



TÜRKİYE BİLİMSEL VE
TEKNİK ARAŞTIRMA KURUMU

THE SCIENTIFIC AND TECHNICAL
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

KSİLANAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYON İLE
AYRIŞTIRILMASI: EKSTRAKSİYON
PARAMETRELERİNİN İNCELENEREK SÜRECİN
OPTİMİZASYONU

2004-62
PROJE NO: MİSAG-177

**Makina Kimyasal Teknolojiler, Malzeme ve İmalat Sistemleri
Araştırma Grubu**

**Mechanical Engineering, Chemical Technologies, Material
Sciences and Manufacturing Systems Research Grant
Committee**

**KSİLANAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYON İLE
AYRIŞTIRILMASI: EKSTRAKSİYON
PARAMETRELERİNİN İNCELENEREK SÜRECİN
OPTİMİZASYONU**

2004-62
PROJE NO: MİSAG-177

PROF. DR. UFUK BAKIR

01.03.2001-01.03.2003
ODTÜ Kimya
Müh. Böl.

**MAYIS 2003
ANAKARA**

$\bar{O} = T - 1$

$S = 1 - 49$

$R = 20$

ÖNSÖZ

Bu rapor, TÜBİTAK tarafından desteklenen MİSAG- 177 nolu ve “Ksilanaz Enziminin Ekstraksiyon ile Ayırıştırılması: Ekstraksiyon Parametrelerinin İncelenerek Sürecin Optimizasyonu” isimli Prof. Dr. Ufuk Bakır’ın yürütücülüğünü yaptığı projenin sonuç raporudur.

Proje kapsamında topraktan izole edilen bir *Bacillus* suşundan ve *Rhizopus oryzae* küfünden fermentasyonlarla üretilen ksilanaz enzimleri sulu-2-faz yöntemi kullanılarak fermentasyon ortamından ayrılmaya çalışılmıştır. Çalışmalarda, enzimlerin ortamdan ayrılma verimi, konsantre edilme ve saflaştırma miktarları belirlenmiştir. Sulu iki faz sistemi olarak polyetilen glikol-fosfat tuzu sistemi kullanılmış ve sıcaklık, pH, iyonik gerilim, PEG derişimi ve molekül ağırlığı, sistem kompozisyonu, iyonik gerilimi değiştirmek için kullanılan tuz çeşidi, konsantrasyonu gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Ayrıca *Bacillus* siteminde hücreleri önden santrifuj ile ayırmadan direk ekstraksiyona alınmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmalar ATPS yönteminin enzim izolasyonu, konsantrasyonu ve kısmi saflaştırma işlemleri için hücre içeren fermantasyon ortamından bile yüksek enzim verimliliği ile sonuçlanan iyi bir yöntem olduğunu göstermiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet.....	8
Abstract.....	9
1.Giriş.....	10
1.1.Çalışmada İncelenen Parametreler.....	11
1.2.Araştırmada Kullanılan Deneysel Yöntemler.....	12
2.Gelişme.....	17
2.1.Literatür Taraması.....	17
2.2.Deneysel Çalışmalar.....	23
3.Sonuç.....	40
Kaynakça	43
Appendix.....	46

Tablo Listesi	Sayfa
Tablo 1 - Sıcaklığın ayrışmaya etkisi.....	26
Tablo 2 - Polimerin molekül ağırlığı ve derişiminin ayrışmaya etkisi.....	29
Tablo 3 - Tuz çeşidinin ve derişiminin ayrışmaya etkisi.....	32
Tablo 4 - Düşük polimer miktarı içeren sistemdeki tuz çeşidi ve derişimin ayrışmaya etkisi.....	33
Tablo 5 - pH'ın ayrışmaya etkisi.....	35
Tablo 6 - Ham fermentasyon ortamındaki <i>Bacillus</i> ksilanazlarının ayrışma sonuçları.....	37
Tablo 7 - Konsantrasyon ve saflaştırma tablosu.....	38
Tablo 8 - <i>Rhizopus oryzae</i> ksilanazlarının sulu iki faz sistemi ile ayrıştırılma sonuçları.....	39

Şekil Listesi**Sayfa**

Şekil 1 - <i>Bacillus</i> izolatlarının büyüme eğrileri ve ksilanaz aktiviteleri	24
Şekil 2 - <i>R. oryzae</i> fermentasyonu ksilanaz üretim grafiği	24
Şekil 3 - Sıcaklığın saflaştırma katsayısına (SK) etkisi.....	26
Şekil 4 - Sıcaklığın konsantrasyon oranına (KO) etkisi.....	27
Şekil 5 - PEG1000 konsantrasyonunun etkisi.....	29
Şekil 6 - PEG4000 konsantrasyonunun etkisi.....	30
Şekil 7 - Ksilanazların bazik pH'lardaki stabilitesi.....	34
Şekil 8 - Ksilanazların SDS-PAGE analizi	36

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, değişik mikroorganizmalardan elde edilen ksilanazların, polietilen glikol (PEG) ve potasyum fosfattan oluşan sulu iki faz sistemi kullanarak fermantasyon ortamından ekstrakte edilmesi (özütlenmesi)dir. Özütleme işleminin optimizasyonu sıcaklık, polimer konsantrasyonu ve moleküler ağırlığı, tuz çeşidi, ortamın iyonik gerilimi ve sistemin pH'ı gibi parametrelerin etkileri araştırılarak yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, *Bacillus* ksilanazlarının üst faza yoğunlaşarak ve kısmen saflaştığını göstermiştir. En iyi sonuçlar %5.6 PEG4000, %18 potasyum fosfat, %9 KI, pH 8.5 ve %3.5 PEG4000, %14 potasyum fosfat, %9 KI, pH 9'dan oluşan sistemlerde elde edilmiştir. İlk kompozisyon, % 76 ksilanaz geri kazanımı ile enzim korunumu için; ikincisi ise 5 kat saflık ve 10 kat konsantrasyon ile enzim saflaştırılması için uygun bulunmuştur. *Rhizopus oryzae* ksilanazlarının ayrışmasında kullanılan %4.7 PEG4000, %20.3 potasyum fosfat ve KI içeren sistemle, enzimler başarıyla üst fazda toplanmış, % 85 enzim geri alımı, 111 kat saflaştırma ve 6 kat konsantrasyon elde edilmiştir.

Son olarak, ksilanazlar bakteriyel hücreleri ihtiva eden fermantasyon ortamından ekstrakte edilmiştir. Tüm *Bacillus* hücreleri alt faza çekilmiştir; aynı zamanda da ksilanazların %69u geri kazanılarak 6 kat saflaştırılmış ve 4 kat konsantre edilmiştir. Çalışmalar Sulu İki-Faz Sisteminin, enzim izolasyonu, konsantrasyonu ve kısmi saflaştırma işlemleri için hücre içeren fermantasyon ortamından bile yüksek enzim verimliliği ile sonuçlanan iyi bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Sulu İki Faz Sistemi, PEG-Tuz Sistemi Enzim Ayrıştırılması, Ksilanaz, *Bacillus*, *Rhizopus oryzae*.

ABSTRACT

The aim of this study was to extract different microbial xylanases from fermentation broths by using an aqueous two-phase system composed of polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate. The partitioning was optimized by investigating the effect of parameters including temperature, polymer concentration, molecular weight, salt type, ionic strength and pH of the system.

The results showed that *Bacillus* xylanases partition completely to the top phase being purified and concentrated at the same time. The systems composed of 5.6% PEG4000, 18% potassium phosphate, 9% KI, pH 8.5 and 3.5% PEG4000, 14% potassium phosphate, 9% KI, pH 9 were found to be the most successful ones. The former composition was suitable for enzyme recovery obtaining 76% of the xylanases, while the latter composition was applicable when enzyme purification is considered giving 5-fold purification and 10-fold concentration. Xylanases produced by *Rhizopus oryzae* were successfully partitioned to the top phase with 85% enzyme recovery, 111 fold purification and 6 fold concentration with an aqua two-phase system composed of 4.7% PEG4000, 20.3% potassium phosphate and KI.

Finally, xylanases were extracted from crude fermentation medium containing *Bacillus* cells. All the *Bacillus* cells were removed to the bottom phase, while xylanases were partitioned to the top phase with 69% recovery and being 6-fold purification and 4-fold concentration. Consequently, ATPS is an excellent tool for enzyme recovery, concentration and partial purification purposes even from the crude fermentation medium containing microbial cells giving a high enzyme yield.

Keywords: Aqueous Two-Phase System, PEG-Salt System, Enzyme Partitioning, Xylanase, *Bacillus*, *Rhizopus oryzae*.

1. GİRİŞ

Bu projenin konusu değişik endüstri kollarında kullanımı olan ksilanaz enziminin mikrobiyal fermentasyonlarla üretilmesi ve sulu iki faz sistemiyle ekstrakte edilmesi (özütlenmesi) ve saflaştırma parametrelerinin optimizasyonudur

Laboratuvarımızda ksilanazlar mikrobiyal fermantasyonlarla üretilmesi, karakterizasyonu, üretime uygun yeni mikroorganizmaların bulunması, üretim veriminin artırılması için fermentasyon koşullarının optimizasyonu ve suş iyileştirmesi, üretilen enzimlerin saflaştırılması gibi çalışmalar yapılmaktadır. Genel olarak enzim üretiminden sonra saflaştırma aşaması daha zor ve daha masraflı olmakta ve endüstriyel amaçlar için üretilecek enzimlerin saflaştırılması için çökeltme, ekstraksiyon gibi ucuz ve pratik yollar aranmaktadır. Ekstraksiyon metodunun en büyük dezavantajı bu işlem sırasında kullanılan organik çözücülerde enzim ve diğer biyolojik moleküllerin dayanıklı olmaması ve bozulmalarıdır. Bu sorunu gidermek amacıyla uygulanabilecek bir özütleme metodu, sulu iki faz sistemidir. Bu yöntemde kullanılan iki değişik polimer ya da polimer-tuz karışımı su bazlı, birbiri ile karışmayan iki sıvı faz oluşmasına neden olur. Polimerlerin, genelde, biyoaktif moleküller üzerinde stabilize etme etkisi bulunmaktadır. Böylece, enzim molekülleri aktivitesini yitirmez ve kullanılan polimer ve tuzun cinsi, polimer molekül ağırlığı, konsantrasyon, pH, sıcaklık, iyonik sertlik gibi enzimin fazlar arasındaki dağılımını etkileyen parametreler değiştirilerek enzimin bir fazda toplanarak saflaşması sağlanır.

Ksilanazların sulu iki faz sistemi kullanılarak ayrıştırılması ile ilgili bulunan çalışmalar az sayıdadır. Elde edilen ksilanazların kaynağı farklı olduğundan, enzimlerin yapısı da çeşitlilik göstermektedir. Dolayısıyla, her biyomolekülün ekstraksiyon koşulları değişik olmaktadır.

Üretilen enzimlerin başarıyla ayrıştırılabilmeleri için saflaştırma parametreleri değiştirilerek optimum koşullar bulunmalıdır. Bu yöntem oldukça ucuz ve verimli olduğundan ve kısa zamanda tamamlandığından, büyük ölçek uygulamalarında da kullanılabilirliği bulunmaktadır. Araştırmamızın kapsamı geniş olduğundan ve birçok parametrenin etkisi incelendiğinden literatürde önemli bir yer alacağını düşünmekteyiz.

1.1. Çalışmada incelenen parametreler

- Ksilanaz üreticisi mikroorganizma seçimi ve üretimin artırılması: Başlangıç olarak iyi bir ksilanaz üreticisi bulmak amacıyla, değişik toprak örnekleri kullanılarak mikroorganizmalar taranmıştır. İzole edilen 300'e yakın mikroorganizma arasından en iyi 5 ksilanaz üreticisi *Bacillus* seçilip daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır. Fermentasyon ortamının iyileştirilmesi aşamasında, değişik zirai yan maddesi karbon kaynağı olarak kullanılmış ve mısır koçanı ile yapılan üretimde en yüksek ksilanaz verimi elde edilmiştir.
- Sulu iki faz sisteminin optimizasyonu: Sulu iki faz sistemleri polietilen glikol (PEG) ve potasyum fosfat tuzları kullanılarak oluşturulmuştur. Ksilanazların saflaştırma işlemleri sulu-iki faz sisteminin kompozisyonu değiştirilerek başlanmıştır. Değişik moleküler ağırlıkta ve derişimde polietilen glikol ve farklı pH değeri ve derişimde potasyum fosfat tuzları kullanılmıştır. Sulu iki faz sisteminin özellikleri değiştirilerek daha iyi saflaştırma verimi elde edilmeye çalışılmıştır. Öncelikle, ayrışma işlemi değişik sıcaklıklarda gerçekleştirilerek etkisi incelenmiştir. Uygun sıcaklık belirlendikten sonra, farklı derişimlerde polietilen glikol ve potasyum fosfat içeren sistemlerin ayrışma sonuçları karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak, ortamın iyonik gerilimi farklı tuzlar eklenerek değiştirilmiş, ksilanazların ayrışmasına etkileri incelenmiştir. Ayrıca, sulu iki faz sisteminin pH'sı potasyum fosfat tuzlarının oranlarıyla oynanarak değiştirilerek daha iyi sonuç elde edilmeye çalışılmıştır. Bu

konuda *Bacillus* ksilanazları en uygun sistem kullanılarak mikrobiyal hücre ihtiva eden ortamdan, tek adımda ekstrakte edilip, saflaştırılmışlardır. Son olarak ta ksilanaz enziminin ekstraksiyondaki etkisi incelenmiştir. Fazlar arasındaki dağılım, enzimlerin yapılarındaki özelliklere bağlı olarak farklılık gösterdiğinden dolayı, farklı bir mikrobiyal kaynak olarak *Rhizopus oryzae*'dan elde edilen ksilanazlar sulu iki faz sistemiyle ekstrakte edilmeye çalışılmıştır ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Bitirilen proje ile proje önerisinde amaç, kapsam ve yöntem açısından bir farklılık yoktur. Proje önerisinde yapılması planlanan araştırma tamamıyla tamamlanmıştır.

1.2. Araştırmada Kullanılan Deneysel Yöntemler

1.2.1. Enzim (Ksilanaz) Aktivitesi Tayini

Çalışmada enzim aktivitesini tayin eden iki yöntem kullanıldı. Her iki yöntem ksilanazın substrat (ksilan) ile girdiği tepkime sonucu açığa çıkan indirgeyici şekerleri ölçen metodlardır. Ksilanazların ilk reaksiyon hızını ölçmek için %1'lik huş ağacı ksilanı içeren substrat ve seyreltilmiş enzim solüsyonu 40°C'de karıştırılarak, 15 saniyelik aralıklarla 1-3 dakika boyunca örnek alındı.

Bir ksilanaz aktivitesi birimi (U), dakikada 1µmol ksiloz eşdeğerlerini 40°C'lik reaksiyon koşullarında üreten enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Appendix B).

1.2.2. Substrat Hazırlama

%1'lik ksilan substratı Bailey'in (1992) açıkladığı gibi hazırlanmıştır. 1.0g huş ağacı ksilanı 80ml fosfat tampon çözeltisiyle (pH 7) karıştırıldıktan sonra, ısıtıldı ve 2-3 dakika süreyle, ksilanın çözünürlüğünü arttırmak amacıyla kaynatıldı. Daha sonra substrat bir gece boyunca çalkalayıcıda karıştırıldı ve işlem sonunda çözeltinin hacmi 100ml'e tamamlandı. Ortamda bulunan katı parçacıklardan kurtulmak için, substrat 20 dakika süreyle 4500 x g'de santrifüj edildi ve buzdolabında, en fazla bir hafta boyunca, muhafaza edildi. Kullanılmadan önce, substrat ve enzim deney sıcaklığına getirildi.

1.2.3. Nelson-Somogyi Metodu

Yöntemde kullanılan bütün kimyasallar Nelson'un (1944) makalesinde anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

1. Nelson'un bazik bakır çözeltisinden 1.0ml ihtiva eden tüplere 1.0ml reaksiyon çözeltisi (enzim + substrat), belirlenen zaman aralıklarıyla (15 saniye), eklenerek hemen karıştırıldı.
2. Tüpler kaynar suya konarak, 20 dakika boyunca kaynatıldıktan sonra, akan çeşme suyu altında soğutuldu.
3. Her tüpe amonyum molibdat içeren reaktiften 1.0ml eklenerek tüpler çok iyi karıştırıldı.
4. Daha sonra 7.0ml distile su eklenerek solüsyonlar homojen bir hal alınca kadar karıştırıldı.
5. Örneklerin optik yoğunlukları (OD) spektrofotometrede, 540nm'de, referans olarak 0.05M, pH 7 fosfat tampon çözeltisi kullanılarak, okundu (Appendix A).

1.2.4. Dinitrosalisilik Asid (DNSA) Metodu

DNSA çözeltisi Miller'in (1959) açıkladığı gibi hazırlanmıştır ve ışıkla teması önlenmiştir.

Tüplere 1.0ml DNSA solüsyonu konduktan sonra, üzerine 1.0ml reaksiyon çözeltisi (substrat+enzim) eklenerek iyice karıştırılmıştır.

Tüpler 5 dakika boyunca suda kaynatıldıktan sonra akan çeşme suyunun altında soğutuldu. Örneklerin optik yoğunlukları (OD), 540nm'de, fosfat tampon çözeltisine karşı okunarak ölçüldüler (Appendix A).

1.2.5. Protein Konsantrasyonu Tayini

Enzim örneklerinin protein konsantrasyonu Bradford'un (1976) geliştirdiği yöntem kullanılarak ölçülmüştür. Bu metotta orijinali kırmızı olan Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlandığında maviye dönüşmesi esas alınmaktadır. Alınan 0.5 ml enzim örneğinin üzerine 1.0ml Bradford solüsyonu eklenip karıştırıldıktan sonra, örneğin optik yoğunluğu (OD)595nm'de okunur ve protein standart grafiği (Appendix C) kullanılarak protein konsantrasyonu hesaplanır. Protein standardı hazırlanmasında 0.04 mg protein/ml ihtiva eden Bovine Serum Albumin (BSA) solüsyonu kullanılmıştır.

1.2.6. Fermentasyon Çalışmaları

Ksilanaz enzim üretim çalışmaları iki değişik biyolojik sistem kullanarak yapıldı. Birincisi topraktan daha önce izole ettiğimiz *Bacillus* suşları, ikincisi ise yine daha önce ksilanaz aktivitesini belirlediğimiz *Rhizopus oryzae* küfü ile enzim üretim çalışmaları yapıldı. *Bacillus* suşlarını seçmemizin sebebi, bu mikroorganizmaların ksilanaz enzimlerinin optimal pH'larının bazik olması dolayısı ile kağıt sanayiinde kağıt hamurunun beyazlatılmasında kullanılabilmesi; *R. oryzae*'nin seçilmesinin nedeni ise gıda sanayiinde rahatça kullanılabilen bir mikroorganizma olmasıdır.

1.2.6.1. *Bacillus* fermentasyonu

Bu proje öncesinde, iyi ksilanaz üreticileri bulmak amacıyla, toprak örnekleri taranıp *Bacillus* suşları izole edilmişti. Bunlardan en iyi 5 izolat seçilerek çalışmada kullanıldı. Bu izolatlar ksilanaz aktivitesinin hesaplanması için sıvı ortamda büyütüldüler. Mikroorganizmalar % 1 glukoz, % 0.5 pepton, % 0.5 maya özütü % 0.1 potasyum fosfat, % 0.02 magnezyum sülfat, % 1 kalsiyum karbonat ve % 2 agar içeren bir ortamda 30 °C'de üretildi ve 4 °C'de saklandı.

Fermentasyon %3 mısır koçanı tozu, %0.5 NaCl, %0.25 maya özütü, %0.1 KH₂PO₄, %0.1 Na₂CO₃ ve %0.02 MgSO₄ içeren ortamda yapıldı.

Fermentasyon işlemi 250'lik flasklarda 100ml'lik ortamlarda, 30°C ve 175dev./dak. ile çalkalanarak gerçekleşti. 96 saat boyunca örnek alınarak, fermentasyonun mikroorganizma büyümesinin ve ksilanaz aktivitesinin gelişimi incelendi. Büyüme eğrileri fermentasyon ortamının 600nm'deki optik yoğunluğu (OD) ölçerek oluşturuldu, ksilanaz aktivitesi ise Nelson-Somogyi metodu kullanılarak ölçülmüştür.

1.2.6.2. *Rhizopus oryzae* fermentasyonu

Bu çalışmada *R. oryzae* ATCC 9363 suşu kullanıldı. Mikroorganizma %0.2 amonyum sülfat % 0.065 potasyum fosfat, % 0.025 magnezyum sülfat, % 0.005 çinko sülfat, % 0.5 glukoz ve % 1.5 agar içeren katı ortamda 30 °C'de üretilmiş ve 4 °C'de saklanmıştır.

R. oryzae'nin ksilanaz üretimini arttırabilmek için daha önce optimize edilmiş olan fermentasyon koşulları kullanılarak ksilanaz üretilmiştir. İnokülasyon işleminden önce spor süspansiyonu hazırlanmıştır ve bu süspansiyondan 1×10² spor/ml 'lik süspansiyon aşılama işlemi için kullanılmıştır. Fermentasyon işlemi çalkalamalı inkübatörde, 1000 ml'lik erlenlerde, %3 hidrolizli mısır koçanı, %1 hidrolizli soya küspesi, %1 amonyum sülfat, %0.5 NaCl içeren 300 ml'lik sıvı besiyerinde 35°C, 175 rpm'de 6 gün süreyle yapılmıştır.

1.2.7. Sulu İki-Faz Sistemi İle Enzim Özütlemesi

1.2.7.1. Stok solüsyonlarının hazırlanması

Enzim ekstraksiyonu deneylerinde iki farklı moleküler ağırlıkta polietilen glikol (PEG) polimerleri kullanıldı: PEG1000 ve PEG4000. PEG polimeri distile suyla karıştırılarak istenilen konsantrasyonda stok çözeltiler elde edildi; PEG1000 ağırlıkça %70 ve PEG4000 ağırlıkça %60 olarak kullanıldı.

İkinci fazı oluşturmada kullanılan tuz çözeltisi, K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 tuzlarının distile suda karıştırılmasıyla ağırlıkça %40'lık solüsyon olarak elde edildi. Tuzların oranı, son solüsyonun pH'sı 7 değerini alacak şekilde ayarlandı.

Stok çözeltiler karanlık ve serin yerde muhafaza edildiler. Kullanımdan önce istenilen sıcaklığa gelmeleri için bekletildiler.

1.2.7.2. Enzim Özütlemesi

Sulu iki faz sistemi oluştururken stok çözeltilerinin ilave sırası önemlidir. Solüsyonların sırası azalan yoğunluğa göre yapılmalıdır; öncelikle [K_2HPO_4/KH_2PO_4] solüsyonu, sonra PEG stok çözeltisi, enzim solüsyonu ve son olarak da yine K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 tuzlarını içeren pH=7'de 0,05M tampon çözelti. Böylece tartım sırasında hata oluşması halinde, çözeltiler birbirine karışmış olmadığı için, üstte kalan solüsyondan fazla olan miktar alınarak hata giderilebilir.

10g'lık sulu iki faz sistemi derecelenmiş plastik tüplerde hazırlandılar. Kapakları kapatıldıktan sonra tüpler başa aşağı birkaç kez çevirildikten sonra 10 sn boyunca vortekslendiler, böylece fazlar homojen bir şekilde karıştılar. Ayrışmayı kolaylaştırmak için tüpler 5 dak boyunca $1300 \times g$ 'de santrifüjlendiler. Faz hacimleri okunduktan sonra, her fazdan örnekler alınarak ksilanaz aktivitesi ve protein miktarı ölçümleri yapıldı. Her deneyde referans olarak enzim ihtiva etmeyen sulu iki faz sistem örnekleri kullanıldı.

1.2.7.3 Sulu İki-Faz Sistem Hesaplamaları

Sulu iki faz sistem deneylerinin başarılı olup olmadığını değerlendirebilmek için aşağıda gösterilen saflaştırma katsayısı, konsantrasyon oranı ve enzim geri alım değerleri hesaplandı. Saflaştırma katsayısı özütlemeye ne kadar saflaştırma yapıldığını, konsantrasyon oranı özütlemenin aynı zamanda konsantrasyonu artırıcı etkisinin olup olmadığını ve enzim geri alımı da numunedeki ksilanaz enzimlerinin ne kadarının kazanıldığını göstermektedir.

$$\text{Saflaştırma katsayısı (SK)} = \frac{[\text{Üst (ya da alt) fazdaki spesifik enzim aktivitesi}]}{[\text{Ham solüsyondaki spesifik enzim aktivitesi}]}$$

$$\text{Konsantrasyon oranı (KO)} = \frac{\text{Ham örneğinin hacmi}}{\text{Enzimin ayrıştığı fazın hacmi}}$$

$$\text{Enzim geri alımı (GA)} = \frac{[\text{Enzim Aktivitesi}]_{\text{üst faz}} \times [\text{Hacim}]_{\text{üst faz}}}{[\text{Enzim Aktivitesi}]_{\text{ham örnek}} \times [\text{Hacim}]_{\text{ham örnek}}}$$

2. GELİŞME

2.1. *Literatür Taraması*

2.1.1. Sulu iki faz ekstraksiyon sistemi

Biyoteknolojideki son gelişmeler, araştırma, eczacılık ve endüstriyel amaçlı uygulamalar için birçok enzim ve proteinin büyük ölçek üretim yöntemlerinin ortaya çıkmasını sağlamıştır (Tanuja ve ark., 1997). Bu enzim ve proteinlerin ticari üretimi başarılı sayılabilmesi için etkili saflaştırma işlemlerine gereksinim duyulmaktadır. Biyolojik maddelerin geri alımı, onların aktivitelerinin korunmasını sağlayan hassas saflaştırma tekniklerinin geliştirilmesini ortaya koymuştur. Dolayısıyla, endüstriyel olarak ekonomik, verimli ve etkili ayırma, konsantre etme ve saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesi ve kullanımı araştırılmalıdır.

Literatürde birçok protein ayırma ve saflaştırma metodları bulunmaktadır. Fakat, bunların çoğu çok basamaklı olup, genelde, çökeltme, membran ve jel filtrasyonu, kromatografi ve

diyaliz gibi aşamalar içermektedirler ve ticari kaygılardan daha çok karakterizasyon amaçlı olarak geliştirilmişlerdir. Bu metodlar, kolay ölçeklendirilebilme, kısa işlem zamanı, yüksek enzim geri alımı ve düşük yatırım ve işleme maliyetine sahip değildir.

Fermentasyon ortamlarındaki ve biyolojik ekstraktlardaki makromoleküllerin geri alımında pratik bir yaklaşım sulu iki faz sisteminin kullanılmasıdır. Bu yöntem, suda çözülmüş iki polimerin; ya da polimer ve yüksek iyon gücündeki tuzun uyumsuzluklarını temel alır (Albertsson, 1986). Bu bağdaşmazlık iki polimer zincirinin birbirine nüfuz edememesinden kaynaklanır. En yaygın kullanılan polimerler polietilen glikol (PEG) ve dekstrandır. Benzer olgu, PEG ve fosfat tuzları gibi polimer ve yüksek konsantrasyondaki tuz arasında da görülebilir. Sistemdeki her iki faz da su bazlı olduğundan, bu yöntem biyolojik materyallerin parçacıklarının ve makromoleküllerinin ayrıştırması için uygundur. Genelde parçacıklar yüzey özelliklerine göre dağılım gösterdiklerinden, bu yöntem santrifüj metodlarıyla kombine edildiğinde ayrıştırma iki boyutlu biçimde iyileştirilebilir.

Sulu iki fazlı sistem kullanarak ayrıştırma yönteminde, temel olarak maddelerin iki faz arasındaki seçici dağılımı yatmaktadır. Çözülebilir maddeler için, ayrışma iki faz arasındaki dağılımla gerçekleşmektedir, ve dağılım ayrışma katsayısıyla karakterize edilmektedir:

$$K = C_t / C_b$$

C_t ve C_b sırasıyla, üst ve alt fazdaki maddenin litredeki mol sayısı cinsinden konsantrasyondur. İki fazlı sistemdeki protein ayrışmasını etkileyen en önemli faktörler şöyledir:

- a) kullanılan polimer;
- b) polimerlerin molekül ağırlıkları;
- c) polimerin konsantrasyonu;

- d) iyonik güç;
- e) pH;
- f) protein solüsyonunun saflığı.

Bu metod, farklı proteinlerin parçalanmış hücre solüsyonlarından ayırmak, bir proteini başka proteinlerden saflaştırmak, ya da proteinleri konsantre etmek için kullanılabilir. En çözülebilir maddeler alt faza, daha polar faz, geçecekler; diğerleri de üst fazda toplanacaklardır (genelde PEG içeren faz). Proteinlerin birbirinden ayrıştırması, ayrışma katsayısının üzerinde oynanmasıyla başarılmaktadır. Bu da, polimerlerin moleküler ağırlıklarının, iyonik gücün değiştirilmesiyle, sistemde farklı iyon kullanılmasıyla veya hidrofobik grupların eklenmesiyle yapılmaktadır.

Daha yüksek bir derecede saflaştırma elde edebilmek için, ardarda birkaç ayrıştırma uygulanabilir, ya da alternatif olarak, başka polimerler de eklenerek ikiden fazla faz oluşumu sağlanabilir. Polimerlerden birisi hidrofobik gruplarla modife edilerek, proteinlerin ayrışma katsayısı değiştirilebilir.

Sulu iki faz ayrışma yöntemi çok yumuşak bir protein saflaştırma yöntemidir; genelde biyolojik aktivitenin bozulması ve kayıp olması görülmemektedir. Muhtemelen bu, yüksek su içeriğinden ve sistemdeki düşük interfaz geriliminden dolayıdır. Bu özellik proteinleri koruduğu gibi, polimerlerin de proteinlerin üzerinde stabilize etme etkisi bulunmaktadır.

Sulu iki faz sisteminin biyolojik uygulamalardaki avantajları şöyle sıralanabilir:

- a) yüksek biyolojik uyum:
 - oldukça düşük interfaz gerilimi;
 - her iki fazın büyük oranda su içeriyor olması;

- polimerlerin protein stabilizasyonunda rol almaları;
- b) yüksek verim;
- c) yüksek kapasite (ağırlıkça %30a kadar katı madde);
- d) kullanılan polimerlerin ve tuzların tekrar kullanılabilmesi;
- e) endüstride kullanma imkanının yüksek olması ve sürekli bir proses haline getirilebilmesi;
- f) başka ayırıştırma yöntemlerinden daha ekonomik olması.

Bütün bu bilgilerin ışığında, mikrobiyal fermentasyonla üretilen ksilanazların saflaştırılması sulu iki faz sistemi kullanarak yapılmış ve ayırıştırma parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır.

2.1.2. Ksilanaz Enzimleri

Ksilan, hemiselülozun önemli bir yapıtaşı olup, bileşenlerine ayırıştırılarak yeniden kullanılabilirlik potansiyelli doğada en yaygın bulunan ikinci kaynaktır (Kulkarni ve ark., 1999). Ksilan, bitki hücrelerinin duvarında bulunan en yaygın polimer olup, kuru ağırlığın %30 ila %35'ini oluşturmaktadır. Heterojen bir yapıya sahip olan ksilanin ana gövdesini β -1,4- glukosidik bağlarla bir araya gelmiş ksiloz yapıtaşları oluşturmaktadır. Ana gövdeye de asetil, arabinozil ve glukoronizil gibi yan gruplar bağlanarak, ksilanın karmaşık yapısını meydana getirirler (Beg ve ark., 2001).

Ksilanın bu heterojen yapısından dolayı, tamamen hirolize edilmesinde birçok enzim rol almaktadır. Ksilanaz kompleksi, β -1,4-endoksilanaz, β -ksilosidaz, α -L-arabinofuranosidaz, α -glukoronidaz, asetil ksilan esteraz ve fenolik asit esteraz gibi değişik özellik ve etki biçimi olan hidrolitik enzimlerden oluşmaktadır. Bütün bu enzimler birlikte çalışarak, ksilanı en küçük yapıtaşlarına ayırırlar. Ksilanaz kompleksinin en önemli enzimi, ksilan molekülünü iç

kısımlarından keserek küçülten ve diğer enzimlerin rahat çalışabilmesini sağlayan endo- β -1,4-ksilanaz (EC 3.2.1.8)'dir.

Ksilanazların dikkatli karşılaştırılması sonucu bu enzimlerin iki ana gruba ayrıldıkları görülmüştür. İlk grup, yüksek moleküler ağırlık ve düşük pI noktasına sahip enzimlerden oluşurken, ikinci grupta düşük moleküler ağırlık ve yüksek pI noktasına sahip enzimler bulunmaktadır. Asidik ve yüksek moleküler ağırlığa sahip ksilanazlar (MA > 30 kDa), daha önce F ailesi olarak tanımlanan glikanaz ailesi 10'a ait oldukları tespit edilmiştir. Bazık ve düşük moleküler ağırlığa sahip ksilanazlar ise, daha önce G ailesi diye tanımlanan glikanaz ailei 11'e ait oldukları bulunmuştur (Biely ve ark., 1997).

Ksilanazlar, bakteri, küf ve aktinomiset gibi birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedirler. Üretilen mikroorganizmaya göre enzimler karakteristik özelliklerinde farklılık gösterirler. Küflerden elde edilen ksilanazlar çalışılmış ve iyi tanımlanmışlardır. *Aspergillus* (Gulati ve ark., 2000), *Trichoderma* (Gomes ve ark., 1992), *Rhizopus* (Bakır ve ark., 2001) ve *Penicillium* (Belancic ve ark., 1995) en fazla çalışılan suşlardandır. Fungal ksilanazların optimum çalışması pH 5'te olurken, bu enzimler pH 2 ila 9 arasında stabil oldukları görülmüştür. Fakat birçok endüstriyel uygulamada, özellikle kağıt sanayiinde, düşük pH optimumu, bir sonraki safhalarda ilave işlemlere gereksinimini ortaya koymaktadır. Öteki yandan, bakteriyel ksilanazların çalışma optimumu, fungal enzimlere göre daha yüksek olduğundan, bakteriyel ksilanazları bu endüstriyel işlemlerde kullanılması daha uygundur (Subramanyan ve Prema, 2000).

Endüstriyel fermantasyonlardaki yüksek uygunabilirliği yüzünden, en fazla çalışılan tür *Bacillus*'tur. Elde edilen yüksek ksilanaz verimi, *Bacillus* türünün endüstriyel uygulamalarda seçilmesinde önemli rol oynamaktadır (Pham ve ark., 1998). Yapılan çalışmalarda, *Bacillus* ksilanazlarının stabilitesinin bazik ortamlarda yüksek olduğu ve pH optimumun 8'i geçmediği görülmüştür. Ayrıca, enzimlerin optimum çalışma sıcaklığı 30 ila 55°C arasında olduğu tespit edilmiştir (Beg ve ark., 2001). Dhillon ve ark. (2000), 80°C'de çalışan *Bacillus* ksilanazları çalışmışlardır, ve termofilik suşların da bulunduğunu ifade etmişlerdir.

Ksilanaz üretiminde kullanılan diğer bir mikroorganizma *Rhizopus oryzae*'dir (Bakir ve ark., 2001). İpliksi bir küf olan *R. oryzae*, birçok enzim, laktik asit ve kitozan üretimi gibi geniş endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. L(+) laktik asit *R. oryzae* fermentasyonu ile ticari olarak üretilmektedir. Birçok bakterinin aksine, *R. oryzae* minimal besi ortamında büyümektedir, başka bir deyişle kompleks azot birleşenlere ihtiyaç duymamaktadır. Bunun sonucunda, elde edilen ürünün geri alımı ve saflaştırması göreceli olarak daha ekonomik olmaktadır.

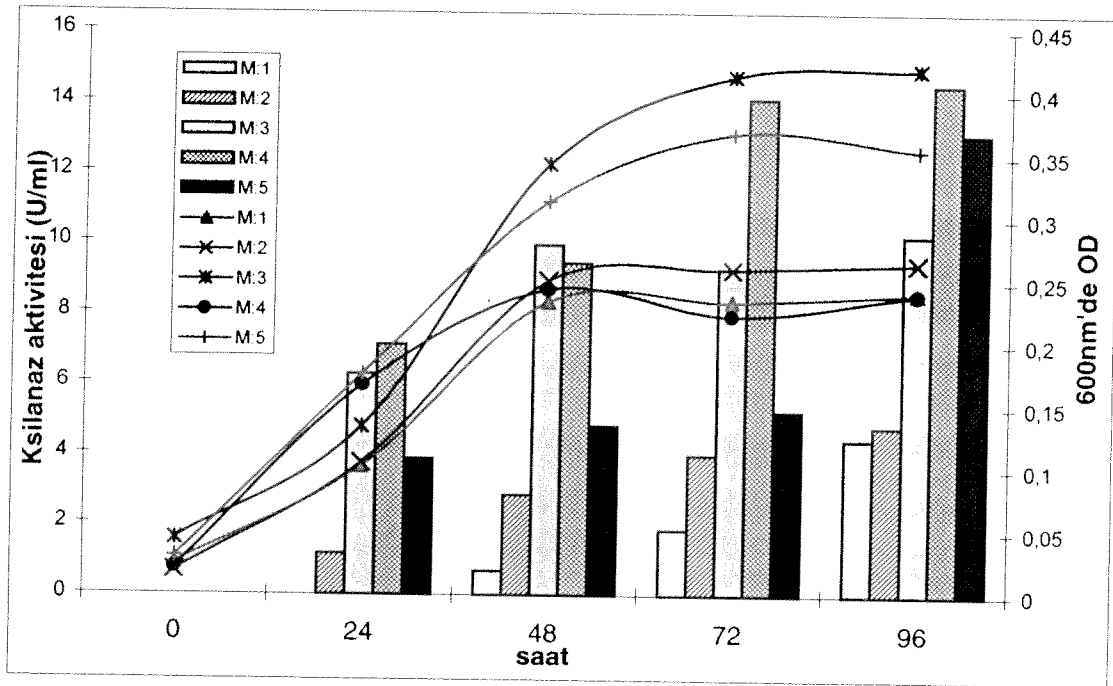
Ksilanazlar, endüstriyel proseslerde potansiyel biyoteknolojik uygulama alanlarından dolayı son on yılda oldukça dikkat çekmişlerdir. Birçok amaçla endüstriyel olarak üretilip kullanılmaktadırlar. Bu amaçlardan bazıları, ksilanın monomeri olan ksiloz haline dönüştürerek kullanırlığı olan bir ürün haline getirilmesi, tekstil endüstrisinde doğal ipliklerin yumuşaklığının artırılması, kağıt sanayiinde kağıt hamurunun beyazlatılması, gıda sanayiinde, meyve suyunun berraklığının artırılması, ekmek hamurunun yumuşaklığının artırılarak ekmek hacminin yükseltilmesi ve bayatlamının geciktirilmesi, yem sanayiinde de yemin besin değerini yükseltilmesi olarak sayılabilir.

2.2. Deneysel Çalışmalar

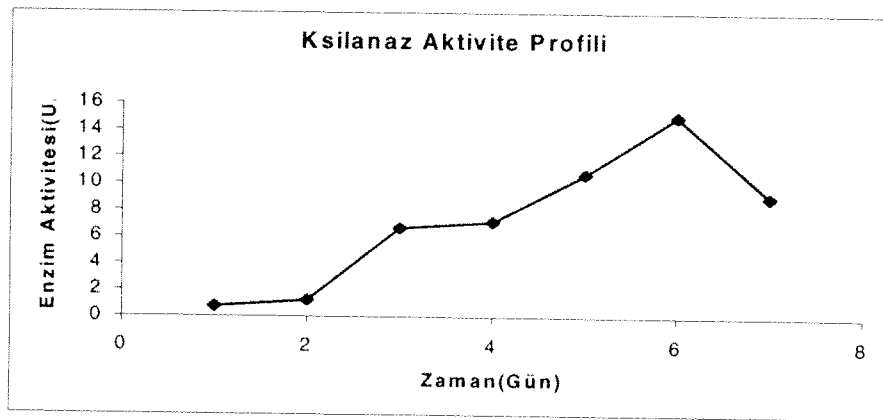
2.2.1. Ksilanaz Üretimi

Araştırmamıza ksilanaz enzimi üretim çalışmaları ile başlandı. Bu işlem iki değişik biyolojik sistem kullanarak yapıldı. Birincisi topraktan daha önce izole ettiğimiz *Bacillus* suşları, ikincisi ise yine daha önce ksilanaz aktivitesini belirlediğimiz *Rhizopus oryzae* küfü ile enzim üretim çalışmaları yapıldı. *Bacillus* suşlarını seçmemizin sebebi, bu mikroorganizmaların ksilanaz enzimlerinin optimal pH'larının bazik olması dolayısı ile kağıt sanayiinde kağıt hamurunun beyazlatılmasında kullanılabilmesi; *R. oryzae*'nin seçilmesinin nedeni ise gıda sanayiinde rahatça kullanılabilen güvenli bir mikroorganizma olmasıdır.

Değişik *Bacillus* izolatları ve *Rhizopus oryzae* küfü ile yapılan fermentasyon çalışmaları sonucu, mikroorganizmaların üreme eğrileri çizildi ve enzim aktivitesi değerleri bulundu. *Bacillus* izolatları 2. veya 3. günde durağan faza girerken, en yüksek enzim aktivite 3. günde ölçüldü. 4 numaralı *Bacillus* izolatının aktivite değeri en yüksek olup, 16 U/ml olarak bulundu (Şekil 1). *Rhizopus oryzae* küfünün 7 günlük fermentasyonu sonucu, en yüksek aktivite 15 U/ml olarak 6. günde ölçüldü (Şekil 2).



Şekil 1. *Bacillus* izolatlarının büyüme eğrileri ve ksilanaz aktiviteleri (Çizgiler: büyüme eğrileri, Sütunlar: enzim aktiviteleri, M: mikroorganizma)



Şekil 2. *Rhizopus. oryzae* fermentasyonu ksilanaz üretim grafiği

Çalışmada enzim aktivitesini tayin eden iki yöntem kullanıldı. Her iki yöntem ksilanazın substrat (ksilan) ile girdiği tepkime sonucu açığa çıkan indirgeyici şekerleri ölçen metodlardır.

Bir ksilanaz aktivitesi birimi (U), dakikada 1µmol ksiloz eşdeğerlerini 40°C'lik reaksiyon koşullarında üreten enzim miktarı olarak tanımlandı. Bu aşamada ksilanaz aktivitesi *Bacillus* fermentasyonlarında Nelson-Somogyi metodu kullanılarak *Rhizopus oryzae* fermentasyonunda ise DNS metodu ile hesaplanmıştır. Nelson-Somogyi metodunun kimyasalları sulu iki faz sisteminde bulunan polietilen glikol ile etkileşimde bulunduğundan, ayırma çalışmalarının hepsinde DNSA metodu kullanıldı. Enzim örneklerinin protein konsantrasyonu ise Bradford'un (1976) geliştirdiği yöntem kullanılarak ölçüldü.

2.2.2. Sulu İki-faz Ekstraksiyon Çalışmaları

Enzim ayırması çalışmalarında 6 parametrenin etkisi incelendi. Bu parametreler, ayırma sıcaklığı, sulu iki faz sisteminin kompozisyonu, sistemde kullanılan polietilen glikolün (PEG) molekül ağırlığı, sistemin iyonik gücü, kullanılan tuz çeşidi ve ortamın pH'sı olarak sıralanabilir.

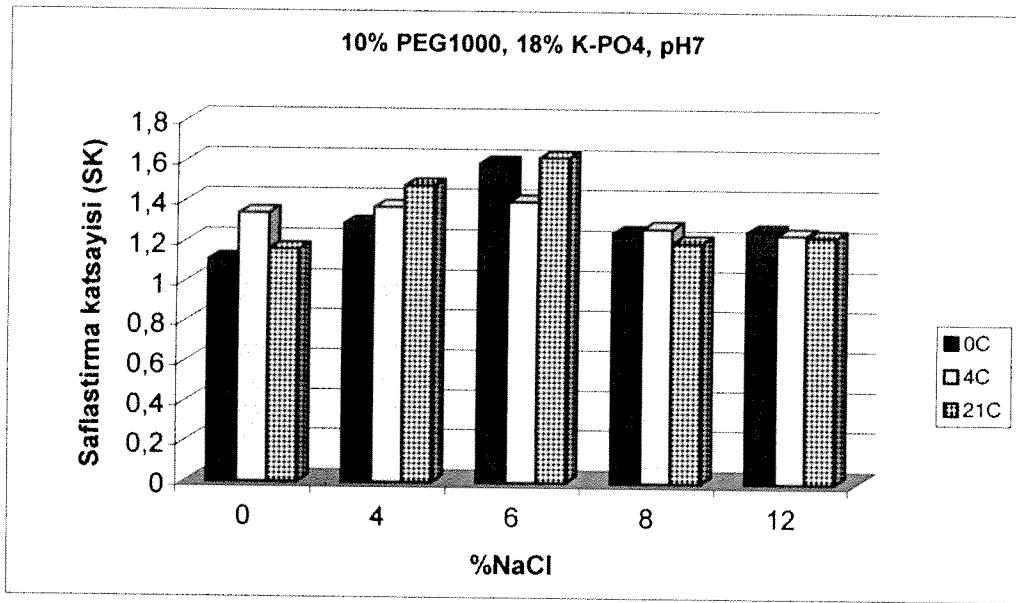
2.2.2.1. Sıcaklığın enzim özütlemesine olan etkisi

Ayırma işlemleri 3 değişik sıcaklıkta denendi. 0°C, 4°C ve 21°C'de (oda sıcaklığı) gerçekleştirilen işlemler sonucu, sıcaklığı enzimin ayırmasında önemli bir etkisi olmadığı tespit edildi (Tablo 1, Şekil 3 ve 4). Ksilanazların oda sıcaklığında aktivitelerinin azalmadığı göz önünde bulundurularak, daha sonraki ayırma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmasına karar verildi. Bu kararın ekonomik olarak da uygun olduğu söylenebilir. Göreceli olarak daha yüksek veya düşük sıcaklarda çalışmanın, ısıtmak veya soğutmak için ayrıca ek bir maliyet gerektireceği açıktır.

Tablo 1. Sıcaklığın ayırmaya etkisi

	Sıcaklık		
	0°C	4°C	21°C
Saflaştırma katsayısı (SK)	1.3	1.2	1.2
Konsantrasyon oranı (KO)	1.0	1.0	1.4

Sistem: %10 PEG 1000, %18 potasyum fosfat, %12 NaCl, pH7

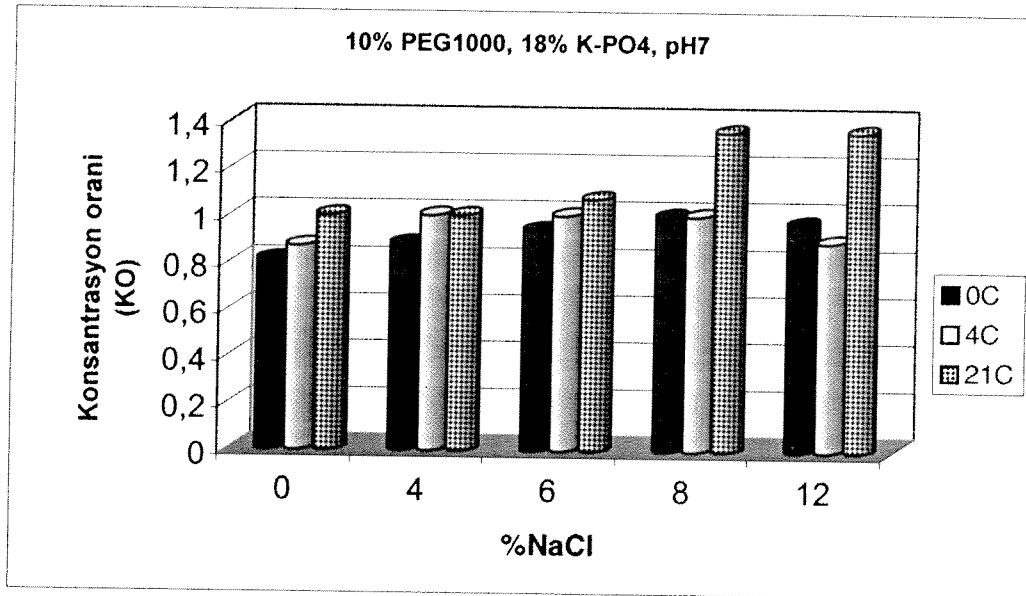


Şekil 3. Sıcaklığın saflaştırma katsayısına (SK) etkisi

Şekil 3'de görüldüğü gibi en yüksek saflaştırma katsayısı, 21°C'de %6 NaCl içeren sulu iki faz sisteminde 1.6 olarak hesaplandı.

Şekil 4'de yüksek sıcaklıkta ayrıştırılan örneklerin konsantrasyon oranlarında kayda değer bir artış gözlenmektedir. Ksilanaz enzimi PEG'ce zengin faza ayrıştığı görülmektedir, böylece sıcaklık artışında azalan üst faz hacmi enzimin daha da konsantre hale gelmesini

sağlamaktadır. Aradaki küçük farka rağmen, bu etki 0° ile 4 °C arasında da gözlemlenmektedir.



Şekil 4. Sıcaklığın konsantrasyon oranına (KO) etkisi

Yukarıdaki grafiklerde değişik tuz konsantrasyonlarının etkisi de görülmektedir. Belli bir eğilim görülmemesine rağmen, ayrışma sürecinde iyonik geriliminin de etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen verilere göre %6'lık NaCl sisteminde en yüksek saflaştırma değerine ulaşıldığı görülmektedir. Tuz derişiminin ve çeşidinin ayrışmaya etkisi daha sonraki aşamalarda detaylı olarak verilmiştir.

2.2.2.2. Sulu İki-faz Sisteminin Kompozisyonunun Enzim Özütlemesine Olan Etkisi

Polimer konsantrasyonunun artışı, sulu iki faz sisteminin kritik noktadan uzaklaştırarak, iki faz arasındaki gerilimin artmasına sebep olmaktadır, bu da ortamdaki partiküllerin interfazda birikmesine yol açmaktadır (Albertsson, 1986). Çalışmamızda, ksilanazların üst faza ayrıştıkları görüldü. Bu nedenle, enzimleri üst fazda konsantre etmek ve interfazda

birikmelerini önlemek için, , binodiyal eğrinin alt kısımlarında kritik noktaya yakın, düşük polimer konsantrasyonu içeren sistemler oluşturuldu.

Moleküler ağırlıkları 1000 ve 4000 olan iki polietilen glikol polimeri kullanıldı. Üç PEG1000 konsantrasyonu araştırıldı: %5.6, 7 ve 10. Üst fazın oldukça küçülmesi ve çalışmanın mümkün olmaması dolayısıyla daha yüksek değerler incelenmedi. Sulu iki faz sistemleri oda sıcaklığında ayrıştırıldı. PEG1000 derişiminin saflaştırma katsayısına (SK) ve konsantrasyon oranına (KO) negatif etkisi olduğu görüldü (Tablo 2, Şekil 5 ve 6).

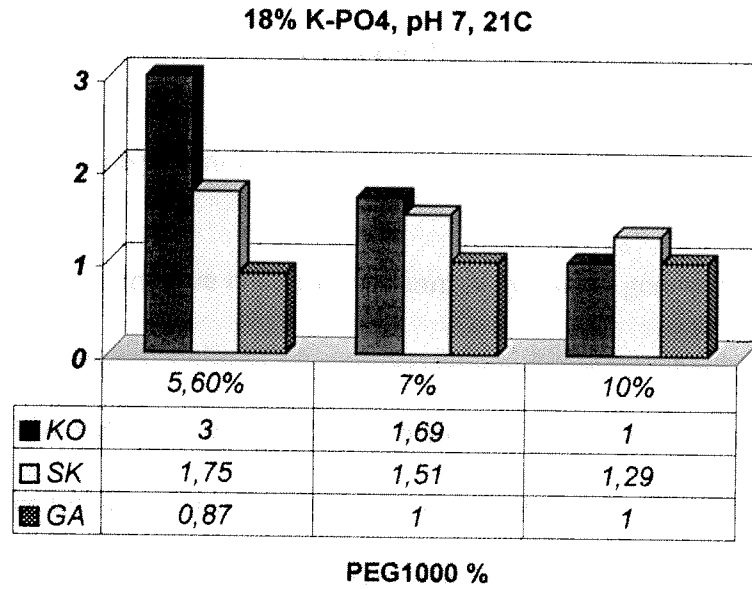
Artan PEG1000 konsantrasyonu, üst fazın hacminin artmasına sebep olarak, o fazlardaki enzimin seyrelmesine neden olduğu anlaşılmaktadır. Her ne kadar sistemler binodiyal eğrinin çok yakınında olacak şekilde oluşturulmuş olsa da, fazlar arasında çökelti katmanı (interfaz oluşumu) gözlemlendi. %5.6 PEG1000 içeren sistemde enzim geri alımında (GA) ufak bir düşüş olması bu interfaz çökmesi ile açıklandı.

PEG1000'deki eğilim PEG4000 ile yapılan ayrışmada da gözlemlendi. Bir başka değişle, artan polimer derişimi azalan konsantrasyon oranı ve saflaştırma katsayısıyla sonuçlandı. PEG1000 içeren sistemlerin aksine PEG4000'li sistemlerde polimer konsantrasyonu arttıkça enzim geri alımı oldukça düştü Bu olayın nedeni artan moleküler ağırlıklı polimer ortamında proteinlerin interfazda daha çok birikmesi ve bozulması olabilir.

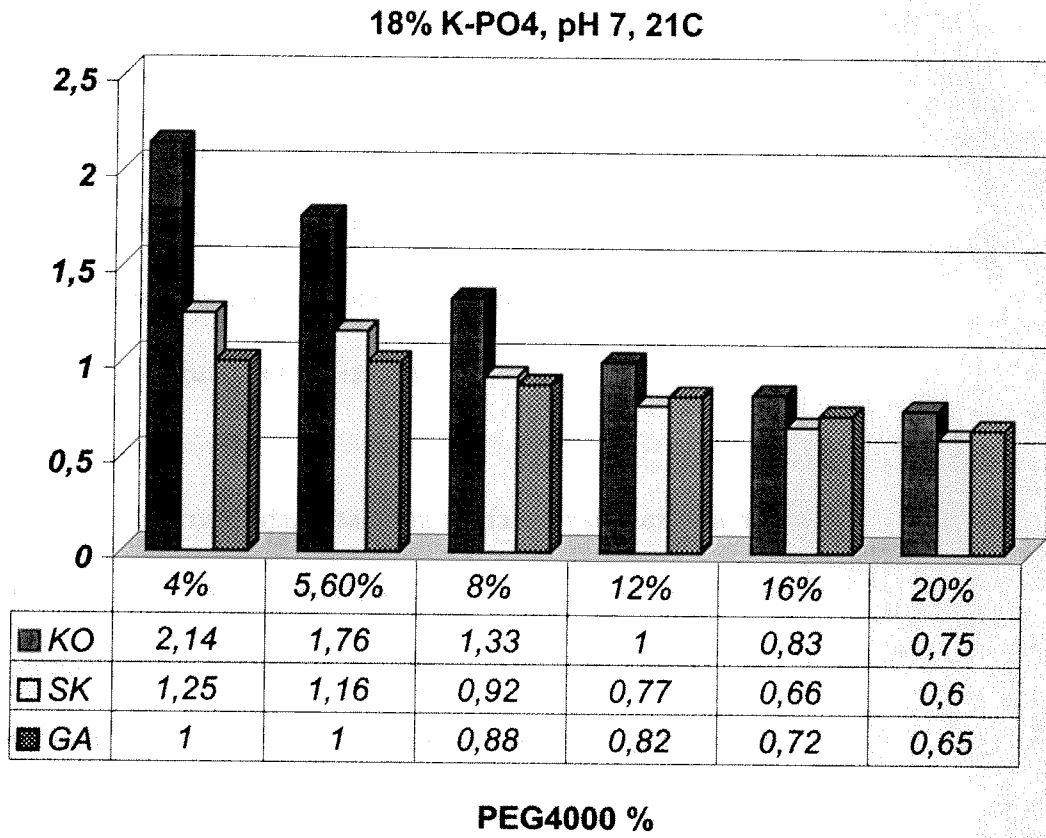
Tablo 2. Polimerin molekül ağırlığı ve derişiminin ayrışmaya etkisi

Polymer	%PEG	Saflaşma katsayısı (SK)	Konsantrasyon oranı (KO)	Üst fazda % enzim geri alımı (GA)
PEG 1000	4		İki faz oluşmadı	
	5.6	1.8	3	87
	7	1.6	1.7	100
	10	1.3	1.0	100
PEG 4000	4	1.2	2.1	100
	5.6	1.2	1.8	100
	8	0.9	1.3	88
	12	0.8	1.0	82
	16	0.7	0.8	72
	20	0.6	0.8	65

Sistem: %18 potasyum fosfat, pH 7, oda sıcaklığında ayrıştırılmış



Şekil 5. PEG1000 konsantrasyonunun etkisi



Şekil 6. PEG4000 konsantrasyonunun etkisi

Pan ve ark. (2001) artan polimer ve tuz derişimlerinin β -xylosidaz geri alımını oldukça düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Polimer konsantrasyonunu iki katına çıkarmak enzim geri alımını %89.4'ten %28.3'e düşürdüğünü ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, polimerin 4 katlık bir artışı bile enzim ayrışmasına bu kadar ters etki yaratmadı. PEG1000'li sistemde olduğu gibi, en iyi sonuçlar düşük polimer içeren sistemlerde elde edildi.

2.2.2.3. İyonik Gücün enzim Özütlemesine Olan Etkisi

Sulu iki faz sistemlerine tuz ilave ederek iyonik gücün değiştirilmesi, yüklü moleküllerin ayrışmasına önemli derecede etki etmektedir (Albertsson, 1986). Tuz iyonlarının çeşidi ve enzimin yüzey özelliklerine bağlı olarak, tuzun ayrışmaya etkisi değişmektedir (Johansson, 1986). Costa ve ark. (1998), Duarte ve ark. (1999) ve Franco ve Bim (2000) NaCl varlığının ksilanaz ayrışmasına etkisini inceleyerek, artan tuz derişiminin enzimin saflaştırılmasında pozitif etkisi olduğunu belirtmişlerdir

Çalışmamızın bu kısmında, amacımız üst fazda ksilanazlarla birlikte toplanan istenmeyen proteinleri NaCl ve KI ilavesiyle alt faza uzaklaştırmaktı. Bu amaçla, en iyi sonuçları veren faz kompozisyonları kullanıldı. %4'lük PEG1000 sistemi ikili faz oluşturmadığından her iki polimer için %5.6'luk derişim, %18 potasyum fosfat, pH 7 ve oda sıcaklığında çalışıldı (Tablo 3). PEG1000 örneklerinde konsantrasyon oranı, NaCl varlığında düştüğü fakat tuz derişimin artmasıyla sabit kalarak daha fazla etkilenmediği görüldü. Aynı örneklerde artan NaCl derişimi saflaştırma katsayısını az da olsa düşürdüğü tespit edildi. PEG 1000 içeren sulu iki faz sisteminde KI varlığı da benzer etkiler gösterdi; konsantrasyon oranını düşürürken saflaştırma katsayısına da olumsuz etkisi bulundu.

Tablo 3. Tuz çeşidinin ve derişiminin ayrışmaya etkisi

Polimer	Tuz çeşidi	% Tuz derişimi	SK	KO	Üst fazda % enzim GA
PEG1000	NaCl	0	1.8	3.0	87
		3	2.0	1.8	100
		6	1.6	1.9	95
		9	1.6	1.9	100
		12	1.5	1.9	97
	KI	0	1.8	3.0	87
		3	1.5	1.9	100
		6	1.4	1.9	100
		9	1.6	1.8	100
		12	1.6	2.0	100
PEG 4000	NaCl	0	1.2	1.8	100
		3	1.2	2.0	100
		6	1.4	2.0	100
		9	1.1	2.1	100
		12	1.3	2.1	100
	KI	0	1.2	1.8	100
		3	1.8	2.0	100
		6	2.2	2.0	100
		9	2.5	2.0	100
		12	2.3	2.0	100

Sistem: %18 potasyum fosfat, pH 7, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

PEG4000 içeren örneklere gelince, tuz ilavesi ksilanazların konsantrasyon oranlarını arttırdı. Saflaştırma katsayısı NaCl ilavesiyle önemli derecede etkilenmezken, artan KI miktarıyla yükselerek %9 KI derişiminde en yüksek değerine ulaştı. Deneilerin neredeyse tamamında ksilanazlar eksiksiz üst fazda geri alındı.

Daha önceki çalışmalarda, düşük polimer derişimli örnekler daha iyi saflaştırma sonuçları vermişlerdi (Tablo 2). PEG4000 seçilerek, düşük derişimli faz bileşenleri içeren sulu iki faz sisteminin verimi araştırıldı. %3.5 PEG4000 ve %14 potasyum fosfattan oluşan pH 7'deki sistem çalışmak için uygun bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. Düşük polimer miktarı içeren sistemdeki tuz çeşidi ve derişimin ayrışmaya etkisi

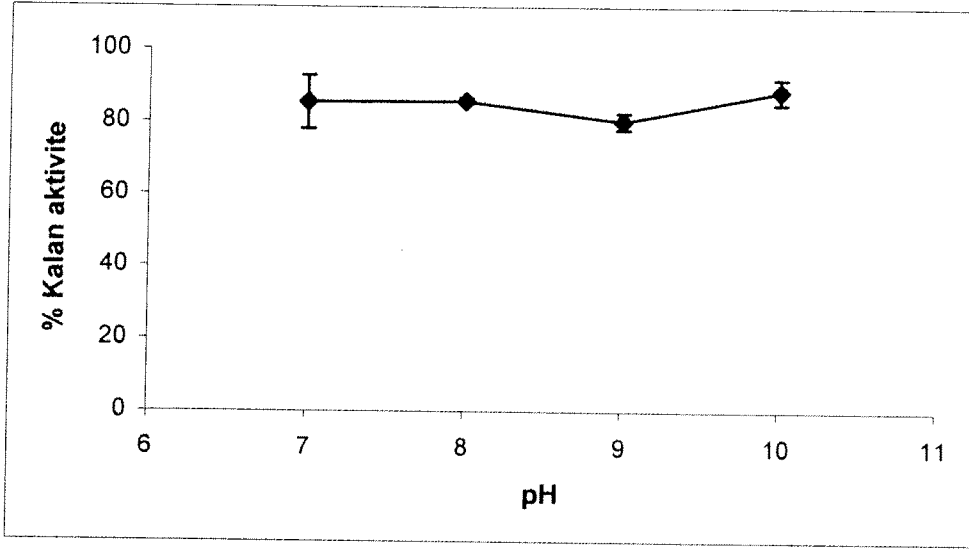
Polymer	Salt type	% Salt concentration	PF	CR	%ER in the top phase
PEG 4000	NaCl	0	1.0	3.8	51
		3	1.9	3.1	74
		6	2.0	3.5	90
		9	2.0	3.8	83
		12	1.4	4.0	63
	KI	0	1.0	3.8	51
		3	3.1	4.4	35
		6	3.4	4.4	40
		9	4.2	4.0	51
		12	3.7	4.4	44

Sistem: %3.5 PEG 4000, %14 potasyum fosfat, pH 7, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

NaCl derişimindeki artış ksilanazların saflaşma katsayısını yükseltirken, konsantrasyon oranında dalgalanmalara sebep oldu. KI ilavesi ise saflaştırma katsayısı ve konsantrasyon oranına önemli bir artış sağladığı görüldü. Her iki tuzun, KO ve SK değerlerini önceki deneylere göre nerdeyse iki kat arttırdığı tespit edildi. Bu iki faz sisteminde beklenmedik bir şekilde enzim geri alımında düşüş tespit edildi. Alt fazda ksilanaz aktivitesi görülmediğinden, enzimlerin interfazda biriktiği anlaşıldı. Bunun gibi düşük polimer ve tuz derişiminde oluşturulan iki faz sisteminde, fazlar arası gerilim göreceli olarak düşük olduğundan, interfazda enzim birikmesi beklenmedik bir olaydır.

2.2.2.4. pH'in Enzim Özütlemesine Etkisi

Ayrışma işlemlerine bazik pH'da başlamadan önce, ksilanazların 7 – 10 pH aralığında stabilitesi ölçüldü. Gerekli tampon çözeltilerde 0°C'de 18 saat bekletildikten sonra enzim aktivitesinde önemli bir düşüş tespit edilmedi. 18 saatlik stabilite çalışmalarının sonunda, ksilanaz aktivitesinin %80'den fazlası korunarak enzimin yüksek pH değerlerine olan dayanıklılığı saptandı (Şekil 7)



Şekil 7 Ksilanazların bazik pH'lardaki stabilitesi

Bilindiği üzere proteinler yüklü moleküllerdir, ve ortamın pH'sının farklı olması, sulu iki faz sisteminin kompozisyonunu değiştirdiği gibi, proteinlerin yüzeyinde bulunan iyon gruplarını da etkilemektedir (Costa ve ark., 2000). Farklı pH değerlerinden doğan etkilerin tahmin edilmesi zor olmakla beraber, genelde yüksek pH'ın ayrışma katsayısını yükselttiği ifade edilmektedir (Menge, 2000). Sulu iki faz sisteminin ayrışmasına pH'ın etkisini incelemek için fosfat stok çözeltilerinin oranları değiştirilerek 7 ve 10 aralığında pH değerleri ayarlandı. %5.6 PEG4000-%18 fosfat çözeltisi-%9 KI içeren ve oda sıcaklığında ayrıştırılan sistem kullanarak yapılan deneyler sonucu, artan pH'ın giderek artan konsantrasyon oranına neden olduğu görüldü. Saflaştırma katsayısı pH 8.5'te en yüksek değerine (SK=3) ulaşırken, enzim geri alımı yüksek pH değerleri ile oldukça düştüğü gözlemlendi (Tablo 5). Yüksek pH'da ortamdaki polimer, iyonlar ve proteinler arası karmaşık etkileşimler enzimlerin geri dönüşümü olmayan bozulmasına neden olması enzim geri alımını düşürmüş olabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, düşük derişimli sulu iki faz sistemi daha iyi ayrışma sonuçları vermişti. Bu

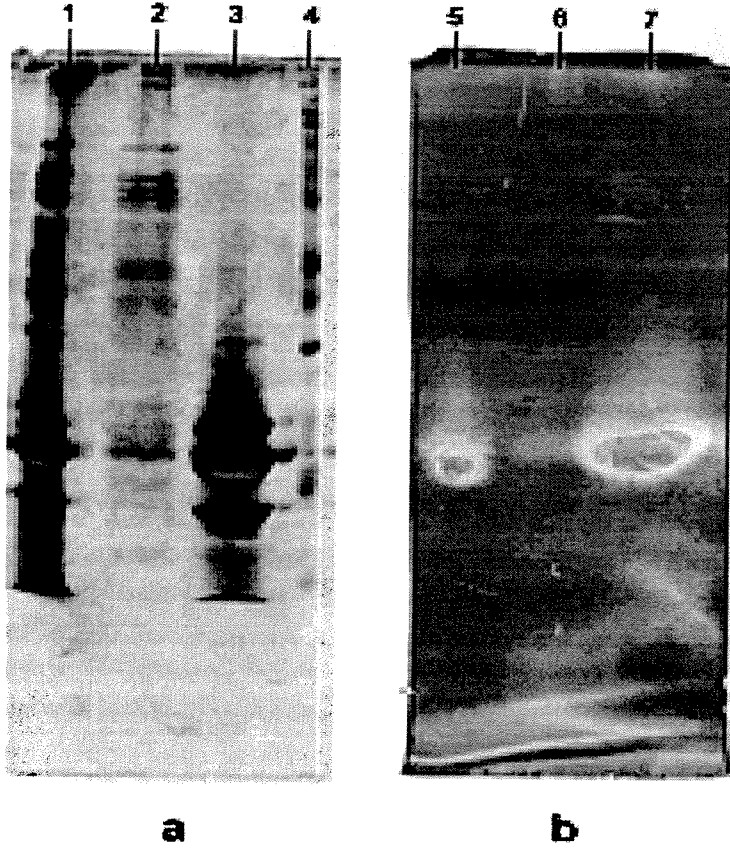
nedenle, pH etkisi %3.5 PEG4000-%14 fosfat çözeltisi-%9 KI içeren ve oda sıcaklığında ayrıştırılan sistem üzerinde de incelendi. Düşük enzim geri alımına rağmen, en yüksek saflaştırma katsayısı (SK=5) ve konsantrasyon oranı (KO=10) bu sistemle pH 9'da elde edildi (Tablo 5).

Tablo 5. pH'in ayrışmaya etkisi

Faz kompozisyonu	pH	SK	KO	%GA
%5.6 PEG 4000 – %18 potasyum fosfat – %9 KI	7	2.5	2.0	100
	8	2.9	2.2	100
	8.5	3.0	2.7	76
	9	2.5	4.3	36
%3.5 PEG 4000 – %14 potasyum fosfat- 9% KI	7	4.2	4.0	51
	8	2.2	8.0	38
	8.5	4.4	6.7	47
	9	5.0	10.0	34

Sistem: oda sıcaklığında ayrıştırılmış

Bu sonucu daha iyi görebilmek için SDS-PAGE ve enzim aktivitesi boyamaları yapıldı. Jel görüntüsünden yüksek moleküler ağırlığındaki partiküllerin çoğu alt faza geçerken daha düşük moleküler ağırlıklı proteinler üst fazda toplandığı tespit edildi. Ksilanazları ayırt edebilmek için jel aktivite boyaması işleminden geçirilerek, ortaya çıkan renksiz bölgelerle enzim bantları tanımlandı. Üst fazda ksilanaz aktivitesi görülürken, alt fazda enzim olmadığı anlaşıldı. Aktivite boyaması yapılan jeldeki ksilanaz bantları SDS-PAGE jeli ile karşılaştırılınca, enzimin düşük moleküler ağırlıktaki proteinlerden oluştuğu ortaya çıktı (Şekil 8). Bu sonuç, enzimin kağıt endüstrisinde kullanılabilirliğini pekiştirdi, çünkü Franco ve Bim (2000) düşük molekül ağırlıklı ksilanazların pulp lifleri arasında dağılmasının gerekliliğini ifade etmişlerdir.



Şekil 8. Ksilanazların SDS-PAGE analizi (a) ve aktivite boyaması (b) of xylanases. Kolonlar: 1-ham örnek, 2-alt faz, 3- üst faz, 4- marker, 5- ham örnek, 6- alt faz, 7- üst faz
Sistem: %3.5 PEG 4000, %14 potasyum fosfat, %9 KI, pH 9, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

2.2.2.5. Microorganizma Ayrımı Yapmadan Enzim Özütlemesi

Olağan protein saflaştırma işlemleri, hücre ayırımı, tuz çökeltmesi ve değişik kolon kromatografileri gibi adımları gerektirir. Enzim aktivitesinde her adımda kaçınılmaz bir şekilde düşme görülmektedir. Ayrıca, proteinleri çöktürmek için büyük miktarda amonyum sülfat gerektirirken, bazen yüksek tuz derişimi enzimlerin deaktive olmasına neden olmaktadır (Pan ve ark., 2001). Alternatif olarak, etanol ve aseton gibi, ortamın polaritesini düşürerek proteinlerin çökmesine neden olan, organik çözücüler kullanılmaktadır. Fakat bu çözücülerin biyomoleküllerle olan uyumsuzluğu kullanım alanlarını oldukça daraltmaktadır. Daha önce bahsetildiği gibi, sulu iki faz sistemleri hassas moleküllerin bozulmasını

engellemektedirler. Ayrıca, sulu iki faz sistemi proteinleri ekstrakte edip, diğer partiküllerden ayırdığından, saflaştırmadaki ilk aşamalarını içermektedir; buna ek olarak, sofistike aletlere gerek kalmaksızın verimli çalışabilmekte ve kolayca ölçeklendirilerek endüstriyel olarak kullanılabilir (Franco ve Bim, 2000).

Bu nedenler göz önünde tutularak, mikrobiyal hücreleri ihtiva eden ham ortamdan, sulu iki faz sistemi kullanarak, ksilanazlar ayrıştırılmaya çalışıldı. İşlem sonunda hücrelerin interfazda biriktiği ya da alt fazda toplandığı görüldü. Mikroskopik inceleme sonucunda, üst fazda hücre bulunmadığı görüldü. Aynı zamanda alt fazda ksilanaz aktivitesi tespit edilmediğinden, enzimlerin seçici olarak üst faza çekildiği veya interfazda biriktiği anlaşıldı. Ham ortamın sulu iki faz sisteminde ayrışması sonucu, ksilanazlar %70 geri alımla 6 kat saflaştırılıp, 4 kat konsantre edildi (Tablo 6). Bu sonuçlar, sulu iki faz sisteminin ham fermentasyon ortamından ksilanazların ilk-kısmi saflaştırma işlemi için oldukça uygun olduğunu gösterdi.

Tablo 6. Ham fermentasyon ortamındaki *Bacillus* ksilanazlarının ayrışma sonuçları

	Hacim [ml]	[prot] [mg/ml]	toplam. prot [mg]	[akt] [U/ml]	topl.akt [U]	sp.akt [U/mg]	SK	KO	%GA
İlk örnek	16.0	0.61	9.76	98.04	1568.64	160.72	1.0		
Üst faz	4.0	0.25	1.00	269.80	1079.20	1079.20	6.7	4.0	68.8
Alt faz	29.0	0.11	3.19	0	0	0	0		0

Sistem: % 3.5 PEG4000, %14 K-PO₄, %9 KI, pH 9, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

2.2.2.6. *Rhizopus oryzae* Ksilanaz'ının Özütlenmesi

Farklı mikrobiyal kaynaklı ksilanazların yapılarında değişiklik olabileceği daha önce ifade edilmişti. Bu nedenle *Rhizopus oryzae* küfünden elde edilen ksilanazlar sulu iki faz sistemiyle ayrıştırıldı.

İki su fazlı ayırım işlemlerinde enzim aktivitelerini daha kolay ölçebilmek için fermentasyondan sonra elde edilen enzim ultrafiltrasyon yöntemiyle konsantre edildi. Ultrafiltrasyon işleminde mol ağırlığı 10 kDa'dan daha büyük molekülleri tutabilen bir membran kullanılmıştır.

Tablo 7: Konsantrasyon ve saflaştırma tablosu

	Hacim (ml)	Enz.akt. (U/ml)	Prot. Konst. (mg/ml)	Sp.akt. (U/mg)	Verim %	Saflik katsayi
Ham Enzim	50	15.07	3.2	4.71	100	1
Konsantre Enzim	10	54.60	5.1	10.71	72.46	2.27

Tablo 7'den de görüldüğü gibi ultrafiltrasyon işlemi sonucunda enzimin yaklaşık % 75'lik bir bölümü alındı ve enzim 2 kat saflaştırıldı.

Özütleme deneylerinde iki farklı polimer/fosfat tuzu kompozisyonunda %9 KI eklenerek ve eklenmeden yapılan ekstraksiyon sonucu, en iyi sonuç % 4.7 PEG4000, %20.3 K-PO₄, %9 KI eklenmesi ile yapılan sistemde elde edildi (Tablo 8). Oda sıcaklığında ayrıştırılmış ksilanazların %85 geri alımla üst faza toplandı ve başarıyla 111 kat saflaştırılıp 6 kat konsantre edildi. *Bacillus* ksilanaz ayrıştırılmasında başarılı sonuçlar elde edilen %3.5 PEG4000, %14 K-PO₄, %9 KI sisteminde iyi sonuçlar elde edilemedi. Bu da enzim molekülünün yapısının ayrıştırma için önemli olduğunu gösterdi.

Tablo 8. *Rhizopus oryzae* ksilanazlarının sulu iki faz sistemi ile ayrıştırılma sonuçları

	Hacim [ml]	[prot] [mg/ml]	toplam. prot [mg]	[akt] [U/ml]	topl.akt [U]	sp.akt [U/mg]	SK	KO	%GA
İlk örnek	5.0	0.058	0.29	0.1	0.5	1.72	1.0	1.0	100
Üst faz	1.2	0.0258	0.031	0.092	0.11	3.55	2.06	4.17	20
Alt faz	8.1	0.017	0.14	0.049	0.4	2.86	1.66	0.62	80

Sistem: % 3.5 PEG4000, %14 K-PO₄, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

	Hacim [ml]	[prot] [mg/ml]	toplam. prot [mg]	[akt] [U/ml]	topl.akt [U]	sp.akt [U/mg]	SK	KO	%GA
İlk örnek	5.0	0.058	0.29	0.1	0.5	1.72	1.0	1.0	100
Üst faz	1.1	0.0014	0.0015	0.074	0.082	54.67	31.78	4.54	16.4
Alt faz	7.3	0.0092	0.067	0.02	0.15	2.24	1.3	0.68	30

Sistem: % 3.5 PEG4000, %14 K-PO₄, KI, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

	Hacim [ml]	[prot] [mg/ml]	toplam. prot [mg]	[akt] [U/ml]	topl.akt [U]	sp.akt [U/mg]	SK	KO	%GA
İlk örnek	5.0	0.316	1.58	0.37	1.85	1.17	1.0	1.0	100
Üst faz	0.8	0.063	0.0504	2.35	1.88	37.3	31.88	6.25	100
Alt faz	8.0	0.0275	0.22	0	0	0	0	0	0

Sistem: %4.7 PEG4000, %20.3 K-PO₄, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

	Hacim [ml]	[prot] [mg/ml]	toplam. prot [mg]	[akt] [U/ml]	topl.akt [U]	sp.akt [U/mg]	SK	KO	%GA
İlk örnek	5.0	0.316	1.58	0.363	1.815	1.15	1.0	1.0	100
Üst faz	0.8	0.015	0.0122	1.948	1.558	127.7	111.04	6.25	85.8
Alt faz	7.0	0.0126	0.088	0	0	0	0	0	0

Sistem: % 4.7 PEG4000, %20.3 K-PO₄, KI, oda sıcaklığında ayrıştırılmış

3. SONUÇ

Topraktan, iyi ksilanaz aktivitesi ve enzim stabilitesine sahip olan *Bacillus* suşları izole edildi. Yapılan fermentasyon çalışmalarında *Bacillus* izolatlarının en yüksek ksilanaz miktarını durağan fazda, özellikle 3. günde, ürettikleri bulundu. *Rhizopus oryzae* küfü ise en yüksek ksilanaz aktivitesini 6. fermentasyon gününde gösterdi. Sıvı fermentasyon ortamındaki ksilanazlar, polietilen glikol ve potasyum fosfat çözeltisi içeren sulu iki faz sistemi kullanılarak ekstrakte edildiler. Sıcaklık, sistem kompozisyonu, kullanılan polimer molekül ağırlığı ve derişimi, iyonik gerilim ve pH gibi parametrelerin, enzimin ayrışmasına etkileri incelendi. Sıcaklığın ekstraksiyon işlemine önemli bir etkisi olmadığı görülerek, daha sonraki çalışmalar oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Yüksek polimer derişimleri, düşük saflaştırma ve konsantrasyon oranlarına neden oldu. Eşit miktarda PEG1000 ve PEG4000 kullanıldığında, ilk polimerin daha iyi sonuç vermesine karşın, ikinci polimer ile daha da düşük derişimli sistemler oluşturulabildiğinden ve bunların daha iyi sonuç verdiğinden ileriki aşamalarda PEG4000 tercih edildi. PEG1000 içeren sistemlere NaCl ve KI eklenmesi saflaştırma ve konsantrasyon oranlarını düşürdüğü gözlemlendi. Öteki yandan, PEG4000 içeren sistemler NaCl ilavesinden önemli derecede etkilenmezken, KI varlığı saflaştırma ve konsantrasyon değerlerinin artışına sebep oldu. %3.5 PEG4000, %14 potasyum fosfat ve %9 KI içeren, pH'sı 9 olan ve oda sıcaklığında ayrıştırılan sistem enzim saflaştırma çalışmalarında 10 kat konsantrasyon ve 5 kat saflaştırma oranlarıyla en iyi sonuçları verdi. SDS-PAGE ve enzim aktivitesi boyama işlemleriyle ksilanazların seçici olarak sadece üst fazda toplandığı ve enzimin düşük moleküler ağırlığına sahip olduğu belirlendi. Mikrobiyal hücre ihtiva eden fermentasyon ortamı ile yapılan sulu iki faz sisteminde, bakteri hücreleri üst fazdan tamamen uzaklaştırılarak ksilanazlar % 70 geri alım, 6 kat saflaştırma ve 4 kat konsantrasyon oranlarıyla tek adımda başarılı bir şekilde ekstrakte edildiler. Farklı mikrobiyal kaynaklı

ksilanazların sulu iki faz sistemindeki dağılımını görmek için, *Rhizopus oryzae* küfünden elde edilen enzimler ayrıştırıldı. %4.5 PEG4000, %20.3 ve KI içeren sistemle ksilanazlar 111 kat saflaştırılarak ve 6 kat konsantre edilerek üst faza toplandı.

Ksilanazların sulu iki faz sistemiye ayrıştırılması ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu araştırmalarda oldukça farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Duarte ve arkadaşları (1999) *Bacillus pumilis*, Pan ve Li (2001) *Trichoderma koningii* fermentasyonu ile üretilen ksilanazlarla çalışarak, enzimleri alt faza 57 ve 33 saflaştırma katsayılarıyla ayrıştırmayı başarmışlardır. Öte yandan, Kulkarni ve ark. (1999), Jain ve Johri (1999) ve Bim ve Franco (2000) ksilanazları üst faza çekerek, sırasıyla, 1.2, 3.6 ve 46.9 saflaştırma oranları elde etmişlerdir. Enzimlerin ayrışabilme özellikleri yapısal farklılıklarına göre çeşitlilik gösterdiğinden, değişik mikrobiyal kaynaklara göre farklı sonuçlar elde edilmektedir. Çalışmamızda iyi bir ksilanaz üreticisi izole edilerek ve daha önce laboratuvarımızda üzerinde çalışılan *Rhizopus oryzae* küfü kullanılarak, yüksek verimle üretilen enzimler sulu iki faz sistemiyle fermentasyon ortamından ekstrakte edildi. Sistem parametreleri değiştirilerek, daha etkili ayırma için optimum koşullar araştırıldı. Çalışmamızın sonucunda, ksilanazlar yüksek enzim geri alınımı ile başarılı bir şekilde üst faza toplanarak fermentasyon ortamındaki diğer moleküllerden uzaklaştırıldı. Şimdiye kadar yapılan yayınlarda 111 gibi yüksek bir katsayıyla saflaştırma başarılmamıştır. Buna ilave olarak, hiç bir çalışmada bakteriyel hücre ihtiva eden ortamın içinden ksilanazlar ekstrakte edilmeye çalışılmamıştır. Araştırmamızın geniş kapsamlı olduğu, birçok parametrenin etkisi incelendiği ve başarılı sonuçlar elde edildiğinden literatürde önemli bir yer alacağını düşünmekteyiz. Sulu iki faz sisteminde kullanılan polimerin biyomolekülleri stabilize etmek etkisi bulunduğundan ksilanazların aktivitesinde herhangi bir bozulma görülmedi. Tek bir adımda oldukça başarılı saflaştırma sonuçları elde edildi. Ayrıca, bu yöntem oldukça ucuz ve verimli olduğundan ve

kısa zamanda tamamlandığından, büyük ölçek uygulamalarında da kullanılabilirliği ortaya konuldu.

Konunun ileriye dönük araştırmasında farklı kompozisyonlu sulu iki faz sistemleri kullanılarak enzim ekstraksiyonu incelenmelidir. Ziraı atıklardan elde edilen doğal polimerler veya sisteme ilave edilecek liganlarla (küçük moleküller) saflaştırma olanakları irdelenmelidir. Bunlara ek olarak, mikrobiyal fermentasyon sulu iki faz sistemi içinde yapılarak, ksilanaz ekstraksiyonu sürekli şekilde gerçekleştirilebilir.

KAYNAKÇA

Albertsson, P.A., Partitioning of cell particles and macromolecules, 3rd Ed., John Wiley and Sons, New York, (1986).

Bakir, U., Yavaşcaoğlu, B.Ş., Güvenç, F., Ersayın, A., An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterisation, *Enzyme and Microbial Technology*, October, (2001)

Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G. S., Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 56, 326-338, (2001).

Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J., Eyzayuirre, J., *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes, *Journal of Biotechnology*, Vol. 41, 71-79, (1995).

Biely, P., Vranska, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D., Endo- β -1,4-xylanase families: differences in catalytic properties, *Journal of Biotechnology*, Vol. 57, 151-166, (1997).

Bim, M. A., Franco, T. T., Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching, *Journal of Chromatography B*, Vol. 743, 349-356, (2000).

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*, Vol. 72, 248-254, (1976).

Costa, M. J. , Cunha, M. T., Cabral, J. M. S., Aires-Barros, M. R., Scale-up of recombinant cutinase recovery by whole broth extraction with PEG-phosphate aqueous two-phase, *Bioseparation*, Vol. 9, 231-238, (2000).

Dhillon, A., Gupta, J.K., Jauhari, B. M., Khanna, S., A cellulase-poor, thermostable, alkali-tolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its

application in biobleaching of eucalyptus pulp, *Bioresource Technology*, Vol. 73, 273-277, (2000).

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

Gomes, I., Gomes, J., Steiner, W., Esterbauer, H., Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 36, 701-707, (1992).

Gulati, R., Saxena, R.K., Gupta, R., Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*, *Process Biochemistry*, Vol.36, 149-155, (2000).

Jain, A., Johri, B.N., Partitioning of an extracellular xylanase produced by a thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces* IIS-68 in an aqueous two-phase system, *Bioresource Technology*, Vol. 67, 205-207, (1999).

Johansson, G., Partitioning of proteins, In: Partitioning in aqueous two-phase systems: Theory, methods, uses and applications to biotechnology, Academic Press, London, (1986).

Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 23, 411-456, (1999).

Menge, U., Optimisation of extractions in aqueous two-phase systems, In: In: Methods in Biotechnology, Vol. 11, Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols, (Hatti-Kaul, R. (Edr.)), Humana Press, New Jersey, (2000).

Pan, I. H., Li, Y. K., Rapid process for purification of an extracellular β -xylosidase by aqueous two-phase extraction, *Journal of Chromatography B*, Vol. 754, 179-184, (2001).

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

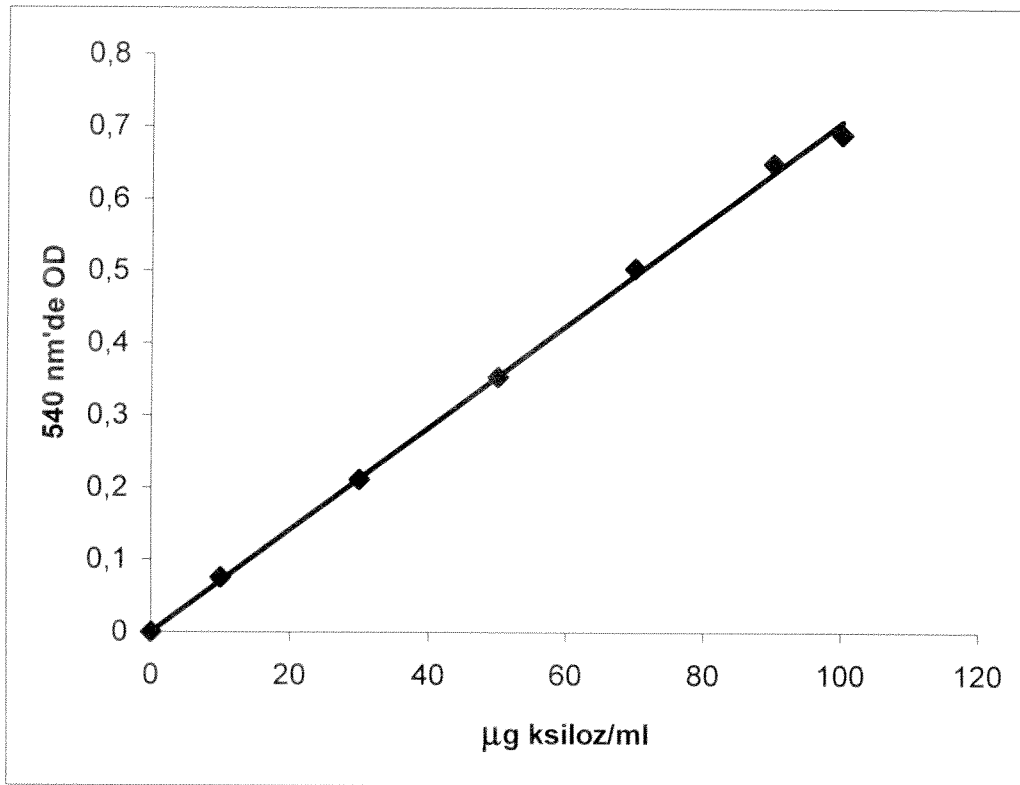
Subramaniyan, S., Prema, P., Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms, *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 183, 1-7, (2000).

Tanuja, S., Srinivas, N. D., Raghava Rao, K. S. M. S., Gowthaman, M. K., Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase, *Process Biochemistry*, Vol. 32, No. 8, 635-641, (1997).

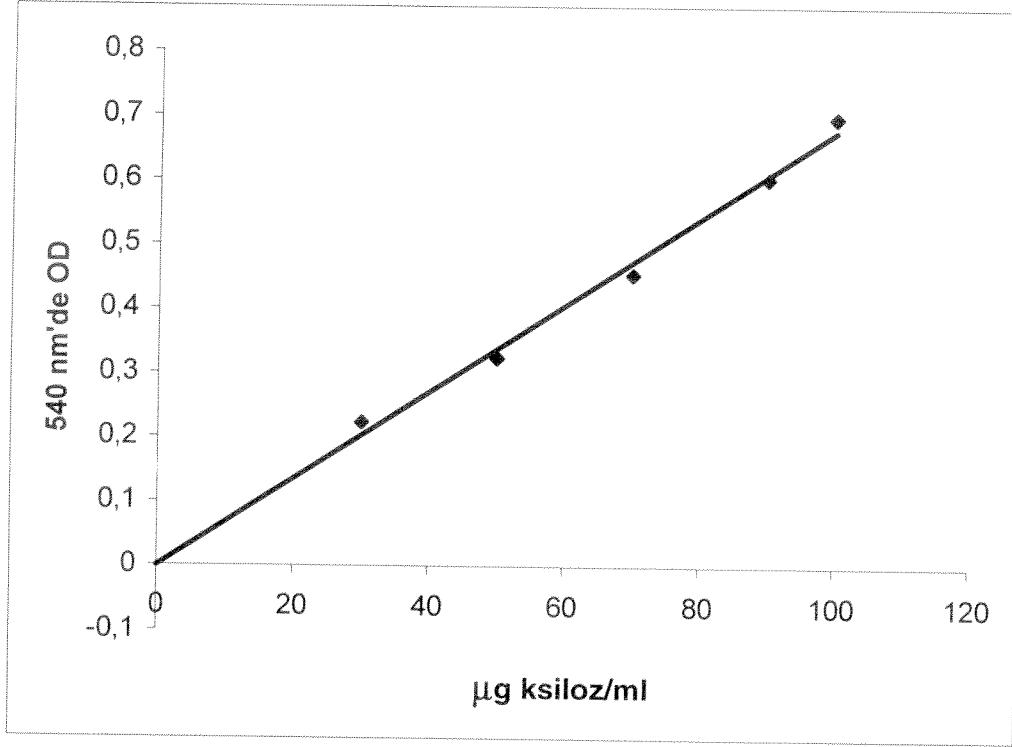
APPENDIX I

A. Standart Ksiloz Grafikleri

Standart grafikler 100 μ g/ml ksiloz çözeltisi kullanılarak elde edilmiştir. Stok ksiloz solüsyonundan gerekli seyreltmeler yapılarak istenen konsantrasyonda ksiloz örnekleri elde edilmiştir. Her iki metodun (Nelson-Somogyi ve DNSA) işlemleri yapıldıktan sonra standart grafikler çizilmiştir (Şekil 1 ve 2).



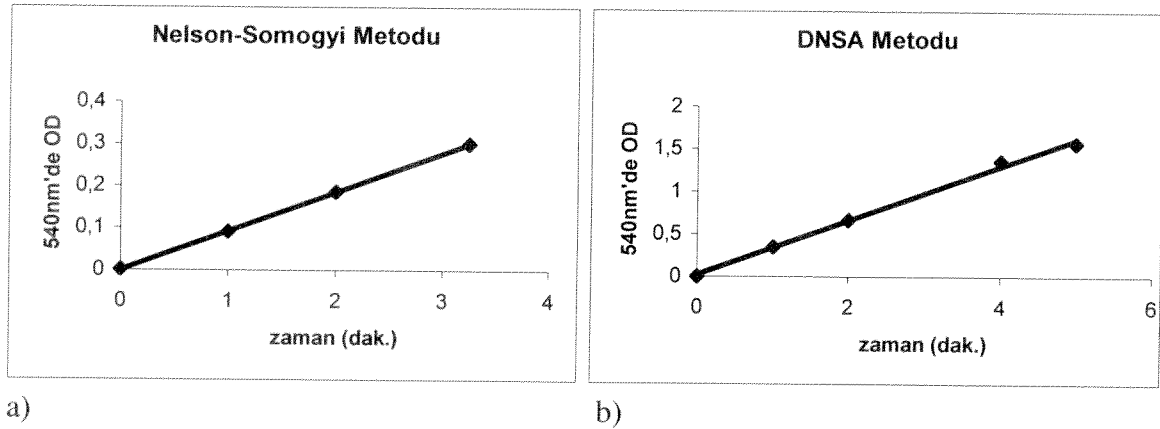
Şekil 1. Nelson-Somogyi metodu için ksiloz standart grafiği



Şekil 2. DNSA metodu için standart ksiloz grafiği

B. Enzim Aktivitesi Hesaplama

Enzim + substrat reaksiyonu boyunca alınan örneklerden, zamana karşı optik yoğunluk (OD) grafikleri çizilerek oluşan doğruların eğimi hesaplanmıştır (Şekil 3). Elde edilen eğimler standart eğrisinin eğimine bölünüp, gerekli seyreltme faktörleriyle çarpılıp ksiloz molekül ağırlığına bölününce, ksilanaz aktivitesi U/ml cinsinden elde edildi.



Şekil 3. İki yöntemle ölçülmüş ksilanaz aktivitesi

a) Nelson-Somogyi metodu

Ksilanaz aktivite doğrusu eğimi = 0.0923 [OD/dak.]

Nelson-Somogyi standart doğrusu eğimi = 0.0071 [OD/ μ g ksiloz.ml⁻¹]

Enzim seyreltme faktörü = 10

Enzim + Substrat seyreltme faktörü = 4

Ksiloz molekül ağırlığı = 150 [g/mol]

Ksilanaz aktivitesi = $\frac{0.0923 \times 4 \times 10}{0.0071 \times 150} = 3.47$ [μ mol/ml.dak] = **3.47 [U/ml]**

b) DNSA metodu

Ksilanaz aktivite doğrusu eğimi = 0.3194 [OD/dak.]

Nelson-Somogyi standart doğrusu eğimi = 0.0068 [OD/ μ g ksiloz.ml⁻¹]

Enzim seyreltme faktörü = 10

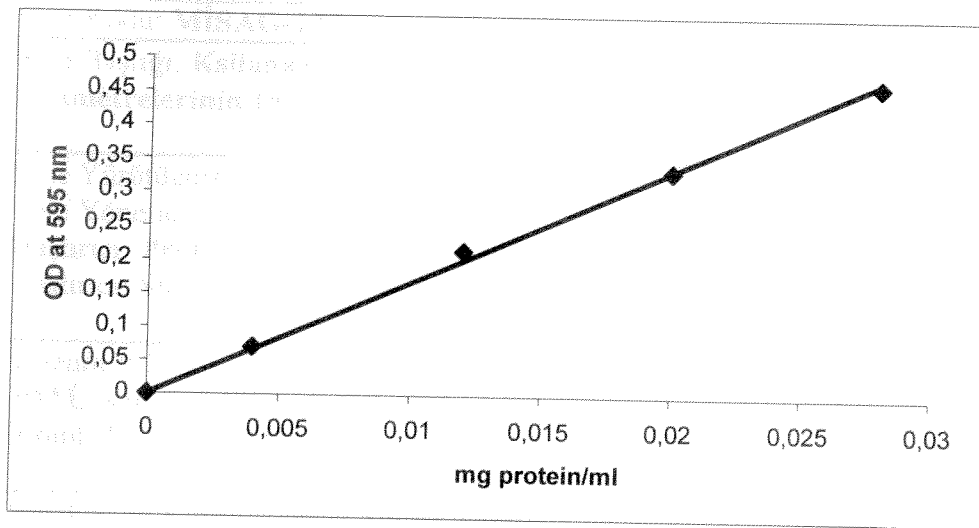
Enzim + Substrat seyreltme faktörü = 10

Ksiloz molekül ağırlığı = 150 [g/mol]

Ksilanaz aktivitesi = $\frac{0.3194 \times 10 \times 10}{0.0068 \times 150} = 31.31$ [μ mol/ml.dak] = **31.31 [U/ml]**

Görüldüğü üzere aynı enzim örneğinin iki farklı yöntem için iki farklı değer hesaplandı. Ksilanaz aktivitesinin DNSA metodu ile 7-10 daha fazla hesaplanabileceği daha önce Biely (1992) tarafından da rapor edilmiştir. Bunun için enzim aktivitesinin hangi metodla ölçüldüğü özellikle belirtilmesi gerekmektedir.

C. Protein Standart Grafiği



Şekil 1. Bradford protein standart grafiği

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: MİSAG-177
Proje Başlığı: Ksilanaz Enziminin Ekstraksiyon ile Ayrıştırılması: Ekstraksiyon Parametrelerinin İncelenerek Sürecin Optimizasyonu
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Proje Yöneticisi: Prof. Dr. Ufuk Bakır Araştırmacı: Prof. Dr. Haluk Hamamcı Araştırmacı: Suzan Biran
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü, İnönü Bulvarı 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: -
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1. 3. 2001 - 1. 3. 2003
Öz (en çok 70 kelime): PEG-fosfat sulu iki faz sistemi kullanılarak, mikrobiyal fermentasyonla üretilen ksilanazların ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Sıcaklık, pH, PEG derişimi ve moleküler ağırlığı, sistem kompozisyonu, ortamın iyonik gerilimi, kullanılan tuz çeşidi ve pH parametrelerinin saflaştırma işlemine etkileri incelendi. Araştırmanın sonunda, Bacillus ksilanazları hücre ayırımından sonra yapılan ekstraksiyonla hiç enzim kaybetmeden 5 kat, hücreleri ayırmadan yapılan ekstraksiyonda da 4 kat, Rhizopus oryzae ksilanazları ise 111 kat saflaştırıldı.
Anahtar Kelimeler: Sulu iki Faz Sistemi, PEG-fosfat Sistemi, Enzim Ayrıştırılması, Ksilanaz, Bacillus.
Projeden Kaynaklanan Yayınlar: - Ekinci B., Biran S. And <u>Bakır U.</u> 2-5 Eylül 2002. "Rhizopus oryzae küfünden üretilen ksilanaz enziminin su bazlı iki faz sistemi ile saflaştırılması ve potasyum iydur tuzunun ayrışma etkisi", 5. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Bildiri özetleri kitabı, ÖP 05. - Single-Step Extraction of Xylanases From Fermentation Medium Containing Microbial Cells by Aqueous Two-Phase System, 11th European Congress on Biotechnology Basel, Switzerland, August 24 - 29, 2003 - Aqueous two-phase separation of Bacillus xylanases from fermentation medium (Enzyme and Microbial Technology dergisine yollanmak üzere hazırlanıyor)
Bilim Dalı: Biyoteknoloji Doçentlik Bilim Dalı Kodu: Biyoteknoloji