

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeliha Nurdan SARAÇOĞLU

**CELLULASE-FREE ALKALINE XYLANASE ENZİM ÜRETİCİSİ
BACILLUS sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2010

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CELLULASE-FREE ALKALINE XYLANASE ENZİM ÜRETİCİSİ
BACILLUS sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Zeliha Nurdan SARAÇOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 16/08/2010 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Burhan ARIKAN
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr.Cumhur ÇÖKMÜŞ
ÜYE

.....
Doç. Dr.Hatice KORKMAZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2010YL20

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere
tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CELLULASE-FREE ALKALINE XYLANASE ENZİM ÜRETİCİSİ
BACILLUS sp. SUŞLARININ İZOLASYONU, ENZİM ÜRETİMİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Zeliha Nurdan SARAÇOĞLU

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Yıl: 2010, Sayfa: 89
Jüri : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ
Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

Bu çalışmada, değişik ortamlardan izole edilen alkalifilik *Bacillus* sp. suşlarından selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bakterilerin farklı sıcaklık ve pH aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim üretme yetenekleri araştırılmıştır. Ayrıca çeşitli kimyasalların ve NaCl'ün farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Bacillus sp. X6 suşundan üretilen enzimin SDS-PAGE analizi sonucunda moleküler ağırlıkları 62.4 kDa ve 22 kDa olan iki aktivite bandı tespit edilmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 30°C bulunmuştur. Enzim 30-100°C arasında 60 dakikada aktivitesinin yaklaşık %86'sını korumuştur. Enzim pH 8.0'de optimum aktivite gösterirken, 24 saat süreyle 30°C'de pH 7.0-12.0 aralığında ortalama %57 kalan aktivite ile alkali-stabil özellik göstermiştir. X6 enzimi %15 NaCl konsantrasyonunda %60'luk optimum aktivite göstermiştir. H₂O₂ (%75), MnCl₂ (%65) ve β-merkaptoetanol (%149) enzim aktivitesini önemli düzeyde arttırırken, diğer kimyasallar aktivitede azalmaya neden olmuştur. İnce tabaka kromatografisi ile açığa çıkan hidroliz ürününün maltoz olduğu saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre X6 enzimi, psikrotolerant, ekstrem-termofil, mezofil, alkalifil, halotolerant, termostabil ve alkali-stabil özellik göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi, bio-bleaching uygulamalarında, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde, meyve suyunun saflaştırılmasında ve tekstil endüstrisinde ağartma işlemlerinde kullanılabilir özelliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp. X6, selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz, kromatografi

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

ISOLATION OF CELLULASE-FREE XYLANASE *BACILLUS* sp. STRAINS, ENZYME PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Zeliha Nurdan SARAÇOĞLU

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Year: 2010, Pages: 89
Jury : Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ
Assoc.Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ

In this study, the cellulase free xylanase enzymes from *Bacillus* sp. strains isolated from different environments were produced and characterized. For this purpose, different temperatures and pH values of bacteria and enzymes to produce reproductive capabilities on solid plate were investigated. Besides, different chemicals and NaCl effects on the enzyme activity was determined.

Molecular weight of the enzyme from *Bacillus* sp. X6 was estimated as 62.4 and 22 kDa on SDS-PAGE. The optimum activity was obtained at 30°C. The enzyme was retained its activity around %86 at the end of 60 minutes between 30-100 °C. The optimum activity was obtained at pH 8.0. The enzyme also presented the alkali-stable properties with a residual activity around 57% at 30 °C between pH 7.0-12.0 for 24 hours. The optimum activity of X6 xylanase has shown 60% in the 15% NaCl concentration. H₂O₂ (%75), MnCl₂ (%65) and β-mercaptoethanol (%149) stimulated the enzyme activity significantly however the other chemicals reduced. Maltose was obtained as a hydrolysis product by thin layer chromatography.

According to these result, X6 enzyme shows psychrotolerant, extreme-thermophile, mesophile, alkaliphile, halotolerant, thermostable and alkali-stable characters. Due to these properties X6 cellulase free xylanase enzyme has capable of using at bio-bleaching applications, paper and pulp industry, clarification processes of fruit juice and bleaching processes at textile industry.

Key Words: *Bacillus* sp. X6, cellulase free xylanase, chromatography

TEŞEKKÜR

Öncelikle lisans dönemimde aldığım araştırma projesi dersinden bu yana, bana bilgi ve birikimini daima sunan, yardımlarını esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a teşekkürü bir minnet bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana gerek bilimsel gerekse manevi desteğini, sevgisini ve sabrını hiç esirgmeden sunan canım hocam sayın Doç. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e ne kadar teşekkür etsem azdır.

Deneyisel çalışmalarım ve tez yazım aşamam boyunca yardımlarını esirgemeyen Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Anabilim dalı Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşlarıma ve Arş. Gör. Ayşenur KAYA'ya teşekkür ederim.

Lisans dönemimden bugüne hiçbir zaman ayrılmadığımız ve bana tez dönemim boyunca da her zaman destek olan yol arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Doğduğum günden bugüne hep en iyi yerlere gelmemi arzulayan ve bunun için benden maddi manevi hiçbir desteği esirgemeyen canım babam S.Sırrı SARAÇOĞLU'na, sonsuz sevgisiyle her zaman yanımda olan canım annem Selma SARAÇOĞLU'na, maddi manevi desteğinden dolayı biricik kardeşim Ziya SARAÇOĞLU'na yani canım aileme yaşam kaynağım oldukları için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Bacillus</i> Cinsi.....	3
1.2. Ksılan ve Yapısı	4
1.3. Ksılanazlar	6
1.4. Ksılanazların Kullanım Alanları	8
1.5. Selülozun Yapısı	10
1.6. Selülazlar	11
1.7. Selülazların Bazı Uygulama Alanları	14
1.8. Elektroforez	14
1.9. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez Sistemi	15
1.10. Kromatografi	16
1.10.1. İnce Tabaka Kromatografisi	17
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	19
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Bakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri	23
3.1.1.1. N1 Besiyeri	23
3.1.1.2. CMC-LB Agar Besiyeri	23
3.1.1.3. Ksılanlı Besiyeri	24
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	24
3.1.2.1. NaOH Çözeltisi	24
3.1.2.2. Kongo Kırmızısı (%0.1)	25
3.1.2.3. NaCl Çözeltisi (1 M)	25

3.1.2.4. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0)	25
3.1.2.5. Sodyum-Fosfat Tamponu	25
3.1.2.6. Glisin-NaOH Tamponu	26
3.1.2.7. Borax-NaOH Tamponu	26
3.1.2.8. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)	26
3.1.3. SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar	27
3.1.3.1. Solüsyon A	27
3.1.3.2. Solüsyon B (4X)	27
3.1.3.3. Solüsyon C (4X)	27
3.1.3.4. Amonyum Persülfat (AMPS) %10	27
3.1.3.5. Örnek Yükleme Tamponu (1X)	27
3.1.3.6. Elektroforez Yürütme Tamponu	28
3.1.3.7. Jel boyama (Staining) Solüsyonu	28
3.1.3.8. Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu	28
3.1.3.9. Zimogram Analizleri İçin Kullanılan Renatürasyon Solüsyonları	28
3.1.4. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları	29
3.1.4.1. Kloroform- Asetik Asit- Distile Su Çözeltisi	29
3.1.4.2. Anilin-Difenilamin-Ortofosforik Asit Çözeltisi	29
3.1.4.3. Ksiloz (%1 w/v) ve Maltoz Çözeltisi (%1 w/v)	29
3.2. Metod	29
3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi	29
3.2.1.1. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu	29
3.2.2. Bakterileri Tanılaması	30
3.2.3. Katı Besiyerinde Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi	30
3.2.4. Katı Besiyerinde Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi	30
3.2.5. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürettiği ve Enzim Sentezinin Gerçekleştiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması	31
3.2.6. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma	31
3.2.7. Enzimin Optimum pH'sının Saptanması	31
3.2.8. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerinin Saptanması	32

3.2.9. Enzimin Sıcaklık (Termal) Stabilitesinin Saptanması	32
3.2.10. Enziminin pH Stabilitesinin Saptanması	33
3.2.11. NaCl'ün Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	33
3.2.12. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal İyonlarının Etkisi	34
3.2.13. SDS-PAGE Elektroforezinde Moleküler Ağırlık ve Zimogam Analizi	34
3.2.13.1. Ayırıcı Jelinin Hazırlanması (%10'luk)	34
3.2.13.2. Dengeleme Jelinin Hazırlanması	35
3.2.13.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi ...	35
3.2.13.4. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogam Analizi	36
3.2.14. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Yöntemiyle Reaksiyon Ürünlerinin Saptanması	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması	39
4.2. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürettiği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği pH ve Sıcaklık Aralığı Sonuçları	39
4.3. Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular	45
4.4. Enziminin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerine Ait Bulgular	48
4.5. Enzimin Termal Stabilite Sonuçları	50
4.6. Enzimin pH Stabilite Sonuçları	53
4.7. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi	55
4.8. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonları ve Deterjanların Etkisi	57
4.9. Enzimin SDS-PAGE ve Zimogam Analizi Sonuçları	60
4.10. Enzimin İnce Tabaka Kromatografi (TLC) Sonuçları	62
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. <i>Bacillus sp.</i> X6 bakterisinin 20°C’de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları	40
Çizelge 4.2. <i>Bacillus sp.</i> X6 bakterisinin 30°C’de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları	40
Çizelge 4.3. <i>Bacillus sp.</i> X6 bakterisinin 40°C’de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları	41
Çizelge 4.4. <i>Bacillus sp.</i> X6 bakterisinin 50°C’de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları	42
Çizelge 4.5. <i>Bacillus sp.</i> X6 bakterisinin 60 °C’de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları	42
Çizelge 4.6. <i>Bacillus sp.</i> X6 ksilanaz enziminin optimum pH değeri	45
Çizelge 4.7. <i>Bacillus sp.</i> X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi optimum aktivite sıcaklığı	48
Çizelge 4.8. <i>Bacillus sp.</i> X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi termal stabilite sonuçları	51
Çizelge 4.9. <i>Bacillus sp.</i> X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi pH stabilite sonuçları	54
Çizelge 4.10. Farklı NaCl konsantrasyonlarının ksilanaz aktivitesine etkisi	56
Çizelge 4.11. İnhibitör, metal iyonları, şelatör, deterjan ve okside edici bileşiklere ait sonuçlar	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 4.1.	<i>Bacillus</i> sp. X6 suşunun 40°C ve pH 6.0–13.0 aralığında katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları	44
Şekil 4.2.	Kısmi saflaştırılmış ksilanaz enziminin ksilanlı besiyerindeki aktivite zonu	44
Şekil 4.3.	<i>Bacillus</i> sp. X6 ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve aralığı	46
Şekil 4.4.	<i>Bacillus</i> sp. X6 ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ve aralığı	49
Şekil 4.5.	<i>Bacillus</i> sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi termal stabilite sonuçları	53
Şekil 4.6.	<i>Bacillus</i> sp. X6 alkalın selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi pH stabilite sonuçları	54
Şekil 4.7.	%3-%30 NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi	57
Şekil 4.8.	İnhibitör, şelatör, deterjan, metal iyonu ve okside edici bileşiklerin enzim aktivitesine etkisi	59
Şekil 4.9.	<i>Bacillus</i> sp. X6 alkalın ksilanaz enzimi zimogram sonucu	61
Şekil 4.10.	<i>Bacillus</i> sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi ince tabaka kromatografisi sonucu	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
μg	: Mikrogam
μL	: Mikrolitre
AMPS	: Amonyum persülfat
CMC	: Karboksimetilselüloz
DNS	: Dinitrosalisilikasit
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
L	: Litre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
M	: Molar
SDS	: Sodyum dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin

1.GİRİŞ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkeler bu konuda tamamen dışa bağımlı durumdadırlar (Gözükara, 2009).

Enzimler, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında ya da bir kısmı protein olan biyo-moleküllerdir. Enzimler, binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde varlığı ve görevi bilinmeden kullanılmıştır. İlk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Yakın tarihte ise Doğu ülkelerinde birçok gıda fermentasyonu için ipliksi mantarlar enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır. Batıda 1896'da gerçek modern mikrobiyal enzim teknolojisi 'takadiastase'in ticareti ile başlamıştır. Bu Doğudan Batı toplumuna önemli bir teknolojik transferdir (Uhlir, 1998; Aygan, 2008).

Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Proteaz grubundaki enzimler kullanımda ilk sırayı alırken, karbonhidratları parçalayanlar ikinci sırada yer almaktadırlar (Hamilton ve ark, 1999; Bhat, 2000). Karbonhidrat parçalayan enzimlerden amilazlar, enzim piyasasında yaklaşık %25'lik bir paya sahiptir (Sidhu ve ark, 1997; Rao ve ark, 1998). Son zamanlardaki en etkin uygulamaları kağıt hamuru beyazlatılması olan ksilanazların endüstride kullanılması hızlı bir yükselişe geçmiştir (Wainq ve Ingworsen, 2003).

Mikroorganizmalar optimum üreme sıcaklıkları dikkate alındığında psikrofiller (20°C altında), mezofiller (20-55°C) ve termofiller (55°C üzeri) olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Bunlara ilaveten Kristjansson ve Stetter (1992), termofil grubu daha da genişletilerek 60-80°C arasında üreyenleri ekstermofil, 80°C'nin üzerinde üreyenler için hipertermofil tanımı kullanılmaktadırlar.

Gerek termofilik gerekse hipertermofilik enzimler karakteristik olarak 40°C'nin altında etkin bir aktivite göstermezler (Gomes ve Steiner, 2004). Sıcaklığa dirençli proteinlerin amino asit kompozisyonu mezofilik organizmaların amino asit

kompozisyonu ile karşılaştırıldığında glisin yerine alanin, lizin yerine arjinin amino asitinin sıcaklığa dirençli proteinlerde daha fazla yer aldığı görülmüştür. Aynı zamanda arjinin termofilik proteinlerin yapısında bol bulunurken sıcaklığa en hassas amino asit olan sistein bu proteinlerin yapısında daha sınırlı düzeyde bulunmaktadır.

Deneysel çalışmalar hidrofobik interaksiyonların termofilik proteinlerin stabilizasyonunda önemli bir rol aldığını göstermiştir. Sıcaklığa dirençli proteinler hidrofobik interaksiyonlarla dimer oluşturarak termal hidrolize karşı daha dirençli hale geçmektedir. Bunlardan başka sıcaklığa dirençli proteinler disülfid bağları, molekül içi hoş kokulu yapılar, zengin hidrojen bağları içermekte ve elektrostatik mekanizmalarla yüksek sıcaklığı tolere edebilmektedirler (Kumar ve Nussinov, 2001).

Deterjan, gıda, yem, nişasta, tekstil, deri, kağıt hamuru, farmasötik endüstrisi, termofilik enzimlerin en geniş kullanıldığı alanlardır (Gomes ve Steiner, 2004).

Endüstride yaygın şekilde kullanılan enzimler arasında *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürleri tarafından sentezlenen ondan fazla enzim vardır. Örneğin ticari olarak üretilen ve kullanılan termostabil amilaz enzimlerinin üretilmelerinde *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* en çok kullanılan iki *Bacillus* türüdür (Horikoshi, 1996; Lin ve ark, 1998; Horikoshi, 1999; Kumar ve Takagi, 1999).

Bacillus cinsi bakteriler toprak, hayvan dışkıları ve bitkisel atıklar üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu cinsin bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay olup, hızlı üreme oranı ile fermentasyon süresi kısadır.

Genel olarak güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı cazip endüstriyel organizmalardır. Çünkü gram negatif bakteriler ürettikleri proteinleri protoplazmalarında ya da periplazmik boşluklarında biriktirirler ve bu da üretilen ürünün izolasyonunu güçleştirerek suştan birden fazla kez yararlanılmasını engeller. Ayrıca sentezlenen ürünlerin organizmaya karşı toksik etki oluşturması söz konusudur.

İntrasellüler ortamda sentez ürünlerinin biriktirilmesi çözünmeyen protein oluşumu, yanlış protein katlanmaları ve etkin olmayan disülfid bağ formasyonu gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Ayrıca gram negatif bakteriler, insanlara toksik olan endotoksin ve intrasellüler protein üretmeleri nedeniyle, proteinlerin izolasyonu ve saflaştırılmasında ekstra maliyet oluşturmaktadırlar (Boyce ve Walsh, 2007).

1.1. *Bacillus* Cinsi

Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Hücreler çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, çoğu olumsuz ortam koşulları için çok dirençli, endospora sahip, açık havada spor oluşturması engellenmeyen, gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bir bakteridir. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlarla bağlı mezo-diamino pimelik asitten oluşur. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrofilik ve termofilik türleri de vardır (Ayhan, 2000; Tatar, 2007).

Bacillus türleri çoğunlukla saprofit olup doğada yaygın olarak toprakta, toz partikülleri ile bulaşması sonucu suda, bitki, bitki atıkları ve hayvanlarda bulunurlar. *Bacillus* türleri, aerob, sporlu basiller şeklinde olup gram pozitif boyanırlar. Vejetatif formları düz, kenarları birbirine paralel, ucu yuvarlak veya künt biten 0,5-1,2 µm eninde ve 2,5-10 µm boyunda olan tek tek veya uzun zincirler şeklinde görülen basillerdir. Çoğunluğu katalaz pozitif olup, endosporları silindirik, oval veya yuvarlak şekilli olup türlere göre santral, terminal veya subterminal konumda bulunurlar. Uygun şartlarda (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis* ve *B. megaterium*) polipeptid yapısında kapsül geliştirirler. Büyük bir kısmını mezofilik cinsleri oluştururken, zorunlu termofil, psikrofil, asidofil ve halofil cinsleri de bulunmaktadır. Bütün hepsi yaşamlarını zor çevre koşullarında yaşamlarını spor formunda sürdürebilirler (Gerçeker, 1999).

1.2. Ksilan ve Yapısı

Ksilan, yüksek bitkilerin hücre duvarında bulunan hemiselülozik yapının temel bileşeni olup, kullanırlılığı dikkate alındığında doğada en fazla bulunan ikinci kaynaktır (Christov ve ark, 1996; Gessesse, 1997). β -1,4- bağlarıyla bağlanmış D-xylopyranose yapılarından oluşan bir düz zincir ve asetil, arabinozil ve glukonozil taşıyan yan bağlardan oluşmuştur (Heck ve ark, 2002).

Hemiselüloz, ksilan, mannan, galaktan ve arabinan içeren heteropolimerdir. Birçok hemiselülozda temel monomer olarak D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz ve L-arabinoz bulunmaktadır. Ksilanlar monomer yapı olarak başlıca D-ksiloz ve eser miktarda L-arabinozdan oluşan heteropolimerlerdir (Bastawde, 1992). Lignin ile kovalent bağlı ve selüloz ile non-kovalent etkileşimdeki ksilan tabakası, selüloz bütünlüğünün ve liflerinin selüloz degradasyonuna karşı korunmasında önemli olabilir (Beg ve ark, 2001).

Hemiselüloz doğada en çok bulunan ikinci büyük bitkisel yapıdır. Tohumlarda depo polimeri, odunsu bitkilerde ise önemli bir hücre çeper bileşenidir. Kullanılmayan selülozik materyal yaklaşık %40 oranında pentoz şekerinden oluşmuş hemiselüloz içermektedir (Magge ve Kosaric, 1995). Çeşitli bitkisel materyalden elde edilen hemiselüloz monomerleri, antibiyotikler, alkoller, hayvan yemleri, kimyasal ürünler ve biyoyakıt üretiminde kullanılmaktadır (Heck ve ark, 2002).

Ksilan β -1,4-glikozidik bağlarla bağlanmış ksiloz rezidülerinde oluşan bir iskelete sahip kompleks bir polisakkarittir. Ksilanın temel zinciri β -ksilopiranoz rezidülerinden oluşmuştur (Whistler ve Richards, 1970). Karasal bitkilerdeki toplam kuru ağırlığın %30-35'ni oluşturan ksilan, hücre duvarında en çok bulunan hemiselülozik polisakkaritlerdir (Joseleau ve ark, 1992).

Ksilan, angiospermilerin sert odunlarında temel hemiselüloz olup gymnospermilerin yumuşak odunlarında daha az miktarda bulunur ve toplam kuru ağırlığın sırasıyla yaklaşık %15-30 ve %7-12'sini oluşturur (Whistler ve Richards, 1970; Wong ve ark, 1988).

Sert odunlu bitkilerde bulunan ksilan 0-asetil-4-O-metilglukuronoksilan olup, en az 70 β -ksilopiranoz biriminin β -1,4-glikozidik bağlarla bağlanması sonucu

oluşturmuştur (Ortalama polimerizasyon derecesi 150-200 arasındadır). Zinciri oluşturan ksiloz birimlerinden onuncu sırada bulunan şekerin iki numaralı atomu bir adet 4-0-metilglukuronik asit taşımaktadır.

Yumuşak odunlu bitkilerde bulunan ksilan önemli miktarda asetilenmiş durumdadır (Örneğin birchwood ksilan her iki mol ksiloz için 1 mol asetik asit taşır). Moleküldeki asetilasyon üç numaralı atomda iki numaralı atoma göre daha büyük sıklıkta bulunur. Asetil grupları ksilanın suda çözünübilirliğinden sorumludur. Asetil grupları alkali ekstraksiyona maruz bırakıldığında molekülden hızla ayrılır (Sunna ve Antranikian, 1997). Yumuşak odunlu bitkilerde bulunan ksilanlar arabino-4-0-metilglukuroksilanlardan oluşmuştur. Bunlarda sert odunlu bitkilerde bulunan ksilanlardan daha fazla miktarda 4-0-metilglukuronik asit içeriği bulunmakta olup, 4-0-metilglukuronik asit birimleri iki numaralı karbona bağlanmış durumdadırlar.

Yumuşak odunlu bitkilerde bulunan ksilanlar ksilozun üçüncü karbonuna α -1,3-glikozidik bağlarla bağlanmış α -L-arabinofuranoz üniteleri taşımaktadır (Puls ve Schuseil, 1993). Asetillenmiş yapıların aksine ksilanda ksiloz birimlerinin yerine %12 oranında arabinozil birimleri yerleşmiştir (Wong ve ark, 1988). Yumuşak odunsu yapı içeren bitkilerde bulunan ksilan daha az dallanma göstermesi ve kısa olması nedeniyle sert odunsu yapıdaki ksilandan ayrılırlar (Beg ve ark, 2001).

Ksilanlar, selülozdan sonra en bol bulunan hemiselüloz bileşikleridir (Collin ve ark, 2005). Bu bileşik hücre duvarında ve bitki hücrelerinin orta lamellerinde bulunur.

Birçok ksilan anayapıyı meydana getiren zincir ile buna bağlanmış yan zincirlerde farklı yapıları içeren heteropolisakkaritler yapısına sahiptir. Ksilan yapıda ortak olan bileşenler asetil, arabinozil ve glukurozil birimleridir. Doğada hasırotu, tütün sapı ve tohum kabuğunda bulunan sadece ksilozil birimlerinden meydana gelmiş homoksilozlar da bulunmuştur (Beg ve ark, 2001).

Ksilanın hidroliz ürünleri arasında ksilitol ve furfural önemli bir yer tutmaktadır. Furfural başlıca tarımsal atıklardan elde edilirken, ksilitol odun atıklarından elde üretilmektedir. Ksilanın diğer hidroliz ürünlerinden ksiloz ve oligosakkaritler, gıda endüstrisinde yoğunlaştırıcı ve dondurulmuş gıdalarda katkı maddesi olarak kullanım alanı bulmuştur (Wong ve ark, 1992).

1.3. Ksilanazlar

Pek çok bakteri ve mantar suşu ksilani parçalayabilmek için ksilanaz enzimi üretmektedirler (Gamerith ve ark, 1992; Gessesse ve Gashe, 1997). Son on yıldır, ksilan ve ksilanaz enzimlerinin endüstriyel uygulamaları, araştırmacıların ilgisini daha fazla çekmektedir. Enzimin kullanım alanlarına örnek olarak kağıt hamuru hazırlama ve kağıt endüstrileri ile gıda ve hayvan yemi üretimi verilebilir (Kulkarni ve ark, 1999; Gözükara, 2009).

Yirminci yüzyılın son yarısında mikroorganizmaların kullanımında, mikroorganizmaların metabolik ürünlerinde, enzimlerin endüstriyel uygulama potansiyelleri ile ilgili bilgiler hızlı bir artış göstermiştir. Özellikle son 20 yılda ksilanaz enzimlerinin ticari alandaki kullanımı kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde yaygınlaşmıştır (Beg ve ark, 2001). Mikrobiyal ksilanolitik sistemlerle ilgili bilgiler giderek artmasına rağmen, mikroorganizma ve bunlara ait enzimlerin ksilani parçalama mekanizmaları tamamen anlaşılmış değildir. Bu mekanizmanın açıklanması yönündeki çalışmalar giderek hız kazanmaktadır.

Yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak enzimin değişik koşullardaki üretimi, enzim üretiminin indüklenebilirliği, enzim karakterizasyonu, saflaştırma, klonlama çalışmaları ile enzim ekspresyonun arttırılması ve kağıt endüstrisinde kullanımı gibi konularda yoğunlaşmıştır (Beg ve ark, 2001).

Ksilanaz enzimlerinin özellikle bakteriler (Gilbert ve Hazlewod, 1993; Sunna ve Antranikian, 1997), mantarlar (Sunna ve Antranikian, 1997), aktinomyetler (Ball ve McCarthy, 1989; Beg ve ark, 2000) ve maya gibi (Hrmova ve ark, 1984) mikroorganizmalardan elde edildiği bildirilmiştir (Beg ve ark, 2001). Bu organizmaların yanı sıra birçok *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Schizophyllum* ve *Trichoderma* suşları da enzim üretme çalışmalarında kullanılmışlardır. Farklı özellikte selülozik enzim sentezleyen *Sporotrichum thermophile*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium* sp., *Thielavia terrestris*, *Sporotrichum cellulophilum* ve *Talaromyces emersonii* gibi mantar grupları, düşük miktarda da olsa ksilanaz üretme yeteneğine sahiptirler (Rani ve Nand, 1996).

Mikrobiyal ksilanazlar genellikle asidik veya nötral pH'larda optimum aktivite gösterirler. Pek çok ksilanaz alkalifilik ve alkalitolerant bakteriden elde edilmiş olmasına rağmen, nötral pH'da optimum aktivite göstermektedir (Nakamura ve ark, 1993).

Tarım endüstrisi ve yiyecek üretim tesislerinin atıkları dünya genelinde önemli miktarlarda üretilip çevreye atıldıkları için, sağlık açısından önemli bir risk oluşturmaktadırlar. Bu atıklar temelde selüloz, hemiselüloz ve lignin içermektedir. Atık ürün şeklindeki materyallerin özellikle yakıt üretiminde kullanılması, verimliliğin artması ve maliyetin düşmesi açısından materyaldeki bütün bileşenlerin hidrolizini gerektirmektedir. Selülozik atıklarda bulunan ve bitkisel materyalin temel yapısal polimeri olan ksilan, ksilanaz sentezleyen mikroorganizmaların faaliyetleri sonucu besin şeklinde değerlendirilip, hidroliz edilirler (Rani ve Nand, 1996).

Ksilanolitik enzimler, çoğunlukla bitki hücre duvarında selüloz ve lignin birleşimleriyle birlikte bulunan ksilanın hidrolizini katalizleyen hemiselülozik enzimlerdir. Bu nedenle, bakteri kaynaklı enzimlerin üretiminde mısır unu, mısır koçanı, buğday kepeği, selüloz, ağaç talaşı ve diğer bitkisel atıklar substrat olarak kullanılmaktadır (Biotech Project 4544, 2006).

Yıllarla birlikte özellikle kağıt ve kağıt hamuru alanında ksilanaz enziminin uygulamaları sürekli bir artış göstermiştir. Bugün için ksilanaz enzimlerinden en fazla kraft (ambalaj kağıdı) hamurunun ağartma işlemlerinde kimyasalların kullanımını minimal düzeye düşürmede yararlanılmaktadır. Enzimlerin kağıt endüstrisindeki uygulamaları hala araştırma ve gelişme aşamasında olmakla birlikte, selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimleri yoğun şekilde kullanılmaktadır (Bajpai, 1999).

Ksilanaz enzimlerinin kağıt hamuru ve kağıt endüstrisindeki kullanımının dışında kümes hayvanlarının yemlerine katkı maddesi olarak (Bedford ve Classen, 1992), hamur kıvamı ve hamur ürünlerin kalitesini arttırmak için (Maat ve ark, 1992), kahvenin ekstraksiyonunda, bitki yağları ve nişasta üretiminde (Wong ve Saddler, 1992), pektinaz ve selülaz ile birlikte meyve sularının berraklaştırılmasında (Biely, 1985) kullanıldığı bulunmuştur. Ksilanolitik enzim sistemi β -1,4-endoksilanaz, β -ksilosidaz, α -L-arabinofuranosidaz, α -glukuronidaz, asetil ksilan esteraz ve fenolik asit esteraz enzimlerinden meydana gelir ve ortak etkileri

sonucunda ksilan molekülünün tam hidrolizi gerçekleşir. Bu tarz multifonksiyonel ksilanolitik enzim sistemi, mantarlar, aktinomycetler ve bakterilerde yaygın şekilde bulunmaktadır (Beg ve ark, 2001).

Ksilanolitik enzimler, ksilan ve arabinoksilan polimerlerinin hidrolizini katalizleyen enzim grubudur. Bu enzimler, endo-1,4- β -ksilanaz, β -ksilosidaz, α -arabinofuranosidaz ve asetilksilan esterazlardır. Ksilanazlar ksilo-oligosakkaritleri üretmek için 1,4- β -D-ksilozidik bağları hidroliz etme yeteneğine sahiptirler. Ksilanazlar doğada en fazla mikroorganizmalar, deniz algleri, protozonlar, crustaceler, böcekler ve yılanlar tarafından sentezlenmektedir (Ratanachomsri ve ark, 2005).

Mikrobiyal kaynaklar arasında, özellikle filamentöz mantarlar, salgılarını üreme ortamına vermeleri ve maya ve diğer mantarlardan daha yüksek ksilanaz aktivitesine sahip olmaları nedeniyle daima ilgi çekmiştir (Krisana ve ark, 2005). Bu özellik mantar ksilanının farklı endüstriyel alanlarda etkin şekilde kullanılmalarını sağlamıştır. Örneğin, ksilanaz enzimleri kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde, ön ağartma işlemlerinde toksik özellikteki klor kullanımını azaltmak için kullanılmaktadır. Ksilan polimerlerinin hidrolizinde rol oynayan en önemli enzim endo-1,4- β -ksilanazlardır (EC 3.2.1.8). Doğada bitki atıkları üzerinde üreyen mikroorganizmaların çoğu genellikle selüloolitik ve ksilanolitik enzimlerin her ikisini de üretme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca hayvan yemlerinde, sindirilebilirliğin yükseltilerek verimin artırılması amacıyla yararlanılmaktadır (Kung ve ark, 2000). Bir diğer uygulama alanı fırıncılık olup hamur vizkositesini, ekmek hacmini ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadırlar (Romanowska ve ark, 2003; Ratanachomsri ve ark, 2005).

1.4.Ksilanazların Kullanım Alanları

Hemiselüloolitik mikroorganizmalar, bitki polisakkaritlerinin temel bileşeni olan hemiselülozun doğadaki geri dönüşümünde önemli bir rol oynamaktadırlar. Ksilanazlar (EC 3.2.1.8) hemiselülozun temel yapısı olan ksilanın hidrolizini katalizler. Bu enzimler kullanılarak ligniselülozik materyalden, sıvı yakıt ve

kimyasalların üretimi ekonomik olarak önemli gelişmeler sağlayabilir. Son yıllardaki gelişmeler, selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimlerinin özellikle kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanılarak çevreyle dost teknolojilerin geliştirilmesi konusunda ön plana çıkmıştır (Kulkarni ve ark, 1999).

Mikroorganizmaların önemli kısmının ksilan parçalayıcı enzim ürettiği bilinmektedir. Endüstriyel uygulamaların başında kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde ambalaj kağıt hamurunun ağartılması gelmektedir (Zamost ve ark, 1991; Viikari ve ark, 1994; Gessesse, 1998). Endüstriyel uygulamadaki sorunların başında enzim üretim ve kullanım maliyeti gelmektedir. Bu nedenle enzim üretiminde maliyeti düşürücü substrat kullanılması yönünde çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Maliyetin düşürülmesi amacı ile özellikle tarımsal atıkların kullanılması üzerine yoğunlaşmıştır.

Optimum verimin elde edilmesinin önündeki diğer engeller kağıt üretiminde kullanılan asit/alkali'ni nötralizasyonu ve ısıtmanın soğutulması işlemleri gelmektedir. Bu özellikle kağıt endüstrisi için üretilecek ksilanolitik enzimlerin termofil/termostabil ve alkalitolerant özellikte olması hedeflenmektedir. Bütün çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır (Dhillon ve ark, 2000).

Dünya genelinde tarımsal, endüstriyel ve kentsel atık şeklinde yıllık milyonlarca ton ksilan içeren atık açığa çıkmaktadır. Ksilan alkali pH'da çözünemediği için, yüksek sıcaklık ve alkali pH'da aktif ve stabil ksilanaz enzimleri bu tür uygulamalar için çok önemlidir (Gessesse, 1998).

Çevre yasasındaki düzenlemeler, özellikle batı Avrupa ve kuzey Amerika ülkelerinde kağıt ve kağıt hamuru işletmelerinde ağartma amaçlı klor kullanımını sınırlamıştır (Chauvt ve ark, 1987). Ağaç kabuklarının soyulması, geri dönüşüm uygulamasında değerlendirilen gazete kağıtlarındaki boyanın giderilmesi, kağıt hamurunun üretimi sırasında selülozun saflaştırılmasında selüloz aktivitesi olmayan ksilanazlar büyük rol oynamaktadırlar. Enzimatik ağartma, lignin ve karbonhidrat arasındaki bağların ayrılması ve kağıt hamuru yapısının açılmasını sağlamaktadır (Kulkarni ve ark, 1999).

Mikrobiyal ksilanazlar, lignoselülozik yapının biyodöngüsü, lignoselülozik materyalden yakıt üretimi, pentoz üretimi, meyve suyunun berraklaştırılması,

rumendeki sindirimin artırılması ve kağıt hamurunun biyolojik ağartılmasında kullanılabilirliği hızla artan bir enzimdir (Srinivasan ve ark, 1995; Garg ve ark, 1998). Selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimleri kağıt üretimi sırasında kağıda parlaklık ve yumuşaklık kazandırmak için kağıt hamurundan hemiselülozun uzaklaştırılması uygulamalarında kimyasal uygulamalara alternatif özelliktedir (Kohli ve ark, 2001).

Selüloz aktivitesi olmayan ksilanazlar (1.4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz: EC 3.2.1.8) geniş bir biyoteknolojik uygulama potansiyeline sahiptir. Öncelikli olarak kağıt ve kağıt hamuru ağartma endüstrisinde ağartıcı ajan olarak kullanılmak amacı ile üretilirler. Ayrıca yiyecek ve içecek endüstrisi alanında buğday ununa karıştırılarak hamur işi ürünlerin kalitesi ile dayanıklılığını arttırmak, şarap ve meyve suları gibi içecekleri berraklaştırmak, sıvı kahve üretim işlemlerinde kahve musilajını sıvılaştırılmak, için kullanılmaktadır (Rouau ve ark, 1994; Hang ve ark, 1997; Kulkarni ve ark, 1999; Techapun ve ark, 2003).

1.5.Selülozun Yapısı

Selüloz, doğada en bol bulunan yenilenebilir bir biyopolimer olup yaygın olarak bitki hücre duvarlarında bulunur. Glikoz birimlerinin β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşan polimerlerdir. Nişastadan farklı olarak düz bir zincir şeklinde olup herhangi bir sarmal yapı göstermez. Selüloz zincirleri hidrojen bağları ile bağlanarak bir arada tutulurlar. Bazı durumlarda selüloz neredeyse saf olarak bulunur. Birçok durumda ise selüloz lifleri hemiselüloz ve lignin gibi diğer yapısal biyopolimerler arasına katılabilmektedir. Selülozun önemli bir özelliği diğer polisakkaritlerden farklı olarak kristal yapı oluşturabilmeleridir. Doğada glikoz birimleri bir zincir halinde sentezlenirken biyosentez bölgesinde kendiliğinden birleşerek elementer fibril olarak adlandırılan yaklaşık 30 selüloz zincirinden oluşan birimlere dönüşür. Bunlar da daha geniş üniteler halinde paketlenerek mikrofibril denen yapıları oluştururlar. Mikrofibriller ise selüloz fibrillerini oluştururlar. Hidrojen bağları, zincirleri zincir içi ve zincirler arası bağlarla birbirlerine bağlar ve sert bir yapı oluşmasını sağlar.

Selülozun kristal tabiatı, atomların bir diğerine göre uygun pozisyonda bağlanması ile oluşan yapısal bir düzen ile elde edilir. Bu kristal yapı mikrofibrillerin düzenleri sayesinde enzim ya da su gibi küçük moleküllerin girmesini önleyici bir paketlenme şekli oluşturur. Kristal yapıya rağmen selüloz fibrilleri doğada her zaman saf kristal halde bulunmazlar. Kristal yapı zamanla değişir ve ikincil düzen şekline (amorfe: biçimsiz) dönüşür. Kristal ve amorf bölgelere ilaveten selüloz fibrilleri dolaşmış yumak veya bükülmüş gibi bir çok düzensizlikler içerebilir.

Saflaştırılmış selülozlar önemli oranda yapısal özelliklerde değişkenlik gösterirler ve düşük yoğunluk arzederler. Mikrokristal yapıdaki selülozlar neredeyse saf olup seyrek asit uygulamaları ile hemiselüloz ve amorföz bölgelerinin fibrilden uzaklaştırılması ile elde edilir. Saf selülozun değişen yapısal kompleksliği ve çözünmez substratlar ile çalışma zorluğu karboksimetil selüloz (CMC) adı verilen çözünürlüğü yüksek selüloz eterinin kullanımının yaygınlaşmasına neden olmuştur (Lynd ve ark, 2002).

1.6. Selülazlar

Selüloz ve hemiselülozun enzimatik parçalanmasıyla ilgili araştırmalar son 30 yılda oldukça hızlı gelişme göstermiştir. Yenilenebilir biyomas ve tarımsal atıklar selüloz, hemiselüloz ve lignin bakımından oldukça zengin olup, bu yapıların bulunma oranı 4:3:3 olabileceği gibi gerçek yüzdeler kaynaktan kaynağa değişiklik gösterebilmektedir (Heck ve ark, 2002).

En kolay ulaşılabilen yenilenebilir karbon kaynağı olan selüloz (her yıl yaklaşık 150 milyar ton organik materyal fotosentez edilir), çoğunlukla hemiselüloz, lignin ve diğer polisakkaritler ile birlikte bulunur. Selüloz, 1,4- β -D-glikozid bağlarıyla bağlanmış, anhydro-D-glikoz ünitelerinden oluşan dallanmamış yapıya sahip bir polimerdir. Bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenen selülotik enzimlerle hidrolize edilebilir. Selülozik bakteriler, *Pseudomonas* ve *Actynomicetes* gibi aerob, *Bacillus* ve *Cellulomonas* gibi fakültatif aerob ve *Clostridium* gibi zorunlu anaerob türlerden meydana gelmektedir. Selülaz enzimi kullanılarak selülozdan glukoz, alkol ve protein üretimi alanlarında önemi çalışmalar yapılmaktadır (Heck ve ark, 2002).

Brezilya dünyanın ikinci en büyük soya üreticisidir. Soyanın endüstriyel uygulamaları sonunda yüksek miktarda fibröz atıklar ortaya çıkmaktadır. Bu materyal %23 hemiselüloz, %16 selüloz ve %28 çözünmez proteinden oluşur (Heck ve ark., 2002).

Selüloz, doğada en bol bulunan yenilenebilir biyopolimer olup yaygın olarak bitki hücre duvarlarında bulunur. Glikoz birimlerinin β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşmaktadır. Nişastadan farklı olarak düz bir zincir şeklinde olup herhangi bir sarmal yapı göstermez. Selüloz zincirleri hidrojen bağları ile birbirlerine bağlanarak bir arada tutulurlar.

Bazı durumlarda saf denecek düzeyde bulunmakla birlikte birçok durumda selüloz lifleri hemiselüloz ve lignin gibi diğer yapısal biyopolimerler arasına katılır ve selülozu meydana getirir. Selülozun en önemli özelliklerinden biri, diğer polisakkaritlerde bulunmayan kristal yapı oluşturmeleridir.

Selüloz, doğada glikoz birimlerinin zincir şeklinde sentezlenmesi ve biyosentez bölgelerinde kendiliğinden birleşerek, yaklaşık 30 selüloz zincirinden oluşan elementer fibril yapılara dönüşmesiyle oluşur. Elementer fibriller daha fazla birimler şeklinde paketlenmesi sonucu mikrofibril adı verilen yapıları oluştururlar. Meydana getirilen mikrofibriller, selüloz fibrillerini üretirler. Hidrojen bağları, zincir içi ve zincirler arası bağlarla zincirleri birbirlerine bağlar ve sert bir yapı oluşmasını sağlarlar (Aygan, 2008; Gözükara, 2009).

Selüloz, β -1,4 bağlarıyla birbirine bağlanmış glikoz moleküllerinden oluşmuş bir homopolimerdir (Bhat, 2000). Selülozun bakteriyel parçalanmasında hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalar görev almaktadırlar. Bu işlemler sırasında selüloz, glikoza kadar parçalanır. Bakterilerin selülitik enzimleri ekzo- β -1,4 ve endo- β -1,4 glukanaazlar şeklinde tanımlanmışlardır (Bhat, 2000; Aygan, 2008).

Glukanaazlar endo ve ekzo glukanaazlar şeklinde ya β -1,3 veya β -1,4 bağlarına etki göstererek glukanaaz molekülünü parçalarken, likenaz enzimi β -1,3 ve β -1,4 bağlarını tek başına parçalayarak etki göstermektedir. Endoglukanaazlar selüloz molekülünde zincirin iç bölgelerinde rastgele hidroliz işlemi gerçekleştirir ve büyüklükleri farklı oligosakkaritler meydana getirirler. Ekzoglukanaazlar ise

selüloz molekülünde zincirin indirgenen ve indirgenmeyen ucundan başlayarak hidroliz gerçekleştirir ve ya glukoz (glukanohidrolaz) ya da sellobiozu (Sellobiohidrolaz) ana ürün olarak açığa çıkarır. Ekzoglukanazlar aynı zamanda mikrokristalin selüloz üzerine de etki göstermektedirler. β -Glukozidazlar sellodekstrin ve sellobiozu glukoza parçalayan enzimlerdir.

Selülaz sistemi farklı şekilde aktivite gösteren birden fazla farklı enzimden oluşmaktadır.

1.Endoglukanazlar (endo- β -1,4-glukanazlar veya β -1,4-D-glukan-4-glukanohidrolazlar, EC 3.2.1.4).

2.Ekzoglukanazlar (Sellodekstrinazlar, β -1,4-D-glukan glukanohidrolazlar) (EC 3.2.1.74) ve Sellobiyohidrolazlar (ekzo- β -1,4-glukanazlar veya β -1,4-D-glukan sellobiyohidrolazlar, EC 3.2.1.91).

3.Sellobiyazlar (β -glukosidazlar veya β -D-glukozid glukohidrolazlar, EC 3.2.1.21).

Endo-(1,3-1,4)- β - glukanaz enzimi, arpa ve yulaf gibi tahılların endosperm hücre duvarlarının büyük kısmını oluşturan karma bağlı (1,3-1,4)- β -glukanları hidrolize edebilme özelliğindedir. β - glukanaz üretme yeteneği *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. macerans* ve *B. licheniformis*'te oldukça yaygın olup, enzim setezinden sorumlu genler başka konak organizmalara klonlanarak enzim sentezi gerçekleştirilmiştir (Liming ve Xueliang, 2004; Gözükar, 2009).

Endo-(1,3-1,4)- β - glukanaz enzimi bira üretimi sırasında malt enzimlerinin daha iyi çalışmasını sağlamak için yoğun şekilde kullanılmaktadır. Termostabil β -glukanazlar, maltın kurutulması sırasında inaktive olmadıkları için özellikle tercih edilirler. Maltlanmış arpada bulunan β -1,3-1,4-glukanaz enzimine benzer özellik gösteren bakteriyel β -1,3-1,4-glukanaz, önemli bir endüstriyel enzim olup, çoğunlukla arpanın ezilmesi sırasında akışkanlığı azaltmak için kullanılır. Hayvan yemi hazırlamada, özellikle ızgaralık piliç ve küçük domuzlarda, bakteriyel β -1,3-1,4-glukanaz içeren enzimatik preparatların yem materyaline eklenmesi, arpadan hazırlanmış yemlerin sindirilebilirliğini artırarak verimin yükselmesine olumlu katkı yapabilirler (Zhang ve ark, 2006; Gözükar, 2009).

1.7. Selülozların Bazı Uygulama Alanları

Selülozların ana uygulama alanları gıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, biyo-yakıt, kimya, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, atıkların giderimi, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirlilik giderimidir (Bhat ve Bhat, 1997).

1.8. Elektroforez

Ayırıcı bir ortamın bulunduğu elektriksel alanda iyonlaşabilir gruplara sahip amino asitler, peptidler, proteinler, nükleotidler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküller, sahip oldukları elektrik yüküne bağlı olarak, anod veya katod bölgesine göç ederler. Moleküller aynı yüke sahip olsalar dahi, molekül ağırlıklarının farklılığı nedeniyle sahip olunan yükün, molekül ağırlıklarına oranı (yük/kütle) farklı olacaktır. Bu farklılıklar sebebiyle solüsyon içindeki iyonlar bir elektriksel alana tabii tutulduklarında moleküllerin göçüne yönelik farklılıklar ortaya çıkmaktadır.

Moleküllerin elektriksel alandaki göç hareketleri; moleküler ağırlık, moleküler konformasyon, ortamın pH'sı, kullanılan ayırma ortamının por çapı, sıcaklık, elektroforez zamanı, uygulanan akım şiddeti gibi birçok farklı parametreden etkilenmektedir (Manniatis ve ark, 1982; Kuzu, 2008). Elektroforez tankı ve güç kaynağı elektroforez için gerekli ekipmanlardır. Güç kaynağı elektrodlar arasında doğru akımın dengeli ve düzgün şekilde akışını sağlayarak elektriksel alanın istenilen özellikte oluşmasını sağlar. Elektriksel alanda sürekli olarak, pozitif yüklü moleküller negatif kutba, negatif yüklü moleküller ise pozitif kutba doğru göç ederler.

Örnekler elektroforezin düzgün gerçekleşmesi için tampon içinde çözülerek hazırlanmalıdır. Ayrıca elektroforezde istenilen başarının elde edilmesi için ayırıcı ortamın mutlaka elektroforez tamponu ile hazırlanması gerekir. pH değişikliği, elektroforezi yapılan molekülün iyonik yükünü değiştirebileceğinden tampon pH'sının stabil tutulması önemlidir.

Ayırıcı ortam olarak filtre kağıdı, selüloz asetat, agaroz, nişasta, agar veya poliakrilamid gibi sistemler kullanılabilir. Elektrodlar arasındaki akımı genel olarak tampon iyonları, az bir kısmını ise örnek iyonları iletir. Sıcaklık artışı elektroforez sırasında direncin düşmesine neden olur. Isı artışı tamponun buharlaşmasına neden olduğunda iyonik gücün değişimine yol açar.

Örneğin net elektriksel yükü arttıkça elektroforez düzeyi de artacaktır. Diğer taraftan molekül büyüklüğü arttıkça göç oranı düşecektir. Örnekler aynı molekül büyüklüğüne sahip olsalar bile moleküllerin globüler ya da fibröz oluşu moleküllerin göçünde farklılığa neden olacaktır. Elektroforez işlemi, kullanılan tamponun bileşimi ve iyonik yükünden farklı şekilde etkilenir. Poliakrilamid jel elektroforezi için yaygın olarak kullanılan tampon tris-glisin karışımıdır (Manniatı ve ark, 1982)

1.9.Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAGE) Sistemi

Proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemede en yaygın kullanılan yöntem poliakrilamid jel elektroforezidir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) bir anyonik deterjan olup, proteinlere sıkıca bağlanarak proteinlerin denatürasyonunu sağlar. Yaklaşık 1 g proteine 1,4 g SDS bağlanır. Proteinler, birim kütle başına sabit negatif elektriksel yük kazanırlar. SDS protein molekülünde her üç aminoasitlik birime bağlanarak proteinlere homojen negatif bir yük kazandırır. Böylece proteinler yük bakımından eşitlendiği için moleküler ağırlıklarına göre birbirlerinden ayrılmaları gerçekleşir (Aygan, 2008). Protein molekülleri negatif yüklü olduğundan SDS-protein kompleksleri elektroforez ortamında anoda doğru göç ederler (Temizkan ve Arda, 2008).

Standart SDS-PAGE uygulamaları dikey elektroforez şeklinde gerçekleştirilir. Protein örnekleri genellikle pH'sı 6,8 olan örnek hazırlama tamponu içinde çözülür. Bu tampon denatüran olarak SDS, disülfid bağlarını indirgeyen β -merkaptoetanol, yoğunluk oluşturan gliserol veya süktroz ve bromfenol mavisi içermektedir. Elektroforez uygulamasında kullanılan jel, genellikle dengeleme (stacking) ve ayırma (separating) jeli olarak iki kısımdan oluşur. Her iki jel içerdikleri akrilamid konsantrasyonları bakımından birbirlerinden farklılık gösterir.

Bu iki jeldeki pH ve konsantrasyon farklılığı sayesinde, protein karışımlarının birbirlerinden ayrılması ve belirgin bandlar oluşturmaları sağlanır (Aygan, 2008).

Analiz edilecek örnek, bir izleme boyası ile (Brom-Phenol Blue) birlikte jelin üst kısmında oluşturulan kuyucuklara yerleştirilir ve sistemden mA şeklinde elektrik akımı geçirilir. Örnekteki bileşenlerden daha hızlı hareket eden izleme boyası jelin bitimine ulaştığında akım kesilir, jel protein boyama karakterindeki bir boya ile (Coomassie-Brillant-Blue R 250, G-250, Silver Stain vb) boyanır (Temizkan ve Arda, 2008). Jelin moleküler elek özelliğinden dolayı belirli bir sürede yol aldıkları mesafe moleküler ağırlığa göre proteinden proteine farklılık gösterecektir. Moleküler ağırlığı bilinen standart bir protein (marker) ile analizi yapılacak örnek aynı ortamda yürütülerek, örnek proteinlerin moleküler ağırlıkları bulunabilir (Aygan, 2008). Marker proteinin jelde göç ettiği mesafe, örnekler ile kıyaslanarak moleküler ağırlık Da veya kDa olarak saptanır (Temizkan ve Arda, 2008).

1.10.Kromatografi

Kromatografi, enzim saflaştırmasında temel bir öneme sahiptir. Bu sistemde analiz edilecek moleküller, fiziksel (büyüklük, şekil, yük ve hidrofobik etkileşim), kimyasal (kovalent bağları) ve biyolojik (biyospesifik afinite) özelliklerine bağlı olarak ayrılırlar (Aehle, 2004).

Rus bilim adamı Mikhail Semyonovich Tsvet tarafından ilk olarak bitki pigmentlerini ayırma metodu olarak geliştirilmiş ve ismini oradan almıştır. Günümüzde son derece duyarlı ve etkin bir yöntem olarak geçerliliğini sürdürmektedir. Kromatografik sistemin temel bileşenleri, sabit faz, kromatografik yatak, hareketli faz, dağıtım sistemi ve bazı durumlarda tespit sisteminden meydana gelir. Sabit faz, destek matriksle tutulmuş katı, jel veya immobilize sıvıdır. Hareketli faz ise kromatografik yatakta, sabit faz boyunca bir sıvı veya bir çözücü olarak etki eden gazdan oluşur. (Temizkan ve Arda, 2008).

Saflaştırılacak malzeme, sabit faz üzerinde hareket ederken, karışım içindeki moleküllerin sabit fazla etkileşimleri farklı olur. Sabit faz ile sıkı ilişki gösteren moleküllerin hareketi, daha zayıf ilişki gösteren moleküllerin hareketine göre sabit

faz boyunca daha yavaş bir ilerleme gösterir. Böylece farklı tipteki moleküller destek materyali boyunca hareket ederken birbirlerinden ayrılırlar (Aygan, 2008).

1.10.1.İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography)

Genellikle bir yüzey üzerine tutturulmuş silika jel, alüminyum oksit ya da selüloz gibi ince bir adsorbent tabakadan oluşan sabit faz kullanılır. Sıvı faz ise, saflaştırılması istenen karışımın, içinde çözündüğü kapiller etki ile çekilebilen uygun bir çözücüdür. İnce tabaka kromatografi tabakaları, silika jel, (adsorbent malzeme), kalsiyum sülfat (bağlayıcı) ve su ile hazırlanır. Hazırlanan karışım genellikle reaksiyon vermeyen cam, kalın alüminyum folyo ya da plastik malzemeler üzerine yayılır. Hazırlanan plakalar havada kurutulduktan sonra, 110°C'lik fırında 30 dakika dikey pozisyonda tutularak, aktive edilirler. Adsorban tabakanın kalınlığı genellikle, analitik amaçlı işlemlerde 0.1-0.25 mm, preparatif çalışmalarda 1-2 mm aralığında kullanılmaktadır (Aygan, 2008).

İnce tabaka kromatografisinde molekülün jeldeki hareketi genellikle aşağıdan yukarıya doğru yükselen yöntem ile gerçekleştirilir. Bunun için cam plaka veya plakaların yerleştirileceği ekipman değişik boyutlar ve şekilde olabilir. Sistemin çoklu uygulamalara uygun olması ve solvent sistemi ile atmosfer doygunluğunun sağlanabilmesi için kapağının olması gerekir. Yürütme işlemi tamamlanmış tabakalar, genellikle havada, infrared ışık altında veya fırınlarında kurutulur. Seperasyonu gerçekleştirilmiş malzemelerin görünür hale gelmesi için kullanılan çözeltiler zehirli veya koroziv olabilecekleri için, çeker ocak ya da özel kabinlerde püskürtme yapılarak gerçekleştirilir. Birçok madde ince tabaka üzerinde herhangi bir özel tespit metoduna gerek kalmadan görülebilmektedir (Aygan, 2008).

Bu çalışmada, özellikle kağıt endüstrisinde yaygın kullanım alanı olan selüloz-free ksilanaz enzim üreticisi *Bacillus* suşlarının doğal ortamlardan izolasyonu, enzimin üretimi ve karakterizasyonunun yapılması ve enzimin biyoteknolojik kullanım olanaklarının araştırılması amaçlanmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Nakamura ve ark (1993), topraktan izole edilen alkalofilik *Bacillus* 41M-1 suşundan farklı özellikte ekstraselüler ksilanaz enzimi üretmişlerdir. Amonyumsülfat fraksiyonlama ve anyon değiştirme kromatografisi kullanılarak saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının 36 kDa, izoelektrik noktasının ise pH 5.3 olduğu saptamıştır. Ksilanaz-J'nin optimum aktivite sıcaklığı 50°C ve optimum pH'sı 9.0 olarak bulunmuştur. Enzimin, pH 9.0 ve 55°C'de 30 dakika inkübe edildiği zaman stabilitesini korumuştur. Ksilanaz-J enzimi Hg^{2+} ve N-bromosuccinimide ile tamamen inhibe olmuştur. Ksilanaz-J enzimi kristalin selüloz ve karboksimetil selüloz üzerine herhangi bir hidroliz etkisi göstermemiştir.

Blanco ve ark (1995), pirinç üretilen topraktan, alkali tolerant *Bacillus* sp. BP-33 suşunu izole etmişlerdir. Saflaştırılarak ksilanaz-A şeklinde adlandırılan enzimin SDS-PAGE zymogram analizi ile moleküler ağırlığının 32 kDa, izoelektrik noktasının pH 9.3 olduğunu belirtmişlerdir.

Gessesse ve Gashe (1997), alkalik ksilanaz üreten alkalifilik *Bacillus* sp. AR-009 suşunu Etiyopya'daki alkalik soda gölünden izole etmişlerdir. Enzimin pH 9.0'da optimum aktivite gösterdiği ve geniş pH aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir. Enzim 60–65°C'de optimum aktivite göstermiştir. Enzimin pH 8.0 ve 9.0 değerleri ve 55°C'de 2.5 saat inkübe edildiği zaman, orijinal aktivitesini yaklaşık %80 koruduğu saptamışlardır. Enzim pH 9.0 ve 60°C'de 1 ve 2.5 saat inkübe edildiği zaman orijinal aktivitesini sırasıyla %63 ve %54 oranında koruduğu bulunmuştur.

Gessesse (1998), bir alkalifilik *Bacillus* sp. suşu olan AR-009'un süpernatant kültüründen XylA ve XylB olarak belirttiği iki ksilanaz enzimi saflaştırılmıştır. Bu iki enzimin moleküler ağırlıkları SDS-PAGE analizinde, sırasıyla 23kDa ve 48kDa olarak ölçülmüştür. XylA enzimi optimum aktivitesini pH 9.0, XylB ise pH 9.0-10.0 aralığında göstermiştir. XylA ve XylB enzimlerinin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C olarak bulunmuştur. Her iki enzim de pH 8.0 ve 9.0 da 60 ve 65°C'de inkübe edildiklerinde stabil kalmışlardır.

Dhillon ve ark (2000), izole edilen ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 6.0-7.0 ve 80°C'de gösterdiğini saptamışlardır. Enzim, 70°C ve pH 9'da 1 saat

inkübe edildiğinde orjinal aktivitesini %67 korumuştur. Enzimin yarılama ömrü 70°C ve pH 7.0'de 24 saat olarak saptanmıştır. *Bacillus circulans* AB 16 suşundan üretilen ksilanaz enzimi, ökaliptus ağacından üretilen kağıt hamurunun ön ağartma işleminde kullanıldığında, ağartma amacıyla kullanılan klor miktarı %20 oranında azalmıştır, fakat kağıt hamurunun parlaklığında hiçbir azalma görülmemiştir.

Subramaniyan ve Prema (2000), ksilanaz üreten birçok bakteri izole ederek karakterizasyonunu yapmıştır. Bu suşlardan *Bacillus* SSP-34 (alkalifilik), nolu izolattan üretilen ksilanazın aktivitesi 100 IU/mL'den daha yüksek bulunmuş ve enzimin optimum aktivitesi 50°C'de, pH 6.0-8.0 aralığında saptanmıştır. pH 7.0'de oldukça düşük aktivite (0.4 IU/mL) elde edilirken, pH 9.0'da ise hiç selülotik aktivite saptanmamıştır.

Balakrisnan ve ark (2002), alkalofilik *Bacillus* (NCL 87-6-10) izole ettikleri selüloz free alkalik ksilanaz enziminin optimum aktiviteyi pH 8.0'de gösterdiğini belirtmişlerdir.

Balakrishnan ve ark (2002), buğday kepeği ve maya özütü kullanılarak üretilen alkalifilik *Bacillus* sp. suşundan "A" ve "C" şeklinde tanımlanan iki alkalik ksilanaz izole etmişlerdir. Ksilanaz "C" enzimi, SDS-PAGE jel elektroforeziyle analiz edildiğinde moleküler ağırlığının 25 kDa pH optimumunun 8.9 olduğu bulunmuştur. Buna karşın ksilanaz "A" enziminin optimum aktivitesini pH 5.3'te gösterdiği ve moleküler ağırlığının 45 kDa olduğu belirtilmiştir.

Tseng ve ark (2002), kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi atıksu arıtma tesisinden izole ettikleri *Bacillus firmus* bakterisinden iki ksilanaz enzimi izole etmişlerdir. Bu enzimlerin moleküler ağırlıklarının sırasıyla 45 kDa ve 23 kDa olduğu ve her iki enzimin de optimum aktivitelerini 37°C ve pH 5.0-11.0 aralığı gösterdiğini saptamışlardır. Enzimler birchwood ksilanı başlıca ksiloz, ksilotrioz ve ksiloheksoz ürünlerine hidroliz etmişlerdir. Enzimler farklı etki şekilleri göstermelerine rağmen her ikisinin kombinasyonu, ksilanı mono ve disakkaritlere hidrolize etmiştir.

Marichamy ve Mattiasson (2005), oat spelt ksilan ihtiva eden besiyerinde 4 farklı *Clostridia* suşunu pH 7.0'de ve 37°C'de üretmişler ve maksimum ksilanaz enzim üretimini 21-24. saatler arasında saptamışlardır.

Damiano ve ark (2006), izole ettikleri alkalifilik *Bacillus licheniformis* 77-2 suşundan önemli miktarlarda termostabil selülaaz-free ksilanaz enzimleri üretmiştir. SDS-PAGE analizi ile enzimin moleküler ağırlıkları 17 kDa ve 40 kDa olan iki alt birimden meydana geldiği bulunmuştur. Alt birimler saflaştırılarak analiz edildiğinde optimum aktivite gösterdikleri pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla 7.0 ve 11.0 ile 70 ve 75°C olduğu bulunmuştur. Enzim alt birimleri 50°C ve 60°C’de bir saat inkübe edildiğinde orijinal aktivitenin %90 korunduğu saptanmıştır.

Ayyachamy ve ark (2007), tarımsal kalıntıları kullanarak *Bacillus subtilis* C 01 suşunun selülaaz-free ksilanaz enzimi izole etmişlerdir. Enzime ait biyolojik ağartma çalışmalarının sonuçları ksilanazın, otsu bitki liflerinin etli kısımlarının parlaklığını artırmada potansiyel bir uygulamaya sahip olduğunu açığa çıkarmıştır. Bu çalışmanın önemi; ksilanaz kullanılarak muz liflerinin, ipeksi pamuk ve pamuk özlerinin ağartılmasında yapılan ilk çalışma olmasıdır. İkincil liflerin biyolojik ağartma sonuçları otsu bitki liflerinin kağıt üretimi için ham madde olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Aygan ve Arıkan (2009), *Bacillus* sp. X13 suşundan izole edilen ekstraselüler ksilanaz enziminin zimogram analizi sonuçlarına göre moleküler ağırlıkları 68.5 kDa, 80.6 kDa, 95.5 kDa ve 108.4 kDa olan dört farklı izozimden meydana geldiğini saptamışlardır. *Bacillus* sp. X13 suşuna ait ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.0, optimum sıcaklığı 40°C bulunmuştur.

Monishe ve ark (2009), ksilanazın uygulama alanları hayvan besleme, fırıncılık, içecek ve tekstil endüstrisi, selozik kağıtların ağartılması, etanol ve ksilitol üretimi gibi biyoteknolojik uygulamalar vardır. Ksilanaz ksiloz birimlerini depolimerize ederek etki gösterir. Ksiloz bakteri ve mantarla tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Azeri ve ark (2010), *Bacillus* suşlarından izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimini sentezleyen bakterilerin tamamının 25–50°C aralığında ürediklerini, optimum üreme ve besiyerinde enzim sentezini ise 40°C’de gerçekleştirdiklerini 55°C’de ise üremeni görülmediğini belirtmişlerdir.

Chidi ve ark (2010), ksilan bitki hücre duvarında bulunan önemli bir hemiselülozik polisakkarit olup, selülozdan sonra en fazla bulunan polisakkarittir.

Bu biyopolimer dünyadaki yeilenebilir enerji kaynaklarını 1/3 ünü meydana getirmektedir.

Savitha ve ark (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan izole ettikleri alkalın termostabil selüloz-free ksilanaz enziminin pH 9.0'da %90, pH 10.0'da %85 aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak bakteri izolasyonu ve identifikasyonunda kullanılan kimyasallar, toprak örneklerinden izole edilmiş *Bacillus* sp. bakterileri kullanılmıştır. Ekipman olarak su ve yağ banyosu, UV Visible spektrofotometre, soğutmalı santrifuj, PAGE elektroforez sistemi, TLC sistemi, otoklav ve steril hava kabini kullanılmıştır.

3.1.1. Bakteri İzolasyonunda Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. N1 Besiyeri

Bakterilerin izolasyonu ve stok kültürlerinin saklanması amacıyla kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	(g/L)
Pepton	10
Et Özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
Agar	15
pH	10.0

(Besiyerinin pH'sı 1 N NaOH ile izolasyonun gerçekleştirileceği değere ayarlanıp, otoklavda steril edilerek kullanılmıştır).

3.1.1.2. CMC-LB Agar Besiyeri

Selüloz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı 1 N NaOH ile izolasyonun gerçekleştirildiği değere ayarlanmıştır.

Bileşimi	(g/L)
Trypton	10
Maya Ekstraktı	5
NaCl	10
CMC	1
Agar	15

3.1.1.3. Ksilanlı Besiyeri

Ksilanaz aktivitesinin saptanması amacıyla kullanılmıştır. Besiyerinin pH'sı 1 N NaOH ile izolasyonun gerçekleştirildiği değere ayarlanmıştır (Gessesse, 1998).

Bileşimi	(g/L)
Pepton	5
Maya Özütü	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1
K ₂ HPO ₄	1
NaCl	5
Ksilan (Oat Spelt)	5
Agar	15

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sını ayarlamak ve tampon çözeltileri hazırlamak için 0.2 N, 1 N ve 2 N NaOH olmak üzere üç farklı derişimde hazırlanmış ve kullanılmıştır.

3.1.2.2. Kongo Kırmızısı (%0.1)

Katı besiyeri ve SDS-PAGE jelinde selüloz ve ksilanaz aktivitelerinin saptanması için kullanılmıştır. 0.1 g kongo kırmızısı 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır (Voget ve ark, 2006).

3.1.2.3. NaCl Çözeltisi (1 M)

Katı besiyeri ve SDS-PAGE jelinde selüloz ve ksilanaz aktivitelerinin saptanması işlemi sırasında besiyeri ve jeldeki boyanın uzaklaştırılması amacı ile kullanılmıştır (Voget ve ark, 2006).

3.1.2.4. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0)

Çöktürme sonucu elde edilen enzimin çözülerek sıvılaştırılması için kullanılmıştır.

3.1.2.5. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimin pH 6.0-8.0 arasındaki aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0.2 M NaH_2PO_4 ile 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve distile sudan uygun hacimlerde alınarak karıştırılır ve istenilen pH'daki tampon elde edilir (Burhan ve ark, 2003).

pH	0.2 M NaH_2PO_4 (27.8 g/L) mL	0.2 M Na_2HPO_4 (53.65 g/L) mL	Distile Su mL
6.0	87.7	12.3	100
6.5	68.5	31.5	100
7.0	39.0	61.0	100
7.5	16.0	84.0	100
8.0	5.3	94.7	100

3.1.2.6. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimin pH 8.5-10.5 aralığındaki aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında 0.2 M Glisin ile 0.2 M NaOH ve distile su uygun hacimlerde karıştırılır ve istenilen pH'daki tampon elde edilir (Burhan ve ark, 2003).

pH	0.2 M NaOH (15.01g/L) mL	0.2 M Glisin (8g/L) mL	Distile Su mL
8.5	4.0	50	146
9.0	8.8	50	141.2
9.5	22.4	50	127.6
10.0	32.0	50	118
10.5	45.5	50	104.5

3.1.2.7. Borax-NaOH Tamponu

Enzimin pH 11.0-12.5 arasındaki aktivitelerini saptamak amacı ile kullanılmıştır. Tamponu hazırlamak için 0.05 M Boraks (19.05 g/L) çözeltisinden 50 mL alınarak üzerine istenilen pH elde edilinceye kadar (0.2 M NaOH ve yüksek pH için 2 N NaOH) uygun NaOH çözeltisinden eklenerek son hacim 200 mL olacak şekilde distile su ilave edilir (Burhan ve ark, 2003).

3.1.2.8. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)

Enzim reaksiyonunu durdurmak ve aktivite sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacı ile kullanılmıştır. 1 g DNS 50 mL distile su içerisinde çözülür, üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2 N NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanır (Miller, 1951).

3.1.3. SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar**3.1.3.1. Solüsyon A**

29.2 g Akrilamid, 0.8 g Bisakrilamid bir miktar distile suda çözülür ve son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Monomer çözeltisi koyu renkli şişede, buzdolabında saklanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.2. Solüsyon B (4X)

75 mL 2 M Tris-HCl (pH 8.8), 4 mL %10'luk SDS ve 21 mL distile su karışımından oluşur (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.3. Solüsyon C (4X)

50 mL 1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4 mL %10'luk SDS ve 46 mL distile su karışımından meydana gelir (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.4. Amonyum Persülfat (AMPS) %10

0.5 g AMPS 5 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır. Daima yeni hazırlanmalıdır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.5. Örnek Yükleme Tamponu (1X)

62.5 mM Tris (pH 6.8), %2 SDS, %5 β -merkaptoetanol, %10 Gliserol ve %0.002 Bromfenol mavisi kullanılarak hazırlanmıştır (Zhang ve ark, 2009).

3.1.3.6. Elektroforez Yürütme Tamponu

3 g Tris, 14.4 g Glisin, ve 1 g SDS bir miktar distile suda çözülür ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.7. Jel Boyama (Staining) Solüsyonu

1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kağıdından süzildükten sonra, karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 mL distile su eklenerek hazırlanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.8. Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu

100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL distile su karışımından oluşur (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.9. Zimogram Analizleri için Kullanılan Renatürasyon Solüsyonları

Solüsyon-1: 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) ve %40 isopropanol karıştırılarak hazırlanmıştır.

Solüsyon-2: 50 mM Na_2HPO_4 ve 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2) karışımından oluşmuştur.

Solüsyon-3: 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.2), 5 mM β -merkaptoetanol ve 1 mM EDTA karışımından oluşmuştur (Burhan ve ark, 2003).

3.1.4. İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları

3.1.4.1. Kloroform- Asetik Asit- Distile Su Çözeltisi

Ksilanaz enzimine ait hidroliz ürünlerinin belirlenmesinde hareketli faz olarak kullanılmıştır. Kloroform- asetik asit- distile su sırasıyla 6:7:1 v/v/v hacminde hazırlanmıştır (Singh ve ark, 2004; Aygan ve Arıkan, 2009).

3.1.4.2. Anilin- Difenilamin- Ortofosforik Asit Çözeltisi

Anilin (%1 v/v) ve difenilamin (%1 w/v) aseton içerisinde çözüldükten sonra karışıma, çözeltideki konsantrasyonu %10 olacak şekilde ortofosforik asit (v/v) ilave edilerek hazırlanmıştır (Singh ve ark, 2004; Aygan ve Arıkan, 2009).

3.1.4.3. Ksiloz (%1 w/v) ve Maltoz Çözeltisi (%1 w/v)

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacı ile standart olarak kullanılmışlardır.

3.2. Metod

3.2.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisi

3.2.1.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu

Farklı ortamlardan alınan toptak örneklerinden 1 g tartılıp pH'sı 10.0'a ayarlanmış sıvı N1 besiyerine inoküle edilmiştir. 40°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra 80°C'de 10 dk ısı uygulaması gerçekleştirilmiştir. Örnek, 40°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tek koloni elde etmek için N1 besiyerine yayma ekim yapılmış ve tekrar 24 saat 40°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Lennette ve ark, 1985).

İnkübasyon sonrasında tek düşmüş suşlardan koloni morfolojilerine göre karakteristik *Bacillus* görünümünde olanlar steril kürdan yardımı ile çizgi ekim şeklinde N1 besiyerine aktarılarak 24 saat 40°C’de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Üreyen suşlar sonraki analizler için stok kültür şeklinde saklanmıştır.

3.2.2. Bakteri Tanılaması

Seçilen bakteri örneklerinin teşhisi için Gram boyama, spor oluşumu gibi mikroskopi testlerinin yanısıra hareketlilik, katalaz ve kültür morfolojisinin incelenmesi ile glikoz, ksiloz ve mannitolden asit oluşumu gibi biyokimyasal testler yapılmıştır (Jin ve ark, 1990).

3.2.3. Katı Besiyerinde Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Topraktan izole edilmiş *Bacillus* sp. suşları oat spelt ksilan bulunan ve pH’sı 10.0’a ayarlanmış olan besiyerine çizgi şeklinde ekilerek 40°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda %0.1’lik kongo kırmızısı ile 15 dakika boyama işlemi yapılmıştır. Bu işlemden sonra boya dökülerek 1 M NaCl ile 15 dakika boyanın geri alınması işlemi gerçekleştirilmiştir. Etrafında sarı zon bulunan suşlar ksilanaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Voget ve ark, 2006; Aygan ve Arıkan, 2009).

3.2.4. Katı Besiyerinde Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Ksilanaz pozitif suşlar CMC agar besi yerine (pH-10.0) çizgi şeklinde ekilerek 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında %0.1’lik kongo kırmızısı ile 15 dakika boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra boya dökülerek 1 M NaCl ile 15 dakika boyanın fazlası geri alınmıştır. Etrafında sarı zon bulunan suşlar selülaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. (Hols ve ark, 1994; Voget ve ark, 2006).

3.2.5. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürediği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması

Bu amaçla pH 6.0-13.0 aralığında sahip oat spelt ksılanlı katı besiyerlerine selüloz-free ksılanaz pozitif olarak saptanan suşlar, çizgi şeklinde ekilerek 20, 30, 40, 50 ve 60°C'de 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda üreme ve enzim sentezinin gerçekleştiği pH ve sıcaklık aralığı, koloni ve aktivite zon çapı ölçülerek saptanmıştır (Hols ve ark, 1994; Voget ve ark, 2006).

3.2.6. Enzim Üretimi ve Kısmi Saflaştırma

Seçilen bakteri örneklerinden selüloz negatif ve en geniş ksılanaz zon çapına sahip X6 suşu enzim üretimi için kullanılmıştır. Bu amaçla seçilen suşun 1 gecelik taze kültüründen içerisinde oat spelt ksılan bulunan pH'sı 10.0'a ayarlanmış sıvı besiyerine substrat hacminin 1/10'u oranında aşılama yapılarak bakterinin izole edildiği sıcaklıkta (40°C'de), 250 devir/dakikada 24 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kültür +4°C ve 8000 d/dak da 30 dakika santrifuj edilerek bakteriler kültürden uzaklaştırılmış ve sıvı faz temiz bir şişeye aktarılmıştır. Sıvı fazın üzerine orjinal hacmin %70'i oranında %96'lık soğuk etanol eklenmiş ve -33°C'de 1 gece bekletilerek alkol presipitasyonu yapılmıştır. Örnek +4°C'de 15 dakika süreyle 10000 d/dak santrifuj edilerek enzim sıvı fazdan geri kazanılmıştır. Çökelti, pH'sı 7.0 olan 0.1 M'lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek aktivite analizlerinde kullanılmak amacıyla +4°C'de saklanmıştır (Srivastava, 1987).

3.2.7. Enzimin Optimum pH'sının Saptanması

Kısmi saflaştırma işlemi ile elde edilen enzim çözeltisinin optimum aktivite gösterdiği pH'nın saptanması için Na-fosfat (pH 6.0-8.0), Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) ve Borax-NaOH (pH 11-13.0) tamponları kullanılarak %1'lik oat spelt ksılan bulunan substrat çözeltileri hazırlanmıştır.

Aktivite tayini için 0.5 mL enzim çözeltisi ve her pH'daki substrat çözeltilerinden 0.5 mL örnek, tüplere konularak enzimin üretildiği sıcaklıktaki su banyosunda 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda her bir örnek tüpüne eşit miktarda DNS ayırıcı konularak (1 mL enzim+substrat, 1 mL DNS) 5 dakika kaynatma işlemi uygulanmıştır. Tüpler çeşme suyunda soğutulduktan sonra Cecil₅₅₀₀ UV-visible spektrofotometrede 540 nm dalga boyu kullanılarak, köre karşı (eşit hacimde substrat ve DNS ayırıcı kullanılarak hazırlanmış) okuma yapılmıştır. Her test iki kez tekrarlanmıştır (Arikan, 2008).

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranlanıp, relatif enzim aktivitesi saptanmıştır (Gessesse ve Gashe, 1997; Burhan ve ark, 2003).

3.2.8. Enzimin Optimum Aktivite Sıcaklığının Saptanması

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın saptanması için 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 ve 120°C'lik sıcaklıklar seçilmiştir. Aktivite tayinleri için 20-60°C aralığındaki denemeler su banyosunda, 70-120°C'deki denemeler yağ banyosunda yapılmıştır. Aktivite tayini için 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat karıştırılarak (optimum pH değerinde hazırlanmış) seçilen sıcaklıklarda 60 dakika süreyle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır (AiBa ve ark, 1983; Srivastava, 1987; Burhan ve ark, 2003).

3.2.9. Enzimin Sıcaklık (Termal) Stabilitesinin Saptanması

Selüloz-free ksilanaz enziminin sıcaklık stabilitesinin saptanması için 30-100°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dakikalık ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir (sadece enzim kullanılarak). Ön inkübasyon işleminden sonra 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat (optimum aktivitenin gerçekleştiği pH'da hazırlanmış) karıştırılarak optimum aktivitenin görüldüğü sıcaklıkta 60 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol testi için, ön işleminden geçmemiş enzim ve substrat kullanılarak standart aktivite analizi yapılmıştır. Kontrolden elde edilen sonuç 100 kabul edilip, farklı sıcaklık değerlerinden elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Burhan ve ark, 2003; Arikan, 2008; Aygan ve Arikan, 2009).

3.2.10. Enzimin pH Stabilitesinin Saptanması

Stok enzim örneğinden (+4°C’de saklanan) 2 mL alınarak eppendorf tüplerine konulmuş ve 11000 devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra örneğin üzerine 2 ml tampon eklenerek (pH’sı 7.0-12.0 olan yeni hazırlanmış tampon çözeltilerinden), süspansiyon elde edilmiştir. Karışım 30°C’de 24 saat ön inkübasyona bırakılmıştır.

Ön inkübasyon süresinin sonunda 0.5 ml enzim (farklı pH çözeltilerinde inkübe edilmiş) ve 0.5 ml substrat (optimum aktivitenin görüldüğü pH değerinde hazırlanmış) çözeltisi karıştırılarak optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklıkta 60 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol testi için, ön işleminden geçmemiş enzim ve substrat kullanılarak standart aktivite analizi yapılmıştır. Kontrolden elde edilen sonuç 100 kabul edilip, farklı sıcaklık değerlerinden elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Burhan ve ark, 2003; Arikan, 2008; Aygan ve Arikan, 2009).

3.2.11. NaCl’ün Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Sıvı enzim örneğinden 2’şer mL alınarak 11000 devirde 5 dakika santrifüj edilip üst faz atılmıştır. Tüplere 2 ml %3, %5, %10, %15, %20, %25, %30 konsantrasyonda NaCl çözeltisi ilave edilerek enzim sıvılaştırılmıştır. Hazırlanan karışım 60 dakika optimum sıcaklıkta ön inkübasyona bırakılmıştır.

Bu sürenin sonunda 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat karıştırılarak optimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklıkta 60 dakika inkübasyon yapılmış ve standart aktivite tayini yapılmıştır.

Kontrol testi için, ön işlem den geçmemiş enzim ve substrat kullanılarak standart aktivite analizi yapılmıştır. Kontrolden elde edilen sonuç 100 kabul edilip, NaCl konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak kalan enzim aktivitesi saptanmıştır (Burhan ve ark, 2003; Arıkan, 2008; Aygan ve Arıkan, 2009).

3.2.12. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Deterjan ve Metal İyonlarının Etkisi

Enzim çözeltisi 2 mL miktarda eppendorf tüplerine aktararak çöktürüldükten sonra sıvı faz atılıp, tüplere 5mM EDTA, 3mM PMSF, %1v/v β -Merkaptoetanol, %1w/v SDS, %1v/v Triton X-100, %1v/v H_2O_2 , 5mM $MnCl_2$, 5mM $CaCl_2$, 5mM NaCl, 5mM $ZnCl_2$, 5mM $BaCl_2$ ve 8M Üre eklenerek süspansiyon haline getirilmiş, 40°C’de 1 saat ön inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra standart aktivite tayini gerçekleştirilmiştir (Arıkan, 2008; Aygan ve Arıkan, 2009)..

3.2.13. SDS-PAGE Elektroforezinde Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Enzimin moleküler ağırlığı ve zimogram analizi için içerisinde %1 oat spelt ksılan bulunan %10’luk SDS-PAGE kullanılmıştır (Laemmli, 1970; Aygan ve Arıkan, 2009).

3.2.13.1. Ayırıcı Jelin Hazırlanması (%10’luk)

Solüsyonlar	Miktar
Sol A	6.5 mL
Sol B	3.7 mL
Distile Su	8.4 mL
Substrat (%3’lük oat spelt ksılan çözeltisi)	1.3 mL
AMPS (%10)	66 μ L
TEMED	13 μ L

Sol A, Sol B, distile su ve substrat çözeltisi yukarıda belirtilen miktarda karıştırılarak 5 dakika degaz işlemi gerçekleştirilmiştir. Degaz işleminden sonra kaşıma uygun miktarda yeni hazırlanmış AMPS ve TEMED ilave edildikten sonra cam plakalar arasına dökülmüştür.

Jelde düzgün bir yüzey elde etmek ve atmosferik oksijenin difüzyonunu önlemek amacı ile üst kısmına distile su ilave edilerek oda sıcaklığında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.13.2. Dengeleme Jelinin Hazırlanması

Solüsyonlar	Miktar
Sol A	1.5 mL
Sol C	2.25 mL
Distile Su	5.25 mL
AMPS (%10)	30 µL
TEMED	7.5 µL

Ayırıcı jelin polimerizasyonu tamamlandıktan sonra jelin üst yüzeyindeki distile su dökülerek, üzerine uygun hacimde hazırlanan dengeleme jeli dökülmüştür. Dökme işleminden sonra tarak yerleştirilerek $20\pm1^{\circ}\text{C}$ de bir gece polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Bollag ve ark, 1996).

3.2.13.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Polimerizasyon tamamlandıktan sonra örnek yükleme tamponunda sıvılaştırılmış ve 2 dakika kaynatılmış enzim, 30 µL konsantrasyonda jele yüklenmiştir. Örnekler ayırma jeline ulaşınca kadar 25 mA akım verilerek, ayırma jeline ulaştıktan sonra 13 mA akım uygulaması ile bir gece elektroforez gerçekleştirilmiştir. Enzim örneğinin moleküler ağırlığını saptamak için jele 10 µL marker protein yüklenmiştir.

3.2.13.4. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizleri

Boyama işleminden önce marker'ın bulunduğu jel parçası kesilerek Comassie Brilliant Blue R250 ile 4 saat boyama gerçekleştirilmiş ve 24 saat boyayı geri alma işlemi uygulanarak marker proteinler görünür hale getirilmiştir.

Enzim örneğinin bulunduğu jel bölümüne renatürasyon işlemleri uygulanmıştır. Bu amaçla solüsyon-1 ve 2 içinde oda sıcaklığında 1 saat ve solüsyon-3 içinde +4°C'de 1 gece inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Renatüre olan jel enzim aktivitesinin gerçekleşmesi için cam plaka üzerine aktarılıp streç film ile sarıldıktan sonra optimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklıkta 5 saat süreyle inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda jel % 0.1'lik Kongo Kırmızısı (w/v) içerisinde 15 dakika boyanmış ve 1 M NaCl çözeltisi ile 15 dakika boya geri alındıktan sonra sarı renkte aktivite gösteren jel bölgesi saptanmıştır. Aktivite gösteren jel ile marker'ın bulunduğu jel parçaları cam plaka üzerinde birleştirilerek aktivite gösteren yapının moleküler ağırlığı saptanmıştır (Aygan ve Arıkan, 2009).

3.2.14. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Yöntemiyle Reaksiyon Ürünlerinin Saptanması

Daha önceden yıkanmış ve kurutulmuş standart ölçüdeki (20x20) camlar, plaka hazırlama sistemine (leveling device) yerleştirilerek, kenar raylar ve sabitleme mandalı ile tutturulmuştur. Kieselguhr "Silika Jel 60 GF-254" materyalinden 30 g alınarak 60 mL (yaklaşık iki kat) distile su içerisinde, kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım, yayma aparatına doldurulmuş ve 0.25 mm kalınlıkta tabaka oluşturacak şekilde cam plakalar üzerine yayılmıştır. Cam plakalar 45 dakika oda sıcaklığında bırakılarak kurutma işlemi yapılmıştır.

Kuruyan plakalar birbirine değmeden dikey pozisyonda fırına yerleştirilmiş ve 115°C sıcaklıkta 1 saat aktive edilmişlerdir. Aktifleşen plakalar oda sıcaklığında soğuyuncaya kadar bekletilmiştir.

Önceden uygun şekilde hazırlanan reaksiyon ürünü 10 µL miktarlarda silika jel üzerine yüklenmiştir. Ksilanaz ürünlerinin doğrulanabilmesi için (marker amaçlı) silika jel plağına %1'lik ksiloz ve %1'lik maltoz çözeltilerinden 7 µL hacimde ilave edilmiştir. Hazırlanan cam plakalar TLC tankına yerleştirilerek kloroform-asetik asit-distile su (6:7:1) karışımından oluşan hareketli faz kullanılarak yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Yaklaşık 7 saatlik uygulamadan sonra reaksiyon ürünlerinin görünür hale getirilmesi için jelin üzerine anilin-difenilamin-ortofosforik asit karışımı püskürtülüp, jel 120°C'lik fırında 45 dakika kurutulmuştur (Aygan ve Arıkan, 2009). Oluşan reaksiyon ürünü ile marker örneklerinin jeldeki görüntüleri karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Çalışmada toplam 271 *Bacillus* sp. suşu izole edilmiş olup bunlardan 169 suş hem selüloz hem ksilanaz negatif bulunmuştur (%62,3), 63 suş ksilanaz ve selüloz pozitif bulunurken (%23.24), 29 suş selüloz pozitif ksilanaz negatif özellikte bulunmuştur (%1.71). Toplam 271 bakteri suşu içerisinde 10 suş selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz aktivitesi göstermiş (%3.69) olup aralarında en iyi aktivite zone gösteren X6 suşu ksilanaz enziminin üretimi ve karakterizasyonu için kullanılmıştır.

Enzim üretimi ve karakterizasyonunda kullanılmak için seçilen suşlar, geniş, beyaz renkli ve dalgalı kenarlı koloni morfolojisine sahiptirler. Suşlar gram pozitif, aerob, spor oluşturan, çubuk şekilli ve hareketli bakterilerdir. Glikoz, ksiloz ve mannitolü asit oluşturarak parçalamakta ve katalaz pozitif özellik göstermektedirler. Koloni morfolojileri ve biyokimyasal özelliklerine göre seçilen suşlar *Bacillus* sp. şeklinde tanımlanmıştır.

4.2. Bakterinin Katı Besiyerinde Ürettiği ve Enzim Sentezini Gerçekleştirdiği pH ve Sıcaklık Aralığı Sonuçları

Enzim üretimi ve karakterizasyonu için seçilen *Bacillus* sp. X6 suşu 20°C, 30°C, 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda pH 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0, 12,0 ve 13,0 değerine sahip ksilanlı katı besiyerlerinde inkübe edilerek bakteri koloni çapı ve aktivite zone çapları saptanmıştır.

Bakteri koloni çapı ve oluşan zone genişliğinin ölçümüne göre en iyi enzim üreten suş belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 1, 2, 3, 4 ve 5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus* sp. X6'nın 20°C'de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnk. Sic.	İnk. pH	İnk. Sür.	Koloni çapı (mm)	Zon çapı (mm)
20 °C	6.0	24 saat	3	63
20 °C	7.0	24 saat	4	40
20 °C	8.0	24 saat	4	64
20 °C	9.0	24 saat	4	64
20 °C	10.0	24 saat	4	64
20 °C	11.0	24 saat	3	48
20 °C	12.0	24 saat	1	62
20 °C	13.0	24 saat	1	38

İnkübasyon sıcaklığının 20°C olarak seçildiği analizlerde *Bacillus* sp. X6 suşu pH 7.0-10.0 aralığına 4 mm koloni çapı oluşturacak şekilde üreme göstermiştir. En geniş aktivite zon çapı pH 8.0-10.0 aralığında 64 mm olarak ölçülmüştür. *Bacillus* sp X6 suşunun üreme hızı pH 13.0'de 1 mm'ye düşerken aktivite zon çapı da 38 mm olarak ölçülmüştür.

Silva ve ark (2008), *T. inhamatum* organizmasından ksilanaz üretiminde ortam pH'sının önemli olduğunu, en iyi üremenin pH 6.0 ve 25°C'de gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. X6'nın 30°C'de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnk. Sic.	İnk. pH	İnk. Sür.	Koloni çapı (mm)	Zon çapı (mm)
30 °C	6.0	24 saat	4	65
30 °C	7.0	24 saat	4	52
30 °C	8.0	24 saat	5	59
30 °C	9.0	24 saat	3	57
30 °C	10.0	24 saat	3	62
30 °C	11.0	24 saat	3	50
30 °C	12.0	24 saat	3	40
30 °C	13.0	24 saat	3	40

İnkübasyon sıcaklığının 30°C olarak seçildiği analizlerde *Bacillus* sp. X6 suşu pH 6.0-7.0'de 4 mm, pH 8.0'de ise 5 mm koloni çapı oluşturarak üreme gösterirken, pH 9.0-13.0 aralığında 3 mm koloni çapı ölçülmüştür.

En geniş aktivite zon çapı pH 10.0'da 62 mm ölçülmüştür. pH 12.0 ve 13.0'te aktivite zon çapı 40 mm belirlenmiştir. Aktivite zon çapları pH 6.0'da 65 mm, pH 7.0'de 52 mm, pH 8.0'de 59 mm, pH 9.0'da 57 mm şeklindedir. İnkübasyon sıcaklığının 30°C olarak seçildiği testlerde bütün pH değerleri için elde edilen ortalama aktivite zon çapı 53.12 mm'dir.

Çizelge 4.3. *Bacillus* sp. X6'nın 40°C'de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnk. Sıc.	İnk. pH	İnk. Sür.	Koloni çapı (mm)	Zon çapı (mm)
40 °C	6.0	24 saat	8	65
40 °C	7.0	24 saat	6	63
40 °C	8.0	24 saat	6	64
40 °C	9.0	24 saat	3	64
40 °C	10.0	24 saat	3	65
40 °C	11.0	24 saat	3	55
40 °C	12.0	24 saat	3	40
40 °C	13.0	24 saat	3	21

İnkübasyon sıcaklığının 40°C olarak seçildiği analizlerde *Bacillus* sp X6 suşu pH 6.0'da 8 mm, pH 7.0 ve 8.0'de 6 mm, pH 9.0-13.0 aralığında ise ortalama 3 mm koloni çapı oluşturmuştur.

Aktivite zon çaplar incelendiği zaman en geniş zon 65 mm ile pH 10.0'da gerçekleşirken, pH 8.0 ve 9.0'da 64 mm, pH 6'da 65 mm zon elde edilmiştir. pH 9.0-13.0 aralığındaki değerlerde 3 mm koloni çapı oluşmasına karşılık aktivite zon genişliği giderek azalmış ve pH 13.0'te 21 mm'ye düşmüştür. Bütün pH değerleri dikkate alındığı zaman bu sıcaklık değerinde elde edilen ortalama aktivite zon çapı 54.62 mm olarak belirlenmiştir.

Kohli ve ark (2001), *Thermoactinomyces thalophylus* suşundan izole edilen thermostabil alkalın selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 50 derece ve pH 8.5'te sentezlendiğini belirtmişlerdir.

Anuradha ve ark (2007), izolasyonunu gerçekleştirdikleri *Bacillus* sp. suşunun en yüksek enzim üretimini pH 6.0-8.5 aralığında gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

Çizelge 4.4. *Bacillus* sp. X6'nın 50°C'de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

İnk. Sıc.	İnk. pH	İnk. Sür.	Koloni çapı (mm)	Zon çapı (mm)
50 °C	6.0	24 saat	3	65
50 °C	7.0	24 saat	3	65
50 °C	8.0	24 saat	3	63
50 °C	9.0	24 saat	3	53
50 °C	10.0	24 saat	1	50
50 °C	11.0	24 saat	1	47
50 °C	12.0	24 saat	1	45
50 °C	13.0	24 saat	1	40

İnkübasyon sıcaklığının 50°C olarak seçildiği analizlerde *Bacillus* sp X6 suşu pH 6.0-9.0 aralığındaki değerlerde 3 mm koloni çapı oluşturarak üreme gösterirken, pH 10.0-13.0 aralığındaki değerlerde koloni çapı 1 mm ölçülmüştür. En geniş aktivite zon çapı pH 6.0 ve 7.0'de 65 mm saptanmıştır. Üremenin zorlandığı pH 10.0-13.0 değerleri arasında aktivite zon genişliği giderek azalmış ve 40 mm'ye düşmüştür.

Bütün pH değerleri dikkate alındığı zaman 50°C'de gerçekleştirilen inkübasyon sonunda elde edilen ortalama aktivite zon çapı 53.5 mm olmuştur. Literatürlerde *Bacillus* sp. BP-7 suşunun pH 4.8–11.4 ve 15–50°C sıcaklık aralığında ürettiği belirtilmektedir. Organizmanın en iyi üremeyi pH 7.8 ve 45°C'de gösterdiği saptanmıştır (Lopez ve ark, 1998).

Çizelge 4.5. *Bacillus* sp. X6 bakterisinin 60°C'de ve farklı pH değerlerinde katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları

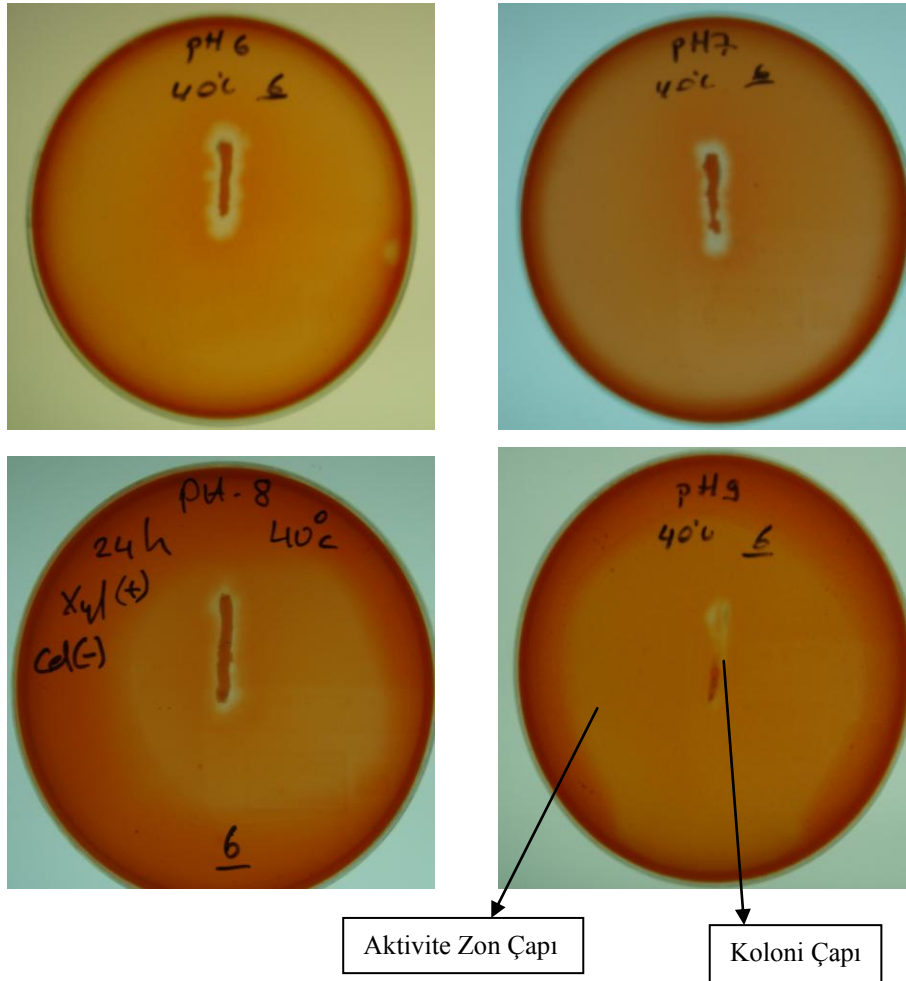
İnk. Sıc.	İnk. pH	İnk. Sür.	Koloni çapı (mm)	Zon çapı (mm)
60 °C	6.0	24 saat	2	50
60 °C	7.0	24 saat	2	61
60 °C	8.0	24 saat	2	63
60 °C	9.0	24 saat	2	53
60 °C	10.0	24 saat	2	43

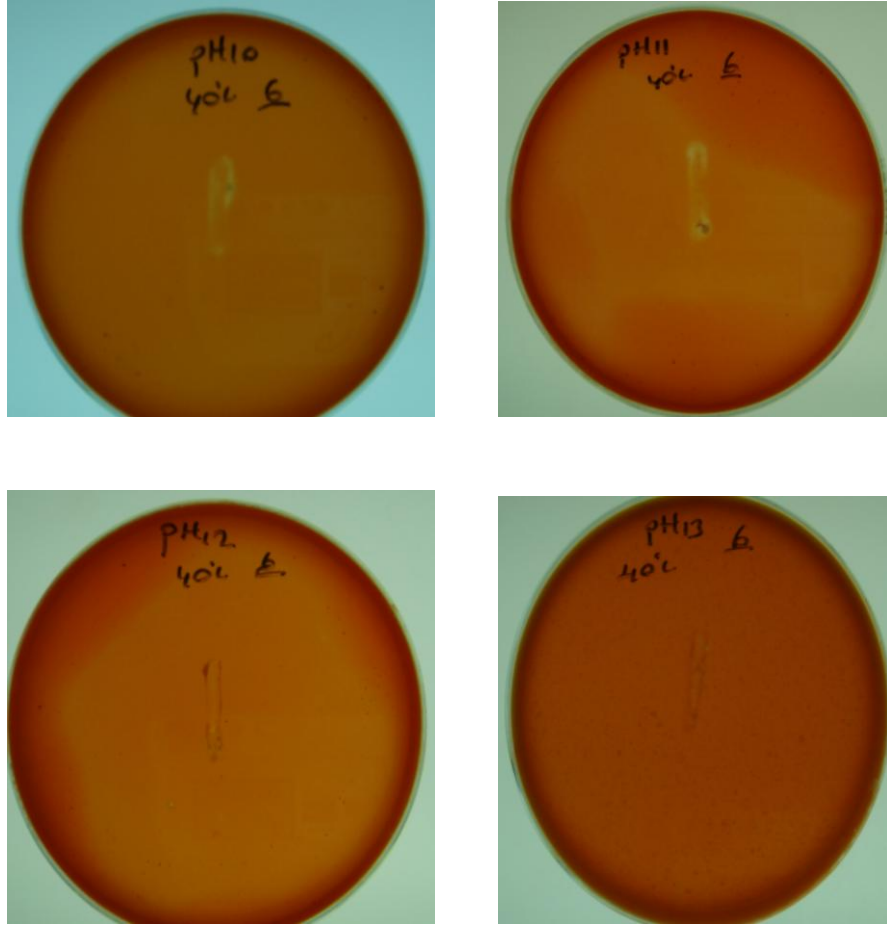
İnkübasyon sıcaklığının 60°C olarak seçildiği analizlerde *Bacillus* sp. X6 suşu pH 6.0–10.0 aralığındaki bütün değerlerde 2 mm koloni oluşturarak üremiştir. Bu sıcaklıkta elde edilen aktivite zon çapları pH 6.0'da 50 mm, pH 7.0'de 61 mm, pH 8.0'de 63 mm, pH 9.0'da 53 mm ve pH 10.0'da 43 mm ölçülmüştür. En geniş aktivite

zonu 63 mm ile pH 8.0'de elde edilirken, pH 10.0'daki değer 43 mm olarak saptanmıştır. Bu sıcaklık değerinde pH 11.0–13.0 aralığında üreme meydana gelmediği için aktivite zon çapı ölçülememiştir. Bu sıcaklık değerinde elde edilen ortalama aktivite zon çapı 54 mm olmuştur.

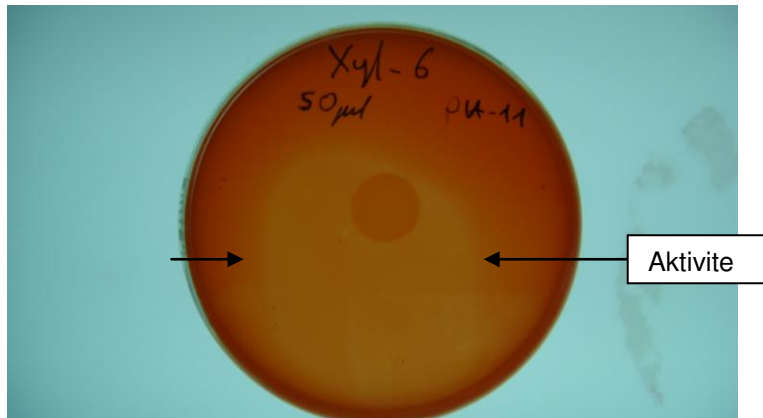
Bütün sıcaklıklar dikkate alındığında en iyi üremenin ortalama 4.5 mm ile 40°C'de gerçekleştiği saptanmıştır. Buna karşılık 20°C'de 3mm, 30°C'de 3.5 mm, 50°C'de 2 mm ve 60°C'de 2 mm koloni çapı olduğu belirlenmiştir. Zon çapları incelendiğinde 20°C ortalama 55.37 mm, 30°C'de 53.12 mm, 40°C 54.62, 50°C'de 53.5 ve 60°C'de 54 mm aktivite zon çapı elde edilmiştir.

Enzim üretimi için seçilen *Bacillus* sp. X6 suşunun 40°C ve pH 6.0-13.0 aralığında katı besiyerindeki koloni ve aktivite zonu oluşturmaya ait bulgular Şekil 1'de gösterilmiştir.





Şekil 4.1. *Bacillus* sp. X6'nın 40°C ve pH 6.0–13.0 aralığında katı besiyerindeki koloni ve aktivite zon çapları



Şekil 4.2. Kısmi saflaştırılmış ksilanaz enziminin ksilanlı besiyerindeki aktivite zonu

Azari ve ark (2010), *Bacillus* suşlarından izole edilen selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimini sentezleyen bakterilerin tamamının 25–50°C aralığında ürediklerini, optimum üreme ve besiyerinde enzim sentezini ise 40°C’de gerçekleştirdiklerini, 55°C’de ise üremenin görülmediğini ve *Bacillus* suşlarının üreme ve enzim sentezleme pH aralıklarının 7.0–10.0 olduğu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda izolasyonu yapılan ve enzim üretimi için seçilen *Bacillus* sp. X6 suşunun katı besiyerindeki üreme ve enzim sentezleme özellikleri literatür verileri ile uygunluk göstermektedir. Özellikle üreme ve enzim sentezleme pH aralıkları dikkate alındığında literatürden çok daha üstün özellikte olduğu görülmektedir (Çizelge 1-5 ve Şekil 1).

4.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığına Ait Bulgular

Bacillus sp. X6 ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin saptanması için enzim, pH 6.0-13.0 aralığında farklı pH değerlerinde 40°C’de 60 dakika inkübasyon gerçekleştirilerek relatif aktivite değeri saptanmıştır.

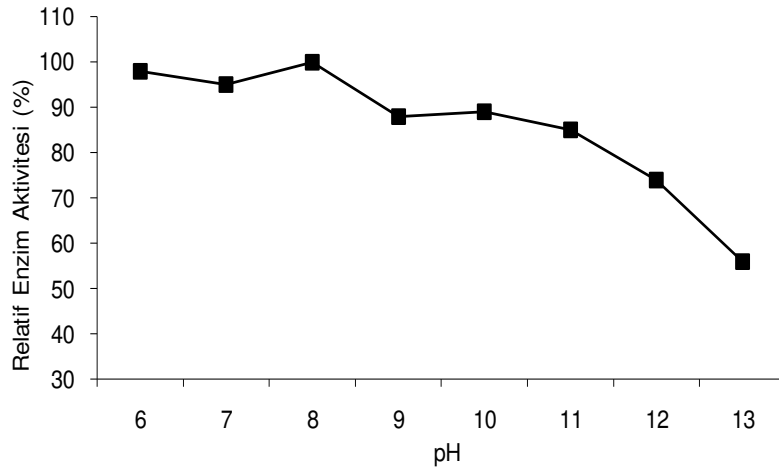
Çizelge 4.6. *Bacillus* sp. X6 ksilanaz enziminin optimum pH değeri

pH	İnk. Sıc.	İnk.sür.	AB1	AB2	ABO	Relatif Aktivite (%)
6.0	40 °C	60 dk.	0.47	0.51	0.49	98
7.0	40 °C	60 dk.	0.46	0.49	0.475	95
8.0	40 °C	60 dk.	0.49	0.51	0.50	100.0
9.0	40 °C	60 dk.	0.44	0.44	0.44	88
10.0	40 °C	60 dk.	0.44	0.45	0.445	89
11.0	40 °C	60 dk.	0.43	0.44	0.435	85
12.0	40 °C	60 dk.	0.35	0.39	0.37	74
13.0	40 °C	60 dk.	0.32	0.24	0.28	56

Bacillus sp. X6 ksilanaz enzimi optimum aktiviteyi pH 8.0’de göstermiştir. pH değerlerine göre, pH 6.0’da %98, pH 7.0’de %95, pH 9.0’da %88, pH 10.0’da %89, pH 11.0’de %85, pH 12.0’de %74 ve pH 13.0’de %56 aktivite saptanmıştır. Enzim pH 6.0–11.0 aralığında ortalama %92.5 aktiviteye sahiptir. Bu özelliği ile asidik ve alkali koşullarda ortalama %90’ın üzerinde aktiviteye sahiptir.

Enzimin tamamen alkali koşullarda gerçekleşen aktivitesi incelendiğinde pH 8.0-13.0 aralığında ortalama %82 aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Bacillus* sp. X6 ksilanaz enzimi pH 12.0–13.0 gibi ekstrem aralıkta %65 aktivite göstermiştir.

Analiz edilen bütün pH değerleri dikkate alındığında (pH 6.0–13.0) elde edilen enzim aktivitesi ortalama %85.26 olarak belirlenmiştir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve aralığı ile ilgili sonuçlar Çizelge 6 ve Şekil 3’de gösterilmiştir. Elde edilen veriler dikkate alındığı zaman *Bacillus* sp. X6 ksilanaz enzimi oldukça geniş bir pH aralığında (pH 6.0-11.0 ortalama %92.5) aktiftir.



Şekil 4.3. *Bacillus* sp. X6 ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri ve aralığı

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda ksilanaz enzimine ait farklı optimum pH sonuçları saptanmıştır. Bunlara örnek olarak; optimum pH değerleri, moleküler ağırlığı 45 kDa olan ksilanaz için 6.0–8.0, 23 kDa olan ksilanaz için 6.0–7.0 olduğu bulunmuştur (Tseng ve ark, 2002).

Gessesse (1998), Xyl A ve Xyl B olarak adlandırılan iki farklı enzimden xyl-A'nın optimum aktivitesini pH 9.0, xyl-B enziminin ise pH 9.0–10.0 aralığında gösterdiğini belirtmiştir.

Blanco (1995), izole edilen enzimin optimum aktivitesini pH 5.5'te göstermesine rağmen pH 9.5'te %72, pH 11.0'de ise %35 aktiviteye sahip olduğunu saptamıştır.

Nakamura ve ark (1993), ksilanaz-J enziminin optimum pH 9.0'da aktif olduğunu, bununla birlikte pH 4.0–11.0 gibi oldukça geniş bir aralıkta aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Silva ve ark (2008), *Trichoderma inhamatum* organizmasından izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 5.5'te gösterdiğini, pH 5.0-6.0 aralığında yüksek düzeyde aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.

Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmus*'tan izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin aktivitesinin pH 5.0-11.0 aralığında gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Savitha ve ark (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan izole ettikleri alkalın termostabil selülaaz aktivitesi olmayan ksilanazın pH 9.0'da %90, pH 10.0'da %85 aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Bacillus sp. X13 ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 6.0'da göstermesine rağmen, pH 4.0-7.0 aralığında yaklaşık %90 pH 4.0-9.0 aralığında ise ortalama %77 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Balakrisnan ve ark, 2002; Aygan ve Arıkan, 2009).

Sharma ve ark (2007), *Geobacillus thermoleovorans* ksilanaz enziminin geniş bir pH aralığında (6.0-9.5) aktivite gösterdiğini, optimum aktivitenin ise pH 8.5'ta gözlemlendiğini bulmuşlardır.

Alkalofilik *Bacillus*'tan (NCL 87–6-10) izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enziminin optimum aktiviteyi pH 8.0'de gösterdiğini saptamışlardır (Balakrisnan ve ark, 2002).

Çalışmamızda izole ettiğimiz *Bacillus* sp. X6 ksilanaz enzimi optimum aktivite pH'sı ve aralığı incelendiğinde elde edilen verilerin literatür bilgileriyle büyük uyum göstermektedir (Şekil 3).

4.4. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerine Ait Bulgular

Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin saptanması için 20-120°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilen deneylere ait sonuçlar Çizelge 7 ve Şekil 4'te gösterilmiştir.

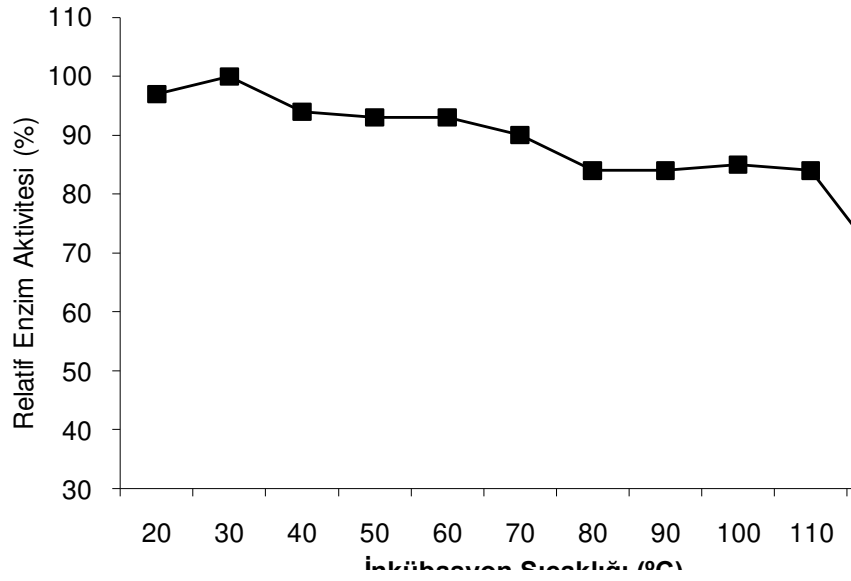
Çizelge 4.7. *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi optimum aktivite sıcaklığı

İnk. Sıc	İnk. Sür.	İnk. pH	AB1	AB2	ABO	Relatif Aktivite (%)
20	60 dk.	8.0	0.67	0.68	0.675	97
30	60 dk.	8.0	0.68	0.71	0.695	100.0
40	60 dk.	8.0	0.63	0.67	0.65	94.0
50	60 dk.	8.0	0.65	0.64	0.645	93.0
60	60 dk.	8.0	0.64	0.65	0.645	93.0
70	60 dk.	8.0	0.59	0.66	0.625	90.0
80	60 dk.	8.0	0.58	0.58	0.58	84.0
90	60 dk.	8.0	0.59	0.58	0.585	84.0
100	60 dk.	8.0	0.57	0.61	0.59	85.0
110	60 dk.	8.0	0.47	0.70	0.585	84.0
120	60 dk.	8.0	0.50	0.45	0.475	68.0

Bacillus sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi 20-120°C aralığındaki sıcaklık değerlerinde analiz edilmiş ve optimum aktivitesini 30°C'de gösterdiği saptanmıştır. Enzim optimum aktiviteyi 30°C'de göstermekle birlikte 20-70°C aralığında %94.5, 80-120°C aralığında ise ortalama %81 aktivite göstermektedir. Bütün sıcaklık değerleri incelendiğinde ortalama %88.36 aktivite elde edilmiştir.

Sıcaklık değerleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde 20°C %97, 40°C %94, 50°C %93, 60°C %93, 70°C %90, 80°C %84, 90 °C %84, 100 °C %85, 110 °C %84 ve 120°C %68 relatif aktivite gerçekleşmiştir. *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ve aralıklarına ait sonuçlar Çizelge 7 ve Şekil 3'te gösterilmiştir

Bacillus sp. X6 ksilanaz enzimi bu özellikleri ile çok geniş bir sıcaklık aralığında yaklaşık %88 düzeyinde aktiviteye sahiptir. Enzim alkalın, asido-alkalın aralıkta aktif, mezotermofil özellik göstermektedir.



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. X6 ksilanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri ve aralığı

Gessesse (1998), Xyl A enziminin optimum aktivitesini pH 8.0'de 70°C'de pH 9.0'da ise 60°C gösterdiğini belirtmiştir. Diğer taraftan, Xyl B enziminde ise optimum aktivitenin pH 8.0'de 70°C gerçekleştiği halde pH 9.0'da 75°C gözlemlendiğini saptamıştır.

Kolenová ve ark (2005), ksilanaz enzimlerinin aktivitesi için optimum sıcaklığın 50°C olduğunu bulmuşlardır.

Silva ve ark (2008), *Trichoderma inhamatum*'dan elde edilen selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin en iyi aktiviteyi 50°C'de gösterdiğini saptamışlardır.

Balakrisnan ve ark (2002), alkalofilik *Bacillus* (NCL 87-6-10) suşundan izole ettikleri selülaz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enziminin optimum aktiviteyi pH 8.0'de ve 40-60°C aralığında gösterdiğini saptamışlardır.

Nagar ve ark (2010), *Bacillus pumilus* SV-85S suşundan izole ettikleri alkalın stabil selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimini optimum aktivitesini 50°C'de gösterirken 65°C'de %78 aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Yin ve ark (2010), *Bacilus* sp. JY6 suşundan izole ettikleri ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 5.0 ve 50°C'de gösterdiğini belirtmişlerdir.

Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmus*'tan izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 5.0-11.0 aralığında ve 37°C'de gösterdiğini bulmuşlardır.

Monishe ve ark (2009), toprak orijinli *Bacillus pumilus* bakterisinden izole edilen ksilanaz enziminin maksimum aktiviteyi pH 7.0 ve 35°C'de gösterdiğini bulmuşlardır.

Anuradha ve ark (2007), *Bacillus* sp. bakterisinden izole ettikleri alkalın ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 8.0 ve 55°C'de gösterdiğini, enzim aktivitesinin pH 10.0'da düşmekle birlikte, pH 7.0-11.0 aralığında ortalama %65 oranında stabil kaldığını saptamışlardır.

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 7.0 ve 55°C'de gösterdiğini 65°C'de ise %57 aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Literatürde genel olarak ksilanaz enzimlerinin optimum aktivitelerini 50-55°C'de gösterdiği, bununla birlikte yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterenlerin de olduğu belirtilmiştir (Khandeparker ve Bhosle, 2006).

Literatürde, *Bacillus* sp. X13 suşundan elde edilen ksilanaz enziminin optimum aktiviteyi 40°C'de gösterirken, 30 ile 80°C aralığında %74'ün üzerinde aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Aygan ve Arıkan, 2009).

4.5. Enzimin Termal Stabilite Sonuçları

Bacillus sp. X-6 enziminin termal stabilitesini saptamak amacıyla 30-100°C aralığında yapılan çalışmalara ait sonuçlar Çizelge 7 ve Şekil 5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. *Bacillus* sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi termal stabilite sonuçları

Ön İnk.sıc	Ön ink. Sür	İnk. Sıc	İnk.sür	AB1	AB2	ABO	% Kalan Aktivite
Kontrol	-	30°C	60 dk.	0.588	0.553	0.57	100
30	60 dk.	30°C	60 dk.	0.494	0.508	0.50	88
40	60 dk.	30°C	60 dk.	0.51	0.52	0.515	90
50	60 dk.	30°C	60 dk.	0.45	0.57	0.51	89
60	60 dk.	30°C	60 dk.	0.51	0.47	0.49	86
70	60 dk.	30°C	60 dk.	0.49	0.48	0.485	85
80	60 dk.	30°C	60 dk.	0.47	0.47	0.47	82
90	60 dk.	30°C	60 dk.	0.46	0.47	0.465	82
100	60 dk.	30°C	60 dk.	0.48	0.49	0.485	85

Bacillus sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 60 dakikalık ön inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini 40°C’de %90 oranında koruduğu belirlenmiştir. Ön inkübasyon gerçekleştirilen bütün sıcaklıklar dikkate alındığında 30°C %88, 40°C %90, 50°C %89, 60°C %86, 70°C %85, 80°C %82, 90°C %82 ve 100°C %85 kalan aktivite değerleri elde edilmiştir.

Enzimin 30-100°C sıcaklık aralığındaki değerlerde orjinal aktivitesini ortalama %86 oranında devam ettirdiği saptanmıştır. Enzim orjinal aktivitesini 30°C’de %88 korurken, 100°C’de %85 kalan aktivite değeri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 8 ve Şekil 4’te gösterilmiştir. *Bacillus* sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi bu özellikleri dikkate alındığı zaman alkalın, asido-alkalın aktif, mezotermofil ve yüksek düzeyde termostabil özellik göstermektedir.

Literatürde XYL-A enziminin 60°C’de 3 saat inkübe edildikten sonra orjinal aktivitenin %95’ten fazlasının 65°C ve pH 8.0’de %78 korunduğunu saptamışlardır (Gessesse, 1998).

B. circulans AB 16 suşundan elde edilen ksilanaz enzimi 55°C’de 24 saatlik inkübasyon sonrasında %100 stabilite göstermiştir (Dhillon ve ark, 2000).

Kolenová ve ark (2005), XYL-B ve XYL-C enzimlerinin 60°C’de 1 saatlik inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %100’e yakın oranda kaybetmiştir.

Heck ve ark (2005), *Bacillus coagulans* BL69 suşuna ait ksilanaz enziminin 50°C’de stabil olduğunu, 60°C’nin üzerinde, aktivitenin aniden düştüğünü belirtmişlerdir. Enzim 70°C’de 5 dakika inkübe edildiği zaman aktivite %34’e düşerken 80°C’de %20 aktivite saptanmıştır.

Bacillus sp. X13 ksilanaz enzimi 60°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda, 60 dakikalık ön inkübasyondan sonra yaklaşık %66 kalan aktivite ile yüksek derecede aktif bulunmuştur (Aygan ve Arıkan, 2009).

Savitha ve ark (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan izole edilen termostabil alkalın selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 5 saat 60°C inkübe edildikten sonra orjinal aktivitesini %95 koruduğunu saptamışlardır.

Nagar ve ark (2010), *Bacillus pumilus* SV-85S suşundan izole ettikleri alkalın stabil selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 60°C 1 saatlik inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %50 koruduğunu belirtmişlerdir. Kohli ve ark (2001), Termostabil alkalofilik, selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 65°C’de 125 dakika inkübe edildiği zaman orjinal aktivitesinin %50’sini kaybettiğini saptamışlardır.

Khandeparkar ve ark (2006), *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 suşundan izole edilen ksilanaz enziminin Enzim 80°C’de 30 dakikalık inkübasyondan sonra aktivitesini %50 kaybettiğini saptamışlardır.

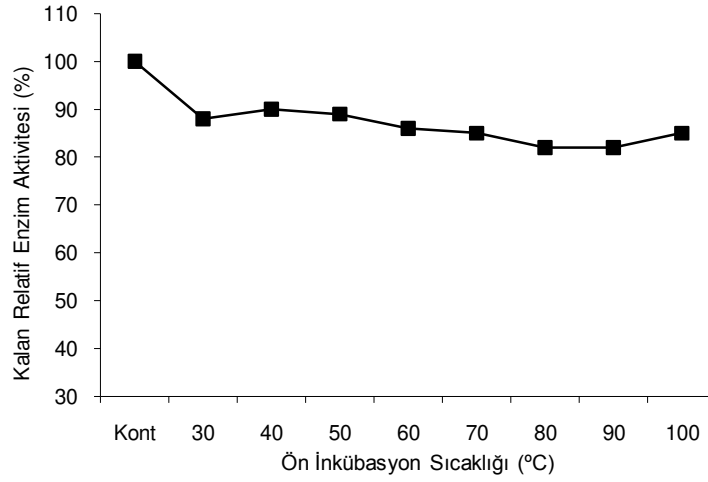
Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin orjinal aktivitesini 55°C’de %80, 60°C’de %51 koruduğunu belirtmişlerdir.

Sharma ve Bajaj (2005), alkali tolerant ksilanaz enziminin 60°C 30 dakika inkübe edildiği zaman orjinal aktivitenin yaklaşık %80 düştüğünü belirtmişlerdir. Diğer taraftan enzim 70°C 15 dakika inkübe edildiğinde ise aktivitenin %72 ile %78 oranında düştüğünü saptamışlardır.

Chanjuan ve ark (2009), izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enziminin 4°C bir gecelik inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %80 oranında korunduğunu belirtmişlerdir.

Sá-Pereira ve ark (2002), ksilanaz enziminin 3 saat süreyle 60°C stabilitesini tam koruduğunu, buna karşılık 90°C’de 14 dakikalık inkübasyonda orjinal aktivitenin %20’ye düştüğünü belirtmişlerdir.

Dutta ve ark (2007), alkali tolerant selüloz aktivitesi olmayan alkalifilik ksilanaz enziminin 50°C 1-4 saatlik inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %65 koruduğunu saptamışlardır.



Şekil 4.5. *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi termal stabilite sonuçları

4.6. Enzimin pH Stabilite Sonuçları

Bacillus sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimine ait pH 7.0-12.0 aralığındaki stabilite çalışmalarının sonuçları Çizelge 9 ve Şekil 6'da gösterilmiştir.

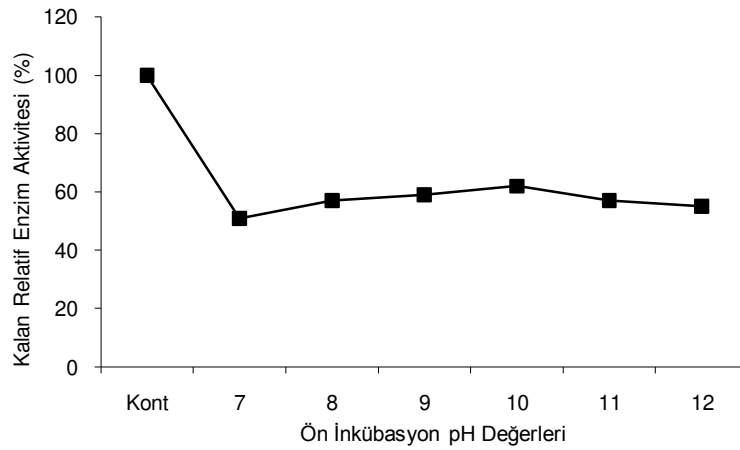
Çizelge 4.9. *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi pH stabilite sonuçları

pH	Ön İnk. Sıc.	Ön. İnk.Sür.	İnk. Sıc.	İnk. Sür.	AB1	AB2	ABO	Kalan Enzim Akt. (%)
Kontrol	-	-	30 °C	60 dk.	0.52	0.50	0.51	100
7.0	30 °C	24	30 °C	60 dk.	0.24	0.28	0.26	51.0
8.0	30 °C	24	30 °C	60 dk.	0.30	0.28	0.29	57.0
9.0	30 °C	24	30 °C	60 dk.	0.32	0.28	0.30	59.0
10.0	30 °C	24	30 °C	60 dk.	0.32	0.32	0.32	62.0
11.0	30 °C	24	30 °C	60 dk.	0.31	0.27	0.29	57.0
12.0	30 °C	24	30 °C	60 dk.	0.30	0.26	0.28	55.0

Bacillus sp. X6 ksilanaz enzimi pH 7.0–12.0 aralığındaki farklı tampon sistemlerinden oluşan pH çözeltilerinde, optimum aktivitenin gözlemlendiği sıcaklık değerinde 24 saat süreyle ön inkübasyona tutulduktan sonra kalan aktivite saptanmıştır.

Kalan enzim aktivitesi ortalama %62 ile pH 10.0’da en yüksek düzeyde ölçülmüştür. pH 8.0–11.0 aralığında gerçekleşen aktivite ortalama %59 olarak saptanmıştır. Kalan aktivite pH 7.0’de %51 düzeyinde elde edilirken pH 12.0 %55 ölçülmüştür. Bütün pH değerleri incelendiğinde 24 saatlik inkübasyon sonunda kalan enzim aktivitesi 7.0’de %51, 8.0 de %57, 9.0 da %59, 11.0 de %57 ve 12.0 de %55 olarak ölçülmüştür.

pH 7.0–12.0 değerleri dikkate alındığı zaman 24 saatlik ön inkübasyon uygulaması sonunda kalan enzim aktivitesi, ortalama %57 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 24 saat süreyle 30°C’de oldukça geniş ve alkali pH aralığında stabil olduğunu göstermektedir (ortalama %57).



Şekil 4.6. *Bacillus* sp. X6 alkaline selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi pH stabilite sonuçları

Li ve ark (2004), *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 suşundan izole edilen selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin pH 6.5 ile 10.0 aralığında stabil olduğunu saptamışlardır. Khandeparker ve Bhosle (2006), *Arthrobacter* sp. MTCC

5214'ten izole edilen ksilanaz enziminin pH 7.0 ve 8.0'de 24 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesini %100 korumaktadır.

Chanjuan ve ark (2009), izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enziminin geniş bir pH aralığında oldukça stabil olduğunu, pH 7.0-12.0 aralığında 4°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %80 oranında koruduğunu belirtmişlerdir.

Chidi ve ark (2010), *Aspergillus terreus* UL 4209 suşundan izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin optimum aktiviteyi pH 6.0'da gösterdiğini, enzimin pH 6.0 ve 35-40°C'de 4 saatlik inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini %95 koruduğunu saptamışlardır.

Dutta ve ark (2007), izolasyonunu gerçekleştirdikleri alkali tolerant selülaaz aktivitesi olmayan alkalifilik ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 8.5'ta gösterdiğini ve pH 4.0-10.0 aralığında stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Literatürde, *Bacillus sp.* X13 ksilanaz enzimi ile gerçekleştirilen pH stabilitesi çalışmalarında, pH 3.6–10.0 aralığında 60 dakika inkübasyon gerçekleştirildiği zaman orjinal aktivitenin %71 korunduğunu saptamışlardır (Aygan ve Arkan, 2009).

Bacillus sp. X6 alkalın selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 24 saat süreyle 30°C gerçekleştirilen pH stabilitesi çalışmalarına göre, elde edilen veriler literatürlerle uygunluk göstermektedir (pH 9.0 da %59).

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin pH 8.0, ve 9.0'da oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyondan sonra orjinal aktivitesini sırasıyla %85, %50 oranında korumuştur. Dhillon ve ark (2000), *Bacillus circulans* AB 16 suşundan elde edilen ksilanaz enziminin 65°C ve pH 7.0'de 2 saat inkübasyon işleminden sonra orjinal aktivitesini %96 koruduğunu, pH 10.0'da aktivitenin %4'e düştüğünü saptamışlardır.

4.7. Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Enzim Aktivitesine Etkisi

NaCl'ün *Bacillus sp.* X6 alkalın selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi üzerine etkisini saptamak için %3, %5, %10, %15, %20, %25 ve %30 konsantrasyonda NaCl kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 10 ve Şekil 7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı NaCl konsantrasyonlarının ksilanaz aktivitesine etkisi

% NaCl	Ön ink.sıc.	Ön İnk. Sür.	İnk. Sıc	İnk. Sür.	AB1	AB2	ABO	Kalan Enz. Ak. (%)
Kontr	-	-	30 °C	60 dk.	0.54	0.55	0.545	100
3	30 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.27	0.28	0.275	50
5	30 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.29	0.31	0.30	55
10	30 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.30	0.32	0.31	57
15	30 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.34	0.33	0.335	61
20	30 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.31	0.31	0.31	57
25	30 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.31	0.31	0.31	57
30	30 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.26	0.24	0.25	46

Bacillus sp. X6 selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi 30°C 60 dakika süre ile %3-30 konsantrasyon NaCl çözeltilerinde ön inkübasyona maruz bırakıldıktan sonra kalan enzim aktivitesi saptanmıştır.

Bacillus sp. X6 selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimine ait en yüksek aktivite %61 ile %15 NaCl konsantrasyonunda elde edilmiştir. Enzim %5-25 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında ortalama %57.4 kalan aktivite değerine sahiptir. Enzimin %3 NaCl konsantrasyonunda %50, %30 NaCl konsantrasyonunda ise %46 kalan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bütün konsantrasyonlar dikkate alındığında ortalama %55 kalan aktivite değeri saptanmıştır. Farklı NaCl konsantrasyonları ile muamele edilmiş X6 selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimine ait kalan aktivite değerleri Çizelge 10 ve Şekil 6'da gösterilmiştir.

Elde edilen bu sonuçlara göre *Bacillus* sp. X6 alkalın selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi %3-%30 aralığındaki NaCl konsantrasyonlarında halofilik özellik göstermektedir.

Azeri ve ark (2010), alkalifilik *Bacillus* suşlarından izole edilen termoaktif selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin maksimum ksilanaz aktivitesini %5 NaCl konsantrasyonunda gösterdiğini belirtmişlerdir.

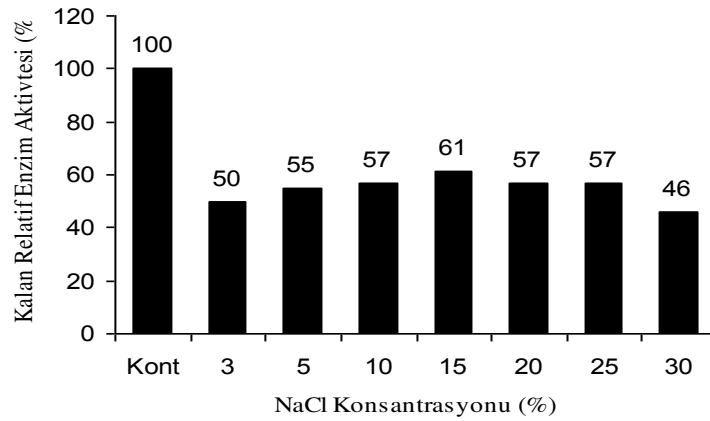
Aygan (2008), C-14 selülaz enziminin 1 saatlik ön inkübasyon işleminden sonra %3-7 tuz konsantrasyonunda orjinal aktivitesini ortalama %70 tuz

konsantrasyonu %10-15 aralığına çıkarıldığında %77, %20 konsantrasyonda %88 oranında koruduğunu bulmuştur.

Aygan (2008), *Bacillus* sp. X13 ksilanaz enziminin %3–25 aralığındaki tuz konsantrasyonuna 1 saatlik ön inkübasyon sonunda orjinal aktivitesini ortalama %89 koruduğunu saptamıştır.

Wejse ve ark (2003), ksilanaz-2 enziminin NaCl konsantrasyonu 2 M'dan 5 M'a çıkarıldığı zaman kalan aktivitenin %31'e düştüğünü saptamıştır.

Wainø ve Ingvorsen (2003), ekstrem halofilik *Halorhabdus utahensis* suşundan izole edilen β -ksilanaz enziminin %5–15 NaCl konsantrasyonunda optimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır. β -ksilanaz enzimi %20 NaCl konsantrasyonunda 24 saat inkübasyon gerçekleştirildiği zaman orjinal aktivitenin %53'e düştüğünü bulmuşlardır.



Şekil 4.7. %3-%30 NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi

4.8. Enzim Aktivitesine İnhibitör, Şelatör, Metal İyonları ve Deterjanların Etkisi

Bacillus sp. X6 ksilanaz enziminin aktivitesi üzerine deterjan, metal iyonu, şelatör, okside edici ajan ve inhibitörlerin etkisini saptamak üzere enzim 60 dakika 40°C'de ön inkübasyon gerçekleştirilerek kalan aktivite saptanmıştır. Sonuçlar Çizelge 11 ve Şekil 8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. İnhibitör, metal iyonları, şelatör, deterjan ve okside edici bileşiklere ait sonuçlar

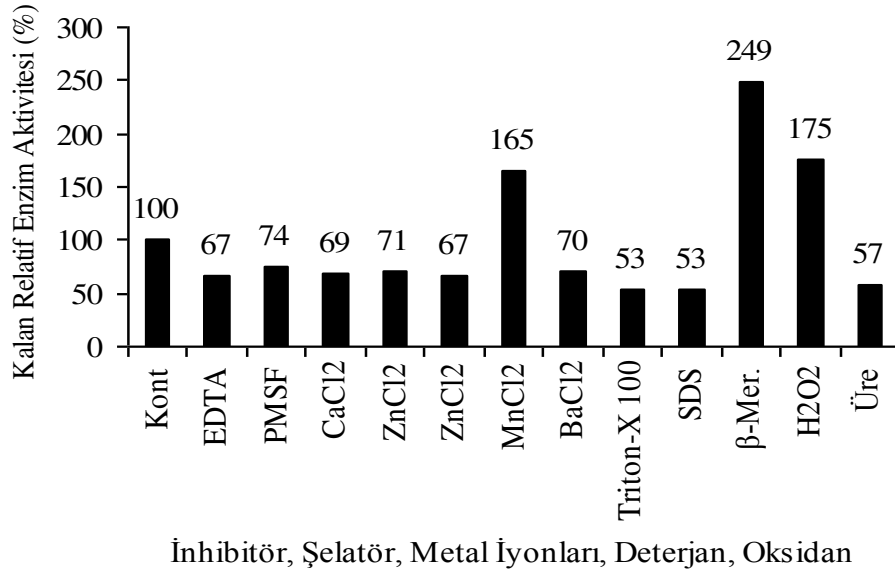
İnh.	İnh. Kons.	Ön İnk. Sıc.	Ön İnk. Sür.	İnk. Sıc.	İnk. Sıc.	AB1	AB2	ABO	Kalan Aktivite (%)
Kont.	-	-	-	30 °C	60 dk.	0.53	0.45	0.49	100
EDTA	5 mM	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.35	0.32	0.33	67
PMSF	3 mM	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.35	0.38	0.36	74
CaCl ₂	5 mM	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.34	0.34	0.34	69
ZnCl ₂	5 mM	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.39	0.31	0.35	71
NaCl	5 mM	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.31	0.35	0.33	67
MnCl ₂	5 mM	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.77	0.85	0.81	165
BaCl ₂	5 mM	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.32	0.36	0.34	70
Triton-X 100	%1	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.26	0.26	0.26	53
SDS	%1	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.29	0.24	0.26	53
β-Mer.	%1	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	1.22	1.22	1.22	249
H ₂ O ₂	%1	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.89	0.84	0.86	175
Üre	8 M	40 °C	60 dk.	30 °C	60 dk.	0.32	0.24	0.28	57

β-Mer. : β-mercaptoethanol

Bacillus sp. X6 enzimi 5mM EDTA varlığında ortalama %67 kalan aktivite gösterirken, 5mM CaCl₂ ile %69, ZnCl₂ ile %71, NaCl ile %67, ve BaCl₂ ile %70 kalan aktivite ölçülmüştür. Selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi 5mM MnCl₂ kullanıldığında aktivitesi indüklenmiş, %65 artış gözlenmiştir (Çizelge 11). Enzim 3mM PMSF ile muamele edildiği zaman, kalan aktivite yaklaşık %74 düzeyinde saptanmıştır. *Bacillus* sp. X6 alkalın selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi %1 triton-X100 ile muamele edildiği zaman orjinal aktivitesini yaklaşık %53 oranında korumuştur. Enzim %1 SDS ile 60 dakika ön inkübasyona tutulduğunda kalan aktivite %53 olarak ölçülmüştür. *Bacillus* sp. X6 enzimi aynı konsantrasyondaki SDS ve Triton-X100 deterjanları ile aynı ölçüde etkilenmiştir.

X6 enzimi %1 β-merkaptetanol ile 60 dakikalık ön inkübasyondan sonra indüklenerek %149 aktivite artışı elde edilmiştir. Selülaaz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enzimi %1'lik H₂O₂ kullanılarak 40°C'de 60 dakika süreyle ön inkübasyona bırakıldığı zaman, enzim aktivitesi %1 β-merkaptetanol'de olduğu gibi uyarılmış ve %75 aktivite artışı saptanmıştır (Çizelge 11). Enzim 8M üre kullanılarak 40°C'de 60

5 dakika süreyle ön inkübasyona bırakıldığında kalan enzim aktivitesi %57 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.8. İnhibitör, şelatör, deterjan, metal iyonu ve okside edici bileşiklerin enzim aktivitesine etkisi

Khandeparker ve ark (2006), *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 organizmasına ait ksilanaz enziminin 1 mM Ca⁺² ve Mg⁺² ile %154, Zn⁺² ile %161, Mn⁺² ile %177 oranında sitümüle olduğunu saptamışlardır.

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 1 mM konsantrasyonda ve oda sıcaklığında 5 dakika ön inkübasyon işleminden sonra ZnCl₂ ile %86.3, CaCl₂ ile %84, NaCl ile %88.5, MgCl₂ ile %84.5, MnCl₂ ile %185 kalan aktivite elde edildiğini bulmuşlardır.

Sharma ve Bajaj (2005), alkalofilik *Streptomyces* CD3 suşundan izole edilen alkali-tolerant ksilanaz enziminin Hg ile inhibe olurken, 10 mM Zn ve Ca ile %116 oranında sitümüle olduğunu bulmuşlardır.

Anuradha ve ark (2007), *Bacillus* sp. bakterisinden izole edilen alkalik ksilanaz enziminin 1 mM β-merkaptetanolda %130, 3 mM β-merkaptetanolda %150 aktivite gösterirken, 1 mM NaCl'de %115, 3 mM NaCl'de ise %120 aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Chanjuan ve ark (2009), selülaaz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enziminin 2 mM MgSO₄ ile %99.6, MnCl₂ ile %57. NaCl ile %96, CaCl₂ ile %100, β-merkaptotanol ile %94.5 ve 5 mM SDS ile %90 aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Dutta ve ark (2007), izolasyonunu gerçekleştirdikleri alkali tolerant selülaaz aktivitesi olmayan alkalifilik ksilanaz enziminin 3 mM Zn ve Mg ile düşük düzeyde inhibe olurken, NaCl, üre ve SDS'nin aktivite üzerine sitümlatör etki yaptığını belirtmişlerdir. Triton X-100 ve Twen 20 aynı etkiyi göstermişlerdir. EDTA ile muamele edilen enzimin aktivitesinde değişiklik meydana gelmemiştir.

Yin ve ark (2010), ksilanaz enziminin PMSF ile inhibe olduğunu, Na, Mg ve β-merkaptotanol ile aktive olduğunu bulmuşlardır.

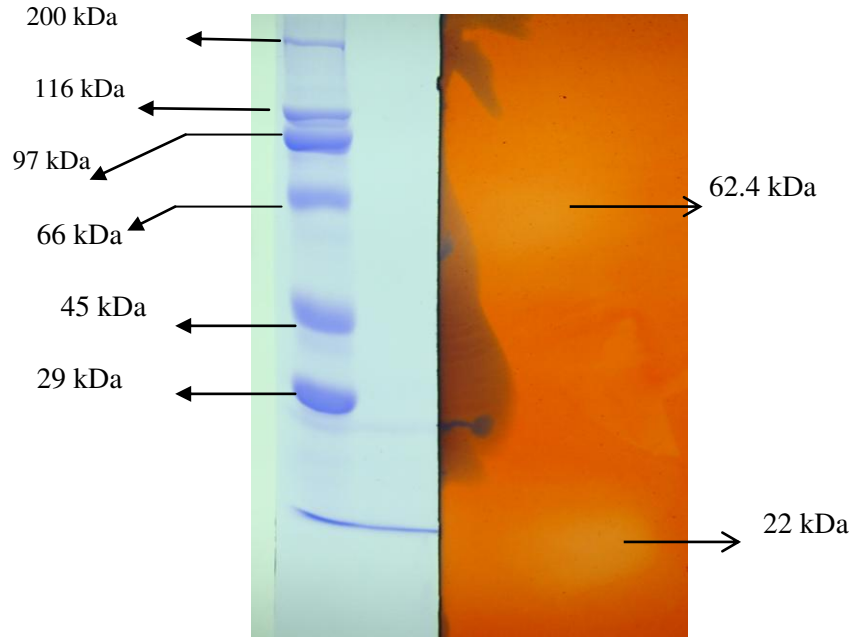
Heck ve ark (2005), *Bacillus coagulans* suşuna ait ksilanaz enzim aktivitesinin Ca, Zn, Ba ve EDTA ile inhibe olduğunu, Mn iyonları ve β-merkaptotanol ile sitümlü edildiğini saptamışlardır.

Bacillus sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 5 mM EDTA, CaCl₂, ZnCl₂, ve BaCl₂ ile aktivitesinin düşmesi, MnCl₂, %1 β-merkaptotanol ve %1'lik H₂O₂ ile önemli düzeyde aktivitede artış meydana gelmesi literatür verileri ile uygunluk göstermektedir.

Elde edilen veriler değerlendirildiği zaman, enzimin aktif bölgesinde metal atomu ve büyük ölçüde sistein amino asidi bulundurduğu, okside edici ajanlardan hiç etkilenmediği aksine daha aktif duruma geldiği, deterjanlara %60'a yakın dirençli olduğu görülmektedir.

4.9. Enzimin SDS-PAGE ve Zimogram Analizi Sonuçları

Bacillus sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enzimi, içerisinde oat spelt ksilan bulunan %10 SDS-PAGE ile analiz edilerek enzime ait aktivite bölgeleri saptanmıştır. Zimogram analizi sonucunda moleküler ağırlıkları 62.4 kDa ve 22 kDa olan birbirinden bağımsız iki aktivite bandı elde edilmiştir. Aktivite bandlarının moleküler ağırlıklarının saptanmasında (Sigma SD6H2 moleküler marker'ı kullanılmıştır: 200, 116, 97, 66, 45 ve 29 kDa) kullanılmıştır. Zimogram analiz sonucu Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *Bacillus* sp. X6 alkalın ksilanaz enzimi zimogram sonucu

Li ve ark (2004), *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 suşundan elde edilen ksilanaz enziminin moleküler ağırlığını yaklaşık 26.2 kDa olarak bulmuşlardır.

Monishe ve ark (2009), toprak orijinli *Bacillus pumilus* bakterisinden izole edilen ksilanaz enziminin SDS-PAGE yöntemi kullanılarak analiz edildiği zaman 19 kDa ağırlığında tek bir protein bandına sahip olduğunu saptamışlardır.

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin zimogram analizini SDS-PAGE kullanarak analiz ettikleri zaman 23 kDa ağırlıkta tek bir aktivite bandı elde etmişlerdir.

Sharma ve Bajaj (2005), alkalofilik *Streptomyces* CD3 suşundan izole edilen alkali-tolerant ksilanaz enziminin zimogram analizi sonunda 69.18, 63.09 ve 43.65 kDa ağırlığında üç bağımsız aktivite bandı şeklinde olduğunu saptamışlardır.

Chanjuan ve ark (2009), izole ettikleri selüloz aktivitesi olmayan alkalın ksilanaz enziminin moleküler ağırlığı 40 kDa olan tek bir aktivite bandı şeklinde olduğunu belirtmişlerdir.

Chidi ve ark (2010), *Aspergillus terreus* UL 4209 suşundan izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 22 kDa ağırlığında tek bir aktivite bandından meydana geldiğini bulmuşlardır.

Dutta ve ark (2007), izolasyonunu gerçekleştirdikleri alkali tolerant selülaaz aktivitesi olmayan alkalifilik ksilanaz enziminin SDS-PAGE analizi sonunda 25 kDa ağırlığında bir aktivite bandından oluştuğunu saptamışlardır.

Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmustan* izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin zymogram analizi sonunda 45 ve 23 kDa ağırlığa sahip iki banttandır oluştuğunu belirtmişlerdir.

Savitha ve ark (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan izole ettikleri alkalik termostabil selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin, zimogram analizi sonunda 23 kDa ağırlıkta tek bir aktivite bandı oluşturduğunu saptamışlardır.

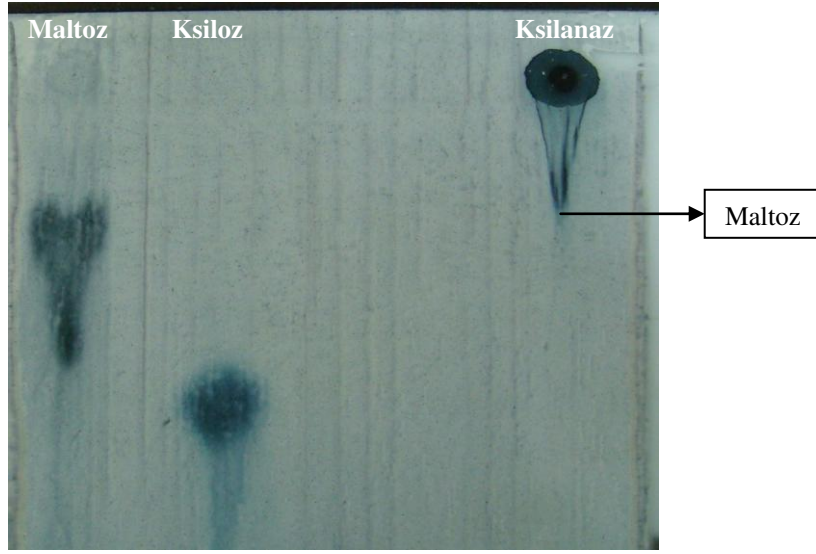
Balakrisnan ve ark (2002), alkalofilik *Bacillus* (NCL 87–6–10) izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan alkalik ksilanaz enziminin SDS-PAGE sistemiyle analiz edildiğinde, moleküler ağırlıkları 25 ve 45 kDa olan birbirinden bağımsız iki aktivite bandından oluştuğunu saptamışlardır.

Bacillus sp. selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi moleküler ağırlıkları 62.4 kDa ve 22 kDa olan birbirinden bağımsız iki aktivite bandından oluşmuştur. Bu sonuç literatürde belirtilen selülaaz aktivitesi olmayan alkalik ksilanaz enzimleri ile uygunluk içindedir.

4.10. Enzimin İnce Tabaka Kromatografi (TLC) Sonuçları

İnce tabaka kromatografi yöntemi kullanılarak selülaaz-free alkalik ksilanaz enzimine ait reaksiyon son ürünlerinin araştırılması yapılmış ve sonuçlar Şekil 10'da gösterilmiştir.

Analiz sonunda açığa çıkan ürünün jelde gösterilmesi amacı ile standart ürün olarak maltoz ve ksiloz kullanılmıştır. Kromatografi işlemleri sonunda selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin reaksiyon ürünü olarak maltoz oluşturduğunu saptanmıştır.



Şekil 4.10. *Bacillus* sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi ince tabaka kromatografisi sonucu

Kullanılan ksiloz ve maltoz standartları ile X6 ksilanaz enzimin hidroliz ürünleri karşılaştırıldığında açığa çıkan ürünün maltoz olduğu saptanmıştır.

Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmustan* izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin ksilani farklı şekillerde parçaladığını ve son ürün olarak mono ve disakkaritleri oluşturduğunu saptamışlardır.

Literatürde *Bacillus* sp. suşunun X13 ksilanaz enziminin, substrat olarak oat spelt ksilanın kullanıldığı 45 dakikalık inkübasyonun sonuncunda hidroliz ürünleri olarak ksiloz ve diğer oligosakkaritlerin açığa çıktığı saptanmıştır (Aygan ve Arıkan, 2009).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyoteknoloji, çok değişik alanlarda gelişme gösteren, kullanım alanı her geçen gün daha da çeşitlenen ve özellikle mikrobiyal biyoteknoloji temelli enzim biyoteknolojisi moleküler biyolojik yöntemlerin de yaygın şekilde kullanımıyla birlikte çağımıza damgasını vuran bir alan haline gelmiştir.

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, biyoteknolojinin endüstriyel enzimlerle ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar, daha da önem kazanmaktadır. Özellikle birkaç ülke dışında diğer ülkeler, bu konuda tamamen dışa bağımlı durumdadırlar (Gözükara, 2009).

Enzimler, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen protein yapısında ya da bir kısmı protein olan biyo-moleküllerdir. Enzimler, binlerce yıldır içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde varlığı ve görevi bilinmeden kullanılmıştır. İlk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Batıda 1896'da gerçek modern mikrobiyal enzim teknolojisi 'takadiastase'ın ticareti ile başlamıştır. Bu doğudan batı toplumuna önemli bir teknolojik transferdir (Uhlig, 1998).

Tarihsel gelişim açısından bakıldığında enzimlerin çok farklı kaynaklardan elde edildiği görülmektedir. Bunlar bitkisel, hayvansal ya da endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Bugüne kadar yaklaşık 2500 farklı enzim tanımlanmış ve bunların ancak %10'u ticari alanda kullanım için kendilerine yer bulmuşlardır (Rao ve ark, 1998). Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır.

Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Rao ve ark, 1998; Wolfgang, 2004).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma kökenli olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizmalardan izole edilmektedirler. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik

aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve daha ucuz olmaları, ekstrem koşullarda çalışabilmeleri, büyük boyutlarda ve yüksek saflıkta elde edilmesi gibi avantajlara sahip olmasıdır. Örneğin mikrobiyal enzimler ekstrem sıcaklık, tuz ve pH değerlerinde çok yüksek düzeyde aktivite gösterirler (Horikoshi, 1999).

Hidrolazlardan selülozik enzimler (selülaz ve ksilanaz) doğada en fazla bulunan yenilenebilir karbonhidrat kaynağı olan selülozu şekerlere dönüştürerek özellikle biyo-etanol gibi biyolojik temelli yakıt katkı maddelerinin üretiminde önemli bir yer tutmaya başlamışlardır. Bu nedenle selülazların (glukanaz) enzim piyasasındaki paylarının ciddi bir şekilde artması beklenmektedir (Boyce ve Walsh, 2007). Son zamanlardaki en etkin uygulamaları kağıt ve kağıt hamuru beyazlatılması, içecek endüstrisi, tekstil ve fırıncılık olan ksilanazların endüstride kullanılması hızlı bir yükselişe geçmiştir (Wainø ve Ingworsen, 2003).

Ksilanaz enzimi başlıca bakteri ve mantarlardan izole edilmektedir. Ksilanazın uygulama alanları hayvan besleme, fırıncılık, içecek ve tekstil endüstrisi, selülozik kağıtların ağartılması, etanol ve ksilitol üretimi gibi biyoteknolojik uygulamalar vardır. Ksilanaz ksiloz birimlerini depolimerize ederek etki gösterir. Ksiloz bakteri ve mantarlar tarafından karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Monisha ve ark, 2009).

Endüstride yaygın şekilde kullanılan enzimler arasında *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürleri tarafından sentezlenen ondan fazla enzim vardır. Örneğin ticari olarak üretilen ve kullanılan termostabil amilaz enzimlerinin üretilmelerinde *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* en çok kullanılan iki *Bacillus* türüdür (Horikoshi, 1996; Lin ve ark, 1998; Horikoshi, 1999; Kumar ve Takagi, 1999).

Bacillus cinsi bakteriler toprak, hayvan dışkıları ve bitkisel atıklar üzerinde yaygın olarak bulunurlar. Bu cinsin bireylerinin çoğu zararsız, izolasyonu ve teşhisi kolay, hızlı büyüme oranı ile fermentasyon süresi kısadır. Genel olarak güvenli olmaları, sentezledikleri proteinleri dış ortama salgılama kapasiteleri gibi birçok nedenden dolayı endüstriyel organizmalardır.

Bacillus türleri çeşitli kompleks substratlara karşı aktivite gösteren çok

sayıda ve çeşitli hidrolitik enzimler üretmekte ve salgılamaktadırlar. Bu nedenle *Bacillus* cinsindeki organizmalar, endüstriyel alanda α -amilaz, proteaz, glukana, glukoz izomeraz ve ksilanaz gibi enzimlerin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadırlar (Uhlig, 1998).

Kağıt ve kağıt endüstrisinde ağartma proseslerinde genel olarak klor ve klorlu bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler toksik olup kalıcı organik kirleticiler olarak bilinirler. Selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi selüloz elyaf yüzeyindeki ksilanı parçalayarak klorlu bileşiklerin ağartma etkisini artırır ve sonuçta klor kullanımı ile birlikte kirlilik ve çevreye verilen zarar azalmış olur (Chanjuan ve ark, 2009).

Ksilan bitki hücre duvarında bulunan önemli bir hemiselülozik polisakkarit olup, selülozdan sonra en fazla bulunan polisakkarittir. Bu biyopolimer dünyadaki yenilenebilir enerji kaynaklarının 1/3'ünü meydana getirmektedir (Chidi ve ark, 2010).

Çalışmada toplam 271 *Bacillus* sp. suşu izole edilmiş, katı besiyeri kullanılarak selüloz ve ksilanaz enzimi üretme yetenekleri araştırılmıştır. İzole edilen suşlardan 63'ü hem selüloz hem de ksilanaz enzimi üretmişlerdir. İzole edilen suşlarda sadece 10'u selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi üretmiştir. Bu suşlar içerisinde en yüksek aktivite zonu oluşturan X6 numaralı örnek farklı pH değerlerine sahip katı besiyerinde farklı sıcaklıklarda inkübasyon gerçekleştirilerek üreme ve enzim üretme yetenekleri araştırılmıştır.

Çalışmada, ortam sıcaklığı 20°C olarak seçildiğinde pH 6.0'da 63 mm aktivite zonu elde edilirken, pH 13'de 38 mm zon ölçülmüştür. pH 6.0-13.0 aralığında ortalama aktivite zon çapı 55 mm bulunmuştur (Çizelge 1). Mikroorganizmanın üretildiği sıcaklık 30 °C olduğunda en geniş aktivite zon çapı 6 mm ile pH 6.0'da saptanırken, pH 6.0-13.0 aralığında ortalama 53 mm aktivite zonu elde edilmiştir (Çizelge 2).

İnkübasyon sıcaklığı 40°C seçildiğinde en geniş aktivite zonu 65 mm ile pH 6.0 ve 10.0 da elde edilirken, pH 13.0'de 21 mm bulunmuştur. Bütün pH değerleri dikkate alındığı zaman 54.6 mm zon saptanmıştır (Çizelge 3).

Kohli ve ark (2001), *Thermoactinomyces thalophylus* suşundan izole edilen thermostabil alkalın selülaa aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 50 derece ve pH 8.0'de sentezlendiğini belirtmişlerdir.

Anuradha ve ark (2007), izolasyonunu gerçekleştirdikleri *Bacillus* sp. suşunun en yüksek enzim üretimini pH 6.0-8.5 aralığında gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir.

Enzim üretiminde kullanılacak suşun inkübasyon sıcaklığı 50°C seçildiği zaman en geniş aktivite zonu pH 6.0 ve 7.0'de 65 mm olarak bulunurken, pH 13.0'te 40 mm'lik zon saptanmıştır. pH 6.0-13.0 aralığındaki bütün zon çapları incelendiği zaman 53.5 mm aktivite zonu saptanmıştır (Çizelge 4).

İnkübasyon sıcaklığı 60°C olduğu zaman bakterilerin üremeleri diğer sıcaklıklara göre oldukça zorlanırken (ortalama 2 mm koloni çapı), en geniş aktivite zonu pH 8.0'de 63 mm ölçülmüştür. Bu sıcaklıkta elde edilen ortalama zon genişliği 54 mm olmuştur (Çizelge 5 ve Şekil 1).

Azeri ve ark (2010), *Bacillus* suşlarından izole edilen selülaa aktivitesi olmayan ksilanaz enzimini sentezleyen bakterilerin tamamının 25–50°C aralığında ürediklerini, optimum üreme ve besiyerinde enzim sentezini ise 40°C'de gerçekleştirdiklerini 55°C'de ise üremenin görölmediğini belirtmişlerdir.

Bacillus sp. X6 selülaa aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 8.0'de gösterdiği saptanmıştır. Enzim pH 6.0, 7.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0 ve 13.0'te sırası ile %98, %95, %88, %89, %85, %74 ve %56 aktivite göstermiştir. Enzim pH 6.0-11.0 aralığında ortalama %92.5 aktiviteye sahiptir. Enzimin asidik ve alkali koşullarda ortalama aktivitesi %90'ın üzerindedir.

Analiz edilen bütün pH değerleri dikkate alındığında (pH 6.0-13.0) gerçekleşen enzim aktivitesi ortalama %85.26 olarak belirlenmiştir. Bu özelliği ile bütün pH koşullarında kullanılacak özelliktedir (Çizelge 6, Şekil 3).

Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmustan* izole ettikleri selülaa aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin pH 5.0-11.0 aralığında gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Savitha ve ark (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan izole ettikleri alkalın thermostabil selülaa-free ksilanaz enziminin pH 9.0'da %90, pH 10.0'da %85 aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır.

Balakrisnan ve ark (2002), alkalofilik *Bacillus* (NCL 87-6-10) izole ettikleri selüla free alkalın ksılanaz enzminin optimum aktiviteyi pH 8.0’de gösterdiğini belirtmişlerdir.

Aygan ve Arıkan (2009), *Bacillus* sp. X13 ksılanaz enziminin optimum aktivitesini pH6.0 da göstermesine rağmen, pH 4.0-7.0 aralığında yaklaşık %90 pH 4.0-9.0 aralığında ise ortalama %77 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Sharma ve ark (2007), *Geobacillus thermoleovorans* ksılanaz enziminin geniş bir pH aralığında (6.0-9.5) aktivite gösterdiğini, optimum aktivitenin ise pH 8.5’ta gözlemlendiğini bulmuşlardır.

Bacillus sp. X6 alkalın selüla aktivitesi olmayan ksılanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 30°C bulunmuştur. İnkübasyon sıcaklığı 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, 110°C ve 120°C seçildiği zaman elde edilen relatif aktivite değerleri sırası ile %97, %94, %93, %93, %90, %84, %84, %85, %84 ve %68 olarak saptanmıştır.

İnkübasyon sıcaklığı 20-70°C aralığında %94.5, 80-120°C aralığında %81 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar enzimin düşük sıcaklıklarda yüksek aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 7, Şekil 4). Enzim psikrotolerant ekstrem termofil aralığında aktiftir.

Kolenová ve ark (2005), ksılanaz enzimlerinin aktivitesi için optimum sıcaklığın 50°C olduğu bulmuşlardır. Silva ve ark. 2008, *Trichoderma inhamatum*’dan elde edilen selüla aktivitesi olmayan ksılanaz enziminin en iyi aktiviteyi 50°C gösterdiğini saptamışlardır.

Nagar ve ark (2010), *Bacillus pumilus* SV-85S suşundan izole ettikleri alkalın stabil selüla aktivitesi olmayan ksılanaz enzimini optimum aktivitesin 50°C’de gösterirken 65°C’de %78 aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmustan* izole ettikleri selüla free xyanaz enziminin optimum aktivitesini pH 5.0-11.0 aralığında ve 37°C gösterdiğini bulmuşlardır.

Monisha ve ark (2009), toprak orijinli *Bacillus pumilus* bakterisinden izole edilen ksılanaz enziminin maksimum aktiviteyi pH 7.0 ve 35°C’de gösterdiğini bulmuşlardır.

Anuradha ve ark (2007), *Bacillus sp.* bakterisinden izole ettikleri alkalın ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 8.0 ve 55°C’de gösterdiğini, enzim aktivitesinin pH 10.0’da düşmekle birlikte, pH 7.0–11.0 aralığında ortalama %65 oranında stabil kaldığını saptamışlardır.

Literatürde, *Bacillus sp.* X13 suşundan elde edilen ksilanaz enziminin optimum aktiviteyi 40°C’de gösterirken, 30 ile 80°C aralığındaki sıcaklık %74’ün üzerinde aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Aygan ve Arıkan, 2009).

Bacillus sp. X6 alkalın psikrotolerant-ekstrem termofil selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin termal stabilitesini saptamak için, 30–100°C aralığında 60 dakika süre ile ön inkübasyon yapılmıştır. Kalan enzim aktivitesi en yüksek 40°C’de %90 olarak gerçekleşirken, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C’lerde %88, %90, %89, %86, %85, %82, %82 ve %85 ölçülmüştür.

Kalan enzim aktivitesi 30–100°C aralığında ortalama %86 iken, 30°C’de %88, 100°C’de %85 düzeyinde saptanmıştır. Bu sonuç enzimin bütün sıcaklık değerlerinde oldukça stabil olduğunu göstermektedir (Çizelge 8, Şekil 5).

Heck ve ark (2005), *Bacillus coagulans* BL69 suşuna ait ksilanaz enziminin 50°C’de stabil olduğunu, 60°C’nin üzerinde, aktivitenin aniden düştüğünü belirtmişlerdir. Enzim 70°C’de 5 dakika inkübe edildiği zaman aktivite %34’e düşerken 80°C’de %20 aktivite saptanmıştır.

Bacillus sp. X13 ksilanaz enzimi 60°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda, 60 dakikalık ön inkübasyondan sonra yaklaşık %66 kalan aktivite ile yüksek derecede aktif bulunmuştur (Aygan ve Arıkan, 2009).

Nagar ve ark (2010), *Bacillus pumilus* SV-85S suşundan izole ettikleri alkalın stabil selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 60°C 1 saatlik inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini %50 koruduğunu belirtmişlerdir.

Kohli ve ark (2001), Thermostabil ve alkalofilik, selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 65°C 125 dakika inkübe edildiği zaman orijinal aktivitesinin %50’sini kaybettiğini saptamışlardır.

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selüloz-free ksilanaz enziminin orijinal aktivitesini 55°C’de %80, 60°C’de %51 koruduğunu belirtmişlerdir.

Bacillus sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi termal stabilite sonuçları literatür verileri ile karşılaştırıldığında, stabilitenin 60 dakika süreyle bütün sıcaklık değerlerinde yüksek düzeyde korunduğunu göstermektedir.

Çalışmada izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi 24 saat süreyle 30°C’de inkübe edildiği zaman ortalama %57 aktivite saptanmıştır. En yüksek kalan aktivite değeri pH 10’da %62 ile elde edilirken, pH 8.0’in üzerinde daha yüksek stabilite (%58) elde edilmiştir (Çizelge 9, Şekil 6).

Li ve ark (2004), *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 suşundan izole edilen selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin pH 6.5 ile 10.0 aralığında stabil olduğunu saptamışlardır.

Chanjuan ve ark (2009), izole ettikleri selülaaz free alkain ksilanaz enziminin geniş bir pH aralığında oldukça stabil olduğunu, pH 7.0-12.0 aralığında 4°C’de bir gecelik inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini %80 oranında koruduğunu belirtmişlerdir.

Chidi ve ark (2010), *Aspergillus terreus* UL 4209 suşundan izole ettikleri selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin optimum aktiviteyi pH 6.0’da gösterdiğini, enzimin pH 6.0’da 35-40°C’de 4 saatlik inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini %95 koruduğunu saptamışlardır.

Dutta ve ark (2007), izolasyonunu gerçekleştirdikleri alkali tolerant selülaaz free alkalifilik ksilanaz enziminin optimum aktivitesini pH 8.5 gösterdiğini ve pH 4.0-10.0 aralığında stabil olduğunu belirtmişlerdir.

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selülaaz-free ksilanaz enziminin pH 8.0, ve 9.0’da oda sıcaklığında 10 dakikalık inkübasyondan sonra orijinal aktivitesini sırasıyla %85, %50 oranında korumuştur.

Bacillus sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi stabilitesini 30°C’de 24 saat süreyle yaklaşık %60 oranında korurken, literatür verilerinden daha stabil olduğu görülmektedir.

Bacillus sp. X6 selülaaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin %3-%30 NaCl konsantrasyonda 30°C’de 60 dakika süreyle ön inkübasyon gerçekleştirildiği zaman en yüksek kalan aktivite değerinin %61 ile %15 NaCl konsantrasyonunda elde

edildiği saptanmıştır. Kalan enzim aktivitesi %3-%20 NaCl konsantrasyonda ortalama %56.16 olarak saptanmıştır (Çizelge 10, Şekil 7).

Azeri ve ark (2010), alkalifilik *Bacillus* suşlarından izole edilen termoaktif selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin maksimum ksilanaz aktivitesini %5 (0.86 M) NaCl konsantrasyonunda gösterdiğini belirtmişlerdir.

Wejse ve ark (2003), ksilanaz-2 enziminin NaCl konsantrasyonu 2 M'dan (%11) 5 M'a (%29) çıkarıldığı zaman kalan aktivitenin %31'e düştüğünü saptamışlardır. *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimden elde edilen sonuçlar literatür verilerinden daha yüksektir.

Çalışmada izole edilen selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi şelatör, inhibitör, metal iyonu, deterjan ve okside edici ajanlarla 40°C'de ve 60 dakika inkübe edildiği zaman ajanlara göre farklı düzeylerde inhibisyon ve indüksiyon gerçekleşmiştir.

5mM EDTA kullanıldığında enzim aktivitesinin ortalama %33, CaCl₂ %31, ZnCl₂ ile %29, NaCl ile %33, ve BaCl₂ ile %30 inhibe edildiği saptanmıştır. Enzim aktivitesi 5 mM MnCl₂ ile %165, %1 β-merkaptotanol ile %249, %1 H₂O₂ ile %175 indüklenmiştir. Selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi %1 triton X-100 kullanıldığında %47, %1 SDS'de %47, 8 M üre kullanıldığında %43 inhibisyon gerçekleşmiştir (Çizelge 11, Şekil 8).

Khandeparker ve ark (2006), *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 organizmasına ait ksilanaz enziminin 1 mM MnCl₂ ile %177 oranında sitümüle olduğunu saptamışlardır.

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selüloz-free ksilanaz enziminin 1 mM konsantrasyonda ve oda sıcaklığında 5 dakika ön inkübasyon işleminden sonra ZnCl₂ ile %86.3, CaCl₂ ile %84, NaCl ile %88.5, MgCl₂ ile %84.5, MnCl₂ ile %185 kalan aktivite elde edildiğini bulmuşlardır.

Anuradha ve ark (2007), *Bacillus* sp. bakterisinden izole edilen alkalik ksilanaz enziminin 1 mM β-merkaptotanolde %130, 3 mM β-merkaptotanolde %150 kalan aktivite değeri elde edildiğini belirtmişlerdir. Yin ve ark (2010), ksilanaz enziminin PMSF ile inhibe β-merkaptotanol ile aktive olduğunu saptamışlardır.

Bu sonuçlar enzimin metalloprotein özelliğinde, serin proteaz karakterine sahip, aktif merkezin sistein amino asitlerince oldukça zengin olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar selülaz free alkalın ksilanaz enzimiyle ilgili literatür verileri ile uygunluk göstermektedir.

Bacillus sp. X6 selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin SDS-PAGE zimogram analizi sonunda moleküler ağırlıkları 62.4 ve 22 kDa olan bağımsız iki izozimden meydana geldiği saptanmıştır (Şekil 9). Elde edilen veriler selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzim sonuçları ile uyum içindedir.

Sanghi ve ark (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan izole edilen selülaz-free ksilanaz enziminin zimogram analizi için SDS-PAGE sistemi kullanarak analiz ettikleri zaman 23 kDa ağırlıkta tek bir aktivite bandı elde etmişlerdir.

Chidi ve ark (2010), *Aspergillus terreus* UL 4209 suşundan izole edilen selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin 22 kDa ağırlığında tek bir aktivite bandından meydana geldiğini bulmuşlardır. Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmustan* izole ettikleri selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin zimogram analizi sonunda 45 ve 23 kDa ağırlığa sahip iki banttı oluşturduğunu belirtmişlerdir.

Balakrisnan ve ark (2002), alkalofilik *Bacillus* (NCL 87-6-10) izole ettikleri selülaz free alkaline ksilanaz enziminin SDS-PAGE sistemiyle analiz edildiğinde, moleküler ağırlıkları 25 ve 45 kDa olan birbirinden bağımsız iki aktivite bandından oluştuğunu saptamışlardır.

Bacillus sp. X6 selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi son ürünlerinin saptanması için ince tabaka kromatografisi yöntemiyle analiz edilmiş ve maltoz benzeri oligo-sakkaritlerin oluştuğu bulunmuştur (Şekil 10).

Tseng ve ark (2002), *Bacillus firmustan* izole ettikleri selülaz aktivitesi olmayan ksilanaz enziminin ksilanı farklı şekillerde parçaladığını ve son ürün olarak mono ve disakkaritleri oluşturduğunu saptamışlardır.

Kağıt endüstrisi açısından optimum verimin elde edilmesinin önündeki diğer engeller, üretiminde kullanılan asit/alkali'nin nötralizasyonu ve ısıtmanın soğutulması işlemleri. Bu nedenle özellikle kağıt endüstrisi için üretilecek ksilanolitik enzimlerin termofil/termostabil ve alkalitolerant özellikte olması hedeflenmektedir. Bütün çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır (Dhillon ve ark, 2000).

Çalışmamızda izolasyonu gerçekleştirilen *Bacillus* sp. X6 bakterisi ve bu bakteriden üretilerek karakterizasyonu yapılan selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi özellikleri incelendiği zaman;

1. Enzim geniş sıcaklık aralığında (20–120°C) psiko-ekstremofil ve termostabil özelliği, pH 8.0’de optimum aktivite göstermekle birlikte pH 13.0’e kadar olan aralıkta yüksek aktivite ve pH 10.0’da en yüksek stabiliteye sahip olması bio-bleaching uygulamaları için öncelikli olarak kullanılabileceğinin göstergesidir. Bio-bleaching uygulamasında kullanılan selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimleri için en önemli parametreler yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde aktivite ve stabilitelerinin korunmasıdır.

2. Termostabil ve orta düzeyde sıcaklıkta aktive gösteren selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimlerinin meyve sularının saflaştırılması, tahıl kaynaklı gıdaların üretimi ve tarımsal atıkların şekerleştirilmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir. *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi özellikleri açısından belirtilen alanlarda ideal kullanıma sahiptir.

3. Ksilan bitki hücre duvarında bulunan önemli bir hemiselülozik polisakkarit olup, selülozdan sonra en fazla bulunan polisakkarittir. Bu biyopolimer dünyadaki yenilenebilir enerji kaynaklarını 1/3’ünü oluşturmaktadır. İzolasyonu ve karakterizasyonu yapılan enzim, diğer selülozik enzimlerin parçalayamadığı hemiselülozun kullanımını sağlayarak bu alanda yaklaşık %33 verim artışı elde edilmesine katkı yapacaktır.

4. Selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi öncelikli olarak kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanılmaktadır. Kağıt işletmelerinde ağartma prosesleri için genel olarak klor ve klorlu bileşikler kullanılmaktadır. Bu bileşikler toksik olup çevre açısından kalıcı organik kirleticiler olarak bilinirler. Selüloz aktivitesi olmayan ksilanaz enzimi, selüloz elyaf yüzeyinde bulunan ksilanı parçalayarak klorlu bileşiklerin ağartma etkisini artırır ve sonuçta klor kullanımı, kirlilik ve çevreye verilen zararı azaltmış olur.

5. Tekstil endüstrisinde dokunan kumaşların ağartılması ve tüysüzleştirme işlemleri pH 11.0, 100°C sıcaklık ve H₂O₂ kullanılarak gerçekleştirilmektedir. İzolasyonu ve karakterizasyon yapılan *Bacillus* sp. X6 selüloz aktivitesi olmayan

ksilanaz enziminin, alkali koşullarda yüksek aktivite göstermesi (pH 6.0-11.0 aralığında ortalama %92.5), yüksek sıcaklıklarda aktif ve stabil olması (80–120°C aralığında ortalama %81 aktivite ve 100°C’de %85 stabilite) ve aktivitenin H₂O₂ ile indüklenmesi (%1 H₂O₂ ile %175 aktivite artışı) gibi özellikleri nedeniyle tekstil endüstrisi için ideal özellik göstermektedir.

KAYNAKLAR

- AEHLE, W., 2004. Enzymes in Industry Production and applications. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, KGaA, Weinheim, ISBN: 3-527-29592-5.
- AIBA, S., KILAL, K., and IMANAKA, T., 1983. Cloning and expression of thermostable α -amilase gene from *Bacillus stearothermophilus* *Bacillus subtilis*. Appl. And Environm. Microbiol. 46 (5):1059-1065.
- ANONYMOUS, 1978. Microbiologischen Handbook. Mecer, Darmstad.
- ANURADHA, P., VIJAYALAKSHMI, K., PRASANNA, N. D., and SRIDEVI, K., 2007. Production and properties of alkaline xylanases from *Bacillus* sp. isolated from sugarcane fields. Current Science. 92 (9): 1283-1286.
- ARIKAN, B., 2008. Highly Thermostable, Thermophilic, Alkaline, SDS and Chelator Resistant Amylase from a Thermophilic *Bacillus* sp. Isolate A3-15. Bioresource Technology.
- AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. Ç.Ü. FBE. Doktora Tezi.
- AYGAN, A. ve ARIKAN, B., 2009. Production and characterization of multifunctional endoxylanase by *Bacillus* sp. X13. Turk J. Biol, 33:231-237.
- AYHAN, K., 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, 43-44. Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.
- AYYACHAMY, M., VATSALA, T.M., 2007. Production and partial characterization of cellulase free xylanase by *Bacillus subtilis* C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. Lett Appl Microbiol. 45 (5):467-472.
- AZERI, C., TAMER, A.U., and OSKAY, M., 2010. Thermoactive cellulase-free xylanase production from alkaliphilic *Bacillus* strains using various agro-residues and their potential in biobleaching of kraft pulp. African Journal of Biotechnology. 9(1): 63-72.

- BALAKRISHNAN, H., KUMAR, B.K., DUTTA-CHOUDHURY, M., and RELE. M.V., 2002. Characterization of Alkaline Thermoactive Cellulase-free Xylanases from Alkalophilic *Bacillus* (NCL 87-6-10). Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics. 6 (5):325 – 334.
- _____, 2002. Production of cellulose-free xylanase from *Bacillus mageterium* by solid state fermentation for biobleaching of pulp. Journal of Biochemistry, Mol. Biol.&Biophys., 6:325-334.
- BALL, A.S., MCCARTHY, A.J., 1989. Production and purification of xylanase from actinomycetes. J Appl Bacteriol., 66:439–444.
- BAJPAI, P., 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. Biotechnol Prog., 15:147–157.
- BASTAWDE, K.B., 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J Microbiol Biotechnol., 8:353–368.
- BEDFORD, M.R., CLASSEN, H.L., 1992. The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in rye-fed broiler chick. In: Visser J, Beldman G, vanSomerem MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases, Elsevier, Amsterdam:361–370.
- BEG, Q.K., BHUSHAN, B., KAPOOR, M., HOONDAL, G.S., 2000a. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. J Ind Microbiol Biotechnol., 24:396–402.
- BEG, Q. K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G. S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications. Appl Microbiol Biotechnol., 56:326–338.
- BHAT, M.K., and BHAT, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances, 15: 583-620.
- BHAT, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances. 18 (5): 355-458.
- BIELY, P., 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol., 3:286–290.
- BIOTECH PROJECT 4544., 2006. Bacterial Xylanase Presentation Catalogue.

- BLANCO, A., VIDAL, T., COLOM, J. F. and PASTOR, F. I. J., 1995. Purification and Properties of Xylanase A from Alkali-Tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 4468-4470.
- BOLLAG, D.M., ROZYCKI, M.D., EDELSTEIN, S.J., 1996. *Protein Methods* (2nd Edt). Wiley-Liss Press, USA. 414s.
- BOYCE, A. and WALSH, G. 2007. Production, purification and application-relevant characterisation of an endo-1,2 (4)- β -glucanase from *Rhizomucor miegei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 76:835-841.
- BURHAN, A., NISA, U., GOKHAN, C., OMER, C., ASHABIL, A. ve OSMAN, G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochem.*, 38: 1397- 1403.
- CHANJUAN, L., HONG, Y., SHA, Z., LIN, L., HUANG, X., LIU, P., WU, G., MENG, X., AND LIU, Z., 2009. Novel Alkali-Stable, Cellulase-Free Xylanase from Deep-Sea Kocuria sp. Mn22. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8:1-8.
- CHAUVT, J.M., COMTAT, J. and NOE, P., 1987. Assistance in bleaching of never-dried pulps by the use of xylanases consequences on pulp properties. *Proceedings of 4th International Congress on Wood and Pulping Industry*, Paris, April, pp. 325-327.
- CHIDI, S.B., GODANA, B., NCUBE, I., JANSE, E., RENSBURG, V., CRONSHAW, A., AND ABOTSI, E.K., 2010. Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. *African Journal of Biotechnology.* 7 (21): 3939-3948.
- CHRISTOV, L.P., AKHTAR, M., and PRIOR, B.A. 1996. Impact of Xylanase and Fungal Pretreatment on Alkali Solubility and Brightness of Dissolving Pulp. *Biobleaching of Sulphite Pulp.* 50: 579-582.
- COLLIN, T., GERDAY, C. AND FELLER, G., 2005. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3-23.

- DAMIANO, V.B., WARD, R., GOMES, E., ALVES-PRADO, H.F., and DA SILVA, R., 2006. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. 129-132:289-302.
- DHILLON, A., GUPTA, J.K., JAURHARI, B.M., and KHANNA, S., 2000. A cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp Bioresource Technology 73: 273-277.
- DUTTA, T., SENGUPTA, R., SAHOO, R., SINGHA, R.S., BHATTACHARJEE, A., AND GHOSH, S., 2007. A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. Letters in Applied Microbiology. 44 (2007) 206–211.
- GARG, A.P., ROBERTS, J.C., MCCARTHY, A., 1998. Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood kraft pulp. Enzyme Microb Biotechnol., 22:594–8.
- GERÇEKER, D., 1999. *Bacillus*. USTAÇELEBİ, Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi, Ankara, sf:411-418.
- GESSESSE, A., and GASHE, B.A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. Journal of Applied Microbiology., 83:402-406.
- GESSESSE, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Appl.Environ.Microbiol.,64:3533-3535.
- GILBERT, H.J., HAZLEWOOD, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases. J Gen Microbiol., 139:187–194.
- GOMES, J. and STEINER, W., 2004. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. Food Technology and Biotechnology, 42(4): 223-235.

- GÖZÜKARA, F., 2009. Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Lichenaz (B-1,3 Ve 1,4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Kullanılabilirliği. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- HAMILTON, L.M., KELLY, C.T., and FOGARTY, W.M. 1999. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. *Biotechnol. Lett.* 2:111-115.
- HANG, Y.D, WOODAMS, E.E., 1997. Xylanolytic activity of commercial juice-processing enzyme preparations. *Lett Appl Microbiol.*, 24:389-92.
- HECK, J.X., HERTZ, P.F., AND AYUB, M.A.Z. (2002). Cellulase And Xylanase Production By Isolated Amazon *Bacillus* Strains Using Soybean Industrial Residue Based Solid-State Cultivation. *Brazilian Journal of Microbiology* (2002) 33:213-218.
- HECK, J.X., FLÔRES, S.H., HERTZ, P.F., and AYUB, M.A.Z., 2005. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. *Process Biochemistry.* 40:107–112.
- HOLS,P., FERAIN,T., GARMYN,D., BERNARD,N., and DELCOUR,J., 1994. Use of expression secretion signals and vector free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for α -amilaseand Levanase expression. *Appl. And Environm. Microbiol.* 60 (5): 1401-1403.
- HORIKOSHI, K., 1996. Alkaliphiles-from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 18:259-270.
- _____, 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 63 (4): 735-750.
- HRMOVA, M., BIELY, P., VRSANKA, M., PETRAKOVA, E., 1984. Induction of cellulose-and xylan-degrading enzyme complex in yeast *Trichosporon cutaneum*. *Arch Microbiol.*, 161:371–376.
- JIN,F., CHENG, X., SHI, Y., and ZHANG, C., 1990. Isolation of New Thermophilic Aerobic Bacteria Which Produce Thermostable a-Amylase. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 36:415-424.

- JOSELEAU, J.P., COMTAT, J., RUEL, K., 1992. Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam: 1–15.
- KHANDEPARKAR, R.D.S., AND BHOSLE, N.B., 2006. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 when grown in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 732–742.
- KOHLI, U., NIGAM, P., SINGH, D., CHAUDHARY, K., 2001. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme and Microbial Technology*, 28:606-610.
- KOLENOVA, K., VRSANSKA, M., and BIELY, P., 2005. Purification and characterization of two minor endo- β -1,4-xylanases of *Schizophyllum commune*. *Enzyme and Microbial Technology*. 36:903–910.
- KRISANA, A., RUTCHADAPORN, S., JARUPAN, G., LILY, E., SUTIPA, T. AND KANYAWIM, K., 2005. Endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 17-23.
- KRISTJANSSON, J.K., and STETTER, K.O., 1992. Thermophilic Bacteria. (J.K.Kristjansson, editör) Thermophilic Bacteria. CRC Pres, London, 1-18s.
- KULKARNI, N., SHENDYE, A., and RAO, M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 23:441-456.
- KUMAR, H.D. and NUSSINOV, R., 2001. How Do Thermophilic Proteins Deal with Heat? A review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 1216-1233.
- KUMAR, G.C., and TAKAGI, H., 1999. Microbial alkaline proteases from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17:561-594.

- KUNG, L. JR., TREACHER, R. J., NAUMAN, G. A., SMAGALA, A. M., ENDRES, K. M. AND COHEN, M. A., 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 115-122.
- KUZU, S.B., 2008. Kitinaz üreten *Bacillus* izolasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Ç.Ü. FBE. Yüksek Lisans Tezi.
- LAEMMLI, U.K., 1970., Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- LENNETE, E.H., BALLOWS, A., HAUSLER, J.W.Jr., SHADOMY, J.H., 1985. *Manuel of Clinical Microbiology*. Vol 4. USA. 1149s.
- LI, X.T., JIANG, Z.Q., LI, L.T., YANG, S.Q., FENG, W.Y., FAN J.Y., KUSAKABE, F.I., KUSAKABE. 2004. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresource Technology*. 10:1-10.
- LIMING, X. AND XUELIANG, S. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology*. 91:259-262.
- LIN, L.L., CHYAU, C.C., and HSU, W.H., 1998. Production and properties of a raw starch degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28:61-68
- LYND, L.R., WEIMER, P.J., van ZYL, W.H., 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:506-577.
- MAAT, J., ROZA, M., VERBAKEL, J., STAM, H., DASILRA, M.J.S., EGMOND, M.R., HAGEMANS, M.L.D., VANGARCOM, R.F.M., HESSING, J.G.M., VANDERHONDEL, C.A.M.J.J., VANROTTERDAM, C., 1992. Xylanases and their application in bakery. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*. Elsevier, Amsterdam:349–360.
- MAGGE, R.J.; KOSARIC, M., 1995. Bioconversion of hemicellulose. *Adv. Biochem Eng Biotech.*, 32: 61-93.

- MANNIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.
- MARICHAMY, S. and MATTIASSON, B., 2005. Rapid production of cellulase-free xylanases by solventogenic *Clostridia* from rumen. Enzyme and Microbial Technology, 37:497–504.
- MILLER, G.L., 1951. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 426-428.
- MONISHA.R., UMA, M.V., MURTHY, V.K., 2009. Partial Purification And Characterization Of *Bacillus pumilus* Xylanase From Soil Source. Kathmandu University Journal Of Science, Engineering And Technology. 5 (2): 137-148.
- NAGAR, S., GUPTA,V., GUPTA, K., KUMAR,D., KUMAR,L., AND KUHAD,R.C.. 2009. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 37 (1): 71-83.
- NAKAMURA, S., WAKABAYASHI, K., NAKAI, R., AONO, R., and HORIKOSHI, K., 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. Appl Environ Microbiol. 59(7): 2311-2316.
- PULS, J., SCHUSEIL, J., 1993. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis. In: Coughlan MP, Hazlewood GP (eds) Hemicellulose and hemicellulases. Portland Press, London: 1–28.
- RANI, S., and NAND, K., 1996. Development of cellulase-free xylanase-producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. Enzyme and Microbial Technology 18:23-28.
- RAO, B.M., TANKSALE, M.A., GHATHE, S.M., and DESHPANDE, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62 (3):597-635.

- RATANAKHANOCKCHAI, K., KYU, K.L., TANTICHAROEN, M., 1999. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-I. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 694-697.
- ROMANOWSKA, I., POLAK, J., JANOWSKA, K. AND BIELECKI, S., 2003. The application of fungal endoxylanase in bread-making. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 68, 317-320.
- ROUAU, X., EL-HSYEK, N.L., MOREAU, D., 1994. Effect of enzyme preparation containing pentosanases on bread making quality of flours in relation to change in pentosan properties. *J Cereal Sci.*, 19:259-72.
- SANGHI, A., GARG, N., GUPTA, V.K., MITTAL, A., KUHAD, R.C., 2010. One-Step Purification And Characterization Of Cellulase-Free Xylanase Produced By Alkalophilic *Bacillus Subtilis* Ash. *Brazilian Journal of Microbiology.* 41: 467-476.
- SÁ-PEREIRA, P., MESQUITA, A., DUARTE, J.C., AIRES BARROS, M.R., COSTA-FERREIRA, M., 2002. Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain of *Bacillus subtilis* and its properties. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 924-933.
- SAVITHA, S.D., RAVIRANJAN, K., NAIK, G.R., 2010. A Highly Thermostable Alkaline Cellulase-Free Xylanase from Thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 Suitable for Paper and Pulp Industry: Purification and Characterization. *Appl Biochem Biotechnol.*
- SHARMA, A., ADHIKARI, S. and SATYANARAYANA, T., 2007. Alkali-thermostable and cellulase-free xylanase production by an extreme thermophile *Geobacillus thermoleovorans*. *World J Microbiol Biotechnol.*, 23:483–490.
- SHARMA, P., and BAJAJ, B.K., 2005. Production and partial characterization of alkali-tolerant xylanase from an alkalophilic *Streptomyces* CD3. *Journal of Scientific and Industrial Research.* 64:688-697.

- SINDHU, G.S., SHAMA, P., CHAKRABARTI, T., and GUPTA, J.K. 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme Microbil. Technol.* 24:584-59.
- SILVA, L. A. D.O.D. and CARMONA, E. C., 2008. Production and Characterization of Cellulase-Free Xylanase from *Trichoderma inhamatum*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 150:117–125.
- SINGH, J., BATRA, N., SOBTI, R.C., 2004. Purification and characterization of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 51-56.
- SRINIVASAN, MC., RELE MV., 1995. Cellulase free xylanases from microorganisms and their applications to pulp and paper biotechnology. *Indian J Microbiol.*, 35:93–101.
- SRIVASTAVA, R.A.K., 1987. Purification and chemical characterization of thermostable amylase produced by *Bacillus stearothermophilus*. *Enzyme. Microb. Technol.*, 9: 749-754.
- SUBRAMANIYAN, S. and PREMA, P., 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 183:1-7.
- SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G., 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Review Biotechnol.* 17:39–67.
- TATAR, S., 2007. Termofil Moderately Halofilik *Bacillus Sp.* Suşlarından Amilaz Enzimi Üretimi ve Endüstriyel Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- TECHAPUN, C., POOSARAN, N., WATANABE, M., SASAKI, K., 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses. *Process Biochemistry* 38: 1327-1340.
- TEMİZKAN, G. ve ARDA, N., 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İst.

- TSENG, M.J., YAP, M.N., RATANAKHANOKCHAI, K., KYU, K.L., and CHEN, S.T., 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (5): 590-595.
- UHLIG, H., 1998. *Industrial enzymes and their applications*. New York : John Wiley and Sons. pp.37-202.
- VIIKARI, L., KANTELINEN, A., SUNDQUIST, J., and LINKO, M., 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 13:335–350.
- VOGET, S., STEELE, H.L., STREIT, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *J Biotechnol* 126:26-36.
- WAINØ, M. and INGVORSEN, K., 2003. Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7:87-93.
- WEJSE, P.L., INGVORSEN, K., MORTENSEN, K.K., 2003. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. *Enzyme.Microb.Technol.*, 32: 721-727.
- WHISTLER, R.L., RICHARDS, E.L., 1970. Hemicelluloses. In: Pigman W, Horton D (eds) *The carbohydrates*. Academic Press, New York: 447–469.
- WOLFGANG, A., 2004. *Enzymes in industry: Production and applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- WONG, K.K.Y., TAN, L.U.L., SADDLER, J.N., 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev.*, 52:305–317.
- WONG, K.K.Y., SADDLER, J.N., 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and purification. *Crit Rev Biotechnol.*, 12:413–435.
- YIN, L.J., LIN, H.H., CHIANG, Y.I., AND JIANG, S.T., 2010. Bioproperties and Purification of Xylanase from *Bacillus* sp. YJ6. *J. Agric. Food Chem.* 58 (1): 557-562.
- ZAMOST, B. L., NIELSEN, H.K., and STARNES, R.L., 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.*, 8:71–82.

ZHANG, B., SUN, Z.W., JIANG, D.D. and NIU, T.G., 2009. Isolation and purification of alkaline keratinase from *Bacillus* sp. 50-3. African Journal of Biotechnology, 8(11): 2598-2603.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana’da doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini farklı illerde tamamladıktan sonra 2004-2008 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimimi tamamladı. 2008-2009 öğretim yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. 2009-2010 güz döneminde İsveç’in Linköping Üniversitesi’nde Erasmus programı kapsamında yüksek lisans öğrencisi olarak bulundu.