, *B. pumilus* SB-M13 GAL üretimini baskılama etkisi, AF ve XYN'ye benzemektedir (Şekil 14). Arabinoz tüketimi ile arabinoz konsantrasyonu azalırken arabinozun GAL üretimini baskılama etkisi azalmıştır. Ayrıca, en yüksek GAL üretimi fermentasyonun 4., 5., 6. ve 7. günlerinde içerisinde % 0.5 arabinoz bulunduran fermentasyon ortamında gerçekleşmiştir.



Şekil 13. L-arabinozun *B. pumilus* SB-M13 XYN üretimine etkisi. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir. (■: %3 mısır koçanı, ◆: %3 mısır koçanı + %1.0 arabinoz, ▲: %3 mısır koçanı + %0.5 arabinoz, fermentasyon ortamındaki arabinoz; ○: %1.0, ve △: %0.5). XYN aktivitesi 40°C, pH 7.0'de standart aktivite ölçüm metodu kullanarak ölçülmüştür



Şekil 14. L-arabinozun *B. pumilus* SB-M13 GAL üretimine etkisi. Deney dört kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir. (■ : %3 mısır koçanı, ◆ : %3 mısır koçanı + %1.0 arabinoz, ▲ : %3 mısır koçanı + %0.5 arabinoz, fermentasyon ortamındaki arabinoz; ◇ : %1.0, ve Δ : %0.5). GAL aktivitesi 40°C, pH 7.0'de standart aktivite ölçüm metodu kullanılarak ölçülmüştür.

Sonuçlar *B. pumilus* SB-M13 ksilanolitik enzimleri üretiminin karbon katabolit baskılama kontrolünde olduğunu göstermiştir. Örneğin, fermentasyon periyodunun ilk günlerinde, ortamdaki yüksek miktarda arabinozun bulunmasından dolayı ksilanolitik enzimlerin üretimi baskılanmıştır. Bu baskının etkisi arabinozun tercihen ilk olarak tüketilmesi ve ortamdaki arabinoz konsantrasyonunun azalmasıyla gittikçe azalmıştır ve ksilanolitik enzimlerin üretimi artmıştır.

Baskılamanın süresi ve etki derecesi, arabinozun başlangıç konsantrasyonuna bağlıdır. Buna göre, % 1.0'lik arabinozun ksilanolitik enzimleri baskılama etkisi, %0.5'lik arabinoz göre daha fazladır. Fermentasyonun 7. günü göz önüne alındığında, %0.5'lik fermentasyon

ortamında arabinozun tamamen tüketildiği ve arabinoz içermeyen ortama göre AF, XYN, ve GAL aktiviteleri sırasıyla 2.2, 1.5, ve 1.4 kat arttığı gözlenmiştir. Fakat, 1% arabinoz içeren fermentasyon ortamında AF, XYN, ve GAL üretimi, arabinoz içermeyen kontrol ortamına göre %54, %52, ve %37 azalmıştır. İçerisinde %1.0 arabinoz bulunduran ortama ait enzim üretim profili, fermentasyon periyodunun 7 günden daha uzun tutulduğu takdirde, enzim üretim miktarlarının günden güne artabileceğini göstermektedir.

Degrassie ve arkadaşları (2003) çeşitli karbon kaynaklarının *B. pumilus* PS213 AF üretimine etkisini araştırmıştır. Çalışmalarında *B. pumilus* PS213 AF üretiminin indüklenme mekanizmasının diğer AF'lerden farklı olduğu ve enzim üretiminin %1'lik L-arabitol, L-sorboz, L-arabinoz, ya da yulaf tanesi ksilanı ile indüklenmediğini belirtmişlerdir. Fakat, bizim çalışmamızda L-arabinozun *B.pumilus* SB-M13 AF üretimini indüklediği (Şekil 12) açıkça görülmüştür. Gerçekten de, %0.5 L-arabinoz AF aktivitesini 2.2 kat arttırmıştır. Ayrıca, L-arabinoz, *Aureobasidium pullulans* (Saha ve Bothast, 1998), *B. stearothermophilus* (Gilead ve Shoham, 1995), ve *Rhodothermus marinus* de(Gomes ve ark, 2000) AF üretimini indüklemektedir.

3.3 *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu

3.3.1 Ksilanaz enziminin saflaştırması

3.3.1.1 Hidrofobik etkileşim kromatografisi

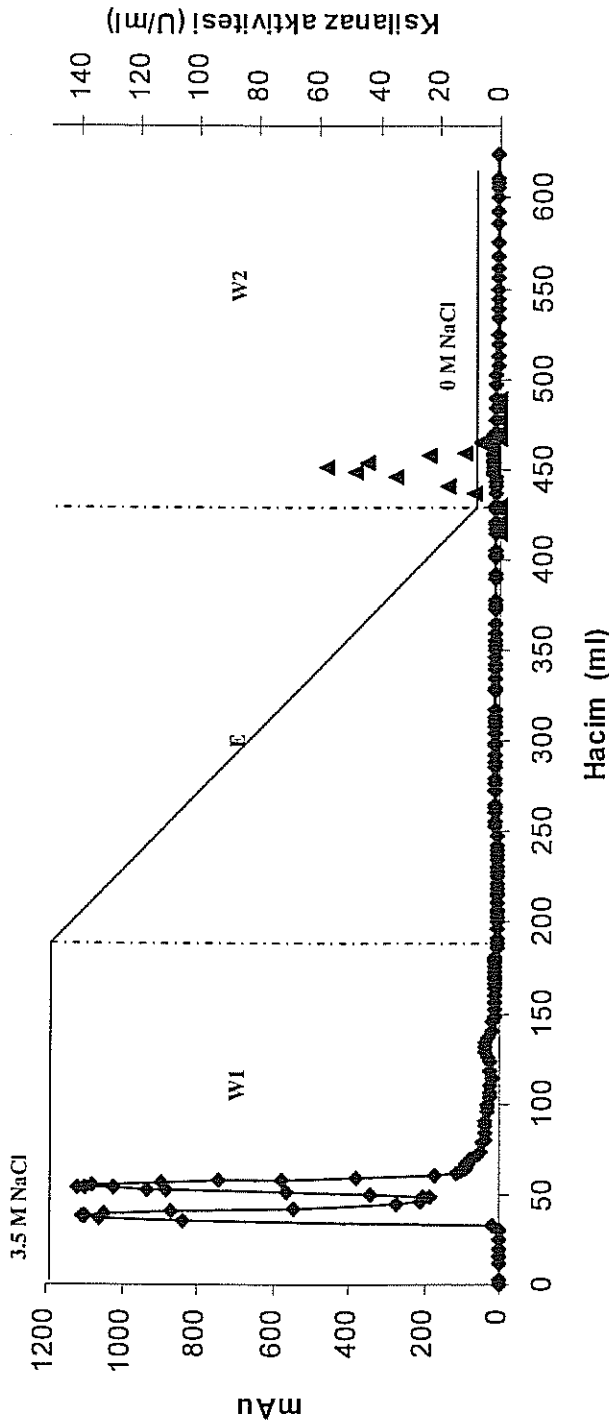
Çalışmamızda, ksilanaz enzimini en saf formda elde edebilmek amaçlı, hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılmış, farklı ligand tipleri, tuz çeşidi ((NH₄)₂SO₄, NaCl), konsantrasyonu ve farklı pH değerine sahip solvent sistemi deneysel parametre olarak denenmiştir.

3.3.1.1.1 Hidrofobik etkileşim mini-test kolonlarının testi

Küçük ölçekte ksilanaz saflaştırması işlemine en uygun kolon tipini bulmak amaçlı butil, oktil hızlı akış, düşük ve yüksek ligand konsantrasyonuna sahip fenil ve fenil sefaroz yüksek performans kolonları test edilmiştir. Saflaştırma şartları ve her kolon tipinin ksilanaz saflaştırma verimliliği Tablo 7' de gösterilmiştir. Sonuçlar değerlendirilirken ksilanazın kolona bağlanıp bağlanmadığı, bağlanan ve bağlanmadan elue olan ksilanazın aktif olup olmadığı göz önünde bulundurulmuştur. Bu sonuçlara göre fenil sefaroz yüksek performans kolonunun ksilanazın bağlanabildiği tek kolon olduğu ve kolona bağlanarak elue edilmiş ksilanaz fraksiyonlarında, maksimum %80 ksilanaz aktivitesinin geri kazanıldığı görülmüştür. Sonuç olarak, fenil sefaroz yüksek performans kolonunun küçük ölçek ksilanaz saflaştırmada en iyi kolon tipi olduğuna karar verilmiştir. Bu olumlu sonuç ardından aynı ligand tipini taşıyan 20 ml hacminde, fenil sefaroz yüksek performans kolonu ile çalışmalara devam edilmiştir.

3.3.1.1.2 Ksilanazın fenil sefaroz yüksek performans kolonu ile saflaştırılması

Küçük ölçek saflaştırma deneylerinde ksilanazın, sadece fenil sefaroz yüksek performans kolonuna bağlandığının gözlenmesinin ardından, sonraki saflaştırma çalışmalarında aynı kolon tipinin büyük hacmi kullanılmıştır. Sabit tutulan 3.5 M NaCl konsantrasyonunda, pH 6.0-7.5 aralığı denenerak, bu şartların ksilanaz saflaştırılmasındaki etkisi belirlenmiştir (Tablo 8). Kromatogramı Şekil 15'de verilen saflaştırma, 3.5 M NaCl konsantrasyonu ve pH 6.3 şartlarında yapılmış ve ksilanaz 186 kat saflaştırılmıştır. Ksilanaz kolona güçlü bağlanmış olduğundan, elusyonu yaklaşık 0M NaCl konsantrasyonunda gerçekleşmiştir. Bu da ksilanazın saf elde edilmesini sağlamıştır.



Şekil 15. *Bacillus pumilus* SB-M13 ksilanazının fenil sefarez yüksek performans kolonu (20 ml, 1.6 cm x 10 cm) ile saflaştırma kromatogramı ve ksilanaz aktivite profili. Safılaştırma 0.35 MPa basınç, 3 ml/dakika akış hızında, 3.5 M NaCl tuz konsantrasyonunda pH 6.3’de gerçekleştirilmiştir. W1: örnek uygulaması ve 3.5 M NaCl tamponunda ilk yıkama, E: 3.5 M-0 M NaCl gradyanında elusyon, W2: 0 M NaCl tuz konsantrasyonunda ikinci yıkama. (■ : protein konsantrasyonu, ▲ : ksilanaz aktivitesi). Fraksiyon hacmi: 3 ml.

Tablo 7. Farklı hidrofobik etkileşim kolonlarının (1 ml) küçük skalada ksilanaz saflaştırma performansı.

Kolon tipi	Tuz konsantrasyonu (M)	pH	Ksilanaz bağlanması	% Geri aktivite kazanımı
Butil sefaroz hızlı akış	1.0*	7.0	(-)	0
	1.5*	7.0	(-)	0
	1.5*	7.0	(-)	0
Oktil sefaroz hızlı akış	1.0**	7.0	(-)	70.0
	4.0**	7.0	(-)	67.0
	3.0**	6.0	(-)	0
Fenil sefaroz hızlı akış yüksek ligand konsantrasyonu	3.0**	8.5	(-)	0
	4.0**	7.0	(-)	0
Fenil sefaroz sefaroz hızlı akış düşük ligand konsantrasyonu	3.0**	8.5	(-)	24.0
	3.0**	6.0	(-)	67.0
Fenil sefaroz yüksek performans	3.0**	7.0	(-/+)	60.0
	3.0**	7.0	(-)	50.0
	3.5**	6.0	(+)	80.0

* Amonyum sülfat, ** NaCl.

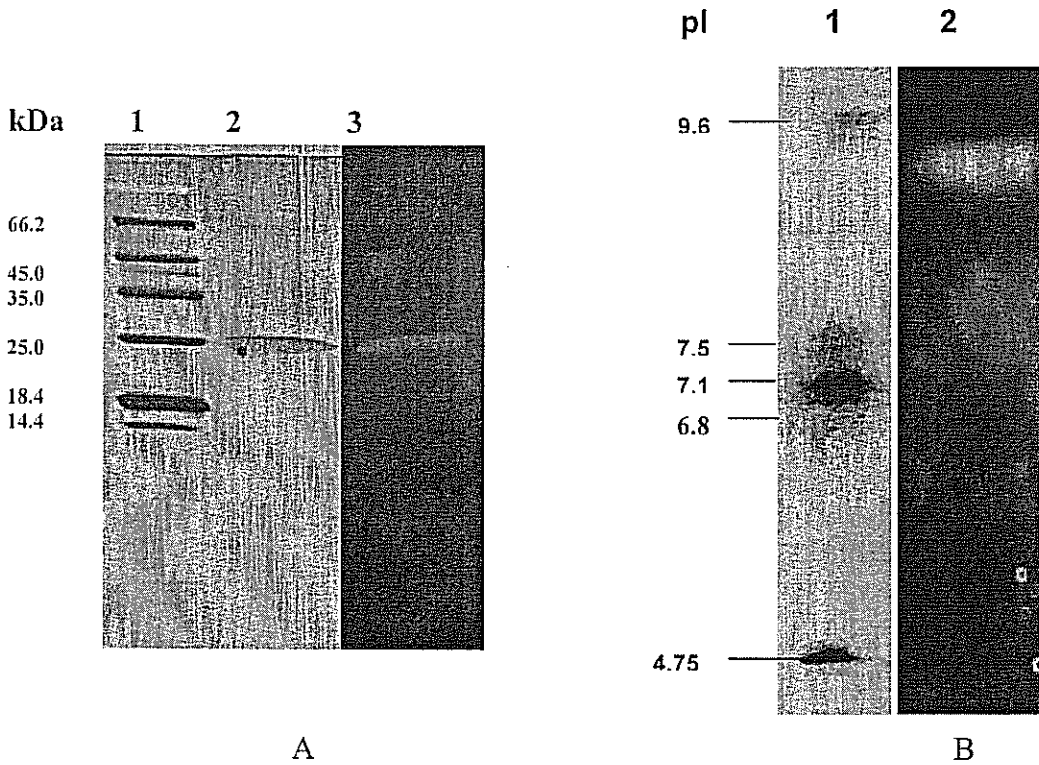
Tablo 8. Farklı deneysel şartlarında 20 ml'lik fenil sefaroz kolon kromatografi ksilanaz saflaştırma performansı

NaCl konsantrasyonu (M)	pH	% Aktivite kazanımı	Saflaştırma katı
3.5	6.0	30	150
3.5	6.3	31	186
3.5	6.5	56	110
3.5	7.0	19	112
3.5	7.5	20	42

3.3.2 Analitik jel elektroforezi ve izoelektrik noktalama

Hidrofobik etkileşim kromatografisi (fenil sefroz yüksek performans kolonu) ile saflaştırılan ksilanaz örnekleri kullanılarak elektroforez ve izoelektrik noktalama çalışmaları yapılmıştır.

Buna bağlı olarak, *B. pumilus* SB-M13 ksilanazının moleküler ağırlığı ve pI noktası sırasıyla 24.8 kDa ve 9.2 olarak belirlenmiştir (Şekil 16). Sonuçlar aktivite jeli ve zimogram analizi ile desteklenmiştir. Jel üzerinde tek bir protein bantının olması ve bu bantın ksilanaz aktivitesi göstermesi, tek basamak hidrofobik etkileşim kolonu ile saf ksilanaz elde edildiğini göstermiştir.

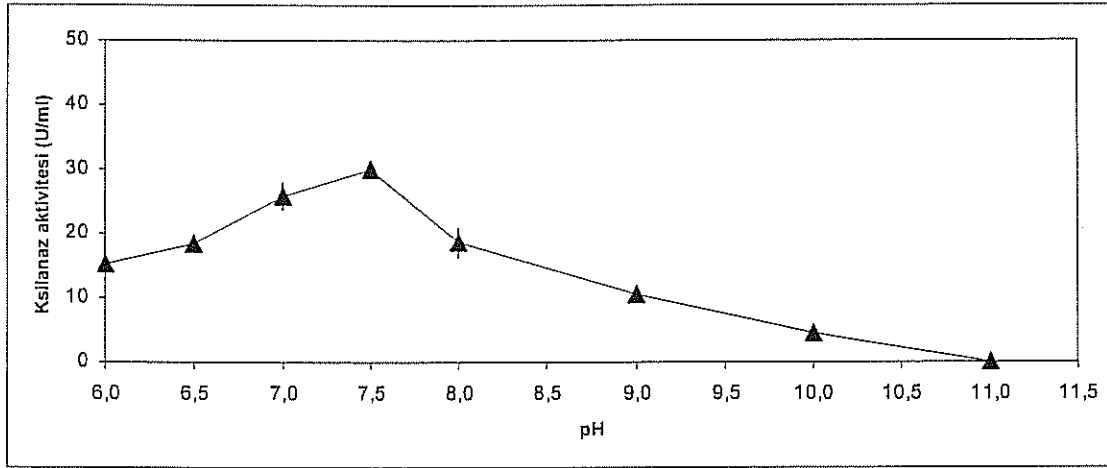


Şekil 16. Tek basamak fenil sefroz kolonu ile saflaştırma ardından 20 kat konsantre edilmiş ksilanaz enziminin; A- SDS-PAGE ve aktivite zimogramı. Kuyular: 1- moleküler ağırlık standartları, 2- saf ksilanaz. Protein bantları gümüş boyama ile boyanmıştır. 3- saf ksilanazın aktivite zimogramı. B- IEF ve aktivite zimogramı. Kuyular:1- görülebilir IEF standartları, 2- saf ksilanazın aktivite zimogramı.

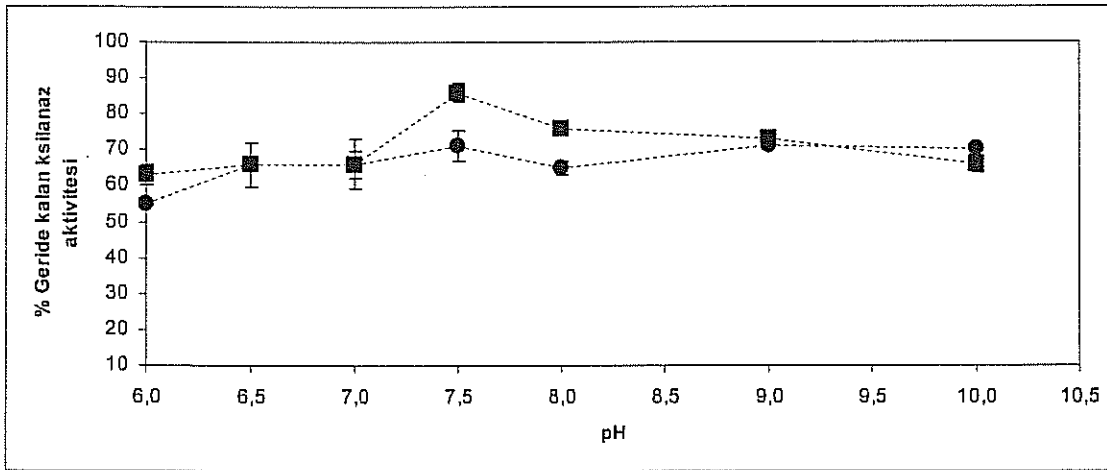
3.3.3 pH ve sıcaklığın ksilanaz aktivitesine etkisi

Ksilanazın pH bağımlılığı pH 6.0-11.0 aralığında 50 mM konsantrasyonunda tamponlar kullanılarak 40 °C' de belirlenmiştir (Şekil 17) . Aktivite-pH eğrisine bakıldığında, enzimin en çok pH 7.5'ta aktif olduğu, fakat pH 8.0'de nispi aktivitesinin % 62 sini koruduğu gözlenmiştir. Ayrıca enzimin pH 11.0 de aktivitesinin tamamını kaybettiği bulunmuştur.

Bunlara ek olarak sıcaklığın ksilanaz aktivitesine etkisi de 40-70 °C arasında 50 mM pH 7.0 fosfat tamponu içinde incelenmiştir (Şekil 18). En yüksek ksilanaz aktivitesi 60 °C gözlenmiştir. 65 ve 70 °C' de elde edilen nispi ksilanaz aktiviteleri sırasıyla % 64 ve % 20 bulunmuştur.

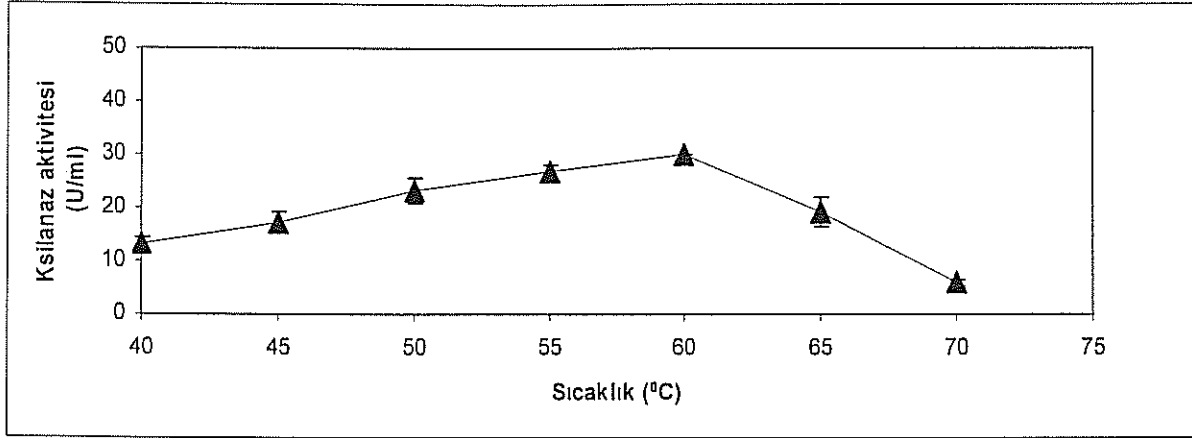


A)

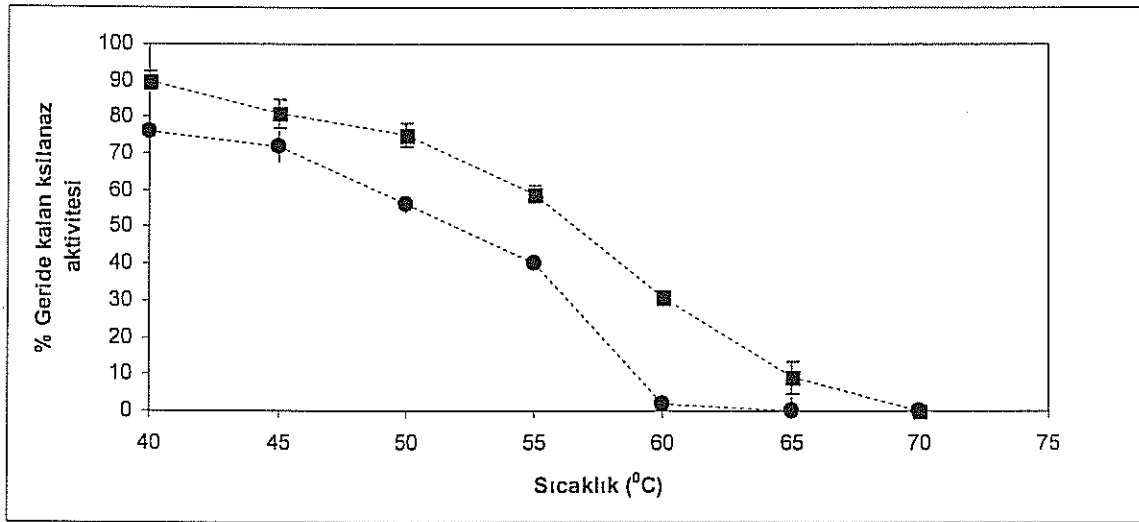


B)

Şekil 17. pH'ın *B. pumilus* SB-M13 saf ksılanazının A) aktivite ve B) dayanıklılığına etkisi. (▲: ksılanaz aktivitesi, ■:100 dakika inkübasyon sonra geriye kalan % ksılanaz aktivitesi, ●: 19 saat inkübasyon sonra geriye kalan % ksılanaz aktivitesi). Ksılanaz aktivitesi 40 °C'de ölçülmüştür. pH dayanıklılık deneylerinde, enzim numuneleri değişik pH değerlerinde belirtilen sürelerce tutulduktan sonra, pH değerleri 7.0'e döndürülerek kalan aktivitesi belirlenmiş ve ilk aktiviteye bölünerek kalan % ksılanaz aktivitesi bulunmuştur. Deneyler altı kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir.



A)



B)

Şekil 18. Sıcaklığın *B. pumilus* SB-M13 saf ksilanazının A) aktivite ve B) dayanıklılığına etkisi. (▲ :ksilanaz aktivitesi, ■ : 15 dakika inkübasyon sonra geriye kalan % ksilanaz aktivitesi, ve, ● : 45 dakika inkübasyon sonra geriye kalan % ksilanaz aktivitesi). Ksilanaz aktivitesi pH 7.0'de ölçülmüştür. Isıl dayanıklılık deneylerinde, enzim numuneleri değişik pH değerlerinde belirtilen sürelerde tutulduktan sonra, kalan aktiviteleri 40 °C'de belirlenmiş ve yine 40 °C'de ölçülen ilk aktiviteye bölünerek kalan % ksilanaz aktivitesi bulunmuştur. Deneyler altı kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir.

3.3.4 pH ve sıcaklığın ksilanaz dayanıklılığına etkisi

Ksilanaz örnekleri belirli pH ve sıcaklık aralığında inkübe edildikten sonra, geride kalan ksilanaz aktivitesi ölçülerek enzimin pH (Şekil 17) ve sıcaklık dayanıklılığı (Şekil 18) belirlenmiştir.

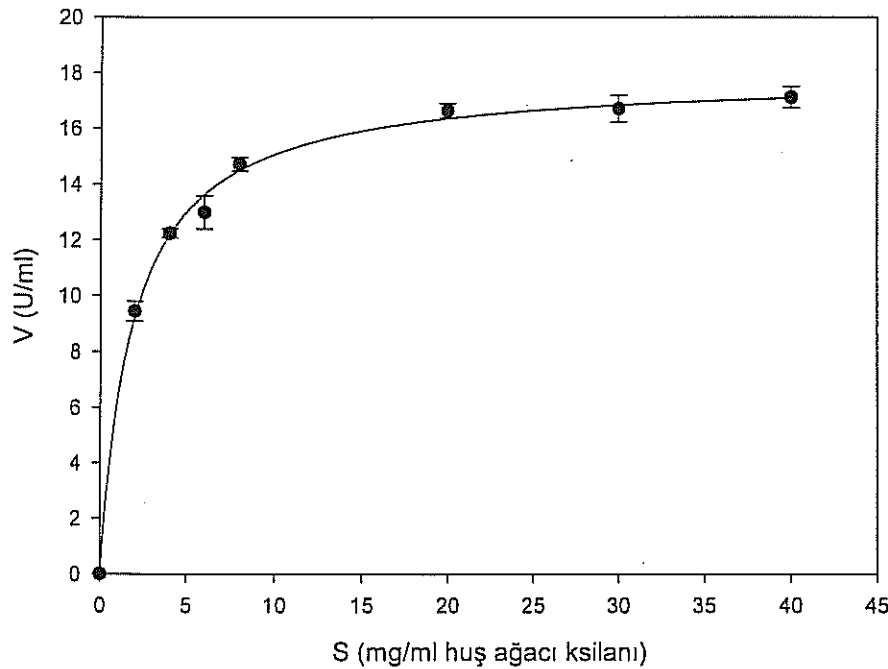
Enzimin pH 6.0-10.0 aralığında dayanıklı olduğu ve en dayanıklı olduğu pH değerinin 7.5 olduğu bulunmuştur. Enzim pH 7.5 tamponunda 100 dakika ve 19 saat inkübe edildiğinde orijinal aktivitesinin sırasıyla %86 ve 71'ini koruduğu gözlenmiştir. Enzim 19 saat inkübasyon sonrasında bazik pH değerinde asidik pH değerlerine göre daha dayanıklıdır. pH 6.0 tamponunda ksilanaz aktivite kaybı % 45 iken pH 9.0 ve 10.0' da aktivite kaybı sırasıyla % 29 ve 30 olarak bulunmuştur.

Ksilanaz enziminin ısı dayanıklılığı, 40-70 °C'de 15 ve 45 dakika inkübasyon sonrasında belirlenmiştir. 15 dakikalık inkübasyon ile karşılaştırıldığında, 45 dakikalık inkübasyon ksilanaz aktivitesinde daha dramatik bir kayba sebep olmuştur. Ksilanaz örnekleri 40 °C'de 15 dakika inkübe edildiğinde enzim orijinal aktivitesinin %90'ını korumuş, fakat bu değer 45 dakika inkübasyon sonrasında % 76'ya düşmüştür. Enzim örneklerinin daha yüksek sıcaklıklarda 45 dakikalık inkübasyonu, enzim aktivite kaybını hızlandırmıştır. Buna bağlı olarak 50, 55, ve 60 °C' de inkübasyon sonrasında enzim sırasıyla orijinal aktivitesinin %56, 40 ve 2'lik kısmını koruyabilmiştir. Enzim aktivitesinin tamamını ise 15 dakika inkübasyon sonrasında 70 °C'de, 45 dakika inkübasyon sonrasında ise 65 °C'de kaybetmiştir.

3.3.5 Kinetik çalışmalar

Enzimin başlangıç tepkime hızı 40 °C'de 50 mM pH 7.0 fosfat tamponunda 2-40 mg/ml huş ağacı ksilan substrat konsantrasyonu aralığında ölçülmüştür. Enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uyduğu belirlenmiş (Şekil 19) ve enzime ait K_m , V_{max} ve k_{cat} kinetik parametreleri

de sırasıyla 1.87 mg/ml, 17.9 U/ml ve $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Literatürde farklı *Bacillus* suşlarının ksilanaz enzimlerine ait K_m , V_{max} ve k_{cat} değerleri sırasıyla 0.6-71.4 mg/ml ve 11.0-1,667 U/ml ve 0.017-700 U/mg aralığında verilmektedir. Enzim aktivite ölçüm şartları, kullanılan substrat tipi ve konsantrasyonundaki farklılık sağlıklı bir karşılaştırma yapmaya engel olmaktadır. Ancak, *B. pumilus* SB-M13 suşu ksilanaz enziminin nispeten yüksek k_{cat} değeri, enzimin katalitik gücünün yüksek olduğuna işaret etmektedir. Buna ek olarak, enzimin nispeten küçük K_m değeri de enzimin yüksek substrat afinitesine sahip olduğunu belirtmektedir.



Şekil 19. *B. pumilus* SB-M13 saf ksilanazının Michaelis-Menten grafiği. Deney beş kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalamaları verilmiştir.

Bacillus suşları birden fazla ksilanaz üretmektedir. Literatürde verilen *Bacillus* ksilanazlarının pH ve sıcaklık optimumları pH 5.0-9.0 ve 40-60 °C aralığında verilmektedir. Enzimin molekül ağırlığı ve pI noktası da 22-78.9 kDa ve 8.8-9.9 aralığında değişmektedir. *B. pumilus* SB-M13 ksilanazının 24.8 kDa molekül ağırlık ve 9.2 pI değerine sahip olması, enzim aktivitesinin pH 7.5 ve 60 °C' de maksimum olması, enzimin diğer *Bacillus* suşu ksilanaz enzimlerine fizikokimyasal açıdan benzediğini göstermektedir.

Literatürde rapor edilen diğer ksilanaz enzimleriyle karşılaştırıldığında, *B. pumilus* SB-M13 ksilanazının orta derecede ısı ve alkalin ksilanazlara göre de daha yüksek alkalin pH dayanıklılığına sahip olduğu bulunmuştur (Duarte, 2000). Diğer *Bacillus* suşu alkalin ksilanazları pH 8.0-10.0 aralığında 2 saat bekletildiğinde enzim orijinal aktivitesinin %30-65'unu korurken, *B. pumilus* SB-M13 ksilanazı aynı pH aralığında 19 saat bekletme sonrasında orijinal aktivitesinin % 65-70'ini koruduğu saptanmıştır.

B. pumilus suşları ksilanaz enzimlerinin ısı dayanıklılığı karşılaştırıldığında, *B. pumilus* IPO (Okada ve ark., 1988) ksilanaz enzimi 60 °C'de 15 dakika bekletildiğinde enzim aktivitesini tamamen kaybederken, *B. pumilus* SB-M13 ksilanazının aynı şartlarda ilk aktivitesinin %31'ini koruduğu gözlenmiştir. 60 °C'de 120 dakikalık inkübasyon sonrasında *B. pumilus* PRL B12 saf ksilanazı (de Buyl ve ark., 1998), buna ilaveten, *B. pumilus* 5₁₄ (Duarte ve ark., 2000) kaba fermentasyon özütünde, enzimlerin sırasıyla ilk aktivitelerinin %40 ve %30'unu koruduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, *B. pumilus* SB-M13 ksilanazının ısı dayanıklılığı *B. pumilus* IPO ksilanazına göre daha fazlayken, enzim, *B. pumilus* PRL B12 ve 5₁₄ ksilanazlarıyla karşılaştırıldığında daha dayanıksızdır. Ancak, ksilanaz örneklerindeki olası protein konsantrasyon farklılığı ve bunun enzim dayanıklılığına olan etkisi düşünüldüğünde, enzimlerinin çok sağlıklı bir şekilde karşılaştırılmayacağı akıldan çıkarılmamalıdır.

Tablo 9. *Bacillus pumilus* ksilanları fizikokimyasal özellikleri.

<i>B. pumilus</i> suşları	MW; SDS-PAGE (kDa)	pI	Optimum pH	Optimum sıcaklık (°C)	K _m (mg/ml)	V _m (U/ml)	k _{cat} (s ⁻¹)	Substrat (A/H)
<i>B. pumilus</i> IPO Panbangred ve ark. (1983), Okada ve ark. (1988)	20*-24	Belirsiz	6.5	40	-	-	-	Karaçam ksilani (1%)
<i>B. pumilus</i> DSM 6124 Anker ve ark. (1993)	22	8.8	6.0	40-60	-	-	-	Huş ağacı ksilani (0.5%)
<i>B. pumilus</i> PRL B12 De Buyl ve ark. (1998)	26	9.8-9.9	5.0-7.0	55	-	-	-	Huş ağacı ksilani (0.5%)
<i>B. pumilus</i> Toprak izolatları Duarte ve ark. (1999-2000)	78.9, 63.8, 24.5, 15.5	Belirsiz	8.0-9.0	55-60	1.1-71.4	11-1667	-	Huş ağacı ksilani (0.5%)
<i>B. pumilus</i> SB-M13 Bu çalışma	24.8	9.2	7.5	60	1.8	17.9	1.7x10 ⁴	Huş ağacı ksilani (0.5%)

*MW denge santrifüjü ile belirlenmiştir

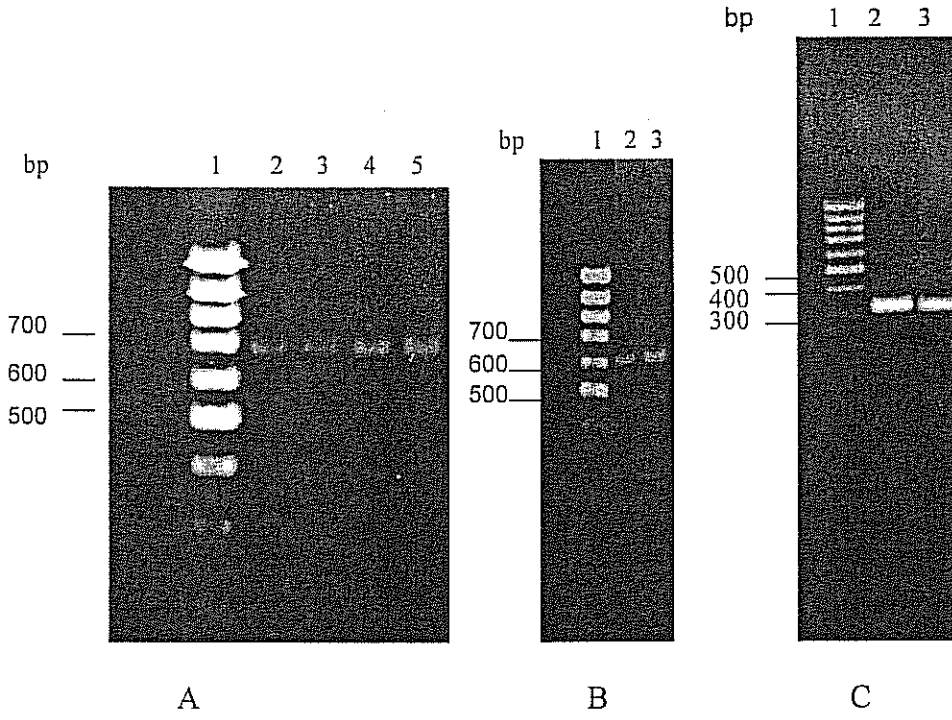
3.4 *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni izolasyonu

B. pumilus SB-M13 ksilanaz geni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltıldıktan sonra genin dizin analizi yapılmıştır. Çalışmada ksilanaz geni izolasyonunda kullanılan primer setleri, literatürde ve gen bankasında bulunan diğer *B. pumilus* suşlarına ait ksilanaz gen

sekansları (AF220528, AF490981) baz alınarak dizayn edilmiştir. Ayrıca, primerlere restriksiyon enzim kesim bölgelerinin koyulması, ilerde yapılması olası çalışmalarda genin farklı vektörlere takılmasını da mümkün kılmıştır.

Çalışmada, *B. pumilus* SB-M13 kromozomal DNAsı template, ileri1/geri 2 primer seti primer olarak kullanıldığında yaklaşık 700 bp büyüklüğünde sinyal peptid bölgesini içeren, ileri 5/geri 2 primer seti kullanıldığında ise yaklaşık 600 bp büyüklüğünde sinyal peptidi içermeyen ksilanaz geni çoğaltılmıştır (Şekil 20). Elde edilen 700 bp ve 600 bp'lik PCR ürünleri, template olarak kullanılıp, ksilanaz geninin iç kısmından dizayn edilen primer setleri ile "nested PCR" yapılmış ve yaklaşık 300 bp'lik ürün elde edilmiştir (Şekil 20). Ayrıca, literatürde *B. pumilus* suşlarına ait ksilanaz genlerinin büyüklüğü 684 bp (sinyal peptidi içeren) ve 603 bp (sinyal peptid içermeyen) civarında belirtilmiştir (AF220528, AY887130, AF490981 ve AY526092).

Ürünler tanımlanması için dizin analizi yapılmıştır. Buna göre, ileri 5/geri 2 primer seti kullanılarak izole edilen (sinyal peptidi içermeyen) *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni ve nested PCR sonucu elde edilen ksilanaz gen parçası jelden saflaştırılarak gen dizin analizine gönderilmiştir. İleri 5/geri 2 primerlerin yüksek erime sıcaklığına sahip olması ve sekanslama için gerekli sıcaklıkta ikincil yapı oluşturmasından dolayı sekanslama çalışmasında kullanılmamıştır. Böylece, sekanslama çalışmaları sekanslama çalışmasına uygun olan iç ileri/iç geri primer seti kullanılarak yapılmış ve 603 bp'lik ksilanaz genin 560 bp'lik kısmı ve 314 bp'lik nested PCR ürününe ait gen dizilimi belirlenmiştir (Şekil 21). Dizin analizi sonucunda (Şekil 21) çoğaltılmış genin ksilanaz geni olduğu kesinleşmiştir.



Şekil 20. *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni agaroz jel (% 1) resimleri. A- Sinyal peptidi içeren ksilanaz geni. Kuyular: 1- Moleküler ağırlık standartları (100 bp (100-1000 bp aralığı), Fermentas), 2,3,4,5- Genomik DNA, ileri1/geri2 primer seti kullanılarak yapılan PCR ile çoğaltılan ksilanaz geni. B- Sinyal peptidi içermeyen ksilanaz geni. Kuyular: 1- Moleküler ağırlık standartları (100 bp (100-1000 bp aralığı), Fermentas), 2,3- Genomik DNA, ileri5/geri2 primer seti kullanılarak yapılan PCR ile çoğaltılan ksilanaz geni. C- Nested PCR sonucu. Kuyular: 1- Moleküler ağırlık standartları (100 bp (100-1000 bp aralığı), Fermentas), 2- Signal peptidi içeren ksilanaz geni ve iç ileri/iç geri primer seti kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen ksilanaz gen parçası, 3- Signal peptidi içermeyen ksilanaz geni ve iç ileri/iç geri primer seti kullanılarak yapılan PCR sonucu elde edilen ksilanaz gen parçası.

Gen dizimleri karşılaştırıldığında (BLAST), *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni (600bp) diğer *Bacillus pumilus* suşlarına ait ksilanaz genleri ile % 89-94 aralığında benzerlik göstermektedir (Tablo 10). Şekil 22 ise *B. pumilus* SB-M13 ksilanazının 560 bp'lik kısmına ve bu gene %

94 oranında benzerlik gösteren diğer bir *B. pumilus* suşu ksilanaz genine (AF220428) ait sekansların karşılaştırmasını göstermektedir. Gen dizini analizi karşılaştırmasına ek olarak, EMBOSS translasyon programı kullanılarak *B. pumilus* SB-M 13 ksilanazına ait amino asit dizilimi belirlenmesi sonrasında (Şekil 23-A), yine bu iki *B. pumilus* suşlarına ait ksilanaz amino asit dizilimi karşılaştırılmıştır (AF220428) (Şekil 23-B). Şekil 23’de görüldüğü gibi iki amino asit dizilimi arasında , korunmayan bölgelerde 4 amino asit farklılığı bulunmaktadır ve bu farklılıklar şekilde koyu renk ve altı çizili harflerle belirtilmiştir. Fakat, amino asit dizininde sondan ikinci sıradaki amino asit farklılığı (R’nin Q’ya dönüşümü), primer dizayn edilirken primerin erime sıcaklığını ayarlamak ve ikincil yapı oluşturmasını engellemek amaçlı primerde yapılan baz değişikliğinden kaynaklanmaktadır.

GGAAACGATTTATGATAATAGGATAGGGACACACAGCGGATACGATTTTGAATTATGGA
 AGGATTACGGAAATACCTCAATGACACTCAATAATGGCGGAGCATTTAGCGCACAATGG
 AACAATATTGGAAATGCTTTGTTTCGAAAAGGGAAGAAGTTTGATTCCACTAAACTCAT
 CATCAACTTGGAAACATCTCCATCAATTACAACGCAGCCTTTAACCCAGGCGGGAATTCC
 TACTTATGTGTCTATGGCTGGACACAATCTCCATTAGCTGAATACTACATTGTTGAGTCAT

İç ileri primer

GGGGCACATATCGCCCAACAGGAACGTATAAAGGATCATTTTATGCCGATGGAGGCACA
TATGACATTTATGAAACGCTACGTGTCAACCAGCCTTCTATTATTGGGGACGCTACCTTTA
AGCAATATTGGAGTGTACGTCAAACAAAACGTACGAGCGGAACTGTATCCGTCAGTGAG
CATTCAGAAAATGGGAAAGCCTAGGTATGCCAATGGGGAAAATGTATGAAACAGCATT
AACTGTAGAAGGCTACCAAAGCA

İç geri primer

Şekil 21. Signal peptid içermeyen *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz gen diziliminin 560 bp’lik kısmı. Altı çizili dizin, nested PCR sonucu elde edilen ksilanaz gen parçasına ait dizilimi göstermektedir.

ATGAATTTGA AAAGATTGAG GCTGTTGTTT GTGATGTGTA TTGGATTTGT
GCTGACACTGACGGCTGTGC CAGCTCATGC GGAAACGATTTATGATAATA
GGAAACGATTTATGATAATA

İleri 5 primer

GGATAGGGACACACAGCGGATACGATTTTGAATTATGGAAGGATTACGGA
GGATAGGGACACACAGCGGATACGATTTTGAATTATGGAAGGATTACGGA

AATACCTCGATGACACTCAATAACGGCGGGGCATTTAGTGCAAGCTGGAA
AATACCTCAATGACACTCAATAATGGCGGAGCATTAGCGCACAATGGAA

CAATATTGGAAATGCCTTATTTGAAAAGGAAAGAAGTTTGATTCCACTA
CAATATTGGAAATGCTTTGTTTCGAAAAGGAAAGAAGTTTGATTCCACTA

AAACTCATCATCAACTTGGCAACATCTCCATCAACTACAACGCAGCCTTT
AAACTCATCATCAACTTGGAAACATCTCCATCAATTACAACGCAGCCTTT

AACCCGGGCGGGAATTCCTATTTATGTGTCTATGGCTGGACACAATCTCC
AACCCAGGCGGGAATTCCTACTTATGTGTCTATGGCTGGACACAATCTCC

İç ileri primer

ATTAGCTGAATACTACATTGTTGAGTCATGGGGCACATATCGTCCAACAG
ATTAGCTGAATACTACATTGTTGAGTCATGGGGCACATATCGCCAACAG

GAACGTATAAAGGATCATTTTATGCCGATGGAGGCACATATGACATATAT
GAACGTATAAAGGATCATTTTATGCCGATGGAGGCACATATGACATTTAT

GAAACGCTCCGTGTCAATCAGCCTTCTATCATTGGGGACGCTACCTTCAA
GAAACGCTACGTGTCAACCAGCCTTCTATTATTGGGGACGCTACCTTTAA

ACAATATTGGAGTGTACGTCAAACAAAACGCACAAGCGGAACTGCTTCCG
GCAATATTGGAGTGTACGTCAAACAAAACGTACGAGCGGAACTGTATCCG

TCAGTGAGCATTTTAAAAAATGGGAAAGCTTAGGCATGCCAATGGGAAAA
TCAGTGAGCATTTTCAAATAATGGGAAAGCCTAGGTATGCCAATGGGAAAA

ATGTATGAAACAGCATTAACTGTAGAAGGCTACCGAAGCAACGGAA GTGC
ATGTATGAAACAGCATTAACTGTAGAAGGCTACCAAAGCA

İç geri primer

GAATGTCATGACGAATCAGC TGATGATTTCGATAA

Geri 2 primer

Şekil 22. *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz genin 560 bp'lik kısmı ve bu gene % 94 benzeyen *B. pumilus* suşu ksilanaz genine (AF220528) ait sekansların karşılaştırılması. Altı çizili olan sekans *B. pumilus* SB-M13, altı çizili olmayan sekans ise diğer *B. pumilus* suşuna ait ksilanaz genini göstermektedir. Koyu renk bazlar iki gen arasındaki farklılıkları gösterirken, italik ve koyu renkte verilen bazlar sinyal peptidi göstermektedir.

ETIYDNRIGTHSGYDFELWKDYGNTSMTLNNGGAFSAQWNNIGNALFRKGKKFDST
KTHHQLGNISINYNAAFNPPGGNSYLCVYGWTQSPLAEYYIVESWGTYRPTGTYKGSF
YADGGTYDIYETLRVNQPSIIGDATFKQYWSVRQTKRTSGTYSVSEHFRKWESLGMP
MGKMYETALTVEGY*QS

A

ETIYDNRIGTHSGYDFELWKDYGNTSMTLNNGGAFSASWNNIGNALFRKGKKFDST
KTHHQLGNISINYNAAFNPPGGNSYLCVYGWTQSPLAEYYIVESWGTYRPTGTYKGSF
YADGGTYDIYETLRVNQPSIIGDATFKQYWSVRQTKRTSGTASVSEHFKKWESLGMP
MGKMYETALTVEGY*RS

B

Şekil 23. *B. pumilus* ksilanazının kısmi amino asit dizilimi. A- *B. pumilus* SB-M13 ksilanazı (amino asit dizilimi EMBOSS translasyon programı ile elde edilmiştir), B- *B. pumilus* suşu ksilanazı (AF220528). * Amino asit farklılığı, primer dizayn edilirken primerin erime sıcaklığını ayarlamak ve ikincil yapı oluşturmasını engellemek amaçlı primerde yapılan baz değişikliğinden kaynaklanmaktadır.

Tablo 10. *Bacillus* suşlarının ksilanaz gen benzerliklerinin karşılaştırılması. (*B. pumilus* SB-M13 ksilanaz genin 560 bp'lik kısmı ile karşılaştırma yapılmıştır).

Sıralama	Ksilanaz geni Gen bankası numarası	Mikroorganizma ve gen adı	Araştırma kapsama bölge yüzdesi (%)	Maksimum benzerlik yüzdesi (%)
1	Bu çalışma	<i>B. pumilus</i> SB-M13 endo-beta ksilanaz geni	100	100
2	<u>AF220528.1</u>	<i>Bacillus sp.</i> HBP8 endo-beta ksilanaz geni	100	94
3	<u>AY954630.1</u>	<i>B. pumilus</i> endo-beta ksilanaz geni	100	93
4	<u>X00660.1</u>	<i>B. pumilus</i> endo-beta ksilanaz geni	93	90
5	<u>AY887130.1</u>	<i>B.pumilus</i> endo-beta ksilanaz geni	93	90
6	<u>AY526092.1</u>	<i>B. pumilus</i> endo-beta ksilanaz geni	93	90
7	<u>AF490981.1</u>	<i>B. pumilus</i> endo-beta ksilanaz geni	93	89
8	<u>AF326785.1</u>	<i>B.pumilus</i> PJ19 endo-beta ksilanaz geni	92	89

Sonuç olarak, çalışmada sinyal peptid içeren ve içermeyen *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni çoğaltılmıştır. Translasyon programı ile kısmi amino asit dizilimi belirlenen *B. pumilus* SB-M13 ksilanazı diğer suşlarla karşılaştırıldığında enzimin, diğer ksilanazlarla büyük oranda benzerlik taşıdığı görülmüştür.

Ayrıca, izole edilen *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni ilerde yapılması muhtemel çalışmalarda, ekspresyon vektörünün özelliğine bağlı olarak seçilip, farklı vektörlere takılıp konak hücrelere aktarılarak ekspres edilmesi, üretim miktarının artırılması gibi çalışmalar düşünülmektedir.

BÖLÜM 4

SONUÇ

Çalışmamızda, iyi bir ksilanaz üreticisi olan toprak izolatının *Bacillus pumilus* olduğu belirlenmiş ve *Bacillus pumilus* SB-M13 olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra bu izolatın ksilanolitik enzim sistemi incelenmiştir. Bu amaçla, mikroorganizma, mısır koçanı, buğday kabuğu ve pirinç kabuğu gibi değişik tarımsal atıklar üzerinde çoğaltılmış ve ksilanolitik enzim üretim profilleri belirlenmiştir. Ayrıca, L-arabinozun ksilanolitik enzim üretimine etkisi, içerisinde %3 mısır koçanı bulunduran fermentasyon ortamında araştırılmıştır.

Ksilanolitik enzimlerin tipinin, çeşitliliğinin ve üretim seviyesinin kullanılan tarımsal atığa ve eklenen arabinoz miktarına bağlı olarak değiştiği ve ksilanolitik enzimlerin sentezinin sinerjik ve karbon katabolit engellemesi altında olduğu gözlenmiştir.

Mısır koçanı, buğday kabuğu ve pirinç kabuğunun *B. pumilus* SB-M13 ksilanolitik enzimleri üretimini indüklenme becerisi karşılaştırıldığında, buğday kabuğunun en iyi karbon kaynağı olduğu ve bu karbon kaynağı ile maksimum seviyede AF (5U/ml), GAL (0.3U/ml), ve XYN (105U/ml) üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir.

B. pumilus SB-M13, %3 oranında mısır koçanı, buğday kabuğu ve pirinç kabuğu içeren fermentasyon ortamında farklı miktarlarda hücre dışı AF, XYN, ve GAL üretmektedir. Fakat hiçbir fermentasyon ortamında XYL ve GLU aktivitesine rastlanmamıştır. Hücre dışı XYL ve GLU aktivitelerinin olmaması, kaba enzim özütünün saflaştırma yapılmadan ksilooligosakkarit üretimi ve kağıt beyazlatma işlemlerinde kullanılabilirliğini mümkün

kılmaktadır. Ayrıca, *B. pumilus* SB-M13 ksilanolitik enzimleri üretiminin karbon katabolit baskılama kontrolünde olduğu görülmüştür. Fermentasyon periyodunun ilk günlerinde, ortamdaki yüksek miktarda arabinozun bulunmasından dolayı ksilanolitik enzimlerin üretimi baskılanmıştır. Fakat, bu baskının etkisi, mikroorganizmanın tercihen arabinozu ilk olarak tüketmesi ve ortamdaki arabinoz konsantrasyonunun azalmasıyla gittikçe düşmüş ve ksilanolitik enzimlerin üretimi de artmıştır. Fermentasyonların 7. günü göz önüne alındığında, başlangıçta %0.5'lik arabinoz içeren fermentasyon ortamında, arabinozun tamamen tüketildiği ve arabinoz içermeyen ortama göre AF, XYN, ve GAL aktivitelerinin sırasıyla 2.2, 1.5 ve 1.4 kat arttığı gözlenmiştir. Ancak, 1% arabinoz içeren fermentasyon ortamında AF, XYN, ve GAL üretimi, arabinoz içermeyen kontrol ortamına göre sırasıyla %54, %52, ve %37 azalmıştır.

Çalışmamızda ayrıca, *B. pumilus* SB-M13 ksilanazı tek basamak hidrofobik etkileşim kolonu ile saflaştırılmış ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Saf enzimin moleküler ağırlığı ve pI noktası sırasıyla 24.8 kDa ve 9.2 olarak belirlenmiştir. Enzim alkali pH'larda dayanıklı olduğu ve maksimum aktivitenin görüldüğü sıcaklık ve pH değerlerinin de sırasıyla 60°C ve 7.5 olduğu bulunmuştur. Enzim K_m ve k_{cat} değerleri ise 1.87 mg/ml ve $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ksilanaz yüksek substrat afinitesi ve yüksek bir katalitik güce sahiptir. Ayrıca, enzimin molekül ağırlığının küçük olması, alkalik pH değerinde dayanıklı olması ve yok denecek kadar az selüloz aktivitesine sahip olması da, enzimin kağıt endüstrisinde ve ksilooligosakkarit üretiminde kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın son bölümünde ise *B. pumilus* SB-M13 ksilanaz geni izole edilmiş ve dizin analizi yapılmıştır. Gen literatürdeki diğer *B. pumilus* ksilanaz genlerine % 88-94 aralığında benzerlik göstermiştir. Amino asit dizilimi ile karşılaştırıldığında ise diğer *B. pumilus* ksilanazlarına göre korunmuş bölge olmayan 4 amino asit farklılığı göstermektedir.

Kaynakça

Anker, L., Bisgard-Frantzen, H., ve Halkier, T., United States Patent, Patent no: 5,457,045, (1993).

Avcioğlu, B., Eyupoglu, B., ve Bakir, U., Production and characterization of xylanases of *Bacillus* strain isolated from soil, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 65-68, (2005).

Bachmann, S.L., ve McCarthy A.J., Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonaspora fusca*, *Applied Environmental Microbiology*, 57, 2121-2130, (1991).

Bakir, U., Yavascaoglu, S., Guvenc, F., ve Ersayin, A., An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization, *Enzyme Microbial Technology*, 29(6-7), 328-334, (2001).

Bakir, U., *Microbial Enzymes: Production and Applications*, *The Haworth Press, NY*, (2005). Pp: 592.

Beldman, G., Schols, H.A., Piston, S.M., Searle-van Leeuwen M.J.F., ve Voragen, A.G.J., Arabinan degrading enzymes, *Adv Macromol Carbohydr Res.*, 1, 1-64, (1997).

Biely, P., Mislovicova, D., ve Toman, R., Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4- β -xylanases and endo-1,4- β -glucanases, *Analytical Biochemistry*, 144,142-146, (1985).

Bielely *ve ark.*, 1992, Hespell ve Cotta, 1995'da referans verilmiştir.

Biran, S., Aqueous two-phase separation of xylanases produced by a *Bacillus* sp., (Master tezi), Orta Doğu Teknik Üniveritesi, Ankara, Türkiye, (2001).

Biran *ve ark.*, 2006, yayınlanmak için yollandı.

Blanco, J., Coque, J.R.R., Velasco, J., ve Martin, J.F., Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo- β - 1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose-binding ability, *Applied microbiology and Biotechnology*, 48, 208-217, (1997).

Bradford, M.M.,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, (1976).

Brillouet *ve ark.*, 1987, Hespell ve Cotta, 1995'da referans verilmiştir.

Cardoso, O.A., ve Filho, X.F., Purification and characterization of a cellulose- free xylanase from *Acrophialophora nainiana*, *FEMS Microbiology Letters*, 223, 309-314, (2003).

Choct ve Annison, 1990, William ve ark., 2000'de referans verilmiştir.

Coughlan, M.P., ve Hazlewood, G.P., β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 17, 259-289, (1993).

De Buyl, E., Lahaye, A., Ledoux, P., Amory, A., Detroz, R., Andre, C., ve Vetter, R., United States Patent, Patent no: 6,426,211, (1998).

De Ioannes, P., Peirano, A., Steiner, J., ve Eyzaguirre, J., An α -L-arabinofuranosidase from *Penicillium purpurogenum*: production, purification and properties, *J of Biotechno.*, 76, 253-258, (2000).

Degrassi, G., Vindigni, A., ve Venturi, V., A thermostable α -arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*: purification and characterization, *Journal of Biotechnology*, 101, 69-79, (2003).

Duarte, M.C.T., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Bim, M.A., Tagilari, C.V., ve Franco, T.T., Production and purification of alkaline xylanases, *Bioresource Technology*, 68, 49-53, (1999).

Duarte, M.C.T., Pelegrino, A.C.A., ve Portugal, E. P., Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(2), 90-94, (2000).

Duarte, M.C.T., Da Silva, E.C., Gomes, I.S.B., Ponezi, A.N., Portugal, E.P., Vicente, J.R., ve Davanzo, E., Xylan-hydrolysing enzyme system from *Bacillus pumilus* CBMAI 0008 and its effects on *Eucalyptus grandis* kraft pulp for pulp bleaching improvement, *Biosource Technology*, 88, 9-15, (2003).

Erikkson, K.E.L., Blanchette, R.A., ve Ander., P., Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, *Springer, Verlag*, NY, (1990).

Ferré, H., Broberg, A., Q. Duud, J., ve Thomson, K.K., A novel type of arabinoxylan arabinofuranohydrolase isolated from germinated barley, *Eur J Biochem*, 276, 6633-6641, (2000).

Gilead, S., ve Shoham, Y., Purification and characterization of α -L-arabinofuranosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 170-174, (1995).

Gomes, J., Gomes, I., Terler, K., Gubala, N., Ditzelmüller, G., ve Steiner, W., Optimization of culture medium and conditions for α -L-arabinofuranosidases production by the extreme thermophilic eubacterium *Rhodotermus marinus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 414-422, (2000).

Gosalbes, M.J., Pérez-González, J.A., González, R., ve Navarro, A., Two β -glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*: molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo- β -(1,3)-(1,4)-glucanase, *Journal of Bacteriology*, 173, 7705-7710, (1991).

Grange, D.C., Genetic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to degrade xylan, (Doktora tezi), University of Stellenbosch, (1999).

Greve, L.C., Labavitch, J.M., ve Hungate, R.E. α -L-Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible roles in hydrolysis of alfalfa cell wall., *Appl Environ Microbiol*, 47, 1135-1140, (1994).

Gunata, Z.Y., Brillouet, J.M., Voirin, S., Baumes, R., ve Cordonnier, R., Purification and some properties of an α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. Action on grape monoterpenyl arabinofuranosyl-glucosides, *Journal of Agric. Food. Chem.*, 38, 772-776, (1990).

Hespell, R.B., ve Cotta, M.A, Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylans with different chemical and physical properties, *Applied and Environmental Microbiology*, 61,3042–3050, (1995).

Hirano, Y., Tsumuraya, Y., ve Hashimoto, Y., Characterization of spinach leaf α -L-arabinofuranosidases and β -galactosidases and their synergistic action on an endogenous arabinogalactan-protein, *Physiol Plant*, 92, 286-296, (1994).

Kaneko, S., Arimoto, M., Ohba, M., Kobayashi, H., Ishii, T., ve Kusabeke, I., Purification and substrate specificities of two α -L-arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4021-4027, (1998).

Khasin, A., Alchanati, I., ve Shoham, Y., Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1725-1730, (1993).

Khoodoo, M.H.R., Sahin, F., Donmez, M.F., ve Fakim, Y.J., Molecular characterization of *Xanthomonas* strains isolated from aroids in Mauritius, *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 366-380, (2005).

Kocabas, E.E., ve Dizbay, M., *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953'ten a-galaktosidaz üretimi, *Turkish Journal of Biology*, Tubitak, 23, 47-54, (1999).

Konno, H., Tanaka, R., ve Katoh, K., An extracellular α -L-arabinofuranosidase secreted from cell suspension cultures of carrot, *Physiol Plant*, 454-460, (1994).

Kormelink, F.J.M., ve Voragen, A.G.J., Degradation of different [(glucurono)arabino]xylans by a combination of purified xylan-degrading enzymes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 688-695, (1993).

Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)*, 227, 680-685, (1970).

Lee, F., ve Forsberg, C.W., Purification and characterization of an α -L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 1011-1016, (1987).

Liab, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J.S., ve Eriksson, J.L., Relationships between activities of xylanases and xylan structures, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 89-94, (2000).

Mabrouk, S.S, EI-Shayeb, N.M.A, Sheble, A.S., ve Sobieh, O., Optimization of β -galactosidase productivity by *Bacillus macerans* 314 (DSM), *Advances in Food Sciences*, 24, 12-19, (2002).

Makkonen, H.P.; Nakas, J.P., Use of xylanase and arabinofuranosidase for arabinose removal from unbleached kraft pulp, *Biotechnology Letters*, 27, 1675-1679, (2005).

Nakajima, K., Tsukamoto, K.I., Watanabe, T., Kainuma, K., ve Matsuda, K., Purification and some properties of an endo-1,4- β -xylanase from *Streptomyces* sp., *Journal of Fermentation Technology*, 62, 269-276, (1984).

Nakamura, S., Aono, R., Wakabayashi, K., ve Horikoshi, K., *Xylan and Xylanases* Prog. Biotechnol. vol 7 (Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A. and Voragen, A. G.J., eds.), Elsevier, Amsterdam, (1992), Pp: 443.

Neto, L.S.S., ve Filho, F.E.X., Purification and characterization of a new xylanase from *Humicola grisea var thermoidea*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 86-90, (2004).

Paavilainen, S., Hellman, J., ve Korpela, T., Purification, characterization, gene cloning, and sequencing of a new beta-glucosidase from *Bacillus circulans* subsp. alkalophilus, *Applied and Environmental Microbiology*, 6, 807–812, (1976).

Panbangred, W., Shinmyo, A., Kinoshita, S., ve Okada, H., Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*, *Agricultural and Biological Chemistry*, 47 (83), 957-963, (1983).

Pham, P.L., Taillandier, P., Delmas, M., ve Strehaiano, P., Production of xylanases by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes, *Industrial Crops and Products*, 7, 195-203, (1998).

Poutanen, K., Rattö, J., Puls, J., ve Viikari, L., Evaluation of different microbial xylanolytic systems", *Journal of Biotechnology*, 6, 49-60, (1987).

Puls, J., ve Schuseil, J., Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis, *Hemicellulose and Hemicellulases*, Portland Press, London, (1993). Pp: 1.

Rahim, A.A.K., ve Lee, B.H., Specificity, inhibitory studies, and oligosaccharide formation by *p*-galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88, *Journal of Dairy Science*, 74, 6, (1991).

- Rahman, A.K.M.S., Kawamura, S., Hatsu, M., Hoq, M., and Takamizawa, K., Physicochemical properties of a novel α -L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1, *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 767-772, (2001).
- Rahman, A.K.M.S, Kato, K., Kawaki, S., ve Takamizawa, K., Substrate specificity of the α -L-arabinofuranosidase from *Rhizomucor pusillus* HHT-1, *Carbohydrate Research*, 338, 1469-1476, (2003).
- Remond, C., Plantier-Royon, R., Aurby, N., Maes, E., Bliard, C., ve O'Donohue, M.J., Synthesis of pentose containing disaccharides using a thermostable α -L-arabinofuranosidase, *Carbohydrate Research*, 339, 2019-2025, (2004).
- Royer, J.C., ve Nakas, J.P., Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*, *Enzyme and Microbiology Technology*, 11, 405-410, (1989).
- Ruiz, M.C., Pietro, A.D., ve Roncero, M.I.G., Purification and characterization of an acidic endo-1,4- β -xylanase from tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *FEMS Microbiology Letters*, 148, 75-82, (1997).
- Saha, B.C., ve Bothast R.J., Enzymology of the xylan degradation. In: Imam S.H.; Greene, R.V.; Zaidi B; editors. *Biopolymers: Utilizing Nature's Advanced Materials*. Washington, DC: American Chemical Society, (1991). Pp: 167.

Saha, B.C., ve Bothast R.J., Purification and characterization of a novel thermostable α -L-arabinofuranosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*, *Applied Environ Microbiology*, 64, 216-220, (1998b).

Saha, B.C., ve Bothast R.J., Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber, *Applied Biochemistry Biotechnology*, 76, 65-77, (1999b).

Saha, B.C., α -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology, *Biotechnology Advances*, 18, 403-423, (2000).

Sandra, E., Chaplin, M.F., Blackwood, A.D., ve Dettmar, P.W., Primary structure of arabinoxylans of ispaghula husk and wheat bran, *Proceedings of the Nutrition Society*, Royal College of Physicians, Edinburgh, UK, 62, 217-222, (2003).

Sasser M.J., Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids, Technical note 101, Microbial ID, Inc., Newark, De., (1990).

Saulnier ve ark., 1994, Saha, 2000' de referans verilmiştir.

Saulnier, L., Vigouroux, J., ve Thibault, J.Ç., Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3042-3050, (1995).

Schlacher, A., Holzman, K., Hayn, M., Steiner, W., ve Schwab, H., Cloning and characterization of the gene for the thermostable xylanase XynA from *Thermomyces lanuginosus*, *Journal of Biotechnology*, 49, 211-218, (1996).

Schooneveld-Bergmans, M.E.F., Beldman, G., ve Voragen, A.G.J, Structural features of (Glucurono) arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide, *Journal of Cereal Science*, 29, 63-75, (1999a).

Spagna, G., Romagnoli, D., Angela, M., Bianchi, G., ve Pifferi, P.G., Simple method for purifying glycosidases: α -L-arabinofuranosidase and β -D-glucopyranosidase from *Aspergillus niger* to increase the aroma of wine. Part I", *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 298-304, (1998).

Sørensen, H.R., Pedersen, S., Nielsen, A.V., ve Meyer, A.S., Efficiencies of designed enzyme combinations in releasing arabinose and xylose from wheat arabinoxylan in industrial ethanol fermentation residue, *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 773-784, (2005).

Tan ve ark., 1987; Tan ve ark., 1985; Wong ve ark., 1986, Esteban ve ark., 1982, Wong ve ark., 1988'de referans verilmiştir.

Tenkanen, M., Tamminen, T., ve Hortling, B., Investigation of lignin-carbohydrate complexes in kraft pulps by selective enzymatic treatments, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 241-248, (1999).

Thomson, J.A., Molecular Biology of xylan degradation, *FEMS Microbiology Reviews*, 104, 65-82, (1993).

Topakas, E., Katapodis, P., Kekos, D., Macri, B.J., ve Cristakopoulos., Production and partial characterization of xylanase by *Sporotrichum thermophile* under solid-state fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 195-198, (2003).

William, P.E.V., Geraert, P.A., Uzu, G., ve Annison, G., Factors affecting non-starch polysaccharide digestibility in poultry, *CIHEAM-Options Mediterraneennes*, (2000).

Wood, T.M., ve McCrae, S.I., Studies of two low molecular weight endo-(1,4)- β -D-xylanases constitutively synthesized by the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*, *Carbohydrate Research*, 148, 321-330, (1986).

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., ve Saddler, J.N., Multiplicity of β -1,4-Xylanase in microorganisms: Function and applications, *Microbiological Reviews*, 52, 305-317, (1988).

Zaneolo, F.F., Polizeli, M.L.T.M., Terenzi, H.F., ve Jorge, J.A., β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose, *FEMS Microbiology Letters*, 240, 137-143, (2004a).

EK A

CH-API 50 CHB/E ORTAM KİTİ KOMPOZİSYONU

Tablo. 50 CH-API 50 CHB/E kit çubuğu kompozisyonu.

Tüp	Test	Aktif İçerik	Miktar (mg/tüp)
0		Control	-
1	GLY	GLYcerol	1.64
2	ERY	ERYthritol	1.44
3	DARA	D-ARAbinose	1.4
4	LARA	L-ARAbinose	1.4
5	RIB	RIBose	1.4
6	DXYL	D-XYLose	1.4
7	LXYL	L-XYLose	1.4
8	ADO	D-ADOnitol	1.36
9	MDX	Methly- D Xylopyranoside	1.28
10	GAL	D-GALactose	1.4
11	GLU	D-GLUcose	1.56
12	FRU	D-FRUctose	1.4
13	MNE	D-MaNnose	1.4
14	SBE	L-SorBose	1.4
15	RHA	L-RHAMnose	1.36
16	DUL	DULcitol	1.36
17	INO	INOsitol	1.4
18	MAN	D-MANnitol	1.36
19	SOR	D-SORbitol	1.36
20	MDM	Methly- D-Mannopyranoside	1.28

Tablo devamı. 50 CH-API 50 CHB/E kit çubuğu kompozisyonu.

Tüp	Test	Aktif İçerik	Miktar (mg/tüp)
21	MDG	Methly- D-Glucopyranoside	1.28
22	NAG	N-AcetylGlucosamine	1.28
23	AMY	AMYgdalin	1.08
24	ARB	ARButin	1.08
25	ESC	ESCulin, ferric citrate	1.16, 0.152
26	SAL	SALicin	1.04
27	CEL	D-CELlobiose	1.32
28	MAL	D-MALtose	1.4
29	LAC	D-LACtose (bovine origin)	1.4
30	MEL	D-MELibiose	1.32
31	SAC	D-SACcharose (sucrose)	1.32
32	TRE	D-TREhalose	1.32
33	INU	INUlin	1.28
34	MLZ	D-MeLeZitose	1.32
35	RAF	D-RAFfinose	1.56
36	AMD	AmiDon (starch)	1.28
37	GLYG	GLYcoGen	1.28
38	XLT	XyLiTol	1.4
39	GEN	GENTibiose	0.5
40	TUR	D-TURanose	1.32
41	LYX	D-LYXose	1.4
42	TAG	D-TAGotosE	1.4
43	DFUC	D-FUCose	1.28
44	LFUC	L-FUCose	1.28
45	DARL	D-ARbitol	1.4
46	LARL	L-ARbitol	1.4
47	GNT	Potassium GlucoNaTE	1.84
48	2KG	Potassium 2-KetoGluconate	2.12
49	5KG	Potassium 5-KetoGluconate	1.8

EK B

CH-API 50 CHB/E ORTAM KİTİ SONUÇ DEĞERLENDİRİLMESİ

Tablo . 50 CH-API 50 CHB/E ortam kit sonuçları

Test numarası	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Sonuç* (-/+)	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Test numarası	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	X	X
Sonuç* (-/+)	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Sonuç mikroorganizmanın 30 °C'de belirtilen karbon kaynaklarını fermente edebilmesine göre değerlendirilmiştir.

72

1-20, ek

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: 104T473
Proje Başlığı: TOPRAK İZOLATI <i>Bacillus pumilus</i> M-13 KSİLANAZ'ININ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZE EDİLMESİ VE KSİLANAZ GENİNİN İZOLASYONU
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr. Ufuk Bakır, Prof. Dr. Zümrüt Ögel, ve Dr. Ayşegül Ersayın Yaşınok
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: O.D.T.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı
Destekleyen Kuruluş Adı ve Adresi: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/06/05-01/12/2006
Öz Çalışmamızda, toprak izolatu <i>Bacillus</i> suşu, <i>Bacillus pumilus</i> SB-M13 olarak tanımlanmış ve ksilanolitik enzim sistemi araştırılmıştır. Ayrıca, <i>B. pumilus</i> SB-M13 β -1,4 ksilanaz enzimi saflaştırılıp biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Enzim alkali pH'larda dayanıklı olup, enzime ait en yüksek aktivite 60°C ve pH 7.5'ta gözlenmiştir. Enzime ait K_m ve k_{cat} değerleri sırasıyla 1.87 mg/ml ksilan ve $1.7 \times 10^4 s^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Son aşamada ise, <i>B. pumilus</i> SB-M13 ksilanaz geni PCR yöntemi ile izole edilmiş ve sekans analizi yapılmıştır.
Anahtar Kelimeler: <i>Bacillus pumilus</i>, ksilanolitik sistem, ksilanaz, ksilanaz geni.
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: : Ksilanaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu içeren bir makale hazırlanarak basılması için uluslararası bir dergiye gönderilmiştir. Bakterinin Ksilanolitik sistemi ile ilgili bir makale de hazırlanmaktadır.
Bilim Dalı: Doçentlik B. Dalı Kodu: