



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KSİLANAZ ENZİMİ XynA-7'NİN ENZİMATİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE KAĞIT
HAMURU AĞARTMA ENDÜSTRİSİ'NDE KULLANIMI**

HANİFİ ALTUN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2012

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KSİLANAZ ENZİMİ XynA-7'NİN ENZİMATİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ VE KAĞIT
HAMURU AĞARTMA ENDÜSTRİSİ'NDE
KULLANIMI**

HANİFİ ALTUN

Bu tez,
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2012

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Hanifi Altun tarafından hazırlanan “Ksilanaz Enzimi XynA-7'nin Enzimatik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Kağıt Hamuru Ağartma Endüstrisi'nde Kullanımı” adlı bu tez, jürimiz tarafından 18/07/2012 tarihinde oy birliğiyle / oy çokluğuyla ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd.Doç. Dr. Uğur ÇÖMLEKÇİOĞLU (DANIŞMAN)

.....

Biyoloji Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Prof. Dr. Ahmet TUTUŞ (ÜYE)

.....

Orman Endüstri Mühendisliği,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Doç. Dr. Ashabil AYGAN (ÜYE)

.....

Biyoloji Anabilim Dalı,

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hanifi ALTUN

Bu çalışma K.S.Ü BAP tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2011/4-14YLS

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

**KSİLANAZ ENZİMİ *XynA-7*'NİN ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE KAĞIT HAMURU AĞARTMA ENDÜSTRİSİ'NDE
KULLANIMI**

HANİFİ ALTUN

ÖZ

Bu çalışmada, *Neocallimastix* sp. GMLF7'ye ait olan *XynA-7* enzimi çalışılmıştır. Bu enzim *xynA-7* geni taşıyan *E. Coli* X7 suşundan elde edilmiştir. Bu suş Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan Rekombinant Bakteri Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. *XynA-7* geni glikozil hidrolaz 11 ailesine ait bir endo 1,4-β-D-ksilanazdır. *XynA-7* enziminin çalıştığı optimum pH 6.0-6.5 ve optimum sıcaklığın 50 °C de olduğu tespit edilmiş, *XynA-7*'nin termal stabilitesinin 50 °C' olduğu ve pH stabilitesinin 6.0'dan sonra arttığı ve pH 6.5'da maksimuma ulaştığı görülmüştür. Hg⁺² ve Merkaptoetanol'ün *XynA-7* aktivitesini düşürürken, Mn⁺², Co⁺², Ba⁺² enzim aktivitesini artırmıştır. Mg⁺² ve EDTA'nın aktiviteyi olumlu veya olumsuz etkilemediği görülmüştür. EDTA'nın aktiviteyi olumsuz yönde etkilememesi *XynA-7*'nin bir metalloenzim olmadığını göstermektedir. *XynA-7*'nin ksilan hidrolizi sonucunda başlıca ürünlerin ksilotrioz ve ksilotetraoz olduğu görülmüştür. Zimogram sonuçları ksilanaz aktivitesi gösteren 45 kDa'dan küçük tek bir enzimin olduğu göstermiştir. Buğday sapı, okaliptus ve kızılçamdan elde edilen esmer kağıt hamurları *XynA-7* ile muamele edilmiş ve açığa çıkan fenolik ve hidrofobik bileşikler belirlenmiştir. Deneme kağıtlarının bazı fiziksel ve optik özellikleri belirlenerek, bu enzimin kağıt hamuru ağartma endüstrisinde kullanılabilirliğine ışık tutulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Anaerobik Rumen Fungus, *Neocallimastix* sp., ksilanaz, kağıt hamuru

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Temmuz / 2012

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Uğur ÇÖMLEKCİOĞLU

Sayfa sayısı: 47

**DETERMINATION OF ENZYMATIC PROPERTIES OF XYLANASE ENZYME
XynA-7 AND IT'S USE IN PAPER PULP BLEACHING INDUSTRY**

M.Sc. THESIS

Hanifi ALTUN

ABSTRACT

In this study, XynA-7 enzyme of *Neocallimastix* sp. GMLF7 was studied. This enzyme was obtained from recombinant *E. coli* X7 strain which carries *xynA-7* gene. This enzyme was obtained from *E. coli* X7 strain. This strain was provided from Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Department of Biology, Biotechnology Laboratory, Recombinant Bacteria Culture Collection. *XynA-7* gene is a endo-1,4-β-D-xylanase belong to glycosyl hydrolase 11 family. The optimum pH was 6.0-6.5 and the optimum temperature was 50 °C for XynA-7 enzyme, the thermal stability of XynA-7 was 50 °C and the pH stability started rising after pH 6.0 and reached maximum at pH 6.5. Enzyme activity was decreased by Hg⁺² and Mercaptoethanol, however enzyme activity was increased by Mn⁺², Co⁺², Ba⁺². It was observed that Mg⁺² and EDTA didn't affect the enzyme activity, therefore XynA-7 is not a metalloenzyme. As a result of xylan hydrolysis of XynA-7, the main products were determined as xylotriose and xyloetraose. The results of zymogram showed that there is only one enzyme smaller than 45 kDa that shows xylanase activity. The brown pulp obtained from wheat straw, eucalyptus and red pine was treated by XynA-7 and the phenolic and hydrophobic compounds were determined. Some physical and optical properties of sample papers were determined and the utility of XynA-7 in pulp bleaching industry was enlightened.

Keywords: Anaerobic Rumen Fungus, *Neocallimastix* sp., xylanase, pulp

Kahramanmaraş Sütçü Imam University

Institute for Graduate Studies in Science and Technology

Department of Biology, July / 2012

Supervisor:Asst. Prof. Dr. Uğur ÇÖMLEKCİOĞLU

Page Number: 47

**KSİLANAZ ENZİMİ *XynA-7*'NİN ENZİMATİK ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ VE KAĞIT HAMURU AĞARTMA ENDÜSTRİSİ'NDE
KULLANIMI
ÖZET**

Ksilanaz enzimlerinin hemiselülozik atıkların muamelesi ve kağıt hamurunun ağartılması gibi işlemlerde endüstriyel alanlarda kullanımı bilinmektedir. Bu kapsamda anaerobik bir fungus olan *Neocallimastix* sp.'ye ait bir ksilanaz olan *XynA-7* enziminin çeşitli özellikleri ile kağıt hamuru ağartma endüstrisinde kullanımı araştırılmıştır. Bu amaçla KSÜ, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı, Rekombinant Bakteri Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen ve *xynA-7* genini taşıyan rekombinant *E. coli* X7 suşu kullanılmıştır. *XynA-7* enzimi rekombinant *E. coli* X7 hücrelerinden elde edilmiştir. *XynA-7* enziminin çalıştığı optimum pH 6.0-6.5 ve optimum sıcaklığın 50 °C de olduğu tespit edilmiş, *XynA-7*'nin termal stabilitesinin 50 °C' olduğu ve pH stabilitesinin 6.0'dan sonra arttığı ve pH 6.5'da maksimuma ulaştığı görülmüştür. *XynA-7* enziminin metal iyonlarına ve çeşitli kimyasallara karşı tepkisi belirlenmiştir. Hg⁺² ve Merkaptotanol'ün *XynA-7* aktivitesini düşürürken, Mn⁺², Co⁺², Ba⁺² enzim aktivitesini artırmıştır. Mg⁺² ve EDTA'nın aktiviteyi olumlu veya olumsuz etkilemediği görülmüştür. EDTA'nın aktiviteyi olumsuz yönde etkilememesi *XynA-7*'nin bir metalloenzim olmadığını göstermektedir. *XynA-7*'nin hidroliz ürünleri ince tabaka kromatografisi ile tespit edilmiş, enzim reaksiyonu sonucunda ağırlıklı olarak ksilotrioz ve ksilotetraoz, az miktarda da ksilobioz meydana geldiği görülmüştür. Zimogram sonuçları ksilanaz aktivitesi gösteren 45 kDa'dan küçük tek bir enzimin olduğu göstermiştir.

XynA-7 ile muamele edilen okaliptus ve buğday sapı kağıt hamurlarından salınan 237 nm absorblayıcı kromofor miktarı enzim dozunun artırılması ile yükselmiştir. Kızılçam kağıt hamurunda ise 237 nm absorblayıcı kromofor salınımı 3 U/ g kağıt hamuru dozunda en yüksek düzeye ulaşırken bu dozun üzerinde kromofor salınımında bir düşüş görülmüştür. Buğday sapı kağıt hamurundan en düşük *XynA-7* dozunda bile yüksek düzeyde 465 nm absorblayıcı kromofor salınırken, diğer kağıt hamurlarında daha yüksek *XynA-7* dozları gerekmiştir. *XynA-7* ile muamele edilmiş her üç kağıt hamurunda da ISO parlaklık, opaklık ve beyazlık değerlerinin arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak ağartılması zor sınıfa giren her üç kağıt hamurunun *XynA-7* ile muamelesi sonrasında ağartılabilirliğinde artış olduğu görülmüştür.

DETERMINATION OF ENZYMATIC PROPERTIES OF XYLANASE ENZYME XynA-7 AND IT'S USE IN PAPER PULP BLEACHING INDUSTRY

SUMMARY

The usage of xylanase enzymes in procedures like treating hemicellulosic waste and bleaching pulp in industrial areas is known. In this context various properties and usage in pulp bleaching industry of XynA-7 enzyme which is a xylanase of an anaerobic fungus *Neocallimastix* sp. is investigated. For this reason, a recombinant *E. coli* X7 strain, which contains *xynA-7* gene, was provided from Kahramanmaras Sutcu Imam University, Department of Biology, Biotechnology Laboratory, Recombinant Bacteria Culture Collection. XynA-7 enzyme was obtained from recombinant *E. coli* X7 cells. The optimum pH was 6.0-6.5 and the optimum temperature was 50 °C for XynA-7 enzyme, the thermal stability of XynA-7 was 50 °C and the pH stability started rising after pH 6.0 and reached maximum at pH 6.5. The effects of metal ions and various chemicals on XynA-7 were determined. Enzyme activity was decreased by Hg^{+2} and Mercaptoethanol, however enzyme activity was increased by Mn^{+2} , Co^{+2} , Ba^{+2} . It was observed that Mg^{+2} and EDTA didn't affect the enzyme activity, therefore XynA-7 is not a metalloenzyme. XynA-7's hydrolysis products were determined by thin layer chromatography, as a result of enzyme reaction mainly xylotriose, xylotetraose, and a small quantity of xylobiose was observed. The results of zymogram showed that there is only one enzyme smaller than 45 kDa that shows xylanase activity.

237 nm absorbing chromophore quantities released from XynA-7 treated eucalyptus and wheat straw pulp was increased by the increase of enzyme dose. In red pine pulp 237 nm absorbing chromophore release reached maximum at 3 U/g pulp dose, chromophore release was decreased over this dose. While lowest dose XynA-7 released high level 465 nm absorbing chromophore from wheat straw pulp, for other pulps higher XynA-7 doses were needed. The ISO brightness, opacity and whiteness rates were increased for all three pulps treated by XynA-7. As a result after treating all three pulps, which are hard to bleach, with XynA-7 an increase in bleachability was observed.

TEŐEKKÖR

Bu arařtırmanın yűrűtűlmesi sırasında gűstermiŐ olduĐu her tűrlű destek ve katkılarında dolayı baŐta danıŐman hocam Yrd. DoĐ. Dr. UĐur ŖMLEKCİŖĐLU'na teŐekkűr ediyorum. Yine deĐerli bilgilerini ve tecrűbelerini esirgemeyen DoĐ. Dr. Ashabil AYGAN'a, gűstermiŐ oldukları ilgiden dolayı Prof. Dr. Metin DIĐRAK'a, DoĐ. Dr. Mehmet ASLANTAŐ'a, Yrd. DoĐ. Dr. Mustafa ÇELİK'e, Yrd. DoĐ. Dr. Hűseyin TANIŐ'a, Murat GŪNALAN' a ve Biyoteknoloji Laboratuvarı alıŐanları ArŐ. GŖr. M. Bekir KELLECI, Gűlay BATTALOĐLU, Sevtap SARITŪRK, Sedat KŖSTEKI, Merva GŪNEŐ ve DŖne PARLAK'a teŐekkűrű bir borç bilirim.

Ayrıca kaĐıt hamurlarının temini ve ilgili çalıŐmaların yűrűtűlmesindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ahmet TUTUŐ'a ve ArŐ. GŖr. Mustafa IEKLER'e teŐekkűr ediyorum.

Bunun yanında, bűtűn çalıŐmalarım sűresince maddi ve manevi desteĐini esirgemeyen aileme, eŐim Nurgűl ve kızım Tuana Ecrin ALTUN'a sonsuz teŐekkűrlerimi sunarım.

TEMMUZ 2012, KAHRAMANMARAŞ

Hanifi ALTUN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler	1
1.2. Enzim Kaynakları.....	2
1.3. Bitki Hücre Duvarı Yapısı ve Enzimatik Yıkımı.....	2
1.4. Ksilanaz Enzimleri ve Endüstrideki Kullanımları.....	5
1.5. Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Ksilanaz Enzimleri.....	7
1.6. Ksilanaz Üreticisi Olarak Anaerobik Rumen Fungusları.....	10
1.7. Tezin Amacı.....	11
2. MATERYAL VE METOT	12
2.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları.....	12
2.2. Moleküler Biyoloji Metotları.....	12
2.3. Enzim Ekstraktının Hazırlanması.....	13
2.4. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	14
2.5. Enzimin Çalıştığı Optimum pH, pH Stabilite, Sıcaklık Değerinin TermalStabilitenin Belirlenmesi.....	14
2.6. Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi.....	15
2.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	15
2.8. Enzimin Saflaştırılması.....	16
2.9. Protein Tayini.....	16
2.10. Kâğıt Hamuru Ağartma Çalışmaları.....	16

	Sayfa No
2.10.1. Kâğıt hamurları ile enzimatik muamele.....	16
2.10.2. Deneme Kağıtlarında Testler.....	17
3. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	18
3.1. Escherichia coli X7 Suşundan Plazmit İzolasyonu ve xynA-7 Geninin Kontrol Edilmesi.....	18
3.2. xynA-7 Geninin Dizilenmesi	20
3.3. E. coli X7'den XynA-7 Enziminin Elde Edilmesi.....	23
3.4. XynA-7 Enziminin Optimum Çalışma Sıcaklığının ve pH'sının Belirlenmesi.....	24
3.5. Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi.....	26
3.6. Enzimin pH Stabilitesinin Belirlenmesi.....	27
3.7. Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisinin Belirlenmesi.....	28
3.8. Hidroliz Ürünlerinin İnce Tabaka Kromatografisi ile Analizi.....	29
3.9. XynA-7 Enziminin Saflaştırılması ve Zimogram Analizi.....	31
3.10. XynA-7 Enziminin Kağıt Hamurları İle Muamalesi.....	32
4.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	37
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. pCT plazmiti ve <i>E. coli</i> X7 suşundan izole edilen pCTX7 plazmitinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	18
Şekil 3.2. pCT ve pCTX7 plazmitlerinden ksilanaz primerleri ile gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	19
Şekil 3.3. xynA-7'nin nükleotid dizisinde açık okuma çerçevesi (ORF) ve bazı endonükleaz tanıma bölgeleri görülmektedir.....	21
Şekil 3.4. XynA-7'nin amino asit dizisinin diğer anaerobik fungal ksilanaz ile karşılaştırılması.....	22
Şekil 3.5. XynA-7'ye ait glikozil hidrolaz 11 ailesine ait katalitik domain görülmektedir.....	22
Şekil 3.6. <i>E.coli</i> X7'den elde edilen XynA-7 enziminin optimum sıcaklık grafiği.....	24
Şekil 3.7. <i>E.coli</i> X7'den elde edilen XynA-7 enziminin optimum pH grafiği.....	25
Şekil 3.8. <i>E.coli</i> X7'den elde edilen XynA-7 enziminin termal stabilitesinin grafiği.....	27
Şekil 3.9. <i>E.coli</i> X7'den elde edilen XynA-7 enziminin pH stabilitesinin grafiği.....	28
Şekil 3.10. <i>E.coli</i> X7'den elde edilen XynA-7 enzimi üzerine metal iyonlarının etki grafiği.....	29
Şekil 3.11. XynA-7'nin hidroliz ürünlerinin TLC ile tespiti.....	30
Şekil 3.12. XynA-7'nin saflaştırma çalışmaları sonrasında 29-45 kDa arasında iki adet protein kaldığı, zimogram analizi sonucunda ise bunlardan küçük olan proteinin ksilanaz aktivitesi verdiği görülmektedir.....	31
Şekil 3.13. Farklı enzim miktarları ile kağıt hamurlarının inkübasyonu sonucunda açığa çıkan fenolik bileşiklerin 237 nm'de ölçülmesi ile elde edilen sonuçlar.....	32
Şekil 3.14. Farklı enzim miktarları ile kağıt hamurlarının inkübasyonu sonucunda açığa çıkan kromoforların 465 nm'de ölçülmesi ile elde edilen sonuçlar.....	33
Şekil 3.15. Farklı enzim miktarları ile kağıt hamurlarının inkübasyonu sonucunda açığa çıkan indirgenen şeker miktarları.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Ksilanazların Potansiyel Uygulama Alanları.....	7
Çizelge 2.1. Bakteriler için kullanılacak antibiyotikler, stok solusyonlar ve besi ortamındaki son konsantrasyonları.....	12
Çizelge 3.1. Mikrobiyal ksilanazların kağıt hamuru ağartma işlemlerinde kullanılması...	35
Çizelge 3.2. Enzim muamelesi görmüş ve görmemiş (kontrol) kağıt hamurlarına ait bazı fiziksel ve optik özelliklerine ait bulgular.....	36

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A.....	: Adenin
Amp ^r	: Ampisilin dirençlilik geni
ark.....	: Arkadaşları
ATP.....	: Adenozin trifosfat
bç.....	: Baz çifti
BİGEM.....	: Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği Laboratuvarı
BSA.....	: Bovin serum albümin
°C.....	: Santigrad derece
dk.....	: Dakika
DNA.....	: Deoksiribonükleik Asit
dH ₂ O.....	: Distile su
dNTP.....	: Deoksi nükleotid trifosfat
DNS.....	: Dinitrosalisilik asit
DTT.....	: 1,4-Dithio-DL-threitol
E.C.....	: Enzim kodu
EDTA.....	: Etilendiaminotetraasetik asit
EtBr.....	: Etidium Bromür
EtOH.....	: Etil alkol
g.....	: Gravity
GC.....	: Guanin Sitozin
gr.....	: Gram
H ₂	: Hidrojen
HCl.....	: Hidroklorik asit
ISO.....	: Uluslararası Standartlık Örgütü
kb.....	: Kilobaz
kDa.....	: Kilodalton
KLA.....	: Konjuge Linoleik Asit

KMS.....	: Karboksi metil selüloz
KMSaz.....	: Karboksi metil selülaz
<i>lacZ</i>	: β -galaktosidaz
L.....	: Litre
LB.....	: Luria Bertani
M.....	: Molar
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
μmol	: Mikromol
μl	: Mikrolitre
mg/ml.....	: Miligram/mililitre
mg.....	: Miligram
mL.....	: Mililitre
mm.....	: Milimetre
mM.....	: Milimolar
MW.....	: Moleküler ağırlık
n.....	: Örnek sayısı
NaCl.....	: Sodyum klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
Na ₂ SO ₃	: Sodyum sülfid
NaOH.....	: Sodyum hidroksit
NCBI.....	: National Center for Biotechnology Institute
(NH ₄) ₂ SO ₄	: Amonyum sülfat
Nm.....	: Nanometre
OD.....	: Optik yoğunluk
ORF.....	: Açık okuma çerçevesi
pI.....	: İzoelektrik noktası
PZR.....	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rRNA.....	: Ribozomal RNA

rDNA.....	:	Ribozomal DNA
SDS.....	:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE.....	:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
sp.....	:	Tür
α	:	Alfa
β	:	Beta
T.....	:	Timin
TBE.....	:	Tris-Borik asit-Edta
TE.....	:	Tris, EDTA
TEM.....	:	Transmisyon Elektron Mikroskopu
T _m	:	Erime sıcaklığı
U.....	:	Enzim ünitesi
UV.....	:	Ultra viyole
Uz.....	:	Nükleotid uzunluğu
v.....	:	Hacim
w.....	:	Ağırlık

1. GİRİŞ

1.1. Enzimler

Katalizör, kimyasal reaksiyonlarda etkili olan, reaksiyonu hızlandıran ve kolaylaştıran moleküllerdir. Biyolojik katalizör olan enzimler ise, hücreler tarafından genetik kontrol altında hücre içinde sentezlenen organik katalizörlerdir (Zaborsky, 1973). Enzimler hücre içerisinde üretilmelerine rağmen hücre dışında da aktivitelerine devam edebilirler. Enzimlerin bu özellikleri endüstriyel uygulamalarda kullanılmalılarının yolunu açmıştır (Aygan, 2008).

Enzimin etki ettiği ve değişikliğe uğrattığı maddeye substrat adı verilir (Yenson, 1984). Reaksiyon sonucu açığa çıkan maddeye ise ürün adı verilir. Enzim substratın dış yüzeyinden itibaren etki etmeye başlar, şeklini bozar ve ürünü açığa çıkarır. Ürün açığa çıktıktan sonra enzim başka bir substrat molekülüne işlem yapmak için hazırlanır. Enzimler protein yapılı olduğundan çok yüksek sıcaklıklarda proteinlerin yapısı bozunmalara uğrayacağından inhibe olur (Bhat, 2000).

Enzimler, bir ortamda bulunan ve yapıları birbirine çok benzeyen çeşitli substratlardan sadece biriyle reaksiyon girer. Her enzimin etki ettiği substratı kendisi için spesifiktir. Substrat açısından enzim spesifikliğini protein kısmı gerçekleştirmektedir. Enzimler kimyasal reaksiyonları gerçekleştirdiklerinde bazı faktörlerin etkisi altında kalırlar. Her enzim reaksiyonunun optimal bir sıcaklık düzeyi vardır. İnsanda bu sıcaklık 36.5 derecedir. Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle optimum sıcaklığa ancak 40-50 °C arasında erişirken, bitkisel kaynaklı enzimlerde bu değer genellikle 50-60 °C arasındadır. Bu sıcaklıkların üzerinde enzimler ısıya bağlı olarak denatüre olurlar (Bhat, 2000).

Enzim reaksiyon hızı farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Enzimin en fazla aktivite gösterdiği pH'ya o enzimin optimum pH'sı adı verilmektedir (Fidancı, 2009). Enzimlerin aktivite gösterdikleri optimum pH değeri enzimden enzime farklılık göstermektedir. Enzimlerin büyük bir kısmışlevlerini su içerisinde gösterdiğinden, suyun miktarı enzim işlevinde etken bir koşuldur. Genellikle % 15'in altında su içeren ortamlarda, enzimler işlev göstermezler. Çünkü moleküllerin birbirine çarparak reaksiyonu gerçekleştirebilmesi için hareketi sağlayacak sıvı bir ortamın olması gerekir.

Enzim konsantrasyonunun enzim hızına etkisi, diğer koşullar sabit tutulduğunda, doğrusal bir ilişki gösterir. Kısaca enzim konsantrasyonu arttıkça enzim hızıda doğru orantılı olarak artar. Her enzim molekülü bağımsız çalıştığı için ne kadar enzim molekülü varsa o kadar çabuk gelişen bir reaksiyon söz konusudur ve reaksiyon da o kadar hızlı yürüyecektir.

Enzim miktarının sabit tutulduğu bir ortamda substrat yoğunluğu arttıkça, tepkimenin hızında artar. Tepkime hızı en yüksek noktaya eriştikten sonra sabit kalır. Buna *Michaelis-Menten sabiti* (Km) denilmektedir (Öztan, 2007). Canlı bünyesinde bulunan eser elementler, mangan (Mn^{+2}), bakır (Cu^{+2}), çinko (Zn^{+2}), demir (Fe^{+2}) ve diğer elementler enzimatik işlevlerde “aktivatör” olarak kullanılır. Bazı maddelerin ise enzimlerin aktif bölgelerine tutulması ile enzimin denatüre olmasına sebep olur, katalitik aktivitesini düşürebilir. Çoğu zaman tamamen durdurabilir, bu maddelere “inhibitör” adı verilir (Aehle, 2004).

1.2. Enzim Kaynakları

Enzimler çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Özellikle endüstride kullanılan enzimler mikroorganizma kaynaklı olsa da bitkisel ve hayvansal kaynaklı da olabilmektedir (John, 1987). Hayvansal kaynaklı enzimler genellikle tavuk yumurtalarının beyazı, domuz midesi, pankreas, geviş getirenlerin karın bölgesi gibi yenilebilen organlardan izole edilebildiği için insan yiyeceklerinin hazırlanmasında da uzun zamandan beri kullanılmaktadır (John, 1987). Bitkisel kaynaklardan elde edilen biyoteknolojik enzimler, yenilebilir bitkilerden elde edilebilmektedir. Toksik olmayan bu yiyeceklerin kaynaklarının güvenilirliği doğrulanmıştır (John, 1987).

Mikrobiyal enzimler özel mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Bira, damıtma, fırıncılık ve tekstil endüstrisinde kullanılabildiği gibi deterjan üretimi ve dericilikte derinin yumuşatılması amacıyla da kullanılmaktadır (Demain ve Solomon, 1981). Mikrobiyal enzimler yan ürün oluşturmaz, daha stabildir, ucuzdur ve fazla miktarda elde edilebilirler. Bununla beraber mikroorganizmaların toksik ve patojen olmayanlardan seçilmeleri de önem arz etmektedir. Dolayısıyla günümüzde endüstride kullanılan birçok enzimin mikrobiyal kökenli olması iyi enzim üreticisi mikroorganizmalara olan ilgiyi arttırmıştır (Kıran ve ark., 2006).

1.3. Bitki Hücre Duvarı Yapısı ve Enzimatik Yıkımı

Doğadaki temel depolanmış karbon kaynağını içeren bitki hücre duvarları, selüloz (β -1,4-glukan'dan oluşan çözünmeyen fibriller), hemiselüloz (mannan ve ksilan gibi selülozik olmayan polisakkaritler) ve ligninden (kompleks polifenolik madde) oluşmaktadır. Bu yapılar genel olarak lignoselüloz olarak isimlendirilmektedir (Thomson, 1993). Lignoselüloz, odunun kuru ağırlığının % 89-98 gibi büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Çeşitli yumuşak veya sert

odun içeren ağaçların selüloz ve hemiselüloz içeren holoselüloz kısmı lignoselülozun % 63-78'ini oluştururken lignin %15-38'ini teşkil etmektedir (Colberg, 1988).

Ayrıca hücre duvarının yapısında; su, iyonlar ve proteinler bulunur (White ve ark., 1993). Bitki hücre duvarının yapısı bitki türlerine, doku tipine, bitkinin yaşına, bitki parçasına, ayrıca bitkinin içinde bulunduğu toprak mineralleri, nem, sıcaklık gibi abiyotik faktörlere bağlı olarak belirli oranda farklılık göstermektedir (Weimer, 1992).

Selüloz, çok sert, suda çözünmeyen bir maddedir; bitkilerin hücre duvarlarında, özellikle yaprak sapları, ağaç gövdeleri ve bitki dokularının odun kısımlarında bulunur 1,4 β -glikozitbağları vasıtasıyla birbirine bağlanmış glikozdan oluşmuş uzun zincirli bir glikoz polimeridir. Selüloz genellikle kristalin selüloz ve nispeten az miktarda şekilsiz (amorf) olan selüloz formunda mevcuttur. Selülozun şekilsiz formu daha az molekül içi hidrojen bağına sahip olması nedeni ile enzimatik parçalanmaya daha duyarlıdır. Ancak kristal formdaki selüloz fiziksel yapısı nedeniyle enzimatik yıkıma karşı daha dayanıklıdır (Beguin, 1990; Perez ve ark., 2002). Selülozlar ve hemiselülazlar, kâğıt ve karton gibi temel kullanım alanları dışında polimerik bir ürün olması sebebiyle de birçok kullanım alanı bulmuştur. Özellikle; gıda, içecek, hayvan yemi, tekstil, deterjan, kâğıt endüstrilerinde hem araştırma hem de geliştirme altındadır. Bakteri ve funguslara ait selülaz, hemiselülazların biyokimyası, genetikteki gelişmeler biyoteknolojide ve araştırmada çok büyük ticari potansiyel oluşturmaktadır (Bhat, 2000).

Selülozun glikoza kadar yıkımı için başlıca 3 enzim sınıfı gerekmektedir; Endoglukanazlar (endo-1,4- β -glukanaz EC 3.2.1.4), sellobiyohidrolazları da içeren ekzoglukanazlar (1,4- β -D-glukan sellobiyohidrolaz EC 3.2.1.91) ve ekzoglukohidrolaz (1,4- β -D-glukan glukohidrolaz EC 3.2.1.74) ve β -glukosidazlar EC 3.2.1.21).

Bu enzimler molekül içi glikozidik bağlarını poliglukan halka boyunca kırarlar. Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolaz ve ekzoglukohidrolaz) poliglukan halkanın uçlarına saldırır ve bu uçlardan sellobiyoz ya da glikoz ünitelerini yıkıma uğrattır (Coughlin ve Ljungdahl, 1988; Goyal ve ark., 1991).

Ksilan selülozdan sonra bitki hücre duvarında bulunan ikinci en çok polisakkarittir. Ksilan hemiselülozun başlıca bileşenidir ve hemiselülozlar doğada toplam biyokütlenin % 30-35'ini oluşturmaktadır (Kulkarni ve ark., 1999). Ksilanlar, temel yapı itibarıyla β -1,4 bağlı D-ksilopiranoz birilerinden meydana gelmiş heteropolisakkaritlerdir (Beg ve ark., 2001).

Ksılanın, omurgası *O*-asetil, α -L-arabinofuranosil, α -1,2 glukuronik asit ya da 4-*O*-metil D-glukuronik asit bileşenlerinden meydana gelmiştir (Kulkarni ve ark., 1999). Ksılan, selülozu enzimatik yıkıma karşı korumaktadır. Ksılan bitkiden uzaklaştırıldığı zaman selüloz selüloolitik hidrolize karşı daha açık olmaktadır (Thomson, 1993). Ksılan çok karmaşık bir moleküldür. Bu nedenle ksılanın hidrolizi için farklı enzimlere ihtiyaç duyulur. Ksılan molekülünün hidrolizini gerçekleştiren enzimlerin tamamına ksılanolitik enzim sistemi denir (Subramaniyan ve Prema, 2000). Ksılanların enzimatik yıkımı için, endo 1,4- β -D-ksilanaz (EC 3.2.1.8) ve β -ksilosidaz (EC 3.2.1.37) enzimleri etkilidir. Yan grupların yıkılması için α -glukuronidaz (EC 3.2.1.131) ve asetil ksılan esteraz (EC 3.1.1.72) enzimlerinin bileşimi gerekmektedir (Orpin ve Letcher, 1979).

Pektin bitkiye dayanıklılık verir, özellikle üzümü sert ve yumuşak çekirdekli meyvelerde bulunur. Genel olarak, α -1,4-D-poligalakturonat omurgasından oluşmakla beraber asidik polisakaritlerle bağlantı kurmaktadır. L-ramnoz dalları α -1,2 bağlarıyla ana zincire bağlanarak polimere helikal bir yapı kazandırmaktadır (Nordkvist, 1987). Pektik maddeler pektinin; pektik asit, pektinik asit ve bunların tuzlarını barındıran bir grup maddeye verilen genel addır (Willats ve Ark., 2001). Pektolitik enzimler galakturonik asidin doğal polimeri olan pektinleri parçalarlar. Pektik enzimleri, pektin molekülünün galakturonan omurgasına olan etkilerine göre pektin esterazlar (ester bağını hidrolize edici enzimler) ve depolimerazlar (zincir kırıcı enzimler) olarak iki sınıfa ayırarak incelemek olasıdır (Aksöz ve ark., 1985).

Lignin, selülozdan sonra bitki hücre duvarlarında en fazla bulunan doğal amorf polimer olup vanilin gibi aromatik gruplar taşıyan karmaşık bir yapıdır. Kimyasal yapısı bitkinin türüne ve morfolojik özelliklerine bağlı olarak değişir (Üner, 2003). Lignin yapıları fiziksel ve biyolojik parçalanmaya karşı daha dayanıklı ve serttir. Bundan dolayı bitki yapısına desteklik sağlar ve enzimatik yıkım ile mikrobiyal parçalanmaya karşı set rolünü üstlenir (Vance ve ark., 1980; Loveless, 1983). Bunun yanında ligninin parçalanması oksijenli ortamda meydana gelmektedir (Kivaisi ve ark., 1990).

Lignin bileşenlerinin parçalanması için lignin peroksidaz veya ligninaz enzimleri gereklidir. Bu enzimler fenol-oksitleyen enzimler olarak görev aldığı ve hidrojen peroksit üretiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Lakkaz veya fenol oksidaz (EC 1.10.3.2) enzimleri fenollerin fenoksi radikallerine oksidasyonunda yer almaktadır (Kirk ve Farrel, 1987).

Bitki hücre duvarlarında polisakaritler ile ilişkili olarak bulunan proteinler gelişen hücre duvarının yeniden şekillenmesinde görev alan enzimler olarak veya yapısal olarak rol

almaktadır. Primer duvarlarında proteinler, kuru maddenin % 10'unu teşkil etmektedir. Hücre en son büyüklüğüne ulaştığında ve hücre duvarının genişlemesi tamamlandığında "ektensin" (hidroksiprolince zengin glikoprotein) proteininin miktarı artmaktadır. Bu proteinin hücrenin son şeklinin verilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Cheng ve ark., 1991)

1.4. Ksilanaz Enzimleri ve Endüstrideki Kullanımları

Ksilanın hidrolizi için farklı enzimlere ihtiyaç duyulur. Ksilanaz enzimleri arasında; β -1,4-endoksilanaz, β -ksilozidaz, α -L-arabinofuranosidaz, α -glukuronidaz, yer almaktadır (Subramaniyan ve Prema, 2000). Ksilanazlar genel olarak, bakteri ve mantarlardan oluşan mikroorganizmalar tarafından üretilirler. β -1,4-endoksilanaz enzimi, ksilan omurgasını rastgele hidrolize ederek depolimerizasyonu sağlarken, β -ksilozidaz enzimi ise kısa oligosakkaritleri hidroliz eder. Asetil ksilan esteraz, α -L-arabinofuranosidaz, α -D-glukuronidaz ve galaktozidazlar ise ksilanın yan gruplarını ana zincirden kopartarak serbest kalmalarını sağlar (Aygan, 2008). Ksilanaz enzimleri ile ilgili yapılan çalışmalarda mikroorganizmalardan elde edilenlerin biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı birçok endüstriyel alanda büyük bir ilgi uyandırmıştır. Başta kağıt ve kağıt hamuru olmak üzere; gıda, yem, sanayi, tarım ve tıp olmak üzere bir çok alanda kullanılmaktadır (Collins ve ark., 2005).

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde ağartma işleminde klor kullanımının sınırlanması çevresel düzenlemeler açısından önem arz eden bir gelişmedir. Bu kapsamda yaşam alanlarımızı endüstriyel atıklardan muhafaza etmek için kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde mikrobiyal enzim sistemlerinin uygulanması önem kazanmıştır (Jeffries, 1981). Bu yaklaşım, ağartmada klor bileşiklerinin önemli derecede indirgenmesine ve kirliliğin azaltılmasına izin vermektedir (Güven, 2011). Kağıt hamurunun ksilanaz kullanılarak ağartılması işlemi ümit verici ve gelecek vaat etmektedir (Kıran ve ark., 2006).

Bunun yanında ksilanazlardan ekonomik yönden önemli ürünlerde üretilebilir. Sıvıya da gaz yakıtların üretimi, tek hücre proteini üretimi gibi genel uygulamalarda kullanılmaktadır (Beg ve ark., 2001). Ksilanazlardan ayrıca odun hamurunda biyo-beyazlatma, sentetik ipek üretiminde ise hamurdan selüloz gibi ürünlerin üretiminden de istifade edilir (Viikari ve ark., 1986; Beg ve ark., 2001). Tarım ve gıda endüstrisinde kullanılan ham maddelerin atık ürünlerinde yüksek oranda ksilan bulunmaktadır. Ksilanaz uygulamaları ile ksilan ksiloza dönüştürülür (Rani ve Nand, 1996).

Meyve sularının berraklaştırılmasında, meyve ve sebzelerin sıvılaştırılması amacıyla selülaz ve pektinaz ile birlikte işleme konulur. Bunun yanında kompostlamayı ve ruminantların beslenmesinde sindirimi artırmak amacıyla yem bitkilerinin ön işleminde kullanılmaktadır (Gilbert ve Hazlewood, 1993). Ksilanazların etkinliği ekmek kalitesi artışında da ekmek hacmini artırarak gözlenmiştir. Bu durum ksilanazlarla birlikte amilazların kullanılmasıyla daha da artmıştır (Maat ve ark., 1992).

α -L-Arabinofuranozidaz ve β -D-Glukopiranozidazlar meyve suyu, şarap ve aroma özütleri için gıda işlemede kullanılırlar. Yemlerin sindirilebilirliğinin artırılması (Wong ve ark., 2000), hemiselülozik atıkların muamelesi işlemlerinde kullanılmaktadır (Wong ve ark., 2000). Ksilanaz enziminin önemli uygulama alanlarından biri de, jüt ve kenevir gibi lif bitkilerinin reçine benzeri maddelerden arındırılmasıdır (Beg ve ark., 2001). Ksilanazların bazı uygulama alanları Çizelge 1.1'de verilmiştir (Collins ve ark., 2005).

Çizelge 1.1. Ksilanazların Potansiyel Uygulama Alanları

FONKSİYONU	UYGULAMA ALANI	ENDÜSTRİSİ
Kağıt imalatı esnasında klorin ve toksik disakkaritlerin kullanımlarının azaltılması	Kağıt hamurunun ağartılması	Kağıt ve kağıt hamuru üretimi
Enzimatik yüzey düzleştirimi	Keten, kendir, jüt ve rami işlenmesi	Tekstil
Meyve suları viskozitesini azaltıcı etkisi yanında yumuşatma özelliği ile kaliteyi artırır.	Meyve ve sebze suyu, Nektar ve pürele eldesi ile bitkisel yağ, şarap imalatı	Meyva ve sebze işleme süreçleri, demleme, şarap imalatı
Hamur elastikiyetini ve dayanıklılığını artırır.	Hamur ve pastacılık ürünleri	Fırıncılık
Çöp arıtımı, fermente edilebilir ürünlerin üretimi, yenilenebilir bioetanol ve zararsız kimyasalların üretimi	Tarımsal, evsel ve Endüstriyel atıkların çevreye zararsızlaştırılması	Biyodönüşüm
Alkali kullanımının azaltılması.	Ligninden ve ekstrak maddelerden kaynaklanan biyolekelerin yok edilmesi	Kağıt ve kağıt hamuru üretimi
Gluten topaklanması işlemi	Nişasta gluten ayırımı	Nişasta

1.5. Kağıt Hamurunun Ağartılmasında Ksilanaz Enzimleri

Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisi, dünyada enzim kullanabilecek en büyük pazarlardan birisi olarak kabul edilmektedir. Hayat standardının artmasına paralel olarak dünya kağıt

ihtiyacı giderek artmakta, çevre dostu ve etkili üretim süreci daha da önem kazanmaktadır (Karademir ve ark., 2002).

Enzimlerin optimum olarak ticari anlamda kağıt ve selüloz endüstrisinde kullanılabilmesi için bir süre daha çalışılması gerekmektedir (Karademir ve ark., 2002). Kağıt endüstrisinin literatür anlamı ile, odun ve hurda kağıdın işlenmesinden, ağartılmasından, kağıt üretiminden ve atık suyun da içine alan işlemleri ifade etmektedir.

Amerika kıtasının kuzey ülkeleri ile Avrupa'nın batısında yer alan bazı ülkelerde, ksilanazlar, ağaç kabuklarının çıkartılmasında, geri dönüştürülmüş liflerin boyalarından arındırılmasından ve kağıt hamurunun çözülmesinin hazırlığı için selülozun saflaştırılmasında kullanılmaktadır (Chen ve ark., 1996). Kağıdın bileşenleri, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi doğal polimerlerdir. Kağıt üretim işleminde lignin, istenmeyen bir madde olarak kimyasal hamur üretmede ve ağartma işlemlerinde hamurdan uzaklaştırılmaya çalışılır (Karademir ve ark., 2002). Hemiselüloz ürün rengini esmerleştirdiği ve çözünmez parçacıklar oluşturduğu için, hamur pişirme ve ağartma işlemleri sırasında uzaklaştırılmaya çalışılır (Gamerith ve Strutzenberg, 1992). Fakat tam anlamıyla uzaklaştırılmadığı için, sonraki üretim safhalarında hemiselüloz, özellikle ksilan, bazı problemlere sebep olur. Bundan dolayı son yıllarda alternatif bir metot olarak sadece hemiselülozu uzaklaştıran enzimler üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Barnoud ve arkadaşlarının, (1986) yaptıkları çalışmada yüksek konsantrasyondaki ksilanaz ile kağıt hamurunun uzun süre muamele edilmesi sonucu, TEM (Transmisyon Elektron Mikroskopu) altında gruplar ve tek tek lifler halinde selüloz mikrofibrillerinin ayrıştığını izlenmişler. İlgili çeperde bulunan selüloz mikrofibrillerini birbirine bağlamada ksilanazların ne kadar önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir. Laboratuar şartlarında kambiyumu parçalayan enzimlerle yapılan çalışmada, ksilanaz enzimiyle muamelede %18 civarında kabuk soymada bir enerji tasarrufu sağlandığını bildirmiştir (Rattö ve ark., 1993).

İnce odun kağıt hamurunun enzimatik ön işleme ağartılmasında, *Pseudomonas fluorescens*'den elde edilen Mannanaz 17 ve *Clostridium thermocellum*'dan elde edilen Man17 nin tek başına etkili olmadığı bildirilmiştir (Clarke ve ark., 2000). *Neocallimastix patriciarum*'dan elde edilen ksilanazın bu iki enzimle birlikte kullanılmasıyla kağıt hamurunun enzimatik yıkımının sağlandığı bildirilmiştir (Clarke ve ark., 2000).

Bir haloalkalophilik olan *Staphylococcus* sp.'den elde edilen SG-13 kodlu ksilanaz enziminin ambalaj kağıdı hamurunun ağartılmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu

enzimin pH'nın 7.5-9.2 ve optimal sıcaklığının 50°C olduğu belirtilmiş, enziminin Fe⁺², Ni⁺², Cu⁺² gibi metallere olumlu etkilendiğini bildirmişlerdir (Gupta ve ark., 2000). *Bacillus subtilis*'den elde edilen ksilanaz enziminin ise ambalaj kağıdı hamurunun ağartılmasında kullanılmasıyla lignin miktarında azalma olduğu ve kappa sayısının düştüğü bildirilmiştir (Saleem ve Akhtar, 2012).

Sert odun ambalaj kağıt hamurunun ön ağartma işleminde sırasıyla; *Aspergillus indicus*, *A. flavus* ve *A. niveus* türü funguslardan elde edilen ksilanaz enzimleri kullanıldığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda kağıt hamurunun kappa değerinin 18.60'dan sırasıyla 6.8, 6.2 ve 5.0 düştüğü ve parlaklığının 19.83'ten sırasıyla *A. indicus*, *A. flavus*, *A. niveus*'un ksilanazları tarafından 42.20, 43.13 ve 45.19'a çıkartılmıştır (Angayarkanni ve ark., 2005). Şeker kamışı sapında yaşamını sürdüren *Aspergillus caespitosus*'tan elde edilen iki ksilanaz enzimi saflaştırılmış ve kategorize edilmiştir (Sandrim ve ark., 2004). Her iki enzimin optimum sıcaklığı 50-55 °C'dir. Optimal pH değerlerinin ksilanaz-1 için 6.5-7.0 ve ksilanaz-2 için 5.5-6.5 olarak belirtilmiştir. Bununla beraber ksilanaz-2 enzimi kağıt hamurunun kappa sayısını daha çok indirmiş ve viskozitesini daha çok arttırmış olduğu belirtilmiştir (Sandrim ve ark., 2004).

Bacillus coagulans'dan elde edilen ksilanaz enziminin odunsu olmayan kağıt hamurunun ön ağartılmasında kullanıldığı ve sonuçların olumlu olduğu ifade edilmiştir (Chauhan ve ark., 2005). Araştırmada pH değeri olarak 8.5'te pirinç sapı kağıt hamurunda daha çok parlaklık sağlanmış ve pH'nın daha yüksek değerlerinde buğday ve pirinç sapı kağıt hamurlarında maksimum parlaklık sağlandığı bildirilmiştir (Chauhan ve ark., 2005).

Robert ve arkadaşları (1990) *Saccharomonospora viridi* 'ten elde ettikleri ksilanaz enzimini ağartılmış kraft kayın hamuru üzerinde denemişler ve %20 civarında toplam ksilan miktarında azalma sağlandığını bildirmişlerdir. *Aureobasidium pullulans*'den elde edilen ksilanaz enzimini kraft ve termomekanik titrete kavak hamurlarına uygulanmış ve yaklaşık %33 oranında ksilan ayrışması başarılmıştır (Jeffries ve Lins, 1990). *Schizophyllum commune* 'den alınan ksilanaz enzimi, lignini alınmış titrete kavak hamurunda denenmiş ve bir saat içerisinde hamurdaki hemiselülozun % 20.4'ten % 13.4'e, 24 saat içerisinde de % 9.1'e düştüğü bildirmiştir (Paice ve Jurasek, 1984). Fakat enzim uygulaması sonucunda hamur viskozitesinin de önemli derecede düştüğü izlenmiş, bu ise ortamda az miktarda dahi olsa selüloz enzimi varlığına bağlanmıştır.

1.6. Ksilanaz Üreticisi Olarak Anaerobik Rumen Fungusları

Ksilanazlar, genellikle ksilan veya ksilanca zengin ortamlarda gelişen mikroorganizmalarda bulunan enzimlerdir. Genel olarak, bakteriler, protozoalar, funguslar ve alglerden elde edildiği belirtilmiştir (Beg et al., 2001).

Bitki hücre duvarının yapısını oluşturan bileşenlerinin (hemiselüloz, selüloz ve lignin) kullanılabilir enerjiye dönüşümü için en uygun ekosistem rumen'dir (Heath, 1988). Rumen (işkembe), ruminant herbivorların sindirim sisteminin hacim olarak en büyük kısmını teşkil eder ve retikulumla (börkenek) beraber, (Hobson ve Wallace, 1982) yoğun bir mikroorganizma popülasyonu içeren, büyük bir fermentöre benzemektedir. Rumen, doğadaki en karmaşık mikrobiyal ekosistemlerden birisini içermektedir (Itabashi, 2004). Rumen mikroorganizmaları arasında, bakteriler, arkealar, protozoalar, bakterofajlar ve funguslar'a ait gruplar yer almaktadır.

Anaerobik funguslar, rumen mikrobiyal ekosistemi içerisinde en dayanıklı bitkisel dokular da dahil olmak üzere bitki hücre duvarlarını kısa bir sürede kolonize edip enzimatik olarak parçalayabilen mikroorganizmalardır (Borneman ve ark., 1991). Rumen funguslarının bitki parçalarının sindiriminde fiziksel ve enzimatik rolleri bulunmaktadır. Funguslar rizoidler veya rizomiselyalar oluşturarak bitki hücre duvarının içine girer ve hücre duvarını fiziksel olarak parçalarlar bu esnada salgıladıkları enzimler sayesinde sindirimde enzimatik açıdan da rol oynarlar (Borneman ve ark., 1993). Ksilanaz (Teunissen ve ark., 1991, Comlekcioglu ve ark., 2010), karboksimetilselülaz (Comlekcioglu ve ark., 2008), glikosidaz ve ksilosidaz (Chen ve ark., 1994, Comlekcioglu ve ark., 2010), amilaz (Mountfort ve Asher, 1988, Comlekcioglu ve ark., 2010), feruloyl ve *p*-kumaril esteraz (Borneman ve ark., 1990) anaerobik fungusların ürettiği fibrolitik enzimlerin başlıcalarıdır.

N. frontalis, ksilanaz enzimini çoğunlukla kültür ortamına salgılamaktadır ve sadece az bir miktarı fungal rizoidler ile ilişkili olduğu bildirilirken (Mountfort ve Asher, 1989; Akyol ve ark., 2009) önemli miktarda hücrel aktiviteye sahip olan türler de bulunmaktadır (Williams ve Orpin, 1987). Anaerobik fungusların enzim sistemlerinin detaylı olarak karakterize edilmesi enzim genlerinin klonlanması ile başarılmıştır. Gen klonlama biyokimyasal olarak ortaya çıkartılamayan enzimlerin tanımlanmasında oldukça değerlidir (Comlekcioglu, 2009). Gilbert ve ark. (1992), *Neocallimastix patriciarum*'un mRNA'sından elde edilen rekombinant bir ksilanazın (*XYLA*), ksilanı ksilobioza kadar parçaladığını bulmuşlardır. Gilbert ve Hazlewood (1993) çalışmalarında *Neocallimastix patriciarum* ve bazı bakteriyel ksilanaz enzimlerinin sekanslarını karşılaştırmış ve bu enzimler arasındaki

belirgin homolojiyi açığa çıkarıp, rumen funguslar ve bakteriler arasında horizontal gen transferinin olabileceğini rapor etmişlerdir.

N. patriciarum'dan *E. coli* 'ye klonlanan β -1,4-ksilanaz geninin kendi promotörü ile çalışmış olması *E. coli*' nin *N. patriciarum* promotörünü tanımladığını göstermektedir (Tamblyn Lee ve ark., 1993). Rumen sıvısı içerisindeki mikroorganizmalardan doğrudan izole edilen genomik DNA'dan spesifik fungal primerler yardımıyla *xynR8* geni elde edilmiş, bu genin sekans analizi sonucunda *Orpinomyces* cinsine ait bir gen olabileceği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2005). *N. patriciarum*'dan klonlanan *xynS20* geni ise en yüksek homolojiyi böcek sindirim sisteminde yer alan mikroorganizmanın ksilanaz geni ile göstermiştir (Liu ve ark., 2008). *N. frontalis*'den izole edilen *xyn11A* ve *xyn11B* genlerinden dokerin domainler çıkarıldığında optimum sıcaklık ve termal stabilitenin arttığı bildirilmiştir (Huang ve ark., 2005). Ancak *Neocallimastix* sp.' den izole edilen ve dokerin domain taşımayan *Xyn2A* enziminin çalıştığı optimum pH ve sıcaklık değerlerinin ise aynı fungusu ait ksilanaz enzimlerinin optimum pH ve sıcaklık değerleri ile aynı olduğu görülmüştür (Akyol ve ark., 2009). *Neocallimastix* sp. GMLF1'den elde edilmiş olan *Xyn1B* enziminin buğday ve okaliptus kağıt hamurlarının kapa değerlerini düşürdüğü gözlenmiştir (Comlekcioglu ve ark., 2010). Klonlama stratejisi kullanılarak anaerobik fungal ksilanaz genlerinin *E. coli*'de ifade edilmesiyle çok yüksek miktarda ksilanaz enzim aktivitesinin (3964 – 16309 U/mg protein) elde edildiği rapor edilmiştir (Gilbert ve ark., 1992; Huang ve ark., 2005; Akyol ve ark., 2009).

1.7. Tezin Amacı

Bu çalışmada, ksilanaz enzim kaynağı olarak anaerobik rumen funguslarından *Neocallimastix* sp.'ye ait ksilanaz genini taşıyan rekombinant *E. coli* X7 suşu kullanılmıştır. Bu suş Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan Bakteri Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Öncelikle *E. coli* X7'de *xynA-7* gen varlığını kontrol etmek için PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PZR ürününün dizileme işlemi gerçekleştirilmiş ve dizi bilgisi analiz edilmiştir. *E. coli* X7 kültür ortamında geliştirilmiş ve ürettiği *XynA-7* enzimi rekombinant hücrelerden elde edilmiştir. *XynA-7* enziminin çalıştığı optimum pH ve sıcaklık tespit edilmiş, *XynA-7*'nin metal iyonlarına karşı tepkisi belirlenmiştir. Buğday sapı, Okaliptus ve Kızılçamdan elde edilen esmer kağıt hamurları *XynA-7* ile muamele edilmiş ve açığa çıkan fenolik ve hidrofobik bileşikler ile belirlenerek bu enzimin kağıt hamuru ağartma endüstrisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada kullanılacak olan *XynA-7* enzimini üreten rekombinant *Escherichia coli* X7 suşu Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda bulunan Bakteri Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

E. coli suşu LB (Luria-Bertani) Broth besi ortamında çalkalamalı olarak veya LB-Agar'da (Sambrook ve ark., 2001) 37 °C'de geliştirilmiştir. Besiyerlerine ilave edilecek antibiyotikler stok solusyonlar hazırlanarak kullanılmıştır. Stok solusyonlar 0,22 µm gözenekli enjektör filtresi ile steril edildi. Antibiyotikler besi ortamına mikroorganizmanın inokülasyonundan önce ilave edilmiştir. Aşağıda bakteriler için kullanılacak antibiyotikler, stok solusyonlar ve besi ortamındaki son konsantrasyonları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bakteriler için kullanılacak antibiyotikler, stok solusyonlar ve besi ortamındaki son konsantrasyonları.

Antibiyotik	Stok Solusyon	Son konsantrasyon
Ampisilin	25 mg/ml; Suda çözülmüştür.	LB'de 50 µg/ml
Eritromisin	100 mg/ml; %75 etanolde çözülmüştür.	LB'de 150 µg/ml
Kanamisin	25 mg/ml; Suda çözülmüştür.	LB'de 100 µg/ml

2.2. Moleküler Biyoloji Metotları

Plazmit DNA izolasyonu Vivantis'in Plazmit İzolasyonu Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla bir gece boyunca büyütülmüş bakteri kültürü kullanılmıştır. Kültür 1200 g' de 10 dk süreyle santrifüj edilip çöktürülmüş ve bakteri hücreleri saf su ile 2 defa yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra elde edilen pelletten ya hemen plazmit izolasyonu gerçekleştirilip veya sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. *E. coli* hücrelerinden plazmit izolasyonu için firmanın prosedürü aynen uygulanmıştır (Cömlekcioglu, 2009).

Elde edilen plazmit DNA, ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanacaktır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu; 32 µl dH₂O, 0.2 µM ileri ve geri primerler, 1 ng kalıp DNA, 4 µl 10X tampon, 200 µM dNTP ve 0.5 U Taq DNA polimeraz karışımı ile gerçekleştirilmiştir. PZR karışımı nazikçe karıştırıldıktan sonra amplifikasyon BioRad Thermal Cycler kullanılmıştır.

PZR, 95 °C'de 4 dk ilk ayrıştırma ile başlatılmış daha sonra 30 döngü olmak üzere 94 °C'de 1 dk, primerler için uygun yapışma sıcaklığında 1 dk, ve 72 °C'de uygun sentez zamanı boyunca gerçekleştirilmiştir. Primerlerin yapışma sıcaklığı, erime sıcaklığının yaklaşık 5 °C altındadır.

PZR ürünlerinin uygun dilüsyonlarından yeterli miktarda (genellikle 5 µl) alınacak, 1 µl yükleme tamponu (% 0.25 bromfenol mavisi; % 40 sükröz; 100 mM EDTA; pH 8.0) ile karıştırılmış jele yüklenerek ve jel büyüklüklerine göre 60-100 V (Biolab; PS 503) altında koşturulmuştur.

DNA kontrolü olarak uygun boyutlardaki (100 bç veya 1 kb) DNA standartları kullanılmıştır. Agaroz jel içindeki DNA, EtBr (0.5 µg/ml) ile 30 dakika boyanarak (post-staining) UV ışığında görüntülendi ve fotoğraflandı (Canon, S31S). Doğaya radyoaktif bir madde olan EtBr kontaminasyonunu engellemek için tüm jeller EtBr destroyer (Favorgen) ile muamele edilmiştir böylelikle EtBr'nin insan ve çevre sağlığına negatif etkileri ortadan kaldırılmıştır.

Elde edilen PZR ürününün DNA dizisi Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'nde bulunan ÜSKİM'de hem ileri hem de geri primerler yardımı ile ortaya çıkarılmıştır. Dizileme işlemi sonrasında elde edilen nükleotid dizisi bilgisayar programı yardımı ile analiz edilmiştir. DNA dizi kromatogramının görüntülenmesi için ChromasPro V1.34 (Technelysium Pty Ltd) programı kullanılmıştır.

2.3. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

Enzim ekstraktı hücre dışı veya hücreli olmak üzere iki ayrı fraksiyondan hazırlanmıştır. Enzim üretimi araştırılacak kültür 1200 g'de 10 dk santrifüjlenip ve besi ortamı ile hücre birbirinden ayrılmıştır. Hücre dışı enzimler için üst sıvı kullanılmıştır. Hücre içi enzimlerin aktivitesinin belirlenmesi amacı ile santrifüj sonrasında elde edilen pelet temiz bir tüpe alınarak, pelet iki defa yıkamadan sonra sıvı azot ile donduruldu ve hücreler öğütülerek parçalanmıştır.

Hücreli materyal 25 mM potasyum fosfat (pH 6.5) tamponu ile çözülmüştür. Hücre parçaları 10000 g'de 2 dk. santrifüj yolu ile çöktürülmüş üst sıvı temiz bir tüpe alınıp hücre içi enzim kaynağı olarak kullanılmak üzere – 20 °C'de saklanmıştır (Cömlekcioglu, 2009).

2.4. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Ksilanaz ve selüloz aktivitelerinin belirlenmesi için Miller (1959)'e ait yöntem kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı enzim ekstraktı ve enzime özel substrattan (% 0.5 substrat [ksilanaz için oat spelts ksilan ve selüloz için karboksi metil selüloz], 25 mM potasyum fosfat tamponu, pH 6.5) oluşmaktadır. Karışım enzim için optimum sıcaklıkta 45 dk. inkübasyona bırakılmıştır. Karışım üzerine 3-5 dinitrosalisilik asit (DNS) solusyonu (% 30 sodyum potasyum tartarat, 2 N NaOH, % 1 DNS) eklenmiştir ve 5 dk. kaynar su banyosunda bekletilmiş enzim reaksiyonu durdurulmuştur. Kontrol ve deney grubu karışımları saf su ile seyreltilmiş ve 540 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Standart çözeltilerinde ksilan için ksiloz, selüloz için glikoz kullanılmıştır.

Bir ünite enzim aktivitesi 1 dk. içerisinde salınan 1 µmol indirgenen şeker miktarı olarak tanımlanmıştır. β-glukosidaz, β-ksilosidaz ve α-L-arabinofuranosidaz aktivitelerinin varlığını araştırmak için ise substrat olarak sırasıyla *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl-α-L-arabinofuranoside kullanılmıştır. Enzim ve ilgili substratlar 40 °C'de 60 dk. inkübe edilmiştir. Reaksiyon 2 MNa₂CO₃ solusyonu eklenip durdurulmuş ve açığa çıkan *p*-nitrophenyl (pNP) miktarı spektrofotometrede 420 nm'de okunarak belirtilmiştir. Standart olarak pNP solusyonu kullanılmış ve bir unite enzim aktivitesi 1 dk içerisinde salınan 1 µmol pNP miktarı olarak tanımlanmıştır.

2.5. Enzimin Çalıştığı Optimum pH, pH Stabilite, Sıcaklık Değerinin ve Termal Stabilitenin Belirlenmesi

Enzimin çalıştığı optimum pH değerinin belirlenmesi için farklı pH'larda hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılmıştır. Bu amaçla pH 3.5 – 5.0 için asetat tamponu, pH 5.5 – 7.0 için sodyum fosfat tamponu ve pH 7.5 – 8.0 için Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Bütün tamponlar 50 mM konsantrasyonunda oluşturulmuştur. Böylelikle pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 ve 8.0 substrat solusyonları elde edilmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesinde aynı prosedür uygulanırken substrat olarak farklı pH'larda hazırlanan substrat kullanılmıştır.

Enzim aktivitesinin çalıştığı optimum sıcaklığın ortaya çıkartılması için farklı inkübasyon sıcaklıkları kullanılmıştır. Bu amaçla enzim çalışmalarında aynı prosedür izlenirken, reaksiyonun gerçekleştiği sıcaklıklar değiştirilmiştir. Enzim substratı ile birlikte 30, 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir.

Enzimin farklı sıcaklıklarda dayanma gücünün belirlenmesi için enzim 40, 50 ve 60 °C'de ön inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca enzimin bu sıcaklıklara dayanma süresinin belirlenmesi için her sıcaklıkta farklı ön-inkübasyon periyotları uygulanmıştır. Bu sürenin sonunda enzim buz içerisine alınarak ve substrat ilave edildikten sonra kalan enzim aktivitesini belirlemek amacıyla optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

Enzimin farklı pH'larda stabilitesini belirlemek için öncelikle enzimler etanol presipitasyonu ile çöktürülmüş ve daha sonra test edilecek pH tamponlarında çözülerek optimum sıcaklıkta 15 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda optimum pH'da hazırlanmış substrat solusyonu kullanılarak enzim denemesi yapılarak enzimin kalan aktivitesi belirlenmiştir.

2.6. Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisi

Çeşitli metal iyonları ile kimyasalların (Co^{2+} , Na^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , KCl ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA), sodyum dodesil sulfat (SDS), ditioneitol (DTT), üre, sodyum azid, β -merkaptoetanol, fenantrolin, sodyum sülfidin (Na_2SO_3) enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak için bu kimyasallar kontrol ve deney gruplarına son konsantrasyonları 1 ve 5 mM olacak şekilde ilave edildikten sonra standart enzim deney prosedürü uygulanmıştır.

2.7. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

XynA-7 ile substrat solusyonu (%1 Beechwood Ksilan, pH 6.5) optimum sıcaklıkta 1, 2, 3, 4 ve 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim reaksiyonları inkübasyonun ardından 100 °C sıcaklıkta 5 dk bekletilerek durdurulmuştur. Reaksiyon karışımı liyofilize edilmiş ve saha sonra metanol ile çözülerek son ürünler konsantre hale getirilmiştir. Son ürünler Silica Jel 25 F254 tabakaları (Merck) üzerine yüklenmiştir. Aynı plaka üzerine ksiloz (Sigma), ksilobioz (Megazyme), ksilotrioz (Megazyme) ve ksilotetraoz (Megazyme) standart karışımı yüklenmiştir. Solvent sistemi olarak *n*-bütanol-asetik asit-su (2:1:1) kullanılmıştır. Şeker bantlarının görüntülenebilmesi için anilin-difenilamin-aseton-%85 fosforik asit (0.4:0.4:20:3) karışımı TLC tabakası üzerine sprey edilmiş ve daha sonra 100 °C'de 4 saat bekletilmiştir.

2.8. Enzimin Saflaştırılması

Enzim üretimi için inkübasyon süresi sonunda kültür santrifüj edilmiş ve hücrelerden enzim ekstraktı hazırlanmıştır. Enzim ekstraksiyonu alkol presipitasyonundan çıkan sonuçlara göre amonyum sülfat ile fraksiyonlu presipitasyon yapılarak saflaştırılmıştır. Fraksiyonlar daha sonra membran torbalar içerisinde diyaliz edilerek de-salting yapılmıştır. Alkol presipitasyonu veya amonyum sülfat presipitasyonu ile toplanan enzimin tam saflaştırma işlemleri ise DEAE Sepharose Kolondan (*Sephadex*® G-100, Sigma) geçirilmiş ve üretilen enzimin tam saflaştırılması gerçekleştirilmiş, ardından SDS PAGE analizleri için kullanılmıştır.

2.9. Protein Tayini

Protein miktarının belirlenmesi için Lowry (1951) metoduna dayanan Favorgen' in hazır kiti kullanılmıştır. Protein analizi mikropilaka okuyucu ile gerçekleştirilmiştir. Protein standartı olarak sığır serum albumini (BSA)'nin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır.

Bu amaçla 10, 25, 50, 75, 100, 250 mg/ml'lik BSA solusyonları hazırlanarak ve bu standart solusyonlar her protein tayini sırasında örnekler ile beraber okunarak kalibrasyon denklemleri ortaya çıkartılmıştır.

2.10. Kâğıt Hamuru Ağartma Çalışmaları

Bu çalışmada kimyasal yöntemlerden sülfat (kraft) – sodyum borhidrür (NaBH_4) metodu kullanılarak Buğday sapı, Okaliptus ve Kızılcam yongalarından üretilen esmer kâğıt hamurları, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Endüstri Bölümü, Kağıt Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

2.10.1. Kâğıt hamurları ile enzimatik muamele

Kâğıt hamurları *XynA-7* enzimiyle muamele edilerek enzimin kâğıt hamurları üzerindeki ksilanolitik aktivitesi araştırılmıştır. Kağıt hamuru örnekleri (50 mM sodyum-fosfat tamponunda % 5 yoğunlukta) *XynA-16*'nın 1, 2, 3 ve 4 U / g dozu ile 50 °C sıcaklıkta 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sodyum azide (% 5) bakteriyel büyümeyi engellemek için ilave edilmiştir.

İnkübasyon sonunda kâğıt hamuru örnekleri süzölmüştür. Süzöntüde indirgenen şeker miktarı analiz edilmiştir. Kağıt hamurundan ortaya çıkan fenolik ve hidrofobik bileşikleri belirlemek için süzöntünün sırasıyla 237 ve 465 nm'de absorpsansları ölçölmüştür (Sandrim ve ark., 2005).

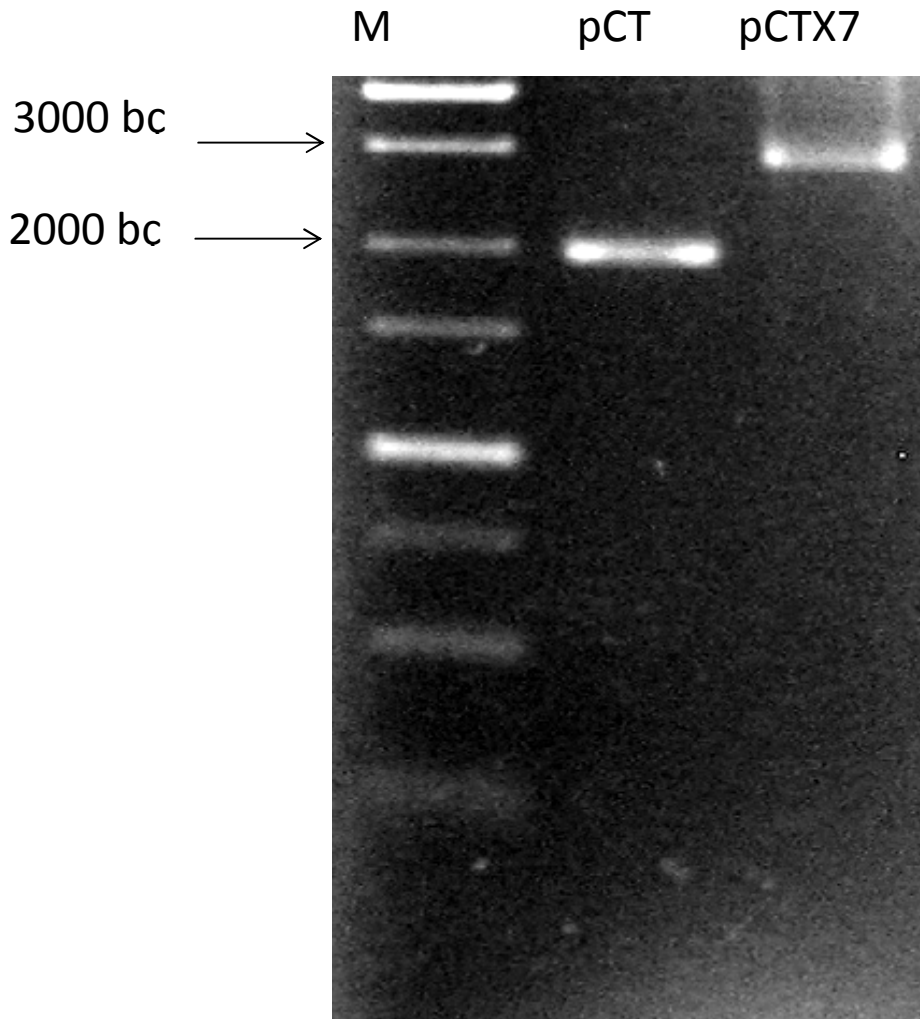
2.10.2. Deneme Kağıtlarında Testler

Enzim ile muamele edilmiş hamurlardan elde edilen deneme kağıtları; TAPPI T 411 om-89 standardına göre yoğunluk ve hacimliliğı, optik özelliklerin belirlenmesinde ISO parlaklık (%) (ANONİM a, 1997), ASTM E 313 Sarılık, (ANONİM b, 2005) ve ISO opaklığı (%) (ANONİM c, 1997), ISO Beyazlık (%) (ANONİM d, 2004) değerleri standart test metotları esas alınarak ve her kağıdın alt ve üst yüzeyindeki ölçümlerin ortalamaları alınarak belirlenmiştir.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

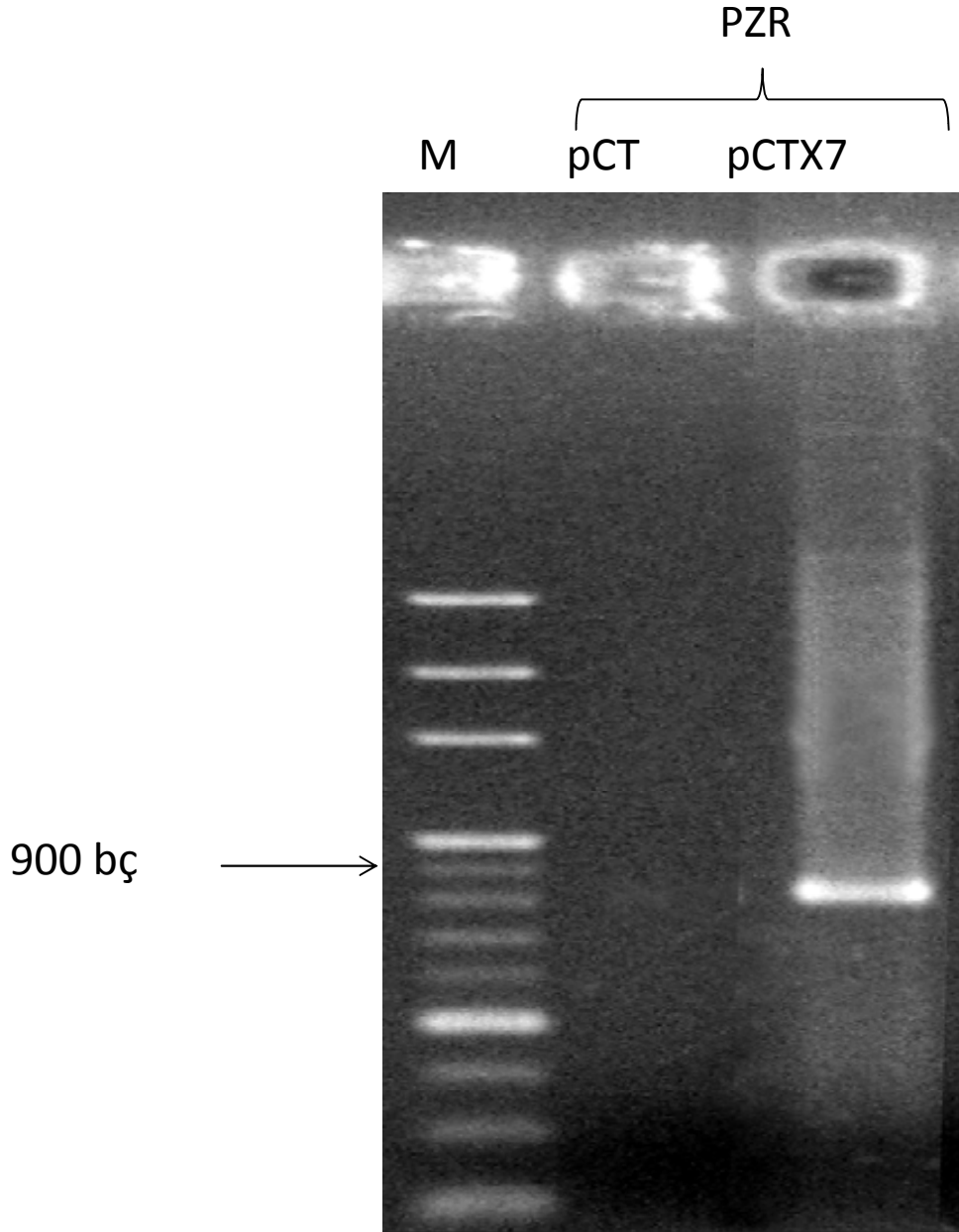
3.1. Escherichia coli X7 Suşundan Plazmit İzolasyonu ve xynA-7 Geninin Kontrol Edilmesi

E. coli X7’de bulunan ve *xynA-7* genini içeren pCTX7 plazmiti, *xynA-7* geninin pCT vektöründe bulunan *lacZ* promotorunun arkasına klonlanması ile oluşturulmuş ve elde edilen rekombinant vektör *E. coli* EC1000 bakterisine aktarılmıştır (Cömlekcioglu ve ark., yayınlanmamış veri). Bu çalışmada enzim kaynağı olarak kullanılacak olan *E. coli* X7 suşunda öncelikle pCTX7 plazmitinin varlığının kontrol edilmesi amacı ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen pCTX7 % 1’lik agaroz jelde pCT plazmiti ile beraber koşturulmuştur. Jel görüntüsünde pCTX7 ile pCT plazmiti arasında yaklaşık 1 kb’lık fark olduğu görülmüştür. Bu farklılık yaklaşık büyüklüğü 1 kb olan *xynA-7* geninden ileri gelmektedir (Şekil 3.1).



Şeki 3.1. pCT plazmiti ve *E. coli* X7 suşundan izole ediln pCTX7 plazmitinin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Ayrıca izole edilen pCTX7 plazmitinde *xynA-7* geninin varlığının kontrol edilmesi amacıyla ile *xynA-7*'nin *Neocallimastix* sp.'den izolasyonunda kullanılan primerler ile PZR gerçekleştirilmiştir. Aynı PZR negatif kontrol olarak pCT plazmitinde de uygulanmıştır. PZR işlemi sonucunda pCTX7'den yaklaşık olarak 800 bç'lik PZR ürünü elde edilirken pCT plazmitinden bir ürün elde edilmemiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. pCT ve pCTX7 plazmitlerinden ksilanaz primerleri ile gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

3.2. *xynA-7* Geninin Dizilenmesi

E. coli X7'den izole edilen pCTX7 plazmitinden gerçekleştirilen PZR sonucunda elde edilen *xynA-7* geni, dizi analizinden önce saflaştırılmak amacı ile agaroz jelden izolasyon işlemi uygulanmıştır. Saflaştırılmış *xynA-7* PZR ürününden her iki iplikçikten de ileri ve geri primerler yardımı ile nükleotid dizisi ortaya çıkartılmıştır. Elde edilen nükleotid dizisi Şekil 3,3'de verilmiştir.

xynA-7 geninin 795 baz çiftlik dizisi tam olarak ortaya çıkartılmıştır. Bu kısım içerisinde 158 amino asit içeren, izoelektrik noktası (pI) değeri 8.95 olan ve 17.909,94 moleküler ağırlığında bir açık okuma çerçevesi (ORF) bulundurmaktadır. Polipeptit zincirinin N terminalinde bir sinyal dizisi bulunmuştur (Von Heijne, 1986).

Tüm *xynA-7* geninin ve ORF bölgesinin GC (Guanin-Sitozin) içeriği sırasıyla % 44 ve % 43 olarak bulunmuştur. *xynA-7*'nin protein kodlayan bölgesi diğer fungal ksilanazların GC içeriğine benzer bulunmuştur (Black ve ark., 1994; Durand ve Fevre, 1996). Bununla beraber kodlanmayan 135 baz çiftlik bölgenin GC içeriği % 45 bulunmuştur. Anaerobik funguslar AT zengin genomları ile bilinmektedir. *Neocallimastix* ve *Piromyces* DNA'larının satelit bölgelerinin GC içeriği % 20'nin altında rapor edilmiştir (Billon-Grand ve ark., 1991). *N. patriciarum*'un *xynA* geni ile *N. frontalis*'in *xyn11A* ve *xyn3* genlerinin protein kodlamayan bölgelerinin GC içeriği sırasıyla % 10.7, % 12.7 ve % 9.8 olarak bulunmuştur (Gilbert ve ark., 1992; Huang ve ark., 2005; Durand ve Fevre, 1996). Bu farklılık primerlerin *Neocallimastix* türlerinin ksilanaz genlerinin özellikle ORF bölgesini çoğaltmak üzere tasarlanmış olmasından kaynaklanmaktadır.

```

1      tgcctctgct ggtcaaagat taaccgtcgy taatgggtcaa aaccaacata aggggtgtagc tgatggttac agttatgaaa
      MspI
81     tctggtttaga taaccctcgt ggtagtggtt ctatgactct cgttagcggc gcaacttca aggttgaatg gactgcactc
      ApaI
      ».....xynA-7.....»
161    gtttaaccgtg gtaacttctc tgcocgtcgt ggtcttgact togtttctca aaagaaggca accgattaca gttacattgg
      HpaI
      ».....xynA-7.....»
241    attggattat actgcaactt acagacaaa; tggtagcgca agtggtaact cccgtctctg tgtatatgga tggttccaaa
      BsmB1
      ».....xynA-7.....»
321    accctggact taatggcgtt ccttttagtag aatactacat caitgaaat tgggttgact ggtttccaga tgcacaagga
      BstXI
      EcoI
      ».....xynA-7.....»
401    aaaaaggtaa ccattgatgg agctcaatat aagattttcc aaatgcatca cactgggtcca actatcaatg gtggtagtga
      SacI
      ».....xynA-7.....»
481    aacccttaag caatacttca gtgtcogtca acaaaagaga acitctggtc atattactgt cttagatcac ttaaggaat
      EcoS7
      ».....xynA-7.....»
561    gggccaaaca aggttggggg tattggtaac cttttatgaa gttgctttga accccaaagc tttgcaaagt agtggggttg
      ».....xynA-7.....»
641    ctgatgtcac cttattagat gttaccocaa ctccaaaggg ttctagtcca gccacctctg ccgtctctcg tactactacc
      BsrBI
721    cgtactacta ctggtacca gttctttcca acccaattac aataagtgtt ctgctaqaat taktggctcc aggtt
      EarI
      BpmI

```

Şekil 3.3. *xynA-7*'nin nükleotid dizisinde açık okuma çerçevesi (ORF) ve bazı endonükleaz tanıma bölgeleri görülmektedir.

XynA-7 geninin nükleotid dizisi kullanılarak belirlenen ORF bölgesinin amino asit dizisi ortaya çıkartılmıştır. Elde edilen amino asit dizisi, *XynA-7* enziminin muhtemel primer yapısını göstermektedir. *xynA-7*'nin kodon kullanımındaki tercih incelendiği takdirde kodonların 3. pozisyonunda T ve C nükleotidleri sırasıyla % 29.67 ve % 33.54 oranında yer aldığı görülmektedir. A ve G nükleotidleri 3. pozisyonunda sırasıyla % 17.41 ve % 19.35 oranında gözlemlenmiştir. *N. patriciarumxynB* geninde kodonların 3. pozisyonunda T önemli ölçüde tercih edilirken G wobble pozisyonundan atılmıştır (Black ve ark., 1994). İnternet Tabanlı Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak yapılan homoloji analizi sonucunda *xynA-7*'nin nükleotid sekansı *P.communis*'in *xynWFI* geni ile % 99, *N. frontalis*'in *xynsk1-15* ve *N. frontalis*'in *xyn11B* geni ile % 96 oranında benzerlik göstermektedir.

XynA-7'nin amino asit dizisi BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) programı yardımı ile bugüne kadar rapor edilmiş ve gen bankasında yer alan tüm diziler ile karşılaştırılmıştır. *XynA-7*, amino asit dizisi bakımından *P. communis* (ABY52795), *N. frontalis* (AAN07082) ve *N. patriciarum* (AAN08348) ile sırasıyla % 100, % 97 ve % 97 oranında benzer bulunmuştur.

```

ABY52795      SMTLGSGATFKAEWSASVNRGNFLARRGLDFGSQKKATDYSYIGLDYTATYRQTGSASGN 120
XynA7        -MTLGSGATFKAEWSASVNRGNFLARRGLDFGSQKKATDYSYIGLDYTATYRQTGSASGN 59
AAN07082     SMTLGSGATFKAEWNAAVNRGNFLARRGLDFGSQKKATDYSYIGLDYTATYRQTASASGN 106
AAN08348     SMTLGSGATFKAEWNAAVNRGNFLARRGLDFGSQKKATDYSYIGLDYTATYRQTASASGN 106
              ***** .*:*****

ABY52795      SRLCVYGFQNRGLNGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHTGPTIN 180
XynA7        SRLCVYGFQNRGLNGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHTGPTIN 119
AAN07082     SRLCVYGFQNRGVQGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHTGPTIN 166
AAN08348     SRLCVYGFQNRGVQGVPLVEYYIIEDWVDWVPDAQGKMVTIDGAQYKIFQMDHTGPTIN 166
              *****.:*****

ABY52795      GGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGIGNLYEVALNPEGLQSSGVADVT 240
XynA7        GGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGYW----- 158
AAN07082     GGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGIGNLYEVALNAEGWQSSGVADVT 226
AAN08348     GGSETFKQYFSVRQQKRTSGHITVSDHFKEWAKQGWGIGNLYEVALNAEGWQSSGIADVT 226
              *****

```

Şekil 3.4. *XynA-7*'nin amino asit dizisinin diğer anaerobik fungal ksilanaz ile karşılaştırılması

XynA-7'nin tahmini polipeptit dizisinde korunmuş bölgeler internet tabanlı “Conserved Domains” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) programında gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda *XynA-7* “glikozil hidrolaz 11” ailesine ait tek bir korunmuş domain içermektedir (Şekil 3.5).

Anaerobik funguslara ait olan *XylA* ve *Xyn11A* proteinleri iki homolog katalitik domain ve ayrıca iki dokerin domain içerirken *Xyn11B* sadece bir katalitik domain ve iki dokerin domain bulundurmaktadır (Gilbert ve ark., 1992; Huang ve ark., 2005).



Şekil 3.5. *XynA-7*'ye ait glikozil hidrolaz 11 ailesine ait katalitik domain görülmektedir.

Ksilanaz enzimleri yapısal (katalitik domain, CBM'lerin varlığı), biyokimyasal (pH ve sıcaklık optimumları), katalitik (substrat özgülüğü, inhibitör duyarlılığı) gibi farklı düzeylerde oldukça çeşitli varyasyonları bulunmaktadır. Ksilanazların ilk sınıflandırılmasında, yüksek moleküler ağırlıklı (MW > 30 kDa) ve asidik pI değerine sahip

olanlar F ailesine, düşük moleküler ağırlıklı (MW < 30 kDa) ve bazik pI değerine sahip olanlar G ailesine dahil edilmiştir. Ancak keşfedilen ksilanaz enzimlerinin sayısı arttıkça bu sınıflandırma yetersiz kalmış ve katalitik domainlerin sekans benzerliklerine dayanan daha kapsamlı bir sınıflandırma sistemi olan glikosil hidrolazlar geliştirilmiştir.

Ksilanazlar, glikozil hidrolaz 5, 8, 10, 11, 16, 26, 30, 43 ve 62 ailelerinde rastlanılmaktadır. Tek bir katalitik domain ile gerçek β -(1,4)- bağlarını kıran ksilanazlar 5, 8, 10, 11 ve 30 ailelerinde görülmektedir (Paes ve ark., 2012). Glikozil hidrolaz 10 ailesi yüksek moleküler ağırlıkta ve glikozil hidrolaz 11 (GH11) ailesi ise düşük moleküler ağırlıkta ksilanazları içermektedir (Haki ve Rakshit, 2003). GH11 ksilanazları özellikle odun hamurunun ağartılmasında klor ve klor dioksit miktarını düşürmesiyle kağıt endüstrisinde öneme sahiptir. GH11 özellikle önemlidir çünkü fibril ve kağıt endüstrisinin sert koşullarına dirençli katalitik ajanlar oluşturulmasına izin veren geliştirmelerin yapıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Bir ksilanaz ön-muamelesi ile atık kağıt hamurunda mürekkep giderilmesini sağladığı, ağartma ajanının kullanımı %10-20 düşürdüğü ve genellikle daha fazla parlaklık elde edildiği görülmektedir (Kulkarni ve ark., 1999). GH11 ksilanazlarının nispeten düşük moleküler ağırlıkları hücre duvarının iç parçalarına daha iyi girmesine (Beaugrand ve ark., 2005) ve odun hamurundan lignin polimerlerinin daha iyi uzaklaştırılmasına (Beg ve ark., 2001) yardımcı olmaktadır.

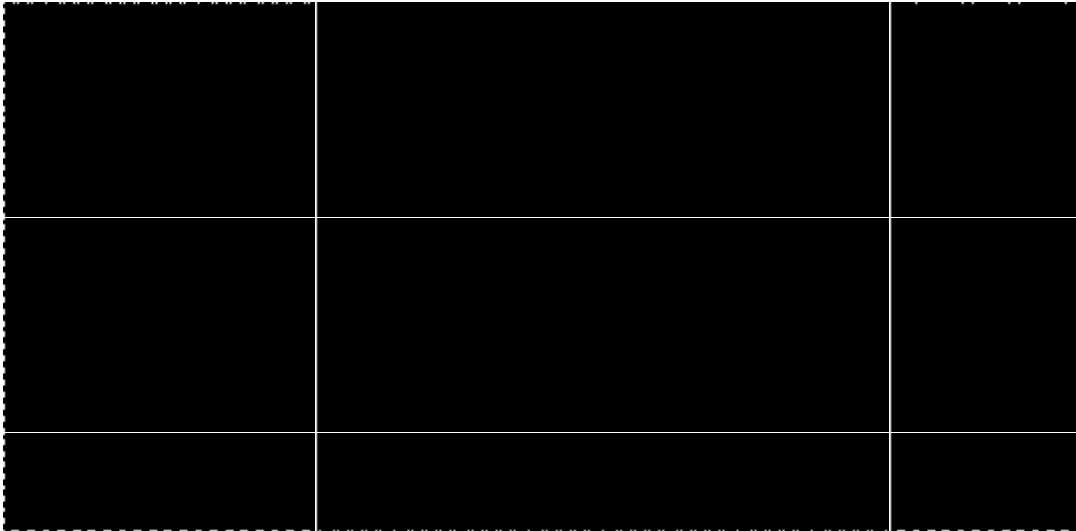
3.3.E. *coli* X7'den XynA-7 Enziminin Elde Edilmesi

XynA-7 enziminin çeşitli özelliklerinin belirlenebilmesi için öncelikle rekombinant *E. coli* X7 suşu 1 litrelik LB besi ortamında bir gece geliştirilmiştir. Geliştirilen kültür santrifüj ile toplandıktan sonra elde edilen hücrelerin hücre duvarları ve zarları sıvı azot yardımı ile kırılarak hücre içeriğinin serbest kalması sağlanmıştır. Kültür gelişimi sırasında pCTX7 plazmitinde ifade edilen *xynA-7* gen ürünü *XynA-7* enzimi *E. coli* tarafından tanınan sinyal sekansları taşımadığı için stoplazma içerisinde birikmektedir. Bu nedenle hücrelerin kırılması ile elde edilen hücre içeriği *XynA-7* enzimini de içermektedir. Hücre içeriği ve hücre parçaları 50 mM pH 6.5 sodyum fosfat tamponu ile sulandırıldıktan sonra hücre parçaları santrifüj ile uzaklaştırılmış geriye kalan tampon çözelti içerisindeki hücre içeriği kaba enzim ekstraktı olarak ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere – 20 °C'de saklanmıştır.

3.4. XynA-7 Enziminin Optimum Çalışma Sıcaklığının ve pH'sının Belirlenmesi

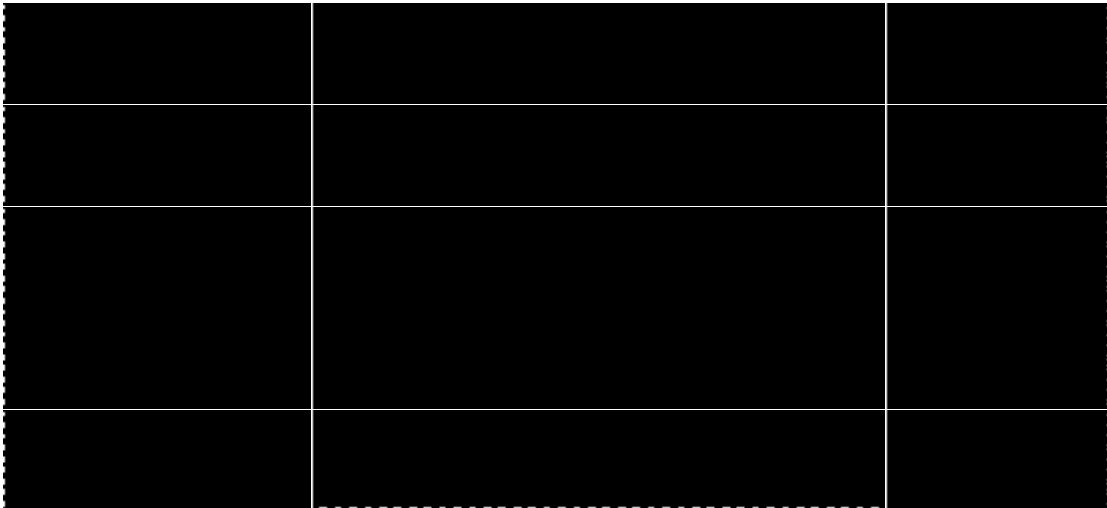
XynA-7'nin ksilanaz aktivitesi farklı pH ve sıcaklıklarda incelenmiş ve optimum değerler pH 6.5 ve 50 °C olarak tespit edilmiştir. Ksilanaz aktivitesinin 30 °C'den 50 °C'ye doğru arttığı gözlenmiştir. Maksimum aktivite 50 °C'de elde edilmiş ve bu noktadan sonra 80 °C'ye kadar aktivite de düşüş gözlenmiştir (Şekil 3.6). Enzimin, 60 °C'de % 80'inin üzerinde 80 °C'de ise % 40 aktivite ile çalıştığı dikkati çekmektedir. *N. patriciarum*'dan klonlanan bir ksilanaz geninin ürünü olan enzimin optimum çalışma sıcaklığı 40 °C bulunmuş, 30 °C ve 55 °C sınırları dışında enzim % 50 aktivite kaybetmiştir (Tamblyn Lee ve ark., 1993). *N. patriciarum*'dan klonlanan *xynS20* gen ürünü enzimin optimum çalışma sıcaklığı 45 °C olduğu 30 °C'nin altında ve 55 °C'nin üstünde aktivitenin %50'den daha az olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2008).

Huang ve ark. (2005), *Xyn11A* ve *Xyn11B* enzimlerinde bulunan iki dokerin domaini sildikleri zaman ksilanaz enzimlerinin optimum pH'larında çok az bir etkilenme olurken optimal sıcaklıklarının önemli derecede etkilendiğini bildirmişlerdir. *Xyn11A*'nın optimum sıcaklığı 55 °C'den 60 °C'ye, *Xyn11B*'nin 60 °C'den 65 °C'ye çıktığı görülmüştür (Huang ve ark., 2005). Ancak dokerin domaini olmayan *Xyn2A* (Akyol ve ark., 2009) ve *Xyn1B* (Cömlekcioglu ve ark., 2010) enzimlerinin optimum sıcaklıkları 50 °C bulunmuştur. Genel olarak rumen fungal ksilanolitik enzimlerinin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklıklar 50 – 55 °C arasında bulunmuştur (Gomez de Segura ve Fevre, 1993; Mountfort ve Asher; 1989, Cömlekcioglu ve ark., 2010).



Şekil 3.6. *E. coli* X7'den elde edilen *XynA-7* enziminin optimum sıcaklık grafiği.

XynA-7, pH 6.5’da maksimum aktiviteye erişmiştir ve bu noktadan sonra aktivitede azalma görülmüştür. pH 3.0’de aktivite neredeyse durmuştur (Şekil 3.7). *XynA-7* enziminin pH 4.0’de %50’nin, pH 8.0’de ise % 60’ın üzerinde aktivite ile çalıştığı görülmektedir. pH 5.0 ile 7.0 aralığında ise % 80’nin üzerinde aktivite göstermektedir. Bu aralık rumen pH’sının değişkenlik gösterdiği aralığı kapsamaktadır. *N. patriciarum*’dan klonlanan ksilanaz enzimi optimum pH 6.2’de çalışırken, pH 4.5’in altında ve pH 7.0’nin üstünde % 50 aktivite kaybı meydana gelmiştir (Tamblyn Lee ve ark., 1993). *XynS20* enziminin optimum pH’sı 6.0 olarak kaydedilmiştir. pH 4.0’ün altında ve 7.0’nin üzerinde optimal aktivitenin %60 kaybedilmiş ve pH 9.0’da hiç aktivite görülmemiştir (Liu ve ark. 2008). *Xyn11A* ve *Xyn11B* enzimlerinin optimum pH’ları 7.0 olarak bulunurken (Huang ve ark. 2005), *Xyn2A* ve *Xyn1B* enzimlerinin optimum pH’ları 6.5 olarak bulunmuştur (Akyol ve ark., 2009, Cömlekcioglu ve ark., 2010). Genel olarak rumen fungal ksilanolitik enzimlerinin en iyi aktivite gösterdiği pH 6.0 – 6.5 °C arasında bulunmuştur (Gomez de Segura ve Fevre, 1993; Mountfort ve Asher; 1989, Cömlekcioglu ve ark., 2010). GH11 ksilanazları pH 2.0’den 9.0 kadar değişen pH optimumları göstermektedir. Pekçok fungal GH11 ksilanazları asidofiliktir. Bakteriyel orijinli ksilanazlar pH 5.5’un altında pH optimumu göstermezler (Paes ve ark., 2012) Bilinen en asidofilik GH11 ksilanazı *Aspergillus kawachii*’den elde edilen *XynC*’dir. pH optimum 2.0 olup, pH 1.0’de inaktive olmaz (Ito ve ark., 1992). *Bacillus* sp. 41M1, ksilanaz salgılamaktadır ve pH optimumu 9.0’dur. Ayrıca aktivitesinin en az % 60’ını pH 5.5-9.5 aralığında korumaktadır (Nakamura ve ark., 1992).

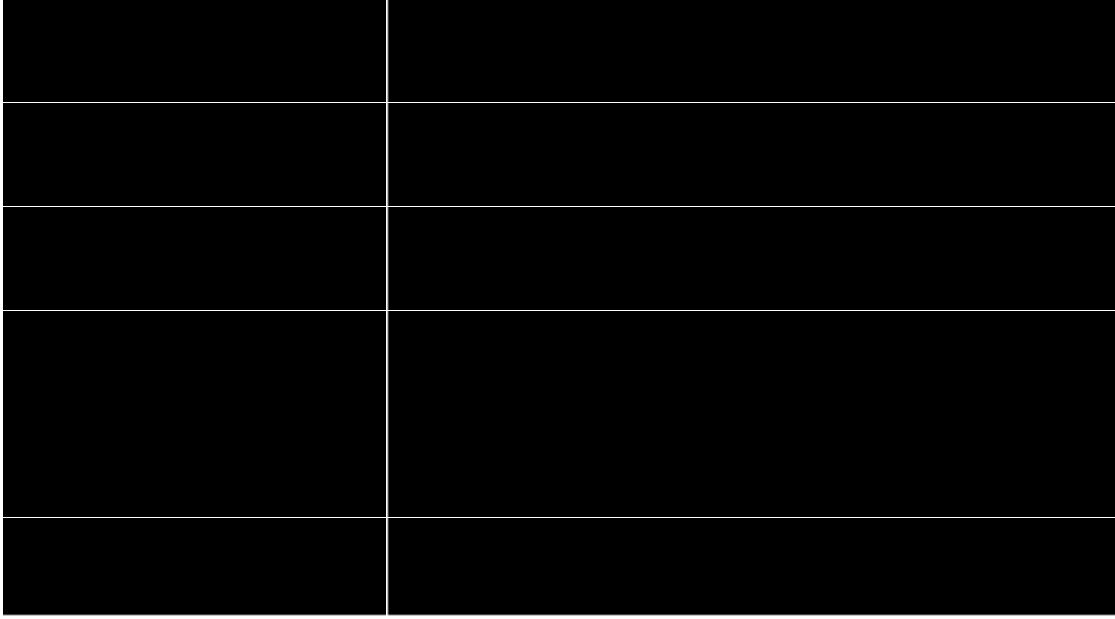


Şekil 3.7. *E. coli* X7’den elde edilen *XynA-7* enziminin optimum pH grafiği.

3.5. Enzimin Termal Stabilitesinin Belirlenmesi

XynA-7'nin aktivitesinin 50 °C'den sonra hızlı bir şekilde azalması enzimin bu sıcaklığın üzerinde termostabil olmamasını akla getirmektedir. Bu nedenle X7gen ürününün termal stabilitesi farklı sıcaklıklarda ve farklı ön inkübasyon zamanları için çalışılmıştır. Termal stabiliteyi belirlemek amacıyla enzim substrat ilave edilmeden 50 ve 60 °C sıcaklıklarda, 60,120 ve 180 dk ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra enzimin kalan aktivitesini belirlemek için substrat ilave edilerek standart enzim deneyleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

Termal aktivite gibi termal stabilitede enzimlerin farklı özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Termal aktivite ve stabiliteyi etkileyen faktörlerin her bir enzim için özel olduğu ve evrensel nitelik taşımadığı görülmektedir. Ancak termal stabilite ile hidrojen bağlarının sayısı, iyonik çiftler ve enzim yüzeyindeki yüklü aminoasitlerin oranı arasında korelasyon bulunmaktadır (Paes ve ark., 2012). Anaerobik funguslar ile ilgili çalışmalarda *Neocallimastix* sp. GMLF1'e ait *Xyn1B* enziminde termal stabilitesinin aynı benzer olduğu görülmüştür (Cömlekcioglu, 2009). *N. frontalis*'e ait bir ksilanaz 4 saat 50 °C'de inkübe edilince aktivitesinin %50'sini ve 60 °C'de inkübe edilince neredeyse tüm aktivitesini kaybetmiştir (Hebraud ve Fevre, 1988). *Neocallimastix*'e ait bir türün ksilanaz enzimi 50 °C'de 7 saatlik inkübasyonun sonunda aktivitesinin %58'ini korumuştur (Lowe ve ark., 1987). Bununla beraber *N. frontalis*'e ait bir ksilanaz enzimi ise 50 °C'de 1 saatlik inkübasyonun ardından aktivitesinin %30'unu kaybederken, 55 °C'de % 80'inini kaybetmiştir (Mountfort ve Asher, 1989). *N. patriciarum*'dan klonlanan *Xyn-CD/WT* enzimi 60 °C'de 60 dk inkübasyon sonrasında aktivitesinin % 50'sini korurken, aynı enzimin mutasyonlar ile değiştirilmiş olan *Xyn-CDBFV* 60 °C'de 78 dk inkübe edildikten sonra %50 aktivitesini kaybetmiştir (Chen ve ark., 2001).



Şekil 3.8. *E. coli* X7'den elde edilen XynA-7 enziminin termal stabilitesinin grafiği.

3.6. Enzimin pH Stabilitesinin Belirlenmesi

XynA-7 enziminin pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'de stabilitesi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.9'da verilmiştir. Bu amaçla enzimler farklı pH'larda 40 °C sıcaklıkta 15 dakika ön inkübasyona bırakılmış daha sonra ortam koşulları enzimin optimum pH'sına dönüştürülmüş ve kalan enzim aktivitesi analiz edilmiştir. Analizler sonucunda enzimin pH stabilitesi pH optimumuna benzer sonuçlar vermiştir. *XynA-7*'nin pH 3.0'den 6.5'e kadar stabilitesinin arttığı bu pH'dan sonra alkali koşullar geliştikçe stabilitesinin azaldığı görülmektedir. Bu durum *XynA-7* enziminin orijin aldığı rumen ortamının pH değerleri ile oldukça uyumludur. *N. patriciarum*'a ait bir ksilanaz mutasyona uğratılarak alkalifilik duruma getirilmiş ve pH stabilitesi artırılmıştır (Chen ve ark., 2001).

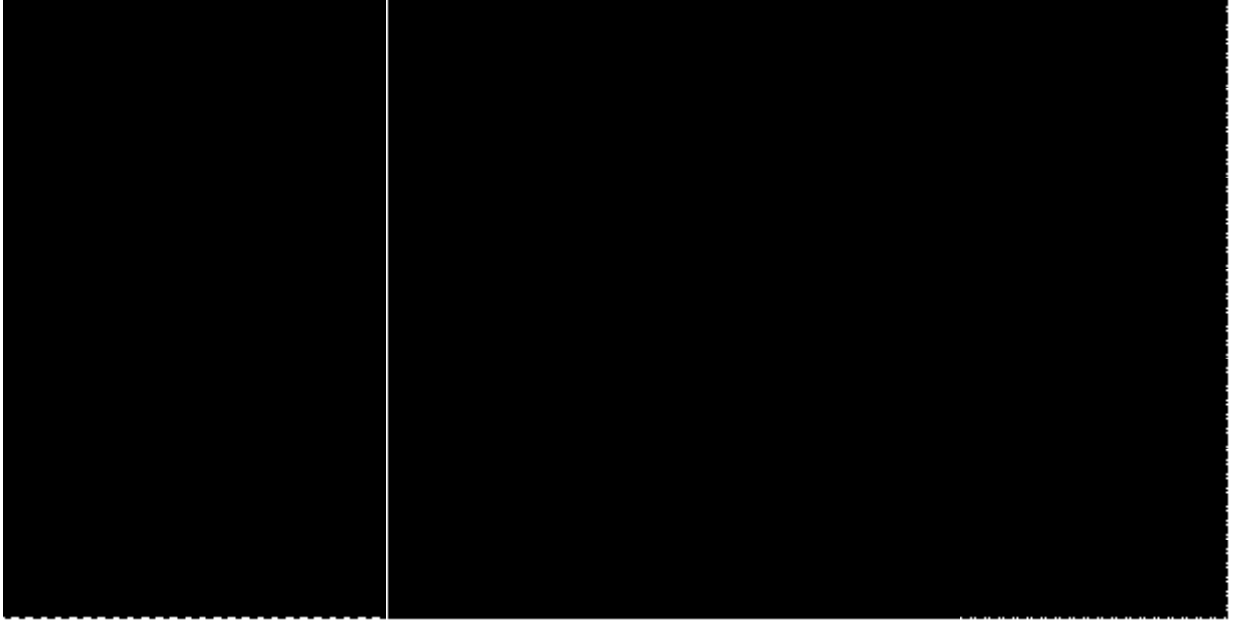
Enzimlerin pH optimumları ve stabilitesi amino asit dizilerindeki özgüllükten ileri gelmekte, bazı amino asitlerin varlığı enzimleri asidofilik veya alkalifilik hale getirmektedir (Paes ve ark., 2012).



Şekil 3.9. *E.coli* X7’den elde edilen *XynA-7* enziminin pH stabilitesinin grafiği.

3.7. Enzim Üzerine Metal İyonlarının Etkisinin Belirlenmesi

Çeşitli metal iyonları (Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , KCl) ile sodyum dodesil sulfat (SDS), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), üre, sodyum azid, β -merkaptotanol, fenantrolin, sodyum sülfid (Na_2SO_3) gibi kimyasalların enzim aktivitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. *XynA-7*’nin aktivitesi üzerine Ba^{+2} , Co^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının olumlu etkilerinin görüldüğü ve aktiviteyi sırasıyla % 140, 150 ve 180 oranında arttırdığı görülmüştür (Şekil 3.10). Mg^{+2} ve EDTA’nın aktiviteyi olumlu veya olumsuz etkilemediği görülmüştür. EDTA’nın aktiviteyi olumsuz yönde etkilememesi *XynA-7*’nin bir metalloenzim olmadığını göstermektedir. Cu^{+2} , Zn^{+2} , fenantrolin ve üre aktiviteyi % 10-30 oranında düşürmüşlerdir. Fe^{+2} , Na_2SO_3 , sodyum azid, SDS, olumsuz etkileri daha fazla olup, Hg^{+2} ve β -merkaptotanol aktiviteyi %20’ün altına düşürmüştür.



Şekil 3.10. *E.coli* X7'den elde edilen *XynA-7* enzimi üzerine metal iyonlarının etki grafiği.

XynA-7'nin 60 °C'de termal stabilitesinin olmaması üzerine, *XynA-7*'nin aktivitesi üzerine olumlu etkileri olan metal iyonlarının termal stabiliteyi de arttırabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla *XynA-7* 2 mM CoCl₂, MnCl₂ ve CaCl₂ ile ayrı ayrı buz üzerinde 15 dk bekletildikten sonra 60 °C'de 5 dk ön inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra optimum sıcaklığında 30 dk enzimatik reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Deney kontrollerinde ilgili iyonlar ilave edilerek bu iyonların sadece termal stabilite üzerine etkileri ortaya çıkartılmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 2 mM Co⁺², Mn⁺² ve Ca⁺² sırasıyla %20.25, %22.96 ve %25.88 arttırmıştır. Bu iyonların daha yüksek konsantrasyonları da denenmiş ancak termal stabilitenin artmadığı görülmüştür.

3.8. Hidroliz Ürünlerinin İnce Tabaka Kromatografisi ile Analizi

XynA-7 tarafından gerçekleştirilen beechwood ksilanın hidrolizi sonucunda ortaya çıkan hidroliz ürünleri ince tabaka kromatografisi kullanılarak ortaya çıkartılmıştır. Bu amaçla *XynA-7* ve beechwood ksilan pH 6.5 sodyum fosfat tamponu içerisinde 1, 2, 3, 4 ve 5 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzimatik reaksiyon sonrasında ortaya çıkan ksilanın parçalanma ürünleri görülmektedir (Şekil 3.11). Beechwood ksilanın hidrolizinin başlıca ürünlerin, ksilotrioz ve ksilotetraoz olduğu az miktarda da ksilobioz meydana geldiği görülmektedir. Bu durum rekombinant *XynA-7* enziminin dizi analizi sonuçlarında ortaya çıkan endoksilanaz olduğu sonucu ile örtüşmektedir. Endoksilanaz grupundaki enzimler β-1,4 ksilan ksilanohidrolaz (EC 3.2.1.8) olarak da adlandırılmaktadır. İnkübasyon süresi ortaya çıkan

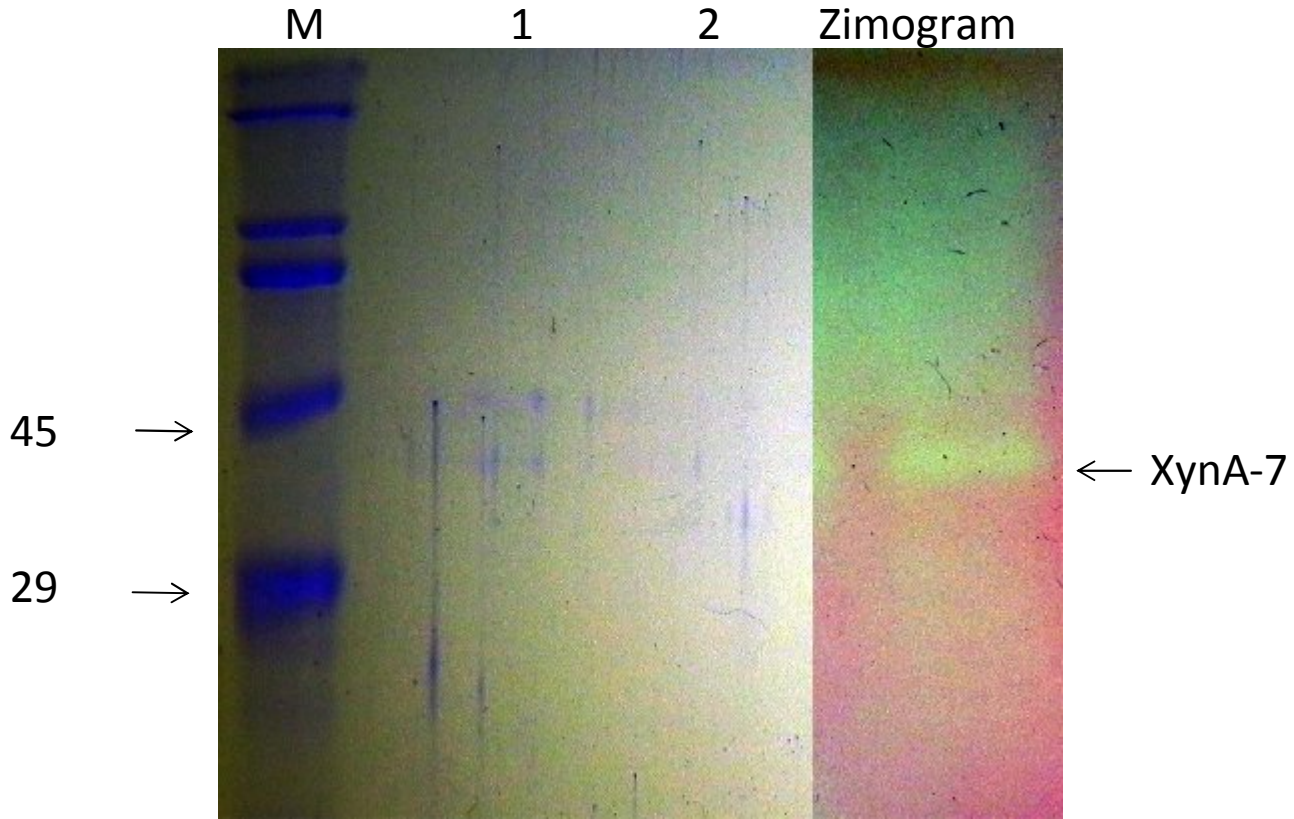
ürünlerin miktarını etkilediği görülmektedir. Az miktardaki ksilobioz 3-4 saatlik inkübasyondan sonra ortaya çıkmıştır. Bir anaerobik fungusdan klonlanan *XynR8* enzimi de *XynA-7* ile benzer olarak oat spelts ksilanın hidrolizi sonucunda ksilobioz ve ksilotrioz ortaya çıkartmıştır (Liu ve ark., 2005). *N. frontalis*'in ksilanlı kültüründe ksiloz ve arabinoz birikimi görülmüştür. Nitekim kültür süpernatantının ksilobiaz aktivitesi olmaması, *N. frontalis*'e ait ksilanaz enziminin β -ksilosidaz aktivitesi göstermediği ve dolayısıyla ksilanaz enziminin hidroliz ürünleri arasında ksiloz olamayacağını göstermektedir (Mountfort ve Asher, 1989). Bununla beraber *N. patriciarum*'dan klonlanan *XYLB* enziminin oat spelts, rye ve wheat ksilan ile yapılan inkübasyonu sonucunda ortamda en çok ksilobioz ve ksilotrioz bulunmasına rağmen ksiloza da rastlanılmıştır (Black ve ark., 1994).



Şekil 3.11. *XynA-7*'nin hidroliz ürünlerinin TLC ile tespiti. S: Ksiloz standartları (yukarıdan aşağıya ksiloz, ksilobioz, ksilotrioz, ksilotetraoz). *XynA-7*'nin beechwood ksilan ile 1, 2, 3, 4 ve 5 saatlik inkübasyonları sonucunda açığa çıkan hidroliz ürünleri sırasıyla 1, 2, 3, 4 ve 5. kanallarda gösterilmiştir.

3.9. *XynA-7* Enziminin Saflaştırılması ve Zimogram Analizi

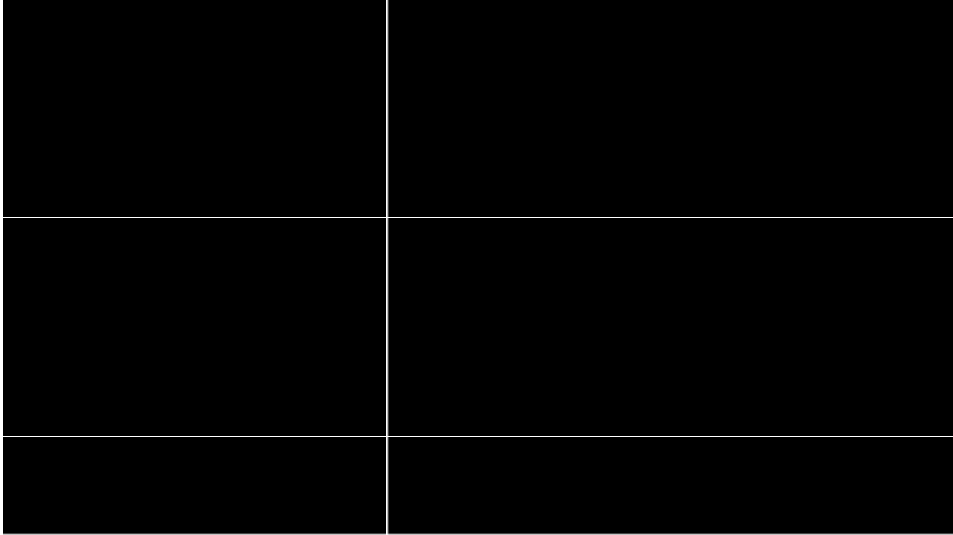
XynA-7 enziminin *E. coli* hücre proteinleri içerisinde ayırmak için saflaştırma ve zimogram analizi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle enzimin amonyum sülfat fraksiyonları (%50-90) alınmış ve tuzların uzaklaştırılması için diyaliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen enzim ekstraktları aktivite kontrolü yapıldıktan sonra iyon değişim kromatografisi kullanılarak ayrıştırılmıştır. Kromatografiden sonra aktivite veren fraksiyon ile zimogram analizi gerçekleştirilmiştir. Zimogram sonuçları ksilanaz aktivitesi gösteren 45 kDa'dan küçük tek bir enzimin olduğu göstermiştir. Saflaştırma çalışmaları *E.coli* hücre proteinlerini büyük ölçüde elimine ederken SDS-PAGE sonucunda 2 adet proteinin kaldığı bunlardan küçük boyutlu olanın ksilanaz aktivitesi verdiği şekilde görülmektedir. *XynA-7*'nin sekans bilgisi neticesinde ortaya çıkartılan amino asit dizisinin analizinde *XynA-7*'nin tek bir katalitik domaine sahip bir polipeptit zincirinden oluşan protein olduğu sonucu zimogram analizi ile de görülmüştür (Şekil 3.12). Saflaştırılma sonucu enzim miktarı çok az kalsa da enzim aktivitesinin zimogram analizinde belirgin olması enzimin spesifik aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.12. *XynA-7*'nin saflaştırma çalışmaları sonrasında 29-45 kDa arasında iki adet proteinkaldığı, zimogram analizi sonucunda ise bunlardan küçük olan proteinin ksilanaz aktivitesi verdiği görülmektedir.

3.10. *XynA-7* Enziminin Kağıt Hamurları İle Muamelesi

Enzimatik uygulamalarda kullanılacak enzim dozunun ayarlanması enzimlerin tasarruflu kullanılması açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle *XynA-7*'nin 1, 2, 3 ve 4 U/g kağıt hamuru dozları kızılçam, ökaliptus ve buğday sapı kağıt hamurları üzerinde denenmiştir. *XynA-7* dozuna bağlı olarak kağıt hamurlarından 237 nm dalga boyunu absorblayan kromofor salınımı incelenmiştir (Şekil 3.13). Kağıt hamurları enzim ile 3 saat muamele edilmiştir. Her bir muamele için enzim içermeyen kontrol grupları oluşturulmuş ve kontrollerden elde edilen sonuçlar enzimatik sonuçlardan çıkartılmıştır. Yapılan ölçümlerde zamanla 237 nm absorblayan kromoforların arttığı görülmüştür. Ökaliptus ve buğday sapı kağıt hamurlarından salınan 237 nm absorblayıcı kromofor miktarı *XynA-7* dozu artırılması ile yükselmiştir. Kızılçam kağıt hamurunda ise 237 nm absorblayıcı kromofor salınımı 3 U/ g kağıt hamuru dozunda en yüksek düzeye ulaşırken bu dozun üzerinde kromofor salınımında bir düşüş görülmüştür.



Şekil 3.13. Farklı enzim miktarları ile kağıt hamurlarının inkübasyonu sonucunda açığa çıkan fenolik bileşiklerin 237 nm’de ölçülmesi ile elde edilen sonuçlar.

XynA-7 ile muamele edilen kağıt hamurlarından enzim miktarına bağlı olarak 465 nm absorblayıcı kromoforların da artarak salındığı dikkati çekmektedir (Şekil 3.14). Buğday sapı kağıt hamurundan en düşük enzim dozunda bile yüksek düzeyde kromofor salınırken, diğer kağıt hamurlarında daha yüksek enzim dozları gerekmiştir. Ökaliptus kağıt hamuru, 4 U/g enzim ile muamele edildiği zaman buğday sapı kağıt hamurundan salınan kromofor miktarları ile eşit düzeyde kromofor salınmıştır.

Şekil 3.14. Farklı enzim miktarları ile kağıt hamurlarının inkübasyonu sonucunda açığa çıkan kromoforların 465 nm’de ölçülmesi ile elde edilen sonuçlar.

Ksilanaz enzimleri kağıt hamurunda bulunan ve hemiselülozun omurgasını oluşturan ksilani parçalayarak açığa indirgenmiş ksilobioz veya ksilotrioz gibi oligosakkaritlerin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bu kapsamda *XynA-7* enzimi ile çalışılan buğday sapı ve ökaliptus kağıt hamurlarından kızılçam kağıt hamuruna göre daha fazla indirgenen şeker salındığını, dolayısıyla *XynA-7*’nin buğday sapı ve ökaliptus kağıt hamurları üzerinde daha etkin olduğu görülmüştür.

Şekil 3.15. Farklı enzim miktarları ile kağıt hamurlarının inkübasyonu sonucunda açığa çıkan indirgenen şeker miktarları.

Literatür incelemesi yapıldığı takdirde genel olarak enzim dozu ve reaksiyon süresi arttıkça indirgenen şeker ve fenoliklerin salınımında artmaktadır. Çizelge 3.1’de bugüne kadar yapılan bazı çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar, kağıt hamurları, enzim dozları ve reaksiyon süreleri verilerek elde edilen indirgenen şeker ve absorbans (237 ve 465 nm) değerleri verilmiştir. Kağıt hamurunda fenoliklerin ve indirgenen şekerlerin salınması kağıt hamuru ağartma işlemlerinde enzim etkinliğini gösteren en uygun yol olduğu bildirilmiştir (Eligir ve ark., 1995).

Fenoliklerin ve indirgenen şekerlerin salınma ve kappa numarasında düşüş, selüloz fibrillerinden lignin karbonhidrat kompleksinin ayrıldığını göstermektedir. Ksilanaz, lignin selüloza bağlayan hemiselüloz zincirlerini kırmaktadır, bu durumda kağıt hamuru içerisinde gevşemiş ligninin uzaklaştırılması için daha az ağartma uygulanacağı anlamına gelmektedir (Saleem ve ark., 2009).

Çizelge incelendiği takdirde proje kapsamında kullanılan enzimden elde edilen değerlerin literatürde bildirilen enzimler ile kıyaslanabilir düzeyde olduğu görülmektedir. En yüksek absorbans (237 nm) ve indirgenen şeker değerleri elde edilen *Thermomyces lanuginosus* SSBP’ ye ait ksilanaz enziminin dozu 100 U/mg pulp olup bu çalışmada kullanılan enzim dozundan 25 kat fazladır.

Çizelge 3.1. Mikrobiyal ksilanazların kağıt hamuru ağartma işlemlerinde kullanılması.

Mikroorganizma	Kağıt Hamuru	Enzim Dozu (U/g pulp)	Reaksiyon Süresi (saat)	Absorbans 237 nm	Absorbans 465 nm	İndirgen en Şeker (mg/g pulp)	Referans
<i>Neocallimastix</i> sp.- XynA-7	Buğday Sapı	4	5	0.929	0.036	-*	Altun, 2012 (Tespit)
<i>Neocallimastix</i> sp.- XynA-7	Okaliptus	4	5	0.867	0.035	-*	Altun, 2012 (Tespit)
<i>Neocallimastix</i> sp.- XynA-7	Kızılcım	4	5	0.667	0.024	-*	Altun, 2012 (Tespit)
<i>Bacillus subtilis</i>	Buğday Sapı	50	3	1.2	0.427	0.778	Saleem ve ark., 2012
<i>Coprinellus disseminatus</i> SH-1	Buğday Sapı	10	5	0.6	0.5	18	Singh ve ark., 2011
<i>Coprinellus disseminatus</i> SH-2	Buğday Sapı	10	3	0.62	0.75	21	Singh ve ark., 2011
<i>Streptomyces chartreusis</i>	Buğday Sapı	40	1	1.3	0.1	0.7	Li ve ark., 2011
<i>Aspergillus sydowii</i> SBS45	Decker	25	5	0.4	0.5	9	Nair ve ark., 2010
<i>Thermomyces lanuginosus</i> SSBP	Bagasse	100	3	1.82	0.022	26	Manimaran ve ark., 2009
<i>Bacillus</i> sp. GRE7	Okaliptus	10	3	-	0.048	1.39	Kiddinamoorty ve ark., 2008
<i>Aspergillus caespitosus</i>	Okaliptus	10	2	0.1138	0.0813	-	Sandrim ve ark., 2005
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 288.54	Buğday Sapı	5	6	1.795	0.417	0.498	Li ve ark., 2005

(* Bu çalışmada indirgenen şeker değerleri absorbans olarak verildiği için tabloya eklenmemiştir.)

Kağıt hamuru ağartma işleminde çalışılan bir diğer yöntemde lignin parçalayan fungusların doğrudan hamurlar ile muamelesi olup, olumlu neticeler elde edilmiştir. Ancak fungal ön muamele zamanının uzunluğu (2-4 hafta) ve lignin dışındaki polisakaritleride

parçalayabilmesi enzimlerin izole edilerek kullanılmasının daha etkili bir metot olduğu bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2006).

Kraft hamurların ksilanazlar ile muamelesi ligninin ekstrakte edilebilirliğini (kappa numarasındaki düşüş) arttırmakta ayrıca farklı miktarlarda indirgenen şeker (ksilooligosakkarit) ve kromoforik (uv absorblayan) maddelerin salınmasına neden olur (Kiddinamoorty ve ark., 2008). İndirgenen şekerlerin salınımı sadece ksilanaz aktivitesini ölçerken, kromoforik materyallerin salınımı kağıt hamurunun ağartılabilirliği ile önemli ölçüde korelasyon içerisindedir (Patel ve ark., 1993).

Çizelge 3.2’de Buğday sapı, Okaliptus ve Kızılçam kağıt hamurlarının *XynA-7* ile muamelesinden sonra bazı fiziksel ve optik özelliklerine ait bulgular verilmiştir. Kızılçam dışındaki diğer kağıt hamurlarında hacimliliğin arttığı ve yoğunluğun azaldığı görülmektedir. Her üç kağıt hamurunda da ISO parlaklık, opaklık ve beyazlık değerlerinin arttığı ancak bunlarla beraber sarılığında arttığı görülmektedir. Fakat parlaklık ve beyazlık değerleri % 50’nin altında olduğundan, sarılık değerindeki artış bir anlam ifade etmiyor. Sonuç olarak *XynA-7* enzim muamelesinin bu çalışmada kullanılan ve ağartılması zor sınıfa giren her üç kağıt hamurunun parlaklık ve beyazlık değerlerin de artma sağladığı belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Enzim muamelesi görmüş ve görmemiş (kontrol) kağıt hamurlarına ait bazı fiziksel ve optik özelliklerine ait bulgular.

<i>Muameleler</i>	<i>Hacimlilik (cm³/g)</i>	<i>Yoğunluk (g/cm³)</i>	<i>ISO Parlaklık (%)</i>	<i>Sarılık (E313)</i>	<i>ISO Opaklık (%)</i>	<i>ISO Beyazlık (%)</i>
BS Kontrol	1.50	0.67	32.27	36.63	99.41	40.79
BS +XynA-7	1.60	0.63	33.13	36.67	99.61	44.46
Ök Kontrol	1.98	0.51	32.27	36.63	99.41	40.79
Ök + XynA-7	2.00	0.50	33.24	47.91	99.79	44.39
Kç Kontrol	1.83	0.55	18.23	57.20	98.88	29.58
Kç + XynA-7	1.74	0.57	19.34	58.93	98.5	32.15

(BS: Buğday Sapı, Ok: Okaliptus, Kç: Kızılçam)

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Anaerobik rumen fungusları zorunlu anaerobik yaşam tarzıyla diğer bilinen funguslardan ayrılan ilginç mikroorganizmalardır. Uzun bir zaman boyunca rumendeki selüloz sindiriminin ana ögesinin selüloolitik anaerobik bakteriler olduğu düşünülmüştür. Ancak rumen funguslarının keşfiyle beraber fibröz bitki parçaları ile sıkı bir şekilde bir araya geldikleri anlaşılmıştır. Bu nedenle rumen fungusları üzerine odaklanan ilginin büyük bir kısmı bitki hücre duvarının biyodegradasyonundaki rolleri ve etkin fibrolitik enzimlere sahip olmaları üzerine olmuş, biyoteknolojik açıdan değerlendirilmelerinin yolları aranmıştır.

Anaerobik fungal ksilanazlar bilinen en aktif ksilanaz enzimlerindedir ve anaerobik funguslar tarafından yüksek düzeyde sentezlenirler. Anaerobik fungus genomu içerisinde ksilanaz genlerinin varyasyonları olduğu gibi homolog tekrarları da bu enzimin sentezini arttıran hususlardandır. Lignoselüloz içerisindeki ksilan omurgasını kıran ksilanaz enzimleri ise son on yıldaki pek çok endüstriyel uygulamanın ilgisini kazanmıştır. Anaerobik fungal ksilanazlarında içinde yer aldığı glikozil hidrolaz 11 ailesi içinde çeşitli biyoteknolojik işlemler için uygun olanların araştırılıp bulunması bu ilginin temelini oluşturmaktadır.

Mikrobiyal tabanlı işlemlerde ksilanazlar ile birlikte selülazlarda üretilmekte, selüloz yapısını bozmakta ve kağıt hamuru kalitesini düşürmektedir. Pekçok mikroorganizma selülazların, ksilanazların ve mannanazların farklı kombinasyonlarını üretmektedir ve çoğunluklarda farklı mRNA işlemleri ve post-translasyonel modifikasyonların neticesi ve çoklu genlerin ürünleri olarak kompleks bir şekilde sentezlenmektedir. Bu durum da daha kompleks ve pahalı saflaştırma basamaklarını gerektiren ileri işlemlere ihtiyaç duyurmaktadır. Tipik olarak bir ksilanazın saflaştırılması proteinlerin çöktürülmesi işlemini takiben jel filtrasyon ve/veya iyon-değişim kromatografî tekniklerini gerektirmekte, endüstriyel ölçekte bu işlemlerin gerçekleştirilmesi ekonomik olmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan klonlanmış *XynA-7*, tamamı ile selülaz aktivitesi olmayan veya selülaz kalıntısı olmayan bir enzim olup, yüksek spesifik aktiviteye sahiptir.

XynA-7'nin optimum pH aralığı 5.5-7.0 ve sıcaklığı 50 °C olduğu görülmektedir. Ticarileşmiş enzimlerin kullanılabilirlikleri pH ve sıcaklık aralıkları; Cartazyme için pH 5 – 7 ve 45 – 55 °C; Irgazyme için pH 7 – 8 ve 50 – 60 °C; Ecopulp için pH 7 – 8 ve 50 °C, Pulpzyme için pH 6 – 8 ve 50 – 55 °C; Resinase için pH 7 ve 45 – 50 °C; Bleachzyme, Amano90 ve XylanaseGS35 için pH 4.5 – 7.0 ve 30 – 40 °C'dir (Techapun ve ark., 2003 tarafından derlenmiştir).

Bu çalışmada kullanılan *XynA-7* yukarıda bahsedilen ticari enzimlerin optimum koşulları içerisinde yer almaktadır. İleriye yönelik *XynA-7* enziminin özelliklerini daha da iyileştirmek (optimum pH ve sıcaklığının, termal ve pH stabilitesinin artırılması) adına moleküler düzeyde çalışmaların (promotor analizleri, sinyal dizileri, mutasyon analizleri vs.) yapılması uygun olacaktır. Ayrıca klonlama sonrasında üretilen rekombinant enzim *E. coli* hücrelerinin içerisinde kalmakta ve bu enzimi elde etmek için hücrelerin parçalanması gerekmektedir. *XynA-7* enzimin daha kolay elde edilebilmesi için özellikle enzimlerini hücre dışına salgılayan *Bacillus* türlerine ait promotorlar ve sinyal dizilerinin gen mühendisliği ilkelerince *xynA-7* geniyle füzyonunu gerçekleştirmek ve daha sonra bu genin *Bacillus* türlerinde ekspresyonunu sağlamak ve fermentörler içerisinde *XynA-7* enziminin üretiminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Ksilanaz enzimleri endüstriler içerisinde kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde en hızlı uygulama alanı bulan enzimlerden birisidir. Kraft kağıt hamurunun yapımında ligninin yaklaşık % 90'ı pişirme sıvısı içerisinde çözülmemektedir. Geride kalan lignin kraft kağıt hamuruna kahve rengini vermektedir. Lignin uzaklaştırılması için klasik metot klor tabanlı kimyasalların kullanılmasıdır ancak bu türlü kimyasallar toksik ve mutajenik kloroorganik bileşiklerin oluşmasından sorumludur. Ksilanaz enzimleri kraft kağıt hamurunda bulunan hemiselülozların parçalanmasını sağlayarak, kimyasalların kağıt hamuruna etkisini arttırmakta ve kalan ligninin uzaklaştırılmasında rol oynamaktadır. Böylelikle ağartma işleminde kullanılan kimyasal miktarını azaltmakta ve parlaklığı yüksek kağıtların elde edilmesini sağlamaktadır. Ağartılması güç olan esmer kağıt hamurlarından buğday sapı, ökaliptus ve kızılçam üzerinde de kendi elde ettiğimiz *XynA-7* enzimi denenmiş ve *XynA-7* enziminin her üç kraft kağıt hamurunun parlaklık ve beyazlık değerlerini arttırdığı gözlenmiştir.

Ksilanazların kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanımı akademik ilginin ve gelecekteki potansiyelinin önüne geçmiş ve gelişmiş ülkelerde yarı-ticari veya ticari ölçekte kağıt hamuru yapımına katıldığı uygulamalar başlamıştır.

Ülkemizin en önemli eksikliklerinden bir tanesi de endüstriyel ölçekte enzim üretiminin olmamasıdır. Ülkemizde gerçekleştirilen endüstriyel çaptaki işlemlerde enzimler yurt dışından getirilmekte ve bu konuda dışa bağımlılığımız devam etmektedir. Enzimlerin değerli bir biyolojik ürün olması nedeni ile dışarıdan enzim satın almak ekonomik bir kayıp meydana getirmektedir. Yapılacak olan çalışmalarla seri enzim üretimleri gerçekleşir ve patent hakları alınırsa ülkemiz için ekonomik açıdan önemli olabilir. Bu nedenle enzim üretim teknolojilerinin geliştirilmesi önemli bir stratejik hedef olarak önümüzde bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Aksöz, E., Aksöz, N., 1985. Pektik Enzimler (derleme). *Biyokimya Dergisi*, 10:38-51.
- Akyol, I., Comlekcioglu, U., Kar, B., Ekinci, M.S., Ozkose, E., 2009. Cloning of a xylanase gene *xyn2A* from rumen fungus *Neocallimastix* sp. GMLF2 in *Escherichia coli* and its partial characterization. *Biologia*, 64(3).
- Angayarkanni ve ark., 2005. Biochemical substitution of fungal xylanases for prebleaching of hardwood kraft pulp. Department of Biotechnology, Bharathiar University, Coimbatore - 641 046, India.
- Anonim a., 1997. ISO/DIS, 2470; Paper, board and pulp—measurement of blue reflection factor (ISO brightness) Beuth-Verlag, 10772, Berlin.
- Anonim b., 2005. ASTM E 313; Standart Practice for Calculation Yellowness and Whiteness Indices from Instrumentally Measured Color Coordinates.
- Anonim c., 1997. ISO/DIS, 2471, Paper and board determination of opacity (paper backing) diffuse reflectance Method.
- Anonim d., 2004. ISO/DIS, 11475, Paper and board -- Determination of CIE Whiteness, D65/10 degrees (outdoor daylight).
- Aygan, A., 2008. Haloalkaloflik *Bacillus* sp. izolasyonu amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Doktora tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Barnoud, F., J. Combat, J.P. Joseleau, F. Mora ve K. Ruel, 1986. In Proceeding of 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm, Sweden, pp:70.
- Beaugrand, J., Paes, G., Reis, D., Takahashi, M., Debeire, P., O'Donohue, M. ve ark., 2005. Probing the cell wall heterogeneity of micro-dissected wheat caryopsis using both active and inactive forms of GH11 xylanase, *Planta*, 222: 246-257.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 326-338.
- Beguín, P., 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Ann. Rev. Microbiol.* 44: 219-248.

- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18: 355-383.
- Billon-Grand, G., Fio, J.B., Breton, A., Bruyere, A., Oulhaj, Z., 1991. DNA of some anaerobic fungi: G+C content determination. *FEMS Microbiol. Lett.* 82: 267-270.
- Black, G. W., Hazlewood, G. P., Xue, G. P., Orpin, C. G., Gilbert, H. J., 1994. Xylanase B from *Neocallimastix patriciarum* contains a non-catalytic 455-residue linker sequence comprised of 57 repeats of an octapeptide. *Biochemical J.* 299: 381-387.
- Borneman, W.S., Hartley, R.D., Morrison, W.H., Akin, D.E., Ljungdahl, L.G., 1990. Feruloyl and *p*-coumaryl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 345-351.
- Borneman, W.S., Ljungdahl, L.G., Hartley, R.D., Akin, D.E., 1991. Isolation and characterization of *p*-coumaryl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2377-2344.
- Borneman, W.S., Ljungdahl, L.G., Hartley, R.D., Akin, D.E., 1993. Feruloyl and *p*-coumaroyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimasti* strain MC-2: Properties and functions in plant cell wall degradation. In *Hemicellulose and Hemicellulases* (M.P. COUGHLAN and G.P.HAZLEWOOD, editor) Portland Press, London. p. 85-103.
- Chauhan, S., Choudhur, B., Singh, S.N., Ghosh, P., 2005. Application of xylanaseenzyme of *Bacilluscoagulans* as a prebleaching agent on non-woody pulps. Kumarappa National Hand Made Paper Institute, Sanganer, Jaipur 303902, India.
- Chen, H., Xinliang, L., Ljungdahl, L.G., 1994. Isolation and Properties of an Extracellular β -glucosidase from the polycentric rumen fungus *Orpinomyces* sp. Strain PC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(1): 64-70.
- Chen, X., Whitmire, D., Bowen, J. P., 1996. Xylanase Homology Modeling Using the Inverse Protein Folding Approach. Cambridge Uni. Press, USA.
- Chen, Y.L., Tang, T.Y., Cheng, K.J., 2001. Directed evolution to produce an alkalophilic variant from a *Neocallimastix patriciarum* xylanase. *Can. J. Microbiol.* 47:1088-1094.
- Cheng, K.J., Forsberg, C.W., Minato, H., Costerton, J.W., 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Ed. T. Tsuda, H. Sasaki, R. Kawahima. Academic press. New York: 595-624.
- Clarke, J.H., Davidson, K., Rixon, J.E., Halstead, J.R., Fransen, M.P., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 2000. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper

- pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 661-667.
- Colberg, P.J., 1988. Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives. In: *Biology of Anaerobic Microorganisms*. Ed. A.J.B. Zehnder: 333-372.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29:3-23.
- Comlekcioglu, U., Akyol, İ., Kar, B., Özköse, E., Ekinci, M.S., 2008. Anaerobik rumen funguslarının izolasyonu, tanımlanması ve kültür koleksiyonunun oluşturulması. *Hayvansal Üretim*, 49(2): 29-35.
- Comlekcioglu, U., Gezginç, Y., Kar, B., Yazdıç, F.C., Akyol, İ., Ekinci, M.S., Özköse, E., 2009. Laktik Asit Bakterilerine Ksilanolitik Özellik Kazandırılması. 6. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Bildiri Kitabı, S: 85-89, Erzurum.
- Comlekcioglu, U., Ozkose E., Yazdic FC., Akyol I., Ekinci MS.,2010. Polysaccharidase and glycosidase production of avicel grown rumen fungus *Orpinomyces* sp. GMLF5, *Acta Biol Hung* 61333-343.
- Demain, A.L., Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, 3-14p. Scientific American, Freeman & Company, San Fransisco.
- Durand, R.C., Fevre, R.M., 1996. Molecular characterization of *xyn3*, a member of the endoxylanase multigene family of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*.
- Eligir, G., Sykes, M., Jeffries, T.W., 1995. Differential and synergistic action of *Streptomyces* endoxylanases in prebleaching of kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 954-959.
- Fidancı, U. R.,, 2009. [htt://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci](http://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci)
- Gamerith, G., and H. Strutzenberg, 1992. In *Xylans and Xylanases*, (ed: Visser, J. Et al), Elsevier, Amsterdam, pp:339.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* (1998) p. 3533-3535.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Laurie, J.I., Orpin, C.G., Xue, G.P., 1992. Homologous catalytic domains in a rumen fungal xylanase: evidence for gen duplicationand prokaryotic origin. *Molecular Microbiology*, 6: 2065-2072.
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139:187-194.

- Gomez De Segura, B., Fevre, M., 1993. Purification and Characterization of Two 1,4- β -Xylan Endohydrolases from the Rumen Fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 59(11): 3654-3660.
- Goyal, A., Ghosh, B., Eveleigh, D., 1991. Characteristic of fungal cellulases, Bioresource Technology, 36: 37-50.
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem., 1-18.
- Güven, R., G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR Yıl: 2011 Cilt: 09 Sayı: 1 Sayfa: 1-10.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Biores. Technol. 89: 17–34.
- Heath, I.B., 1988. Recommendation for future taxonomic studies of gut fungi. Biosystems. 21: 417-418.
- Hebraud, M., Fevre, M., 1988. Characterization of glycoside and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromonas communis*. J. Gen. Microbiol. 134: 1123-1129.
- Hobson, P.N., Wallace, R.J., 1982. Microbial ecology and activities in the rumen: Part II. Crit. Rev. Microbiol. 9: 253-320.
- Huang, Y.H, Huang, C.T., Hseu, R.S., 2005. Effects of dockerin domains on *Neocallimastix frontalis* xylanases, FEMS Microbiology Letters 243: 455–460.
- Itabashi, H., 2004. Recent topics in Rumen Microbiology with particular reference to animal production in Japan. Microbes Environment, 19(4): 270-275.
- Ito, K., Iwashita, K., Iwano, K., 1992. Cloning and sequencing of the xynC encoding acid xylanase of *Aspergillus kawachii*. Biosci Biotechnol Biochem, 56: 1338-1340.
- Jeffries, T.W., 1981. Conserved Motifs in Xylanases for Pulp Bleaching. USDA, Forest Service.
- Jeffries, T.W. ve C.W. Links 1990. In Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture (ed: Kirk, T.K. and Chang, H.M.), Butterworth-Heinmann, Boston, pp:191.
- John, F.K., 1987. Enzyme Technology (H.J.Rehm ve G.Reed editör). Biotechnology, Vol.7A. New York s 37-62.
- Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kağıt endüstrisinde enzim kullanımına genel bir bakış. K.S.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1).

- Kiddinamoorthy, J., Anceno, A.J., Haki, G.D., Rakshit, S.K., 2008. Production, purification and characterization of *Bacillus* sp. GRE7 xylanase and its application in eucalyptus Kraft pulp biobleaching. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 605-612.
- Kıran, Ö.E., Cömlekcioglu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *K.S.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9 (1): 12-19.
- Kirk, T.K., Farrel, R.L., 1987. Enzymatic “combustion”: The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- Kivaisi, A.K., Op Den Camp, H.J.M., Lubberding, H.J., Boon, J.J., Vogels, G.D. 1990. Generation of soluble lignin-derived compounds during degradation of barley straw in a artificial rumen reactor. *Applied. Microbiology. Biotechnology.* 33: 93-98.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23, p. 411-456.
- Liu, J.R., Duan, C.H., Zhao, X., Tzen, J.T.C., Cheng, K.J., Pai, C.K., 2008. Cloning of a rumen fungal xylanase gene and purification of the recombinant enzyme via artificial oil bodies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 225-233.
- Liu, J.R., Yu, B., Liu, S.H., Cheng, K.J., Chen, Y.C., 2005. Direct cloning of a xylanase gene from the mixed genomic DNA of rumen fungi and its expression in intestinal *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 233–241.
- Love, S.E., Theodorou, M.K., Trinci, A.P.J., 1987. Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1216-1223.
- Loveless, A.R., 1983. Principles of Plant Biology For The Tropics. Longman, London.
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., daSilva, M.J.S., Egmond, M.R., Hagemans, M.L.D., vanGarcom, R.F.M., Hessing, J.G.M., vanDerhondel, C.A.M.J.J., vanRPTterdam, C., 1992. Xylanases and their application in bakery. (J.Visser, G.Beldman, M.A.K. vanSomeren, A.G.J. Voragen, editörler) *Xylan and Xylanases*. Elsevier, Amsterdam, 349-360s.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426–428.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A., 1988. Production of α -amylase by the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2293-2299.
- Mountfort, D.O., Asher, R.A., 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1016-1022.

- Nakamura, S., Aono, R., Wakabayashi, K., Horikoshi, K., 1992. Alkaline xylanase produced by newly isolated alkaliphilic *Bacillus*. In: Visser J, Beldman G., K-vsm, A, Voragen, AGJ, ed: *Xylan and Xylanases*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.; 443-446.
- Nordkvist, E., 1987. *Composition and Degradation of Cell Walls in Red Clover, Lucerne and Cereal Straw*. The Swedish University, Agricultural Science. UPPSALA.
- Orpin, C. G., Letcher, A. J., 1979. Utilization of cellulose, starch, xylan and other hemicelluloses for growth by the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *Curr. Microbiol.* 3: 121–124.
- Öztaş, D., *Tirosinaz Enziminin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı*. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 7s (2007).
- Paes, G., Berrin, J.G., Beaugrand, J., 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances* 30: 564-592.
- Paice, M.G. ve L.J. Jurasek, 1984. *Wood Chemical Technology*, no:4, pp:187.
- Patel, R.N., Grabski, A.C., Jeffries, T.W., 1993. Chromophore release from Kraft pulp by purified *Streptomyces roseiscleroticus* xylanases. *Appl Microbiol Biotechnol* 39: 405–412.
- Rani, S., and Nand, K., 1996. Development of cellulase-free xylanase producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. *Enzyme. Microb. Technol.*, 18: 23-28.
- Rattö, M., A. Kantalin, M. Bailey, ve L. Viikari, 1993. *Tappi Journal*, 76(2):125.
- Roberts, J.C., A.J. McCarthy, N.J. Flynn ve P. Broda, 1990. *Enz. Microb. Technology*, 12, pp:210.
- Saleem, M., Tabassum, M.R., Yasmin, R., Imran, M., 2009. Potential of xylanase from thermophilic *Bacillus* sp. XTR-10 in biobleaching of wood kraft pulp. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63: 1119-1124.
- Saleem, M., Aslam, F., Akhtar, M.S., Tariq, M., Rajoka, M.I., 2012. Characterization of a thermostable and alkaline xylanase from *Bacillus* sp. and its bleaching impact on wheat straw pulp. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 513-522.
- Sandrim, V.C., Rizzatti, A.C.S., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Milagres, A.M.F., Polizeli, M.L.T.M., 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. *Process Biochem.* 40: 1823-1828.

- Sambrook J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 2001. Molecular cloning, a laboratory manual, 2. Ed. C. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Subramanian, S., Prema, P., 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 183: 1-7.
- Tamblyn Lee, J.M., HU, Y., Zhu, H., Cheng, K.J., Krell, P.J., Forsberg, C.W., 1993. Cloning of a xylanase gene from the ruminal fungus *Neocallimastix patriciarum* 27 and its expression in *E. coli*. *Can. J. Microbiol.* 39: 134-139.
- 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 bioprocess: a review, *Process Biochem.*, 38, 1327-1340.
- Teunissen, M.J., Smits, A.A.M., OP Den Camp, H.J.M., Vogels, G.D. 1991. Fermentation of cellulose and xylanolytic enzymes by anaerobic fungi from ruminant and nonruminant herbivores. *Archives Microbiology*, 156:290-296.
- Thomson, J.A., 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 65-82.
- Üner, B., 2003. Kraft hamurundan kalıntı ligninin izole edilmesi ve yapısı. Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi Seri: A, Sayı: 2, Yıl: 2003, ISSN: 1302-7085, Sayfa: 83-100.
- Vance, C.D., Kirk, T.K., Sherwood, R.T., 1980. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 259-288.
- Viikari, L., Ranva, M., Kantelinen, A., Sandquist, J., Linko, M., 1986. Bleaching with Enzymes. Third International Conference in biotechnology in pulp and paper industry. 16-19 June, Stockholm, s67-69.
- Von Hejne, G., 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic Acids Res.* 14: 4683-4690.
- Weimer, P.J., 1992. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 189-223.
- White, T.M., Mackie, R.I., Doerner, K.C., 1993. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. In *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. (Eds. H. G. Jung, D. D. Buxton, R. D. Hatfield and Ralph) pp. 455-484. ASA-CSSA-SSSA Madison, USA.
- Williams, A.G., Orpin, C.G., 1987. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi on a range of carbohydrate substrates. *Can. J. Microbiol.* 33: 418-426.
- Willats, W.G., McCartney, L., Mackie, W., Knox, J.P., 2001. Pectin: cell biology

and prospects for functional analysis. *Plant Mol Biol* 47:9-27.

Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: function and applications. *Microbiol. Rev.* 52: 305-317.

Yenson, M., "İnsan biyokimyası", İstanbul Üniversitesi Tıp Anabilim Dalı. Kırklareli. 1984.

Zaborsky, O. 1973. "Immobilized Enzymes" Edited by Zaborsky, I., CRC Press, Cleveland, Ohio.

Zhao, J., Li, X., Qu, Y., 2006. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. *Bioresource Technology*, 97: 1470-147.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Hanifi ALTUN
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 07.09.1981 Adıyaman
Medeni hali : Evli
Telefon : 0 (505) 7105788
e-posta : altun_ailem@hotmail.com.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	KSÜ/ Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Adıyaman Lisesi	1999

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2005-2007	K.Maraş Özel Arşimet Derşhanesi	Biyoloji Öğretmenliđi
2008-2010	K.Maraş Özel Pi Analitik Derşhanesi	Biyoloji Öğretmenliđi
2011-2012	K.Maraş Özel Eksen Derşhanesi	Biyoloji Öğretmenliđi

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Basketbol, Masa Tenisi, Futbol, Dođa gezileri