

**YENİ TANIMLANMIŞ *STREPTOMYCES* SP. BN212 İLE *RİCİNUS*
COMMUNİS ATIKLARININ BİYOLOJİK YIKIMININ
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BENGÜ EVCİOĞLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
MAYIS-2018**

**YENİ TANIMLANMIŞ *STREPTOMYCES* SP. BN212 İLE *RİCİNUS*
COMMUNIS ATIKLARININ BİYOLOJİK YIKIMININ
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS

BENGÜ EVCİOĞLU

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

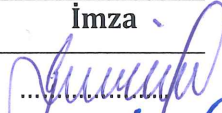
**BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Münir TUNÇER**

**MERSİN
MAYIS - 2018**

ONAY

Bengü EVCİOĞLU tarafından Prof. Dr. Münir TUNÇER danışmanlığında hazırlanan “Yeni tanımlanmış *Streptomyces* sp. BN212 ile *Ricinus communis* atıklarının biyolojik yıkımının araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Gazi GÖRÜR	
Üye	Prof. Dr. Mehmet Ali MAZMANCI	
Üye	Prof. Dr. Münir TUNÇER (Danışman)	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.06.2018 tarih ve 2018.27 / 943 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. Cahit BİLİM
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

11 Mayıs 2018 / 11 May 2018

Bengü EVCİOĞLU

ÖZET

Bu tez çalışmasında 5'i termofilik karakterde olan 37 adet yeni aktinomiset üyesi izolatan yanı sıra, son zamanlarda tanımlanmış olan fakat lignoselülitik aktiviteleri çalışılmamış olan *Nocardia thraciensis*, *Actinomadura geliboluensis*, *Amycolatopsis cihanbeyliensis* ve *Actinoplanes* sp. suşlarının ekstrasellüler endoksilanaz üretim potansiyelleri araştırılmıştır. Taranan izolatlar arasında en yüksek ekstrasellüler endoksilanaz üreticisi olarak belirlenen BN208, BN212^T ve BN407 ise 16S rRNA gen dizilimlerine göre Aktinobakteria şubesinin *Streptomyces* cinsine ait oldukları belirlenmiştir.

Farklı karbon kaynaklarının *Streptomyces* üyesi BN208, BN212^T ve BN407 izolatları ve *A. geliboluensis* suşunun endoksilanaz üretimine etkisinin araştırılması sonucunda daha ileri çalışmalar için seçilen *Streptomyces* sp. BN212^T suşu en yüksek ekstrasellüler endoksilanaz üretimini buğday samanı üzerinde 69,94 U/mL; mısır samanı üzerinde 64,64 U/mL; meşe talaşı üzerinde 70,37 U/mL ve hint yağı bitkisi üzerinde ise 76,74 U/mL olarak gerçekleştirmiştir.

İnkübasyon pH'sının, sıcaklığının ve hint yağı bitkisinin partikül boyutunun ve oranının *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisinin araştırıldığı çalışmada ise bu suşun pH 6'da, 45 - 55 °C'de ve 0,25 mm partikül boyutundaki 10 g/L oranındaki hint yağı bitkisinin bulunduğu kültür koşullarında maksimum düzeyde enzim ürettiği belirlenmiştir. Farklı azot kaynaklarının *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz üretimi üzerine etkisinin incelendiği çalışmada ise en yüksek endoksilanaz üretiminin maya özütü ile gerçekleştiği belirlenmiştir. NaCl oranının ise 0,9 g/L'ye kadar *Streptomyces* sp. BN212^T tarafından endoksilanaz üretimini etkilemediği, 1,2 g/L NaCl'ün ise enzim üretimini %10 azalttığı belirlenmiştir.

Streptomyces sp. BN212^T ekstrasellüler endoksilanazının kısmi karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda endoksilanazının optimal aktivite sıcaklığının 60 °C; optimal aktivite pH'sının 7,0 olduğu; endoksilanaz aktivitesinin Mn²⁺ (%131), Fe²⁺ (%120) ve DTT (%135) varlığında indüklendiği, Hg²⁺ (%19) varlığında ise büyük ölçüde inhibisyona uğradığı gözlemlenmiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstrasellüler endoksilanaz aktivitesinin yarılanma ömrünün 40 °C ve 50 °C'de yaklaşık 8 saat, 60 °C'de 6 saat, 70 °C'de 4 saat ve 80 °C'de ise yaklaşık 3,5 saat olduğu hesaplanmıştır. *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ürettiği olduğu ekstrasellüler endoksilanaz ile gerçekleştirilen doğal PAGE ve zimogram çalışmaları sonucunda jel üzerinde farklı kütlelere sahip 2 farklı aktivite bant bölgesinin olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: aktinomiset, *Streptomyces*, endoksilanaz, hint yağı, *Ricinus communis*.

Danışman: Prof. Dr. Münir TUNÇER, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

In this MSc thesis study, extracellular endoxylanase activities of 37 new isolates of actinobacteria members, that 5 of those thermophilic, beside recently identified but lignocellulosic activities had not been studied *Nocardia thraciensis*, *Actinomadura geliboluensis*, *Amycolatopsis cihanbeyliensis* and *Actinoplanes* sp. strains was screened. Among the screened isolates BN208, BN212^T and BN407 was determined as the highest extracellular endoxylanase producers and identified as *Streptomyces* genera of actinobacteria according to 16S rRNA gene sequences.

According to supplementary optimization studies with *Streptomyces* sp. BN208, BN212^T and BN407 and *A. geliboluensis*'s extracellular endoxylanase production on different carbone sources, *Streptomyces* sp. BN212^T has been chosen for further investigations due to the greatest endoxylanase activities on ball milled wheat straw (69,94 U/mL), on corn straw (64,64 U/mL), on oak sawdust (70,37 U/mL) and on costar oil plant straw (76,74 U/mL) at the third day of incubation.

Optimization studies of incubation pH, temperature and particle size and concentration of costar oil plant on extracellular endoxylanase production by *Streptomyces* sp. BN212^T revealed that the strain produced the greatest endoxylanase activity at pH 6, 45 - 55 °C and 0,25 mm partikül size and 10 g/L of costar oil plant. The effect of nitrogen sources on endoxylanases production by *Streptomyces* sp. BN212^T was also investigated and yeast ekstrakt was found as the most suitable nitrogen source. Production of extracellular endoxylanase by *Streptomyces* sp. BN212^T in the presense of up to 0,9 g/L NaCl was not effected, wile in the presense of 1,2 g/L NaCl enzyme production was decreased by 10%.

Characterization studies carried out with crude enzyme showed that endoxylanase of *Streptomyces* sp. BN212^T have a pH optima at 7.0 and temperature optima at 60 °C. Mn²⁺ (%131), Fe²⁺ (%120) and DTT (%135) was found to act as an inducer for endoxylanase activity, while endoxylanase activity strongly inhibited (19%) with the presence of Hg²⁺. The half-lives of endoxylanase produced by *Streptomyces* sp. BN212^T were calculated as 8 h at 40 °C and 50 °C, 6 h at 60 °C, 4 h at 70 °C and 3,5 h at 80 °C. Extracellular endoxylanase produced by *Streptomyces* sp. BN212^T was separated by PAGE and developed as zymogram and revealed that this strain has two isoforms of endoxylanase with different molecular weight.

Keywords: Actinobacteria, *Streptomyces*, endoxylanase, costar oil, *Ricinus communis*.

Advisor: Prof. Dr. Münir TUNÇER, Department of Biology, University of Mersin, Mersin-Turkey.

TEŞEKKÜR

Öncelikle beni yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden, bilgi birikimini ve tecrübelerini her zaman paylaşan, büyük bir anlayış ile arkamda olduğunu hissettiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Münir TUNÇER'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez İzleme Kurulu Başkanı Sayın Prof. Dr. Gazi GÖRÜR ve Tez İzleme Kurulu Üyesi Sayın Prof. Dr. Mehmet Ali MAZMANCI'ya değerli vakitlerini ayırıp, katkıda bulundukları için çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, büyük bir özveri ile her konuda her zaman yardımına koşan Dr. Ali Osman ADIGÜZEL'e gösterdiği ağabeylik için çok teşekkür ederim.

Son olarak tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman yanımda olan, birbirimizden uzakta dahi olsak ellerini hep omuzlarımda hissettiğim annem Ferah NANE ve babam Op. Dr. Mehmet NANE'ye ve kendimi geliştirmem adına her zaman beni gönülden destekleyen eşim Hamdi Efe EVCİOĞLU'na çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	4
2.1. Lignoselüloz Materyallerinin Yapısı Ve Biyokimyası	4
2.1.1. Selüloz	4
2.1.2. Hemiselüloz	5
2.1.2.1. Ksilan	5
2.1.2.1.1. O-asetilglukuronoarabinoksilan (AcGAX)	7
2.1.2.1.2. Arabinoglukuronoksilan (AGX)	8
2.1.2.1.3. O-asetilarabinoksilan (AcAX)	9
2.1.2.1.4. Asetil-4-O-metilglukuronoksilan (AcGX)	9
2.1.3. Hemiselülozun Selüloz ve Lignin İle Etkileşimi	10
2.1.4. Lignin	11
2.2. Lignoselüloz Yıkımında Rol Alan Enzimler	14
2.2.1. Selülazlar	14
2.2.2. Hemiselülazlar	15
2.2.3. Peroksidazlar	17
2.2.4. Lakkazlar	18
2.3. Lignoselüloz Yıkımında Rol Alan Organizmalar	21
2.3.1. Lignoselüloz Parçalayan Bakteriler	21
2.3.2. Lignoselüloz Parçalayan Funguslar	22
2.3.3. Lignoselüloz Parçalayan Aktinomisetler	23
2.4. Hint Yağı Bitkisi	24
2.4.1. Hint Yağı Bitkisinin Kullanım Alanları	26
2.5. Aktinobakteriler	27
2.5.1. Aktinobakterilerin Genel Özellikleri	27
2.5.1.1. <i>Streptomyces</i> spp.	28
2.6. Çalışmanın Amacı	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	30
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	31
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tamponların Hazırlanması	34
3.1.4. Poli Akrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) ve Zimogram Sırasında Kullanılan Çözeltiler	35
3.1.5. PZR ve Agaroze Jel Elektroforezi İçin Gerekli Çözeltiler	35
3.2. Yöntem	36
3.2.1. Örneklerin Alınması, Hazırlanması ve Bakterilerin İzolasyonu	36
3.2.2. Selülaz, Ksilanaz, Amilaz ve Lakkaz Aktivitelerinin Katı Besiyerinde Taranması	36
3.2.3. İnokulum Hazırlanışı	37
3.2.4. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu İçin DNA'larının İzolasyonu	37
3.2.5. 16S rRNA Genlerinin PZR ile Çoğaltılması	37

3.2.6. Çoğaltılan DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi ile Gösterilmesi	38
3.2.7. PZR Ürünlerinin Yoğunlukları ve Kalitesinin Tayini	38
3.2.8. Ekstrasellüler Toplam Protein Miktarının Tayini	39
3.2.9. Endoksilanaz Tahlili	39
3.2.10. Substratların Hazırlanması	41
3.2.11. Ekstrasellüler Endoksilanaz Üretim Optimizasyonu	41
3.2.11.1. Ekstrasellüler endoksilanaz üretiminin büyüme döngüsü ile olan ilişkisi	41
3.2.11.2. Kültür sıcaklığının ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi	41
3.2.11.3. Kültür pH'sının ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi	41
3.2.11.4. Azot kaynaklarının ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi	42
3.2.11.5. NaCl derişiminin ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi	42
3.2.12. Endoksilanazın Kısmi Karakterizasyonu	43
3.2.12.1. Endoksialnazın optimum sıcaklığının ve termostabilitesinin belirlenmesi	43
3.2.12.2. Endoksilanazın optimum pH'sının belirlenmesi	43
3.2.12.3. Endoksilanazın metal iyonlarına duyarlılığının belirlenmesi	44
3.2.12.4. Endoksilanazın organik çözücülere duyarlılığının belirlenmesi	44
3.2.13. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal-PAGE)	44
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	46
4.1. Katı Besiyerinde Enzim Aktivitelerinin Taranması	46
4.2. Yüksek Aktivite Gösteren BN208, BN212 ^T ve BN407 İzolatlarının 16S rRNA Gen Dizisine Göre Tanımlanması	48
4.3. Ekstrasellüler Endoksilanaz Üretimine Optimizasyonu	51
4.3.1. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>Streptomyces</i> Üyesi BN208, BN212 ^T ve BN407 İzolatları ve <i>A. geliboluensis</i> Suşunun Endoksilanaz Üretimine Etkisi	51
4.3.2. İnkübasyon Sıcaklığının <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endokilanaz Üretimi Üzerine Olan Etkisi	61
4.3.3. Besiyeri Çeşidinin <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T ile Endoksilanaz Üretimine Etkisi	62
4.3.4. <i>Ricinus communis</i> 'in (Hint Yağı Bitkisi) Farklı Partikül Boyutlarının ve Oranlarının <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Suşunun Endoksilanaz Üretimi Üzerine Etkisi	63
4.3.5. Kültür pH'sının <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T 'nin Endokilanaz Üretimi Üzerine Olan Etkisi	66
4.3.6. Farklı Azot Kaynaklarının <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endoksilanaz Üretimi Üzerine Etkisi	68
4.3.7. Farklı NaCl Derişimlerinin <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endoksilanaz Üretimi Üzerine Etkisi	69
4.4. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endoksilanazının Kısmi Karakterizasyonu	70
4.4.1. Sıcaklığın ve pH'nın <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endokilanaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi	70
4.4.2. Farklı Metal İyonlarının ve Organik Çözücülerin <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endoksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	72
4.4.3. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endoksilanaz Enziminin Isıl Kararlılığı	74
4.4.4. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T Endoksilanaz Aktivitesinin Elektroforetik Çalışmalar ile Gösterilmesi	76
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	91

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Nişasta-Kazein Agar besiyerinin bileşenleri	31
Tablo 3.2. Gause's No:1 Besiyeri bileşenleri	32
Tablo 3.3. ISP-4 Besiyeri bileşenleri	32
Tablo 3.4. Ksilanaz Tarama Besiyeri 1 bileşenleri	32
Tablo 3.5. Ksilanaz Tarama Besiyeri 2 bileşenleri	32
Tablo 3.6. Selüloz Tarama Besiyeri bileşenleri	32
Tablo 3.7. Amilaz Tarama Besiyeri bileşenleri	33
Tablo 3.8. Lakkaz Tarama Besiyeri 1 bileşenleri	33
Tablo 3.9. Lakkaz Tarama Besiyeri 2 bileşenleri	33
Tablo 3.10. Lakkaz Tarama Besiyeri 3 bileşenleri	33
Tablo 3.11. ISP-2 Besiyeri bileşenleri	33
Tablo 3.12. MS-YEM Besiyeri bileşenleri	34
Tablo 3.13. Fosfat tamponunun hazırlanması	34
Tablo 3.14. Britton-Robinson Universal Buffer	43
Tablo 4.1. <i>Actinomyces</i> üyesi yeni izolatların karbon kaynağı olarak oat spelt ksilan (OSX), birchwood ksilan (BWX) ve karboksimetil selüloz (CMC) içeren katı besiyerlerinde büyümesi ve zon/koloni çapı oranları	46
Tablo 4.2. Yeni tanımlanmış <i>Nocardia thraciensis</i> , <i>Actinomyces geliboluensis</i> , <i>Actinomyces cihanbeyliensis</i> ve <i>Actinomyces</i> sp. suşlarının katı besiyerinde büyümesi ve zon/koloni çapı oranları	47
Tablo 4.3. PZR ürünlerinin A_{260}/A_{280} oranları ve yoğunlukları	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. ABD yakıt arzına 2012 yılına kadar 7,5 milyar galon etanol ve biyoyakıt talebi eklenmiştir	1
Şekil 1.2. Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanole dönüşümünün başlıca basamaklarının şematik gösterimi	3
Şekil 2.1. Selülozun moleküler yapısı ve selüloz zincirlerindeki zincir-içi (intra) ve zincirler-arası (inter) hidrojen bağlarının oluşturduğu motif	5
Şekil 2.2. Ksilan-tipi polisakkaritlerin bitkilerde bulunuşu	6
Şekil 2.3. Ladin, kavak ve dallı darı bitkilerinin ikincil çeperlerinde yer alan ksilan yapıları	8
Şekil 2.4. Glukuronoksilanların omurgası ve yan-dallanma oluşturan grupların bağlanma pozisyonları	10
Şekil 2.5. <i>p</i> -kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolün kimyasal yapısı	12
Şekil 2.6. Bir yumuşak odun lignininin şematik yapısal formülü	13
Şekil 2.7. Selüloz parçalayan enzimlerin işlevsel koordinasyonunun şematik gösterimi	15
Şekil 2.8. Hemiselüloz (temel olarak ksilan) parçalayan enzimlerin işlevsel koordinasyonunun şematik gösterimi	17
Şekil 2.9. <i>Bacillus subtilis</i> lakkazının (CotA) bakır merkezleri	20
Şekil 2.10. Hint yağı bitkisinin genel görünümü	25
Şekil 3.1. Bakteriyel DNA'nın izolasyonu	38
Şekil 3.2. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın farklı derişimlerinin Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğrisi	39
Şekil 3.3. D-ksilozun farklı farklı derişimlerinin analizi sonucu elde edilen indirgenmiş şeker standardı	40
Şekil 4.1. L1: BN208, L2: BN212 ve L3: BN407 izolatlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılan 16S rRNA genlerinin agaroz jelde görünüşleri	48
Şekil 4.2. <i>Streptomyces</i> genusu içerisinde yer alan ve endoksilanaz üreticisi olduğu tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş olan (a) BN208, (b) BN212 ve (c) BN407 izolatlarının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonları	50
Şekil 4.3. <i>Streptomyces</i> sp. BN208'in (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitki samanı içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları	53
Şekil 4.4. <i>Streptomyces</i> sp. BN212'nin (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitki samanı içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları	55
Şekil 4.5. <i>Streptomyces</i> sp. BN407'in (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitki samanı içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları	57
Şekil 4.6. <i>Actinomadura geliboluensis</i> 'in (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitki samanı içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları	59
Şekil 4.7. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının <i>Streptomyces</i> sp. BN212 endoksilanaz üretimi üzerine etkisi.	61
Şekil 4.8. <i>Streptomyces</i> sp. BN212'nin (a) MS-YEM ve (b) ISP-2 sıvı besiyerindeki üremesi, endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları	63
Şekil 4.9. <i>Streptomyces</i> sp. BN212'nin <i>R. communis</i> 'in farklı partikül boyutları (a) 0,25 mm ve (b) 0,50 mm üzerinde üremesi, endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları	64
Şekil 4.10. 0,25 mm partikül boyutuna sahip <i>R. communis</i> 'in farklı oranlarının <i>Streptomyces</i> sp. BN212'nin endoksilanaz üretimine etkisi	66

	Sayfa
Şekil 4.11. Besiyeri başlangıç pH'sının <i>Streptomyces</i> sp. BN212'nin endoksilanaz üretimine etkisi	67
Şekil 4.12. Farklı azot kaynaklarının <i>Streptomyces</i> sp. BN212'nin endoksilanaz üretimine etkisi	69
Şekil 4.13. Farklı NaCl oranlarının <i>Streptomyces</i> sp. BN212 endoksilanaz üretimi üzerine etkisi. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T farklı oranlarda NaCl içeren MS-YEM besiyerinde inkübe edilmiş ve örneklerin endoksilanaz aktiviteleri standart enzim analiz ile belirlenmiştir.	70
Şekil 4.14. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 endoksilanaz enziminin optimal aktivite sıcaklığı. Endoksilanaz içeren reaksiyon örnekleri değişen sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.	71
Şekil 4.15. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 endoksilanaz enziminin optimal pH'sı. Endoksilanaz içeren reaksiyon örnekleri değişen pH'larda inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.	71
Şekil 4.16. Farklı metal iyonlarının ve kimyasalların <i>Streptomyces</i> sp. BN212 endoksila-naz aktivitesi üzerine etkisi. Metal iyonlarını ve kimyasalları içeren reaksiyon örnekleri 50 °C'de inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.	73
Şekil 4.17. Farklı organik çözücülerin <i>Streptomyces</i> sp. BN212 endoksilanaz aktivitesi üzerine etkisi. Organik çözücülerini içeren reaksiyon örnekleri 50 °C'de inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir	73
Şekil 4.18. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 ^T endoksilanaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısı kararlılığı. Reaksiyon örnekleri 50 °C'de inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.	75
Şekil 4.19. <i>Streptomyces</i> sp. BN212 tarafından üretilen endoksilanaz enziminin (a) doğal PAGE ve (b) aktivite jeli olan zimogramı	76

KISALTMALAR ve SİMGELER

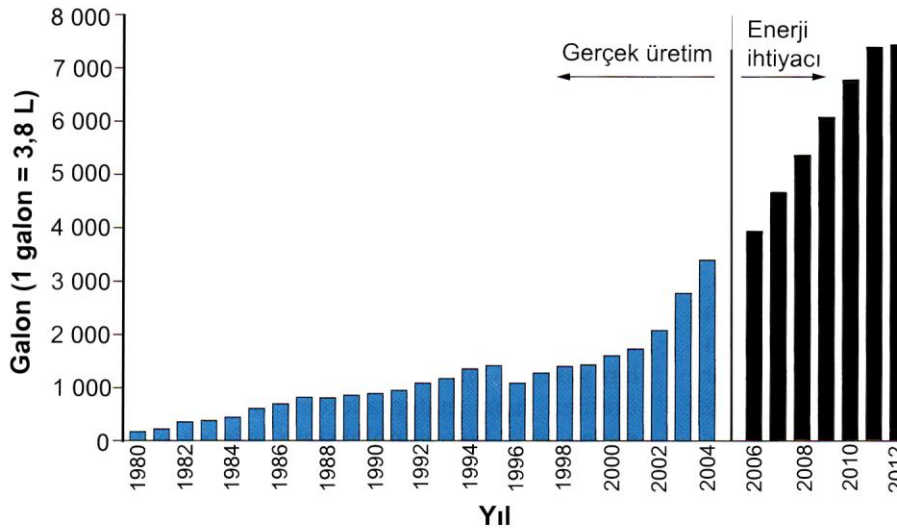
Kısaltma	Tanım
μL	mikro litre
3-HAA	3-hidroksiantranilat
Å	angstrom (0,1 nm)
AAO	aril alkol oksidaz
ABTS	[2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit)]
AcAX	O-asetilarabinoksilan
AcGAX	O-asetilglukuronoarabinoksilan
AcGX	asetil-4-O-metilglukuronoksilan
AGX	arabinoglukuronoksilan
APS	amonyum persülfatın
Araf	arabinofuranoz
BBP	birleştirilmiş biyoproseste
BSA	bovin serum albumin
BWX	birchwood ksilan
CMC	karboksimetil selüloz
CMCaz	karboksimetil selülaz
CotA	<i>Bacillus subtilis</i> lakkazının
Da	dalton
DHP	dehidrogenasyon polimerizat
DNA	deoksiribonükleik asit
DNS	dinitrosalisilik asit
dNTP	deoksinükleotid
DOPA	3,4-dihidroksifenilalenin
DTT	dikloro difenil trikloroethan
E.C	enzim komisyonu
EDTA	etilen diamin tetra asetik asit
EpoA	ekstrasitoplazmik fenol oksidaz
ESF	eş-zamalı sakkarifikasyon ve fermentasyon
g	gram (10 ⁻³ kg)
GLOX	glioksal oksidaz
GlupA	D-glukuronik asit
HRP	horseradish peroxidase
ISP	uluslararası streptomyces projesi
kDa	kilodalton
kob	koloni oluşturan birim
L	litre
L-DOPA	L-3,4-dihidroksifenilalenin
LiP	lignin peroksidaz
M	molar
Me-GlupA	(4-O-metil)-α-D-glukuronik asit
mL	mililitre (10 ⁻³ litre veya 1 cm ³)
mM	mili molar
MnP	mangan-bağımlı peroksidaz
MS-YEM	minimal-salt yesat ekstrak mediyum
NA	nutrient agar
NMR	nükleer manyetik rezonans
OSX	oat spelt ksilan
PAGE	poli akrilamid jel elektroforezi
PAH	polisiklik aromatik hidrokarbon
PZR	polimeraz zincir reaksiyonu

SDS	sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	sodyum dedosil sülfat – poli akrilamid jel elektroforezi
TBE	tris borat EDTA
TEMED	tetrametiletildiamin
U	ünite
X	tek tip glikozidik bağları içeren homoksilan
X _m	farklı tiplerde glikozidik bağları içeren homoksilan
Xylp	ksilopiranozil



1. GİRİŞ

Günümüzde çözüm üretilmesi gereken temel sorunların başında enerji ihtiyacının karşılanması gelmektedir (Şekil 1.1). Hali hazırda gerekli olan enerjinin ne yazık ki büyük bir bölümü hala fosil yakıtlardan sağlanmaktadır. Oysaki fosil yakıtların her birisinin sınırlı miktarlarda rezervlere sahip oldukları da bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, karar vericilerin ve politika yapıcıların öncelikli konularından birisi fosil yakıtlara alternatif enerji kaynaklarının kullanımını artırmaktır. Kısa ve uzun vadeli bu enerji politikaları arasında en akla uygun çözüm ise “yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynaklarının verimli bir şekilde kullanılmasını yaygınlaştırmak” olarak görülmektedir. Bu nedenle de ülkemiz de dâhil olmak üzere pek çok ülke, toplam enerji giderleri içerisindeki yenilenebilir ve sürdürülebilir kaynaklardan sağlanan enerji oranlarını artırmak için kısa ve uzun vadede çeşitli hedefler koymuşlardır. Alternatif enerji teknolojilerinin geliştirilmesi, ham petrol rezervlerinin sınırlı olması ve petrol fiyatının değişken olmasının yanı sıra, petrol teminindeki güvenlik ve küresel ısınma ve hava kirliliği gibi çevresel sorunlar nedeniyle de zorunludur. Fosil yakıtlara alternatif olarak yararlanılabilecek yenilenebilir ve sürdürülebilir enerji kaynaklarından birisi ise biyokütledir.



Şekil 1.1. ABD yakıt arzına 2012 yılına kadar 7,5 milyar galon etanol ve biyoyakıt talebi eklenmiştir (1 galon = 3,8 L).

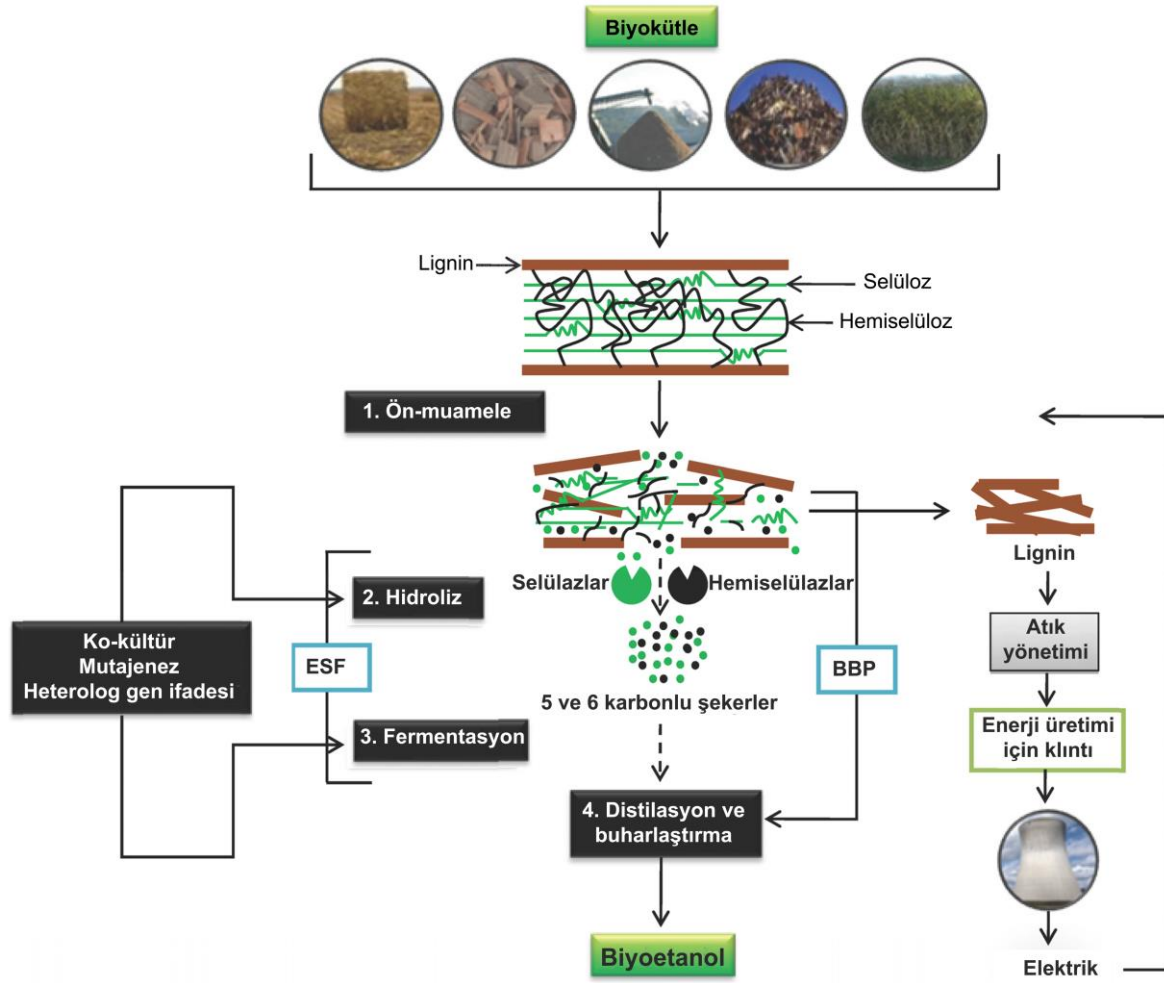
Biyokütle, fosil-olmayan, bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilen; yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir maddelerdir [1]. Biyokütle temelli hammadde kaynakları oldukça çeşitlilik gösterse de genel olarak dört grupta toplanır: **(i)** nişasta içeren, **(ii)** şeker içeren, **(iii)** mikroalgal ve **(iv)** lignoselülozik (tarımsal ve ormansal atık kökenli) maddeler [2]. Biyokütlenin dönüştürülmesi ise dünyamızda en bol bulunan ve aynı zamanda en çok yenilenebi-

len biyolojik materyal olması nedeniyle diğer alternatif enerji stratejilerine göre bazı avantajlara sahiptir.

Tahmini olarak karasal bitkiler tarafından her yıl yaklaşık 50 milyar ton karbon biyokütleyle dönüştürülmektedir. Bu nedenle, lignoselüloz doğada bol olarak bulunan ve yenilenebilen bir enerji kaynağını teşkil eder. Lignoselülozik kalıntıların biyolojik dönüşümü (biyodönüşüm) ise bu materyalleri parçalayabilen funguslar ve bakteriler gibi mikroorganizmalarca başlatılır. Ancak, lignoselülozik kalıntıların biyoetanol gibi katma değeri yüksek ürünlere biyodönüşümü, nişasta temelli kalıntıların biyodönüşümünden çok daha komplekstir. Bu nedenle, lignoselülozik kalıntıların biyodönüşümü dört işlem basamağı gerektirir. Bu basamaklardan ise ilk üçü biyolojik süreçler olup, dördüncüsü ise öncelikli olarak kimya mühendisliği ile ilişkilidir: **(i)** ön-muamele, **(ii)** hidroliz olarak bilinen bir süreçle, selüloz ve hemiselülozun çözünebilir şeker monomerlerine (heksozlar ve pentozlar) sakkarifikasyonu (depolimerizasyon), **(iii)** fermentasyon süreci ile monomerik şekerlerin etanol gibi katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi ve **(iv)** ürünlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması (Şekil 1.2).

Lignoselülozun yenilenebilir ve sürdürülebilir bir enerji kaynağı olarak verimli bir şekilde kullanılabilmesi için lignoselülozu enerji kaynağı olarak kullanan funguslar ve aktinomisetler gibi mikroorganizmaların tanımlanması, bu organizmaların gelişmesini ve gerekli enzim sistemlerinin teşvikini sağlayan optimum çevresel koşulların belirlenmesi ve lignoselülozun enzimatik olarak yıkım mekanizmasının ortaya konması gerekmektedir. Bunun sonucunda da hammadde olarak lignoselülozun kullanıldığı biyoetanol (Şekil 1.2), kâğıt, ekmekçilik, bira ve meyve sularının arıtılması, hayvan yemlerinin muamelesi gibi çok farklı alanlardaki potansiyel uygulamaların verimliliği gelişmiş olacaktır [3-8].

Lignoselülozik biyokütle kaynaklarından olan kene otu (*Ricinus communis L.*) bitkisi ise *Euphorbiacea* familyasında yer alan, önemli endüstri bitkilerinden birisidir. Bitkinin yetiştirilmesi ise tohumundan elde edilen ve hintyağı olarak bilinen sarımsı veya renksiz yağı nedeniyle dir. Hintyağından Türk Kırmızısı olarak bilinen Sulforasinalat elde edilmektedir. Tıpta ise daha çok bağırsak röntgeni çekimlerinde müshil ilacı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, kozmetik ürünlerin üretiminde, zararlı böcek ve mantarları yok eden ilaçların yapımında, kumaşlarda, naylon tiplerinde, elektrik yalıtım malzemelerinde, vernik yapımında, aydınlatıcı ve plastik madde yapımında, özellikle ABD’de uçak motorlarının yağlanmasında, patlayıcı madde yapımında ve bazı mürekkeplerin yapımında kullanılmaktadır. Kene otu tohumlarında bulunan risin nedeniyle, hintyağı yemeklik yağ olarak kullanılmadığı gibi posası da yem olarak kullanılmamaktadır [9].



Şekil 1.2. Lignoselülozik biyokütlenin biyoetanol dönüşümünün başlıca basamaklarının şematik gösterimi. Hidroliz ve fermentasyon süreçleri ayrı ayrı gerçekleştirilebileceği gibi (kesikli oklarka gösterilmiştir), eş-zamalı sakkarifikasyon ve fermentasyon (ESF) olarak da gerçekleştirilebilir. Ancak, birleştirilmiş biyoproseste (BBP) ise bir veya daha fazla mikroorganizmanın yer aldığı tek biyoreaktör içerisinde bütün biyodönüşüm basamakları tek basamağa indirgenmektedir. Ürün verimini geliştirmek amacıyla, mikrobiyal biyokatalizörlerin şeker kullanım verimliliğini arttırmanın yanı sıra, hidrolitik mikrobiyal enzimlerin aktivitelerini ve/veya kararlılıklarını arttırmak için mutajenez, ko-kültür ve heterolog gen ifadesi gibi farklı teknikler de kullanılmaktadır. Üretim maliyetini düşürmek için ise biyoetanol üretimi, yakıt olarak lignini kullanan bir termik santrelle entegre edilebilir [10].

Son zamanlarda ülkemizde de deneme ekimleri gerçekleştirilen ve güney bölgelerimizde ise doğal olarak yetişen kene otu bitkisinin tohumları hasat edildikten sonra geriye kalan bitkinin yaprak ve saplarındaki lignoselülozik yapı ise mikrobiyal faaliyetler sonucunda yakıt, kimyasallar, şeker şurubu gibi çeşitli ürünlere ya da hammaddelere dönüştürülebilir. Literatürde kene otu bitkisinin gövdesinden elde edilen selüloz mukavva, karton, kâğıt ve duvar kâğıdı yapımında değerlendirildiğine dair yayınlar bulunmaktadır [9].

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Lignoselüloz Materyallerinin Yapısı Ve Biyokimyası

Karasal biyokütlenin büyük bir oranının oluşturan bitki hücre duvarı çok sayıda çevresel ve ekonomik role sahiptir. Bitkilerin hücre duvarını oluşturan lignoselülozik materyaller çeşitli bitkisel ürünlere uygulanan hasat, soyma, öğütme, ayıklama ve kurutma gibi işlemler sonucunda elde edilen tarımsal atıklar, kentsel katı atıklar, kâğıt ve kâğıt hamuru (pulp) endüstrisi atıkları ile otsu ve odunsu bitkilerden oluşmaktadır [11, 12].

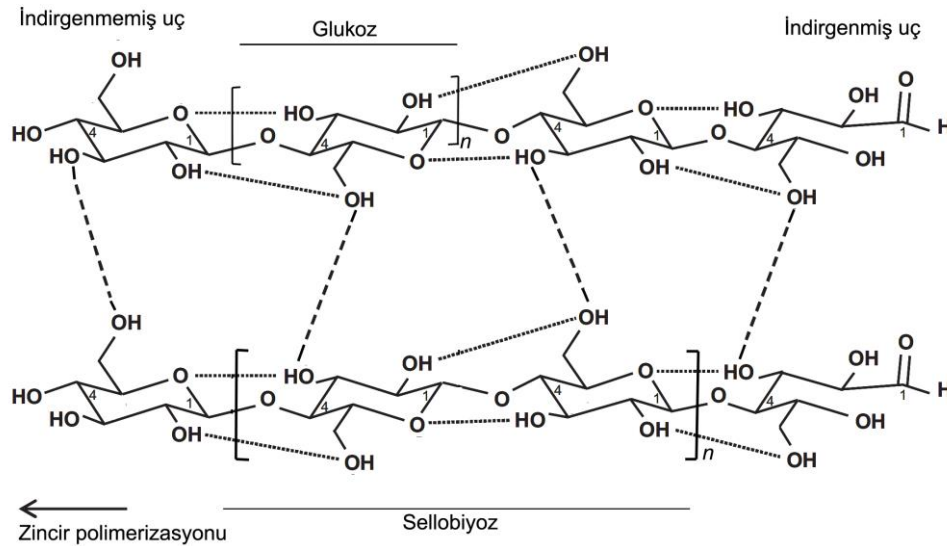
Bitkilerin hücre duvarını oluşturan lignoselüloz ise kompleks bir yapıya sahip olup, genel olarak selüloz, hemiselüloz (ksilanlar, ksiloglukanlar, mannanlar v.s), lignin, pektin ve bazı proteinlerden oluşmaktadır. Ayrıca bitki materyallerinin yapısında terpenleri, resinleri ve fenoller içeren diğer minör bileşikler de bulunmaktadır. Hücre duvarını oluşturan her bir bileşenin oranı ise türe, dokuya ve hücre tipine bağlı olarak büyük oranda değişmektedir [13].

2.1.1. Selüloz

Selüloz, yeryüzünde en fazla bulunan doğal polimerdir ve genel olarak bitkiler tarafından üretilen bir polimerdir [14]. Selüloz en fazla ve saf halde yaklaşık %95 oranında pamuk bitkisinde bulunmaktadır. Ağaç, ot gibi bitkilerde lignin ve hemiselüloz %30-70 oranında; yosun, alg gibi bitkilerde ise toplam %10-40 oranında bulunmaktadır [15]. Selüloz sebzeler ve tahıl ürünleri gibi lifli gıdaların ise kuru ağırlığının %20-50'sini oluşturur [16].

Bitkilerde hücre çeperinin ana bileşeni olan selüloz, glikoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanmasıyla meydana gelmektedir ve oldukça tek-düze (uniform) yapıya sahiptir (Şekil 2.1). Moleküller arası bağlar selüloz zincirlerini bir araya getirerek kristal yapıyı oluşturur. Genellikle doğal selüloz %70 kristallik derecesine sahiptir. Kristallik derecesi en fazla olan selüloz ise bir alg cinsi olan *Valonia* üyelerinde bulunan valonia selülozu iken kristallik derecesi en az olan ise asitle muamele edilmiş selülozdur. Kristal bölgeler ise birbirinden daha az kristal yapı gösteren amorf bölgelerle ayrılmıştır [15].

Selülozun farmakoloji, kozmetik ve gıda sanayi gibi yaygın bir kullanım alanı vardır. Toz formda dolgu maddesi, diyet amaçlı gıda ve tıbbi tabletlerde bağlayıcı, jel formda viskoziteyi düzenleyici, pasta ve krema gibi ürünlerde emülsifiye edici olarak kullanılmaktadır [17]. Kimyasal olarak modifiye edilmiş selüloz türevleri gıdaların yapısını, hidrofilik özelliklerini ve fonksiyonellik kalitesini olumlu etkilediğinden, gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [18]. Ayrıca selüloz, glikoza hidrolize edilerek etanol, bütanol ve organik asitler, aseton veya gliserol gibi çeşitli ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır [19].



Şekil 2.1. Selülozun moleküler yapısı ve selüloz zincirlerindeki zincir-içi (intra) ve zincirler-arası (inter) hidrojen bağlarının oluşturduğu motif. Selüloz, sellobiyozdan meydana gelmektedir: 4-O-(β -D-glukopiranozil)-D-glukopiranoz. n , Polimerizasyon derecesini göstermektedir ve yaklaşık olarak 10.000 üniteden meydana gelmektedir. Noktalı-çizgiler: zincir-içi (intra) hidrojen bağları; kesikli-çizgiler: zincirler-arası (inter) hidrojen bağlarını göstermektedir [20].

2.1.2. Hemiselüloz

Lignoselüloz içerisindeki bir başka karbonhidrat bileşiği ise hemiselülozdur. Hemiselüloz içeriği türden türe, hatta aynı türün organ ve dokularında dahi değişmekte ve değişik oranlarda glukoz, ksiloz, arabinoz, galaktoz, fruktoz, mannoz, glukronik asit ve galakturonik asit içermektedir. Hemiselüloz, selüloz fibrilleriyle hidrojen bağları oluşturur. Böylece, bitki hücre duvarının iskeletini oluştururlar [21].

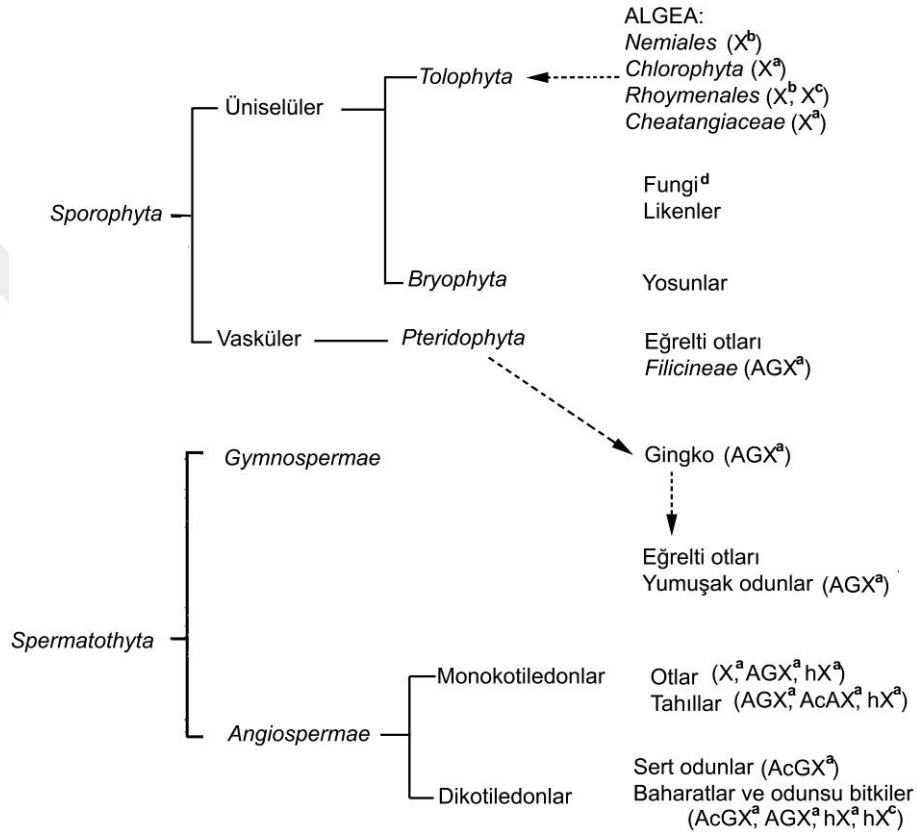
Hemiselüloz; pentoz (ksiloz ve arabinoz), heksoz (mannoz, glukoz ve galaktoz) ve şeker asitlerinden (glukronik asit ve galakturonik asit) oluşan heterojen bir polimerdir. Selülozun aksine hemiselüloz kimyasal olarak homojen değildir. Genellikle hücre duvarlarından alkali ile özütlenen (ekstrakte edilen) polisakkarit olarak tanımlanmaktadır [22, 23].

2.1.2.1. Ksilan

Ksilanlar, bitkiler âleminde selülozdan sonra doğada en yaygın bulunan biyopolimerlerdir ve hemiselülozların yapısını oluşturan temel polisakkaritlerdendir. Şayet yeryüzündeki toplam bitkilerin %20'sinin ksilandan oluştuğunu varsayarsak, kabaca her yıl yaklaşık 10 milyar ton karbonun ksilan yapısına katıldığını söyleyebiliriz. Ksilan, kavak gibi dikotiledon karasal bitkilerin ikincil hücre duvarlarındaki lignin ve selüloz ara-yüzeyinde ve biyoendüstri için uygun olan dallı darı gibi birçok monokotiledon bitki türününün ise birincil ve ikincil hücre duva-

rında yer almaktadır [24, 25]. Genel olarak bitkilerde toplam kuru ağırlığın %30-35'ini ksilan oluşturmaktadırlar [26].

Ksilan, odunsu bitkilere ilaveten otlar, tahıllar ve baharat bitkileri gibi diğer bitkilerde de bulunur. Günümüze kadar ksilanla ilgili yapılmış yayınlardan anlaşıldığı üzere, ksilanın yapısal çeşitliliği, bunların bitkilerdeki işlevleriyle ilişkili olduğunu ve bitkiler âleminde belirli ksilan tiplerinin yayılışı ise bitkilerin evrimsel şemasını açıklamaktadır. Bitki dokularında ksilanın bulunması, botanik açıdan en eski bitkilere kadar takip edilebilir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Ksilan-tipi polisakkaritlerin bitkilerde bulunuşu. ^a)β-(1,4)-D-Xylp omurgası, ^b)β-(1,3)-D-Xylp omurgası, ^c)β-(1,3 ve 1,4)-D-Xylp omurgası, ^d)pentoz veya ksiloz içeren polisakkaritler; **X**: homoksilan; **hX**: heteroksilan; **AGX**: arabinoglukuronoksilan; **AcGX**: asetil-4-O-metilglukuronoksilan; **AcAX**: O-asetilarabinoksilan; → Bitkisel evrimin gidişatı [27].

Caulerpa sp. üyeleri gibi yeşil alglerin hücre çeperi mimarisinde ise β-1,3-glikozidik bağlarını içeren homoksilan (X) selülozun yerini alırken, *Palmariales* sp. ve *Nemaliales* sp. gibi kırmızı deniz alglerinin hücre çeperlerinde ise β-1,3 ve β-1,4-glikozidik bağlarının karışık olarak bulunduğu homoksilan (X_m) bulunmaktadır. Yüksek bitkilerin tamamında bulunan ksilan ise β-1,4-ksilopiranozil (Xylp) birimlerinin oluşturduğu bir omurgadan oluşmaktadır ve genellikle şeker birimleri ve O-asetil gruplarıyla dallanmaktadırlar. Bu nedenle de bu tür ksilanlar heteroksilan olarak adlandırılırlar. Omurgasında karışık bağlanma görülen tek istisna heteroksilan

ise *Plantago* sp. (sinir otu) tohumlarından izole edilmiştir. Homoksilanların yüksek bitkilerde bulunması ise oldukça nadirdir.

Ksilan-tipi polisakkaritler sadece bitkilerde bulunmaz. Uniselüler bir flagellat olan *Herpetomonas samuelpessoai* tarafından benzersiz yapıya sahip olan bir glikomannan sentezlendiği rapor edilmiştir [28]. Bu glikomannan, D-glukuronik asit (GlupA) son-grupları taşımaktadır ve α - ve β -bağlı ksilopiranozil (Xylp) omurgası ise O-2 ve O-4 pozisyonlarından dallanmaktadır. Protozoon bir parazit olan *Leptomonas samueli*'den ise yan-zincirleri karışık-bağlı ksilandan oluşan yüksek moleküler kütleli bir glikan izole edilmiştir [29]. *Pasteurella multorida* bakterisi tarafından sentezlene eksopolisakkarit ise β -1,4-D-ksilan ve hiyaluronik asit karışımından oluşmaktadır [30].

Moleküler kütleleri, dallanma grupları ve bu grupların dağılımı gibi ksilanların yapısal özellikleri ise türler, hücre tipleri ve gelişim aşamaları arasında oldukça değişmektedir (Şekil 2.3). Bu nedenle ksilan dört temel gruba ayrılır: asetil-4-O-metilglukuronoksilan (AcGX), arabino-glukuronoksilan (AGX), O-asetilglukuronoarabinoksilan (AcGAX) ve O-asetilarabinoksilan (AcAX) [31].

2.1.2.1.1. O-asetilglukuronoarabinoksilan (AcGAX)

Monokotiledon türlerin ksilanı, yapısal olarak oldukça çeşitlilik göstermektedir. Tahılları (mısır, buğday ve pirinç) ve enerji bitkilerini (dallı darı ve *Miscanthus*) de içeren otlar, monokotiledonların en çok çalışılmış olan türleridir. Otların ikincil çeperleri AcGAX içerir ve ksiloz kalıntılarının oluşturduğu omurga O-2 pozisyonundan GlupA veya Me-GlupA ile dallanırlar, fakat esas dallanmaları O-3 pozisyonlarındaki α -L-Araf kalıntıları oluşturmaktadır. α -L-Araf kalıntılarının kendilerine ise sıklıkla O-2 pozisyonundan bir başka α -L-Araf veya β -D-Xylp kalıntısı bağlanmaktadır (bkz. Şekil 2.3 c). Birincil hücre çeperinde bulunan AcGAX'in omurgasını oluşturan ksiloz kalıntıları ise α -1,2 ve/veya α -1,3 bağları aracılığıyla tek veya çift olarak arabinozil kalıntılarıyla dallanmaktadır. Dikotiledonların ve monokotiledonların AGX ve AcGX yapılarında bulunan indirgenmiş uçtaki Xylp-1,4- β -D-Xylp-1,3- α -L-Rhap-1,2- α -D-GalpA-1,4-D-Xyl'den (dizin 1 olarak adlandırılır) oluşan tetrasakkarit dizisi ise otların AcGAX'inde bulunmamaktadır (bkz. Şekil 2.3). [31].

perlerin *Gnetophyta* üyeleri oluşturmaktadır ve bu grubun üyeleri *O*-asetil ksilan sentezlerler. *Gnetophyta* üyeleri tarafından sentezlenen ksilan ise dikotiledonlar tarafından sentezlenen AcGX'in belirlenemeyen arabinozil yan-zincirlerinin oranı ve uronik asit dallanmasının düşük miktarda olması gibi AcGX'in tipik yapısal özelliklerine de sahiptir [33, 31].

2.1.2.1.3. *O*-asetilarabinoksilan (AcAX)

Tahıl tanelerinin temel ksilanını oluşturan *O*-asetilarabinoksilan (AcAX) polimerinin omurgasını ksilopiranozil (Xylp) birimleri oluşturmaktadır ve Xylp birimleri 3. veya hem 2. hem de 3. pozisyonlarından α -L-arabinofuranoz (Araf) birimleriyle dallanır. Hem endospermik hem de perikarpik dokularda bulunan ve oldukça dallanmış olan AcAX, tekli- ve ikili-dallanmış Xylp birimlerinin sıklığı ve dağılım motifi açısından farklılık göstermektedir. Daha az dallanmış AcAX moleküllerinin ise selüloz mikrofibrillerine bağlanabildiği gösterilmiştir [31].

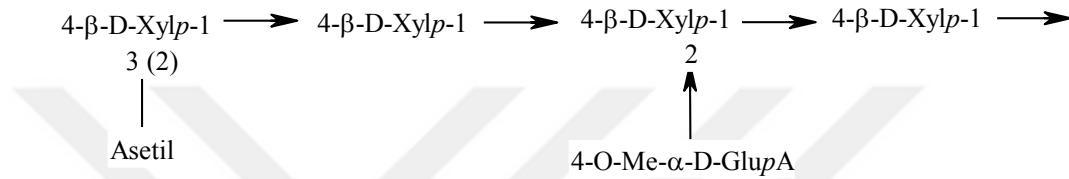
2.1.2.1.4. Asetil-4-*O*-metilglukuronoksilan (AcGX)

Evrimsel olarak en gelişmiş bitkiler olan kavak (*Populus* sp.) gibi sert odunların ve *Arabidopsis thaliana* gibi otsu dikotiledonların ksilan oranı toplam kuru ağırlığın %15-30'u arasındadır ve asetil-4-*O*-metilglukuronoksilan (AcGX) (kısaca glukuronoksilan da denilen) yapısındadır [34]. AcGX, β -1,4 glikozidik bağlar ile bağlanan D-ksilopiranoz (Xylp) birimlerinden oluşan bir omurgadan oluşmaktadır. Bu AcGX'ler uzunluk açısından eş-dağılımlıdır (*Arabidopsis*'te yaklaşık 100 kalıntı) ve ortalama olarak her on ksiloz kalıntısından birisi *O*-2 pozisyonundan (4-*O*-metil)- α -D-glukuronik asit (Me-GlupA) ile dallanmaktadır (Şekil 2.4). Çeşitli sert odunlardan izole edilen AcGX'in yapısındaki Xylp: Me-GlupA oranı ise 4-16:1 arasında değişmektedir.

Glikozil dallanmalarına ilaveten AcGX'in ksiloz omurgasında sıklıkla *O*-asetil esterleri de bulunmaktadır ve bu tip dallanma AcGX'de en bol bulunan dallanmadır. Örneğin, kavak ve *Arabidopsis* AcGX omurgasındaki ksilaz kalıntılarının yarıdan fazlası *O*-asetillenmiştir. AcGX omurgasındaki ksiloz kalıntıları 2. ya da 3. pozisyonundaki C'dan tek olarak asetillendikleri gibi bu iki karbonun her ikisinden de asetillenebilirler. *O*-2 pozisyonunda Me-GlupA taşıyan ksiloz kalıntıları ise *O*-3 pozisyonundan asetillenebilirler. Kavak ve *Arabidopsis* AcGX'inde *O*-2 veya *O*-3'den tek asetillenme en sık görülen asetil kalıntısıdır ksiloz kalıntılarının %34-49'ununda gerçekleşmektedir. İkili asetillenmiş ksiloz kalıntılarının oranı ise %6-7 civarındadır. *O*-2'den Me-GlupA ile dallanmış ksiloz kalıntılarının ise neredeyse tamamı *O*-3'den asetillenir ve bu ksiloz kalıntıları, omurgayı oluşturan toplam ksilozun yaklaşık %10'una denk gelmektedir. Ksilandaki 2-*O* ve 3-*O*-asetil dallanmalarının oranını belirlemek ise asetil gruplarının aynı ksiloz halkası içinde *O*-2 ve *O*-3 pozisyonları arasında göç etmeleri nedeniyle zordur. Son zamanlarda

yapılan çalışmalar ise *Arabidopsis*'de *O*-asetilasyon dağılımı motifinin ardışık olarak (bir atlama-lı olarak her iki ksiloz kalıntısından birisinin) gerçekleştiğini ve GX omurgasına sistematik olarak *O*-asetil gruplarının eklendiğine işaret etmektedir [31, 32].

AcGX'in β -1,4-D-Xylp omurgasından ayrı olarak, indirgenmiş ucunda Xylp-1,4- β -D-Xylp-1,3- α -L-Rhap-1,2- α -D-GalpA-1,4-D-Xyl'den (dizin 1) oluşan farklı bir tetrasakkarit dizisi içermektedir (bkz. Şekil 2.3 b). Bu indirgenmiş tetrasakkarit dizisinin hücre çeperindeki işlevi ise hala bilinmemektedir. Bu farklı diziyi referans olarak kullanarak, *Arabidopsis*'deki ve bazı sert odun türlerindeki AcGX polimerlerinin her birisinin yaklaşık 100 ksiloz kalıntısından oluşan polimerleri tanımlanmıştır [31]



Şekil 2.4. Glukuronoksilanların omurgası ve yan-dallanma oluşturan grupların bağlanma pozisyonları [32].

2.1.3. Hemiselülozun Selüloz ve Lignin İle Etkileşimi

Hemiselülozun temel yapısı olan ksilan, yapısal olarak selüloza benzer olup, omurgasını ise β -1,4-bağlı ksiloz kalıntıları oluşturmaktadır. Omurgayı oluşturan ksiloz kalıntıları ise hem C1 hem de C1pozisyonlarında ekvatoryal oksijen atomlarına sahiptirler. Yaygın olan bu şeker geometrisi, polisakkarit omurgasının selüloza komplementer (eşlenik) olan bir moleküler şekille sonuçlanmasına yol açar [35]. Atalla ve ark. [36] tarafından *Acetobacter xylinum* ile yapılan bir çalışmada, bu bakteri tarafından üretilen ksilanların anında selüloz fibrillerine bağlandığını rapor edilmiştir. Bu çalışma, hücre çeperinin birleştirilmesi esnasında ksilanın fiziksel özelliklerinin, selülozun oryantasyonunu ve kümelenmesini (agregasyonunu) etkilediğinin kanıtıdır. Ayrıca, *in situ* etiketleme yöntemleriyle odunsu dokularda AcGX'in öncelikle, selülozun oryantasyonunu değiştirdiği bölgeler olan S tabakları arasındaki geçiş zonlarında lokalize olduğu gösterilmiştir [37-39].

Ksilan omurgasının dallanma tipi ve dallanmaların dağılım motifi ise kesinlikle ksilanın kendi kendine ve hücre çeperindeki diğer polimerlerle olan etkileşimi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Seyrek olarak dallanmış ksilanların selüloz mikrofibrillerine karşı daha yüksek bir ilgi (affinite) gösterdikleri ve hatta *O*-asetil dallanmasının az olmasını ise ksilanın selüloza adsorbsiyonunda bariz bir etkisinin olduğu rapor edilmiştir [40-42]. Bunun aksine, son zamanlarda gerçekleştirilen moleküler dinamik benzetim (simülasyon) çalışmaları ise ksilan dallanmasının, ksilanın selüloza bağlanmasını sınırlamaktan ziyade bağlanmayı kararlı hale getirdiğini

göstermiştir. Görünüşe göre birbirinin zıttı olan bu sonuçlar ise seyrek olarak dallanmış ksilanın selüloza adsorbsiyonunun artmasının nedeninin, düşük derecede dallanmanın ksilanın kendisiyle etkileşim kurmasına yol açtığı ve böylece ilave ksilan moleküllerinin biraraya gelerek yığılmasına yol açtığı ve bu yığılmanın da doğrudan selüloza bağlandığı şeklinde bir hipotezle rasyonelize edilmiştir [43, 44].

Ksilan yapısıyla ilişkili güncel modeller, ksilanın solüsyon içerisinde iken kazandığı üç-boyutlu helikal döngü konformasyonunun ise selüloz ile etkileşime geçtiğinde iki-boyutlu düz heliks yapısına dönüştüğü şeklindedir [42]. Ksilan omurgasına bağlı olan ve çift ksiloz kalıntısıyla birbirinden ayrılan ve bu nedenle de ksilan kurdelasının sadece bir yüzünde yer alan GluA ve /veya O-asetil ise ksilan ile hidrofilik selüloz yüzeyi arasında hidrojen bağlarından oluşan bir ağın meydana gelmesini sağlar. Hidrofobik yüzeylerde ise ksilan omurgasındaki ardışık dallanmaların ksilanın selüloz ile bağlanmasını güçlendirdiği önerilmektedir [43].

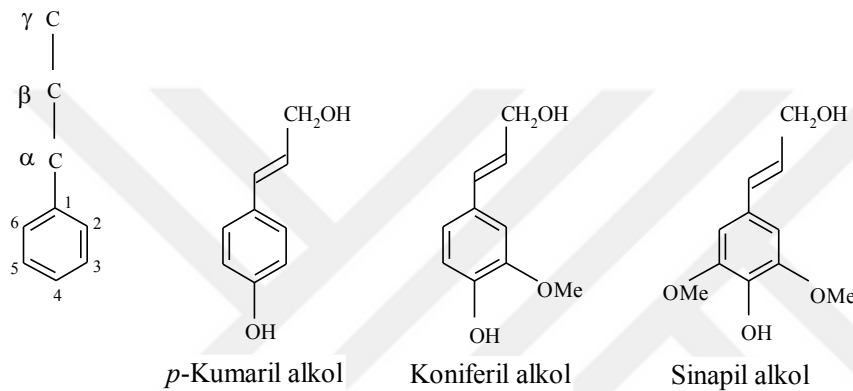
Lignoselülozik biyokütlenin ikincil hücre çeperinde ksilanın selüloz ile etkileşimine ilaveten, ksilan fiziksel ve/veya kovalent olarak lignine de bağlanır ve böylece bu polimerlerin sıkı bir matriks oluşturmasını sağlar. Otların ikincil çeperindeki GAX'lerin ise ferulatları aracılığıyla lignin ile oldukça yaygın çapraz-bağlı ko-polimerizasyonlar oluşturduklarına dair kuvvetli kanıtlar bulunmaktadır (bkz. Şekil 2.3 c ve Şekil 2.8) [45-47]. Sert odunlarda ve diğer dikotiledonlarda ise GX'lerin Me-GulpA dalları yoluyla lignin ile esterlendikleri düşünülmektedir. Çeşitli odunsu türlerden lignin-karbohidrat kompleksleri izole edilmiştir, fakat bu moleküler kompleksin yapısı hakkında çok şey bilinmemektedir. Son zamanlarda farklı hücre çeperi kompozisyonlarına sahip *Populus* genotipleriyle yapılan bir çalışma ise ksilan ile lignin arasında yakın bir etkileşimin olduğunu ve ksilan asetilasyonunun derecesinin ise hücre çeperinin üç temel bileşeni arasındaki etkileşimi etkilediğini ve izotermal-olmayan bir yığma (batch) reaktöründe %0,3 H₂SO₄ ile ön-mumamelenin verimliliğini etkilediğini göstermiştir [48].

2.1.4. Lignin

Lignin, bitki hücre duvarında en çok bulunan diğer bir bileşiktir. Lignin, latince odun (lignum) anlamına gelen kelimedenden türetilmiştir. Lignin kelimesi ilk defa 1819 yılında de Candolle tarafından kullanılmıştır. Ligninin bitki hücrelerinin çeperine katılması, bitkilere Yerküre'nin karasal alanlarını fethetme şansı vermiştir. Çünkü lignin bitkilerin mekanik dayanıklılığını arttırmış ve böylece 100 metreyi aşabilen uzunluklarıyla yukarıya doğru dik olarak büyüye-bilmişlerdir.

Hücre çeperinde yer alan lignin, selüloz ve hemiselüloz matriksine gömülmüş halde bulunmaktadır [34, 49]. 1897'de Peter Klason, lignosülfonatların kompozisyonunu çalışmış ve ligninin kimyasal olarak koniferil alkol ile ilişkili olduğunu, 1907' de ise ligninin

makromoleküler bir madde olduğunu, 1917’de ise koniferil alkol birimlerinin eter bağlarıyla birbirine bağlandığını ileri sürmüştür. Lignin, Klason’un öne sürdüğü gibi fenolik yapıda bir polimer olup yapısının büyük kısmını sinapil, *p*-kumaril ve koniferil alkoller oluşturmaktadır (Şekil 2.5). Bu yapıtaşlarındaki hidroksil gruplarının reaksiyonu ile üç-boyutlu kompleks bir fenilpropan polimeri olan lignin molekülünü oluşturmaktadır [14, 50]. Bir başka tanımlama ile lignin, bir aromatik çekirdek ile bir propan zincirinden oluşmaktadır [51] ve fenil propan olarak adlandırılmaktadır [52]. Lignin hidroksil grupları gibi metoksil grupları da içeren, karmaşık yapıya sahip bir polimerdir [53]. Lignin içerdiği karbonhidrat olmayan fenolik maddeler sayesinde bitkiye mekanik destek ve mikrobiyal parçalanmalara karşı direnç gibi özellikler sağlar [54]. Hücre duvarında yapıştırıcı özelliğinden dolayı selüloz liflerini bir arada tutar [14, 50].



Şekil 2.5. *p*-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolün kimyasal yapısı.

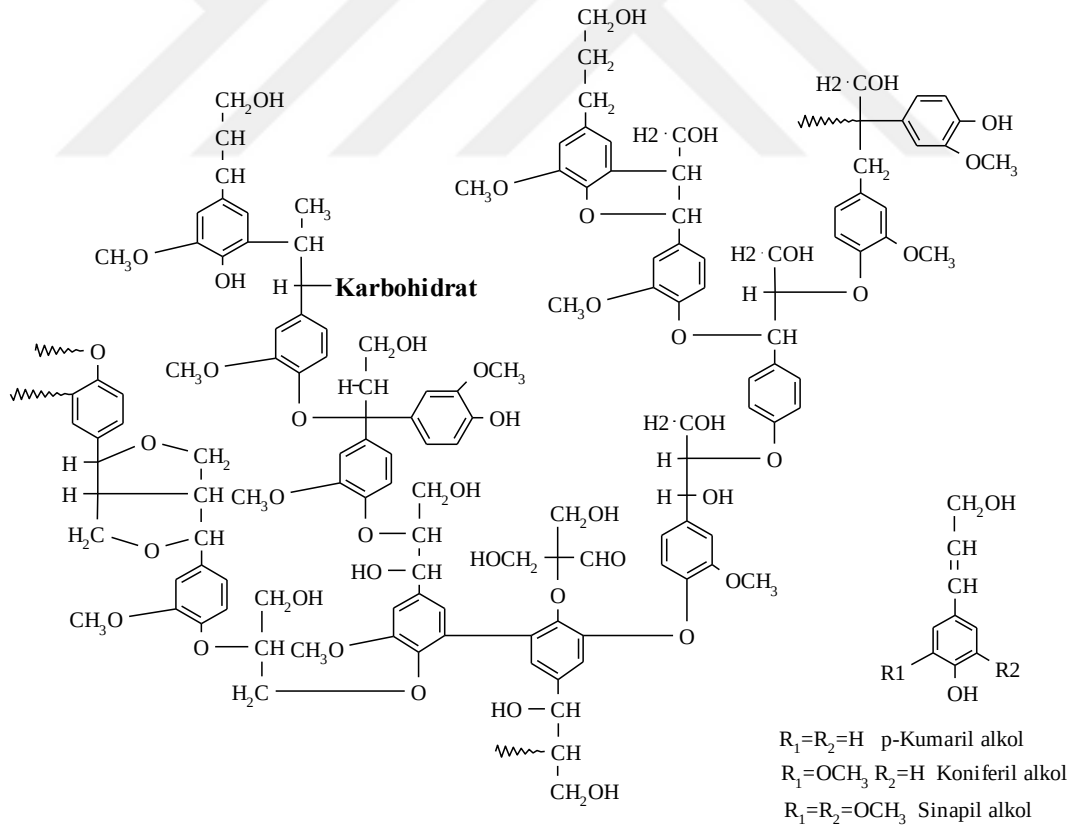
Ligninin kimyasal olarak polisakkaritlerle bağlı bulunduğu ortaya çıkmıştır. Ligninin izolasyonu aşamasında maddenin doğasının bozulmasından dolayı yapılan birçok çalışmaya rağmen lignin hakkında yeterli bilgi elde edilememiştir. Bu yüzden lignin doğada bulunduğu biçimiyle elde edilememiş, asıl madde yerine türevleri incelenmiştir [55]. Ligninin polimerik yapısının büyük kısmını oluşturan sinapil, *p*-kumaril ve koniferil alkoller Şekil 2.5’de gösterilmiştir. Bileşimindeki alkoller içinde esas bileşen olan koniferil alkol, kozalaklı ağaçların lignininde %90, yayvan yapraklı ağaçların lignininde ise %50 oranında bulunur [56].

Lignin, yapısal özelliklerine göre birkaç sınıfa ayrılmaktadır: **(i)** Yumuşak odunsu bitkilerde bulunan ve yapısında sinapil alkol olan “guasil lignin”. **(ii)** Sert odunsu bitkilerde bulunan, yapısında ise koniferil alkol ve sinapil alkol bulunduran “guasil-siringil”; monomerik birimlerin oranı ise 4:1’den 1:2’ye kadar değişmektedir. **(iii)** Sıkıştırılmış odunlarda bulunan “*p*-hidroksifenil lignin” olup, normal guaikal birimlerinin yanı sıra yüksek oranlarda *p*-hidroksifenil tipte fenilporpan birimleri içermektedir [57].

Lignin asitlerle hidroliz olmayan, hidrofobik (su sevmeyen) bir polimerdir. Bu sebeple polimer farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Lignin, kimyasal ve enzimatik parçalanmalara karşı doğadaki en dirençli polimerlerden birisidir ve %72 (w/w) sülfürik asitte bile çözün-

mez. Ligninin kompleks yapısında güçlü kovalent bağlar vardır. C-C ve eter bağları lignini hidrolik olaylara karşı dirençli yapar. Bu bağ, alkali, ılımlı oksidasyon, nitrobenzen oksidasyonu gibi işlemlerle kırılır. Lignin; kâğıt üretiminde kükürtdioksit, sodyum sülfite ya da sodyum hidroksit gibi maddeler yardımı ile lignoselülozik materyallerden ayrılır [55]. Aynı zamanda bitki hücre duvarındaki veya mikroorganizmalarla üretilen peroksidazlar ya da lakkazlar bu monomerleri okside ederek lignini parçalayabilirler [58].

Ligninin biyolojik olarak parçalanabilmesi oldukça güç olup, hücre duvarının diğer kısımlarının kullanılabilirliğini azaltmaktadır. Şimdiye kadar lignini tek karbon kaynağı olarak kullanabilen hiçbir organizma bulunamamıştır. Ligninin tek karbon/enerji kaynağı olarak mikroorganizmalar tarafından kullanılamaması standart zenginleştirme yöntemleri ile lignini parçalayan mikroorganizmaların izolasyonunu güçleştirmektedir. Ligninin mikroorganizmalarca parçalanması *Actinomycetes*'ler (özellikle *Streptomyces* spp., *Streptomyces viridoendosporus* ve *Streptomyces setonii*) ve *Basidiomycetes*'ler kullanılarak çalışılmıştır [55, 59]. *Basidiomycetes*'ler beyaz-çürükçül mantarlar olup, kompleks ekstraselüler enzim sistemleri ile seçici olarak lignin polimerini uzaklaştırarak selülozun elde edilmesine olanak sağlar [60]. Şekil 2.6'da ligninin şematik bir yapısal formülü görülmektedir.



Şekil 2.6. Bir yumuşak odun lignininin şematik yapısal formülü [61].

Lignin, temelde odun dokularında mekanik bir role sahip olmasına rağmen, (örneğin, mekanik streslere karşı dirençlilik kazandırarak ve hücreler arasında bağlayıcı ajanlar olarak) su geçirmeyen ksilem damarlarının, bitki patojenlerinin gerçekleştirdiği mikrobiyal saldırılara karşı dirençliliğini de sağlamaktadır [62, 63].

Ligninin kimyasal yapısının karmaşık olması bu maddeden yararlanmayı zorlaştırdığı için daha çok yakıt olarak kullanılır. Bununla beraber ligninin birçok alternatif kullanımı mevcuttur. Bu kullanımlara; kimyasal dönüşüm ürünleri (vanilin, dimetilsülfid, fenoller, benzen türevleri gibi), çeşitli makromoleküler (emülsiyon stabilizatörü, pıhtılaştırıcı ve çökteltici maddeler, vs.), karbonlaştırma, pirolizleştirme (aktif karbon, karbon veya grafit lifleri ve köpükler), toprak ve gübre uygulamaları örnek gösterilebilir [64]. Ayrıca küçük bir kısmından yapıştırıcı ve kaplama olarak yararlanılmaktadır [53].

2.2. Lignoselüloz Yıkımında Rol Alan Enzimler

Teknolojik amaçlı kullanımlar için geliştirilebilir aktiviteye sahip farklı enzimlere olan ihtiyacın artması, araştırmaları, bu gibi enzimlerin kaynağını yüksek organizasyonlu hayvan ve bitkilerde [örneğin; bayırturpu ve şalgam köklerinden HRP (**H**orseradish **P**eroxidase)] aramak tansa, mikroorganizmalarda, özellikle de ekolojileri ve sekonder metabolit üretimleri hakkında çok iyi dokümantasyona sahip olunması nedeni ile *Actinobacteria* ve *Fungi* üyelerinde, aramaya daha çok yönlendirmiştir. Mikroorganizmalardan izole edilen enzimler günümüzde, ilaç endüstrileri ve moleküler biyolojide olduğu kadar, gıda işlemlerini ve deterjan üretimini de içerisine alan çeşitli işlemlerde kullanılmaktadır. Üretilen bu enzimler içerisinde selülazlar, hemiselülazlar ve kitinazlar gibi bir takım hidrolitik enzimler vardır [65]. Lignoselülozun biyoyıkımında ise selülazlar, hemiselülazlar, peroksidazlar ve lakkaz rol almaktadır. Bunlara ek olarak bazı akse-suar enzimler ise hidrojen peroksit üretiminde iş görürler. Glioksal oksidaz (GLOX) ve aril alkol oksidaz (AAO) bu gruba dahil olan enzimlerdendir [66].

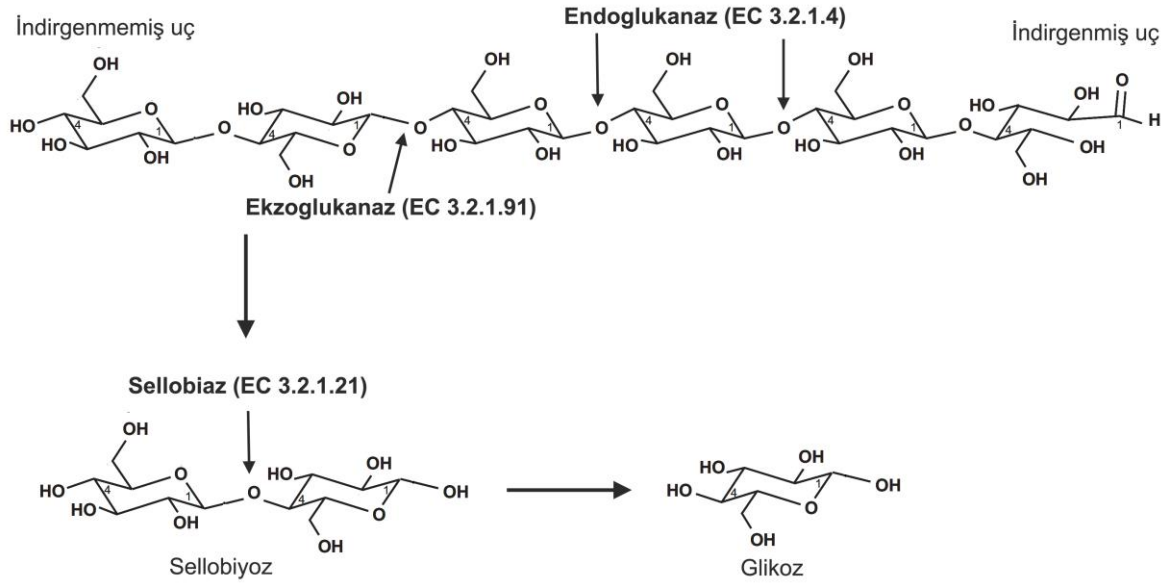
2.2.1. Selülazlar

Aktinomisetlerdeki selülazlar, genel olarak fungal selülazlardakine benzer bir şekilde rol oynarlar [32]. Selüloolitik enzimler, mikroorganizmalar tarafından besiyeri içine salgılanırlar ve sinerjistik olarak görev yapan kompleks bir enzim karışımı oluştururlar [67]. Funguslardakine benzer olan aktinomisetlerdeki selüloolitik sistem başlıca üç çeşit enzim içermektedir (Şekil 2.7):

i. Endoglukanazlar: Endoglukanazlar (1,4- β -glukan glukonahidrolaz, EC 3.2.1.4) β -1,4-glikozidik bağlarını rastgele kırarlar.

ii. Ekzoglukanazlar: Ekzoglukanazlar (1,4- β -D-glukan sellobiyohidrolaz, EC 3.2.1.91) selüloz zincirinin indirgenmemiş uçlarından sellobiyozları oluşturacak şekilde kırma yaparlar.

iii. Sellobiazlar: (β -glukozidaz, EC 3.2.1.21) sellobiyozu, glukoz birimlerine hidrolize ederler.



Şekil 2.7. Selüloz parçalayan enzimlerin işlevsel koordinasyonunun şematik gösterimi.

2.2.2. Hemiselülazlar

Hemiselülozun yapısı, selülozun tekrarlamalı glukoz bloğu tipi yapısından daha kompleksir. Ksilan, hemiselülozda bulunan en yaygın iskelet yapısıdır. Bununla birlikte, hemiselüloz yapısı aynı zamanda, hidrolizi gerçekleştirebilmek için daha kompleks bir enzimler takımı gerektiren, dallanmış hetero-polisakkaritlere sahiptir. Monomerler arası bağları rastgele ayıran enzimlerin (endo- enzimler), zincirin sonundan monomerleri uzaklaştıran enzimlerin (ekzo- enzimler) ve dimerleri hidrolize eden enzimlerin birlikte çalışmasına ihtiyaç vardır. Bu enzimler, endo-1,4- β -ksilanaz (1,4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz; EC 3.2.1.8), β -ksilozidaz (1,4- β -D-ksilan ksilohidrolaz; EC 3.2.1.37), α -glukuronidaz (EC 3.2.1.139), α -L-arabinofuranozidaz (EC 3.2.1.55) ve asetil ksilan esterazı (EC 3.1.1.72) içerir. Dallanmış asetil ksilanın karbonhidrat monomerlerine tamamen yıkımının elde edilebilmesi doğrultusunda hemiselülolitik enzimlerin birlikte çalışması gerekmektedir [65].

Ksilanazların özellikleri hakkındaki mevcut bilginin çok büyük bir kısmı, bakteriyel ve fungal enzimler üzerine yapılan çalışmalardan köken almaktadır. Mikrobiyal ksilanazlar 8-145 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklarının yanı sıra tek alt-üniteli proteinlerdirler [53]. Bakteriyel ve fungal kaynaklardan elde edilen endoksilanazların optimum aktivite sıcaklıkları 40 °C

ile 60 °C arasındadır. Fungal ksilanazlar, genellikle bakteriyel ksilanazlara kıyasla daha az termostabildirler. Bakteriler, yüksek moleküler ağırlıklı asidik ksilanazlar ve düşük moleküler ağırlıklı bazik ksilanazlar olmak üzere iki tip ksilanaz üretirler. Bununla birlikte bu tarz bir ilişki funguslarda gözlenmez, fakat düşük moleküler ağırlıklı bazik ksilanazlar funguslarda yaygındır [68].

Ksilan omurgasından ksilozun eldesi için ise ksilanaz enzimleri devreye girmektedir. Ksilanaz enzimleri, ksilandaki β -1,4-D-ksilozidik bağlarını zincirin iç kısımlarından hidrolizle kıran glikosidazlardır (Şekil 2.8). Bunlar, hücre metabolizması için karbon kaynağının sağlanmasında ve bitki patojenlerince bitki hücresinin enfeksiyonunda gerekli olan ve doğada yaygın bir enzim grubudur [69]. Ksilanın, heterojen ve karmaşık yapısı nedeni ile tamamen hidrolizi, işbirliği içerisinde ilişkili geniş bir grup mikrobiyal enzimi gerektirmektedir ki bu grubu oluşturan enzimler şunlardır (Şekil 2.8) [69]:

- 1) Ksilan omurgasındaki iç glikozid bağları rast gele kıran **β -1,4-endoksilanazlar** (1,4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz; EC 3.2.1.8).
- 2) Ksilobiyozu ksiloza hidrolize eden, başka bir deyişle ksilooligosakkaritleri indirgen olmayan uçlarından kıran **β -D-ksilosidazlar** (1,4- β -D-ksilan ksilohidrolaz; EC 3.2.1.37).
- 3) Ksilandaki arabinoz yan-zincirlerini hidrolize eden **α -L-arabinofuranosidazlar** (EC 3.2.1.55).
- 4) Ksiloz gruplarından glukuronik asit yan-zincirlerini ayıran **α -D-glukuronidazlar** (EC 3.2.1.139).
- 5) Asetat gruplarını serbestleştiren **asetil-ksilan esterazlar** (EC 3.1.1.72).
- 6) Ksilan ile lingin matriksi arasındaki bağı kıran **ferulik asit esterazlar** (EC 3.1.1.73).
- 7) Ksilan ile lingin matriksi arasındaki bağı kıran **p-kumarik asit esterazlar** (EC 3.1.1.-).
- 8) Ksilan omurgasının indirgenmiş ucundaki uç glikozid bağları kıran **ekzo- β -1,4-ksilanazlar** (β -D-ksilopiranozill-(1→4)- β -D-ksilopiranoz indirgen-uç ksilanaz; EC 3.2.1.156).

Şekil 2.8’de ksilanaz enzimlerinin ksilan omurgasındaki etki noktaları şematik olarak gösterilmektedir.

sında üretilirler [77]. Bununla birlikte aktinomiset peroksidazları primer metabolizma esnasında üretilir [75, 76, 78].

Mangan-bağımlı peroksidazlar, ligninin ve çeşitli fenolik lignin model bileşiklerinin oksidasyonunu ve depolimerizasyonunu hidrojen peroksit vasıtasıyla katalizlemektedir [79]. Ayrıca azo boyalar [80] ve fenolik organo kirleticileri [81] içeren diğer substratlara dayalı aktivitelerden de sorumludurlar. Adından da anlaşılacağı gibi MnP'nin etki şekli, mangan iyonlarının bulunmasına bağlıdır. MnP, mangan iyonları ile indüklenir ve Mn(II)'yi Mn(III)'e oksitlerler. Mn(II)'nin oksidasyon ürünü olan Mn(III), oksalat ya da glikolat gibi iyonu stabilize eden ve enzinden salınmasını destekleyen organik asitlerle şelatlanmak zorundadır [82, 83].

Bunların yanı sıra LiP ve MnP, fungusların en iyi büyümeyi gösterdiği ve enzimlerin optimum pH'larının yakınında çalıştıkları, en düşük pH değerlerinde ve mezofilik ortamlarda lignin depolimerizasyonunda önemli bir rol oynamakla birlikte, ekolojik yönden en önemli peroksidaz gruplarından birisini oluştururlar [65].

2.2.4. Lakkazlar

Lakkaz enzimleri (benzendiol:oksijen oksidoredüktaz, E.C. 1.10.3.1) doğada oldukça yaygın olarak bulunmaktadır. Lakkaz adı ise ilk kez 1883 yılında bu enzimin tanımlanmış olduğu Japon vernik ağacı (lacquer) olan *Rhus vernicifera*'dan türetilmiştir [84]. Daha sonraları ise şeftali, firavun inciri, tütün ve kavak gibi çok sayıdaki bitkide de lakkaz enzimlerinin varlığı belirlenmiştir. Lakkaz enzimleri bitkilerde yaygın olarak bulunmasına rağmen, bitkisel lakkazların karakterizasyonu ve kullanımı mikrobiyal kökenli lakkaz enzimlerine göre çok da yaygın değildir.

Şimdiye kadar karakterizasyonu yapılmış olan lakkaz enzimlerinin büyük bir çoğunluğunun kaynağını ise genellikle iyi bir lignin parçalayıcısı olan beyaz-çürükçül funguslar oluşturmaktadır. İyi bilinen lakkaz üreticileri arasında *Podospora anserina*, *T. versicolor*, *Polyporus ostreatus* (yeni adı, *Trametes cubensis*), *Neurospora crassa*, *A. bisporus*, *Botrytis cinerea*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*, *Coriolus (Trametes) polyporus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Chaetomium thermophilum* ve *Coprinus cinereus* gibi çok sayıda fungus bulunmaktadır [85].

Geniş bir substrat aralığına sahip olan fungal lakkazların, fenolik bileşiklerin polimerizasyonunu, depolimerizasyonunu, metilasyonunu ve/veya demetilasyonunu katalizledikleri bilinmektedir. Ayrıca fungal lakkazlar, bitki patojenitesinde, ligninin parçalanmasında, meyvelenme yapılarının pigmentasyonunda, eşeysel farklılaşmada, hücre lizisine dirençlilikte ve detoksifikasyonda rol almaktadırlar [85].

Aktinomisetlerde lakkaz enzimlerinin varlığına dair ilk çalışmalar substrat özgüllüğü göstermeyen reaksiyonlara dayalı olarak başlamış olsa da [86] daha sonraki yıllarda yapılan

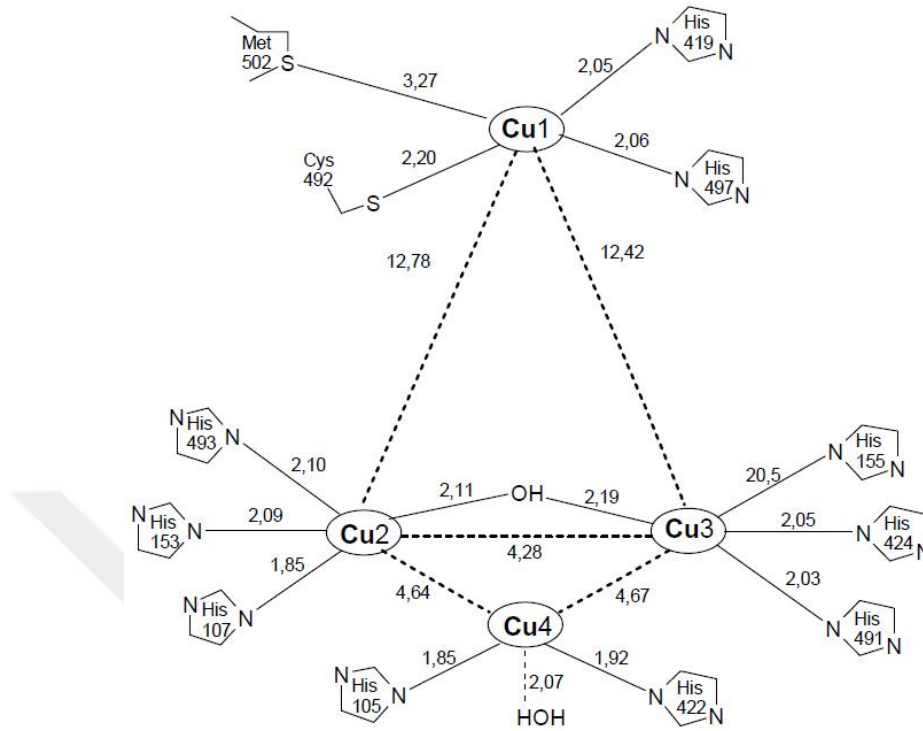
çalışmalarla lakkaz enzimlerinin varlığı *S. Griseus* [87], *S. cyaneus* [88], *S. lavendulae* [89], *S. coelicolor* [90] ve *Streptomyces psammotus* [91] için doğrulanmıştır. *S. griseus* tarafından üretilen ekstrasitoplazmik fenol oksidaz (EpoA) proteini ise amino asit dizininin benzer olması ve tirozini okside etmezken DOPA'yı okside ederek melanin pigmenti üretmesi gibi hem fizikokimyasal hem de biyokimyasal olarak lakkaz veya lakkaz türünden bir enzim olarak karakterize edilmiştir. *S. griseus* tarafından üretilen EpoA proteininin ifadesi ise rekombinant rEpoA olarak *E. coli* hücresinde sağlanmıştır. rEpoA ise homotrimer olup, 114 kDa moleküler kütleye sahiptir ve lakkaz enzimleri için model substrat molekülleri olan guaikol ve şiringaldazin gibi moleküllerin oksidasyonunu gerçekleştiremediği gibi göreceli olarak çok daha dar bir substrat özgüllüğüne sahiptir. EpoA enziminin ise *Streptomyces* sp. türlerinin morfogenezinde rol aldığı görülmektedir [87, 92].

Spektroskopik olarak farklı olan 3 tip bakır iyonuna sahip olmaları nedeniyle lakkaz enzimleri (EC 1.10.3.2; *p*-difenol:dioksijen oksidoredüktazlar), çoklu-bakır içeren mavi proteinler sınıfına dâhil edilmektedirler. Lakkaz enzimleri, çeşitli substitüye fenolik bileşikler, aromatik aminleri ve hatta bazı inorganik bileşikler dahi elektron akseptörü olarak moleküler oksijeni kullanarak oksitleyebilmektedirler. Lakkaz enzimlerinin oldukça geniş bir çeşitlilikteki substratlar üzerinde aktivite gösterebilme yeteneği, son zamanlarda bu enzimlerin tekstil boyalarının renk giderimleri, kâğıt hamurunun biyolojik olarak ağartılması ve biyoremediasyon gibi farklı biyoteknolojik uygulamalarda biyokatalizör olarak kullanılmalarına yol açmıştır. Lakkaz enzimleri organizmaların patojenitesinde, immünitesinde, morfogenezinde ve pigmentasyonunda rol aldıkları gibi lignin ve humik asit gibi kompleks organik maddelerin metabolize edilmesinde de rol almaktadırlar [85].

Lakkaz enzimlerinin moleküler yapısı genellikle funguslardan izole edilen enzimlerden elde edilmiştir. Fungal lakkazlar, multimerik kompleksler oluşturacak şekilde oligomerize olan izoenzimlerden meydana gelmektedirler. Monomerlerin moleküler kütleleri ise 50-110 kDa arasında değişmektedir. Lakkaz enzimlerinin önemli bir özelliği ise protein kısmı kovalent olarak bağlanmış olan ve proteinin toplam kütesinin %10-45'ini oluşturan bir karbonhidrat kısmının da bulunmasıdır. Karbonhidrat kısım enzimin yüksek kararlılık göstermesine katkıda bulunmaktadır [85].

Lakkaz enzimlerinin katalitik aktivitelerini gösterilebilmeleri için, aktif olan her bir lakkaz proteini için en az 4 bakır atomu gerekmektedir. Bakır bağlama bölgeleri oldukça korunmuş özellikte olan lakkaz proteinlerinin her birinde bulunan bu bakır iyonlarının ışık absorbanları ve elektronparamanyetik davranışları farklıdır. Bu nedenle, lakkaz enzimlerinde bulunan bakır iyonları spektroskopik özelliklerine bağlı olarak üç ana sınıfta gruplandırılırlar. Lakkaz proteinlerinde bulunan bakır iyonlarından birisi Tip1 veya "mavi bölge" olarak adlandırılan bölgeye

bağlı iken, Tip2 ve Tip3 olarak adlandırılan bölgelerin oluşturduğu trinuklear kümeye bağlı olarak ise 3 bakır iyonu daha bulunmaktadır (Şekil 2.9):



Şekil 2.9. *Bacillus subtilis* lakkazının (CotA) bakır merkezleri [93].

Fungal kaynaklı üç veya dört bölge bulunduran tipik lakkaz enzimlerinden farklı olarak, *Streptomyces griseus* kaynaklı EpoA [94] ve *Streptomyces coelicolor* kaynaklı SLAC [95, 96] lakkazları ise sadece iki bölge içerirler. EpoA ve SLAC enzimleri arasındaki benzerlik %69 olmasına rağmen, EpoA aynı zamanda trimer olarak da aktivite göstermektedir. İkinci bölgenin bulunmadığı SLAC, bariz bir lakkaz aktivitesine sahip olup, lakkaz enzimlerinin karakteristik özelliği olan üç bakır bölgesinin de bu enzimde tam olarak bulunduğu ve NMR (Nükleer Manyetik Rezonans) sonuçlarına göre trinuklear kümenin var olduğu gösterilmiştir [95].

Lakkaz, bir oksidant olarak moleküler oksijeni kullanan, fenolik halkaları fenoksi radikallere okside eden, çok büyük bir çoğunlukla 60-80 kDa arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip olan, bakır içeren polifenol bir oksidazdır [97]. Lakkazlar, bir fenolik substratın ya da aromatik aminler ve diğer elektronca zengin substratların arkası arkasına dört tane 1-elektron oksidasyonu basamaklarıyla moleküler oksijenin suya indirgenmesini katalizlemektedirler [97]. Lakkaz bazı koşullar altında, örneğin reaksiyon karışımı ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonik asit)] ile [98] ya da diğer aracı moleküller ile desteklendiğinde, fenolik olmayan bileşikler de okside etme kapasitesine sahiptir. Bu enzim, fenolik halkaların (bu halkalara büyük gruplar bağlandığında) kırılmasına da neden olabilmektedir [99]. Lakkaz ayrıca sentetik dehidrogenasyon polimerizat (DHP) ligninini, suda çözünebilir ürünler verecek

şekilde de [100] modifiye eder ve demetilasyona neden olur [32]. Ekstrasellüler lakkazlar, tipik olarak beyaz-çürükçül funguslar tarafından üretilmektedirler [32, 101].

Rekombinant lakkazlar oldukça kolay bir şekilde *Trichoderma reesei* [102] ya da *Aspergillus oryzae*'de [102] üretilmektedir. Bundan dolayı lakkazın kağıt hamurunun enzimatik beyazlatılmasında, tekstil sanayisinde ve atıklardaki boyaların arıtılmasında, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH'lar) gibi çevre kirliliği oluşturan kirleticilerin biyoremediasyonunda kullanılma olasılığı gerçeğe uygundur. ABTS gibi sentetik ara ürünlerin keşfinden kısa bir süre sonra, doğal bir ara ürün olan 3-hidroksiantranilat (3-HAA) üzerine yapılmış olan bir çalışma ise Egert ve ark. [103] tarafından yayınlanmıştır. Lakkazla ilgili ilk raporlar 1880 gibi oldukça erken bir döneme rastlamasına rağmen bu enzim, lignin degrede eden bir enzim olarak uzun bir süre kayda değer görülmediğinden enzimin üç-boyutlu yapısı ancak 1990'lı yıllarda çözülmüştür [104].

2.3. Lignoselüloz Yıkımında Rol Alan Organizmalar

2.3.1. Lignoselüloz Parçalayan Bakteriler

Filamentöz olmayan bakteriler genellikle lignin preparasyonlarının %10'undan daha azını mineralize ederler ve sadece lignin degradasyon ürünlerine ilaveten, ligninin düşük moleküler ağırlığa sahip olan bölümünü degrede edebilirler. Böylece filamentöz olmayan bakteriler ligninin tam olarak mineralizasyonunda bazı roller oynayabilirler. Bu bakteriler arasında, *Pseudomonas* spp. en etkili degrede edici organizmalardır. Bununla birlikte bu bakteriler, ekstrasellüler oksidoredüktazlar üretmezler. Büyük moleküller, anlaşıldığı kadarıyla hücre içerisine transfer edilemezler. Bunların, polimerik lignine saldıramadığı açık bir şekilde görülmüştür [102].

Tayvan'da yapılan bir çalışmada, endo- β -1,4-D-glukanaz, ekzo- β -1,4-D-glukanaz, β -1,4-D-glukozidaz ve ksilanaz enzimlerinin aktivitelerini belirlemek için *Pseudomonas* sp. CL3 kullanılmıştır. Enzim aktiviteleri için optimum sıcaklık sırasıyla 50, 45, 45 and 55 °C olarak belirlenmiştir. Bütün enzimlerin aktivite gösterdikleri pH ise 6'dır [105].

Bir başka çalışmada ise, selüloz üretimi için *Bacillus tequilensis* S28 kullanılmıştır. Selüloz üretimi için pH 7'de, 150 rpm'de ve 37 °C'de 72 saatlik inkübasyon sonucu optimum besiyeri kompozisyonu; pepton (4,94 g/L), amonyum klorid (4,99 g/L), maya özütü (2 g/L), Tween-20 (0,53 g/L), kalsiyum klorid (0,20 g/L) ve kobalt klorid (0,60 g/L) olarak kaydedilmiştir [106].

2.3.2. Lignoselüloz Parçalayan Funguslar

Funguslar lignoselülitik materyali degrades edebilme yetenekleri doğrultusunda üç kategoride sınıflandırılmaktadırlar: beyaz-çürükçül funguslar, kahverengi-çürükçül funguslar ve yumuşak-çürükçül funguslar [107].

Beyaz-çürükçül funguslar, odun polisakkaritler ve ligninin her ikisine birden veya tercihen lignine saldırıp degrades ederek, lignoselülozu etkin bir biçimde degrades edebilir. Tipik olarak beyaz-çürümeye, etkilenmiş odundan her ne kadar tercihen sadece lignin uzaklaştırılsa da, sağlam odunda bulunan lignin ve polisakkaritlerin eşit biçimde uzaklaştırıldığı süngerimsi, ipiksi ya da yapraksı yapı olarak tanımlanan çürüklükler ortaya çıkmaktadır. Lignoselüloz degrades eden beyaz-çürükçül fungusların çoğu *Basidiomycetes*'e (örneğin; *Agaricaceae*, *Corticaceae*, *Hydnaceae*, *Polyporaceae* ve *Telesporaceae*) veya *Ascomycetes*'in *Sphaeriales* ordosuna (örneğin; *Ustilago vulgaris* ve *Xylaria polimorpha*) aittirler [65].

Kahverengi-çürükçül funguslar, konifer odunlarından selüloz ve hemiselülozu seçici biçimde uzaklaştıran, hem patojenik hem de saprofitik türleri içermektedir. Enfekte odun, çok hızlı biçimde doğal dayanıklılığını kaybeder. Ani ayrılmalar ve çürüyen odun fibrilleri boyunca kırılmalar meydana gelir. İlerleyen aşamalarda odun kübik, koyu kahverengi, çabucak dağılabilen parçalar haline almaktadır. Kahverengi-çürükçül funguslar, bazidiomisetlerdir ve tüm odun çürükçülü bazidiomisetler içerisinde azınlığı oluştururlar (%10-26). Kahverengi-çürükçül funguslar, lignin degradasyonu için gerekli olan oksidatif fenol oksidaz veya peroksidaz aktivitelerine sahip değildirler. Bununla birlikte selüloz hidrolizi için muhtemelen Fenton reaksiyonu ile üretilen düşük moleküler ağırlıklı şelatörleri, oksalatları ve hidroksil radikallerini içeren etkin bir mekanizma geliştirmişlerdir [65].

Yumuşak-çürümeye neden olan funguslar ise yüksek nem içeren ve suya doymuş oduna saldırabilirler. *Ascomycetes* ve *Deuteromycetes* (Fungi Imperfecti) üyesi funguslar, odunda genellikle yumuşak-çürüklüğe neden olurlar [108]. Kuruduğu zaman kırılan ve çatlayan çürümüş odun, kahverengi, yumuşak bir görüntüye sahiptir. Toprak, orman döküntüsü ve kompostlardaki başlıca karbonhidratları genellikle degrades ettiği düşünülen *Deuteromycetes* ve bazı *Ascomycetes*'e ait olan mikrofunguslar ve küfler, bu çevrelerde lignini de degrades edebilmektedirler. Aktinomisetler, bir orman toprağındaki ligninolitik mikroorganizmalar yönüyle, büyük bir dikkatle incelenerek seçilmiş 82 suş arasında baskın olmasına rağmen, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum* ve *Fusarium solani* gibi bazı mikrofunguslar da tanımlanmıştır [109]. Yumuşak çürümeye neden olan birçok *Aspergillus* sp., güçlü ksilanaz üreten türlerdir ve bunlar lignin model bileşiklerini de degrades edebilmektedirler. Fakat yüksek moleküler ağırlığa sahip olan lignin ya da ¹⁴C- işaretli sentetik dehidrogenasyon polimerizat (DHP) ligninini çok daha zayıf degrades ederler [110].

Pakistan’da CMCaz üretimi için yapılan bir çalışmada *Aspergillus versicolor* kullanılmıştır. İzolatın selüloolitik potansiyeli basit agar plaka yöntemi ile gösterilmiştir. En yüksek enzim üretimi, pH 4,0’de besiyerine %0,5 g karboksimetilselüloz, %0,2 g Tween 80, %0,075 g pepton, %0,050 g CaCl₂, %1,5 g NaNO₃ ve %0,2 g KH₂PO₄ ilave edildiğinde 120 s, 30 °C’de elde edilmiştir [111].

2.3.3. Lignoselüloz Parçalayan Aktinomisetler

Gerçek anlamda ligninolitik aktinomisetler üzerine yapılan çalışmalar, Crawford’un ve McCarthy’nin laboratuvarlarında (sırasıyla, Bakteriyoloji ve Biyokimya Bölümü, Idaho Üniversitesi, ABD ve Genetik ve Mikrobiyoloji Bölümü, Liverpool Üniversitesi, UK) yürütülmüş olmasına rağmen, doğal habitatlarda, lignin degradasyonunda aktinomisetler gibi bakterilerin işe karıştığı uzun süre şüphe uyandırmıştır [112]. 1954 yıllarında Hintli balıkçıların balık ağlarındaki çürümenin nedeni olarak *Streptomyces* ve *Nocardia* türlerine görülmüştür [113]. 1968 yılında, Sorensen adlı araştırmacı *in vivo* koşullarda lignin degradasyonunun toprak bakterileri vasıtasıyla gerçekleştiğini rapor etmiştir [114]. Bununla birlikte 1977 yılında, lignoselüloz degradasyonunun aktinomisetler vasıtasıyla gerçekleştiğinin reddedilemez kanıtı [¹⁴C]-lignin-işaretle lignoselülozun geliştirilmesinden sonra sağlanmıştır [115]. Crawford 1978 yılında [¹⁴C]-lignin-işaretle lignoselülozu, [¹⁴CO₂]’e okside edebilme yeteneğinde olan bir grup *Streptomyces* türü elde etmiştir [116]. *Streptomyces* genusuna ait olan filamentöz bakteriler, iyi bilinen lignin degradesi organizmalardır ve bunlar, etiketlenmiş ligninin %15’inden fazlasını, fakat bazen daha azını mineralize edebilirler [117]. Berrocal ve ark. [118], 9 tane *Streptomyces* spp.’nin gerçekleştirdiği ¹⁴C-[lignoselüloz]-buğday samanının mineralizasyonunu karşılaştırmıştır. *Streptomyces cyaneus* CECT 3335, ¹⁴C-[lignin] fraksiyonunun %45’ini solubilize eden ve işaretle karbonu 21 günde mineralize eden en etkili izolatlardan birisi olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte referans tür olan *S. viridosporus* ise aynı substratın %59’unu çözündürmüş, %4,5’ini de mineralize etmiştir [119]. 1980’li yıllarda Crawford’un çalışma grubu tarafından yürütülen birçok çalışmada, *S. viridosporus* T7A tarafından gerçekleştirilen lignoselüloz degradasyonunun sonuçları ortaya konmuştur. Aynı yıllarda, McCarthy’nin çalışma grubu, Paul Broda ile birlikte temeli Manchester’da kurulan ve daha sonra Liverpool’a taşınan, lignoselüloz degradesi eden aktinomisetlerin seçilmesini konu alan aktif bir araştırma programına başlamıştır. Bu çalışmalar sonucunda, *Micromonospora*, *Streptomyces* ve *Thermomonaspora* generalarına ait olan organizmaların lignoselülozu degradesi etme aktivitesine sahip oldukları ve en yüksek lignoselüloz degradasyonunun ise *Streptomyces* sp. MT813 ve *Thermomonaspora mesophila* tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir [120].

Tuncer ve Ball [121], *Thermomonospora fusca* BD25 tarafından üretilen ekstraselüler lignoselüloolitik enzimlerle, substrat olarak kullanılan yulaf ksilanının %28,9'unun hidroliz edildiğini rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar, substrat olarak öğütülmüş buğday samanı ve solubilize kraft hamurunu kullandıklarında ise bu materyallerin hidroliz oranlarının yulaf ksilanına oranla, sırasıyla 4- ve 6-kat daha az olduğunu, fakat bu iki substratın içerdikleri hemiselüloz miktarları dikkate alındığında ise hemiselülozun hidroliz oranlarının yine sırasıyla %22,2 ve %25,9 olarak gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Brezilya'da yapılan bir çalışmada, selüloz yıkımını gerçekleştiren *Streptomyces* sp. SLBA-08 kullanılmıştır. Bu tür, azot kaynağı olarak farklı derişimlerde amonyum sülfat ve farklı karbon kaynakları kullanılarak (sisal ağacı küspesi, şeker kamışı posası, saman) mineralli bir besiyerinde batık kültür fermentasyonu altında selüloz üretimi için test edilmiştir. 48 saat sonra besiyerinde %2,4 (w/v) sisal ağacı küspesi ve %0,3 amonyum sülfat içeren karboksimetilselülazın (1,11 U/mL) en yüksek üretimi gerçekleşmiştir. Optimal pH ve sıcaklık sırasıyla 6,0 ve 50 °C olarak belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar *Streptomyces* sp. SLBA-08'in lignoselülozik kalıntıları kullanarak (özellikle sisal ağacı küspesi) karboksimetilselülaz (CMCaz) üretme yeteneğinin olduğunu gösterilmiştir [122].

Bir başka çalışmada ise *Streptomyces viridosporus* T7A tarafından buğday samanı biyolojik yıkımının mekanizmasını keşfetmek için ileri Fourier dönüşümlü kızılötesi, piroliz gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi ve ¹³C çapraz-polarization NMR analizi yapılmıştır. Sonuçlar, artan karbonhidrat/lignin oranı ile *S. viridosporus* T7A'nın lignin ve hemiselülozları uzaklaştırdığını göstermiştir. Ayrıca kompleks lignin yapısındaki karbonil ve metoksil gruplarının önemli bir değişikliğe uğradığı aşıkardır. Ayrıca, kantitatif (nicel) analizler neticesinde lignin yıkımının guaiasil biriminin eksikliğinden dolayı kaynaklandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, bakteriler aracılığıyla lignin yıkımının anlaşılması için yeni bir bakış açısı sağlanmıştır [123].

2.4. Hint Yağı Bitkisi

Hint yağı (*Ricinus communis* L.) bitkisi *Euphorbiaceae* familyasından değerli bir yağ bitkisi. Dik, yuvarlak, çok dallı, parlak, soluk yeşil veya kırmızıdan mora kadar değişen bir gövde yapısına sahiptir (Şekil 2.10). Bitki boyu 1,5–3 metre arasında değişmektedir. Hint yağı bitkisi meşe palamuduna benzeyen bir bitkidir. Çok dallı, tek veya çok yıllık bir ağaç veya çalı şeklinde görünür. Soğuk ve kurak yerlerde bitki sadece tek yıllık ama tropik bölgelerde çok yıllık olarak yetişebilmektedir [124].

Euphorbiaceae (Sütlegengiller) familyasının bir türü olan *Ricinus communis*, Güney Asya, Afrika, Hindistan'ın tropik, subtropik ve ılıman bölgelerinde yetiştirilmektedir [125]. Hint yağının askeri amaçla kullanılmasından dolayı üretim değerleri gizli tutulmaktadır. Bu nedenle

dünya hint yağı üretim değerleri kesin olarak bilinmemektedir. Bazı literatürlere göre; bu bitki Mısır, Cezayir ve Fas gibi Kuzey Afrika ülkelerinde yetiştirilmektedir. Bununla birlikte Avrupa'da Fransa, Romanya, Rusya ve Ukrayna'da da üretimi vardır. Ayrıca Amerika'nın Kuzey Kansas, Missouri, Kuzey Indiana, Tennessee, Oklahoma ve Teksas'ın bazı bölgelerinde de yetiştirilmektedir. İngiltere'nin kışı çok soğuk ve dondurucu olmayan bazı bölgelerinde de tarımı yapılmaktadır. Dünyada en çok ithalatını yapan ülkeler ise Fransa ve ABD'dir. Dünyada hint yağı üretimi ve ihracatı en fazla olan ülkeler Hindistan, Brezilya, Filipinler, Paraguay ve Çin'dir. Bu ülkelerin dışında dünyanın çok değişik bölgelerinde de hint yağı bitkisi yetiştirilebilmektedir [126].

Türkiye'deki yetiştigi yerler ise genellikle Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri olmakla birlikte, özellikle Adana, Aydın, Antalya, Bursa, Diyarbakır ve Elazığ illeridir. Türkiye'nin çevre ve toprak koşulları hint yağı ekimine uygun olmasına rağmen, maalesef hint yağının tarımı ülkemizde çok yapılmamaktadır. Oysa bu bitkinin birçok alanda kullanılması nedeniyle tohumunu ve yağını elde etmek için çok fazla miktarda döviz ödenmektedir. Türkiye'de hintyağı bitkisi yol kenarlarında ve bahçelerde süs bitkisi olarak kendiliğinden yetişmektedir. Bu bitki sadece küçük alanlarda ekilmektedir ve tarımı oldukça basit yapılmaktadır [126].

Türkçe'de; Dedemene, Hint-baklası, Kene tohumu ve Hint çiçeği adlarıyla bilinmektedir. Hint yağı bitkisinin kromozom sayısı $2n = 20$ 'dir ve bu tür (*Ricinus communis*) farklı alt türlere sahiptir. Bunlar *Ricinus communis persicus* (İran), *Ricinus communis chinesis* (Çin), *Ricinus communis zanzibarensis* (Zegebar), *Ricinus communis sanguinens* (Krismon) ve *Ricinus communis cambogensis* (Mor) türleridir [9].



Şekil 2.10. Hint yağı bitkisinin genel görünümü.

Hint yağıın tohumlarından elde edilen yağ ve bu yağın elde edilmesi sırasında pres ar-tığı olarak çıkan küspesi kullanılmaktadır. Tohumlardan %50-60 oranında yağ elde edilir. Hint yağı; risinoleik, izorisinoleik, stearik ve dihidroksi stearik asitlerin gliseritlerinden oluşmakta-dır. Küspesinde çok zehirli olan risin bulunmaktadır [9, 126].

2.4.1. Hint Yağı Bitkisinin Kullanım Alanları

Hint yağı bitkisinin kullanıldığı birçok alan vardır. Sarımsı veya renksiz yağından, tohu-mundan küspesine kadar birçok ürününden faydalanılmaktadır. Örneğin sanayide, tıpta, giyim kumaşlarında, poliamid naylon yapımında, elektrik yalıtım malzemelerinde, sinek kağıdı, vernik, aydınlatıcı ve plastik madde yapımında da kullanılmaktadır [127].

Hint yağından Türk Kırmızısı olarak bilinen Sulforasinalat etken maddesi elde edilmek-tedir. Bu bileşik kumaş boyacılığında kullanılmaktadır. Hint yağı bitkisi sinek ve sivrisinekleri uzaklaştırmaktadır. Bu ağacın olduğu bahçelerde, köstebek ve böcekler bulunmamaktadır. Ayırı-ca hint yağı akkarınca (termit), diğer zararlı böcekler ve mantarları yok eden ilaçların yapımın-da da kullanılmaktadır [9].

Ekonomik açıdan önemli olan bu bitkinin diğer bir özelliği ise lastik ve kauçuk üretimin-de önemli doğal kaynak sayılmasıdır. Kozmetik ürünlerde, özellikle jöle ve saç toniği yapımında da kullanılmaktadır [126].

Ayrıca uzun yıllardan beri ABD ve birçok ülke tarafından askeri amaçla kullanılan bir bitkidir. Uçak motorlarının yağlanması ve patlayıcı madde yapımında değerlendirilmektedir [128]. Aynı zamanda yazıcı, daktilo ve baskı mürekkeplerinde ve sabun üretiminde de kullanıl-maktadır. Gövdesinden elde edilen selüloz ise mukavva, karton, kağıt ve duvar kağıdı yapımında değerlendirilmektedir. Hint yağı dehidrate edilince erken kuruma özelliğine sahip olduğundan özellikle boyacılık ve vernik sanayisinde kullanılmaktadır [9]. Bu bitkinin özelliklerinden birisi de suya dayanıklılığıdır. Hint yağı naylon sanayisinde de kullanılmaktadır [129].

Hint yağı tohumunda fitik asit formunda %90 oranında fosfor bulunduğundan zengin bir fosfor kaynağıdır. Hint yağı toksin etkisi olduğu için birçok ülkede yemeklik yağ olarak kulla-nılmamaktadır. Yemeklik yağ olarak kullanılabilmesi için ilk önce toksin etkisinin giderilip, daha sonra kullanmaya başlanması istenir ve bu işlem çok zor ve pahalıdır [9]. Hint yağında bulunan ve zehirli etkisi olan risin maddesi ise biyoterör saldırılarında kullanılmaktadır. Örneğin; Rusya, İngiltere, İtalya, Almanya ve Fransa gibi ülkeler savaş esnasında bu bitkinin tohumlarını insan-lar ve hayvanları (atları) öldürmek için kullanmışlardır [124].

Hint yağı bitkisinin yağı, özellikle hassas motorlar için motor ve makine yağı olarak, uçak motorlarında, ayrıca motosiklet ve bisiklet motorlarını yağlamak için ve popüler yakıt katkısı olarak da kullanılmaktadır. Hint yağı seker, çikolata ve paketlenme sanayisinde, küflenmeyi en-

gelleyen madde olarak kullanılmaktadır. Hint yağı gıda sanayisinde, gıda katkısı olarak meyve tat vericisi olarak kullanılmaktadır [130].

Tıp alanında birçok kullanımı olmasından dolayı hint yağına “her derde derman” (iksir) adı verilmektedir. Ağrı kesici olarak, panzehir, müshil, acıyı dindirme amacıyla emülsiyon ve ekspektoran olarak kullanılmaktadır. Ayrıca arterit (mafsal iltihabı), astım, kanser, kolera, grip, köpek ısırması, epilepsi (sara hastalığı), baş ağrısı, iltihaplanma, kas ağrıları, romatizma, yanma, yara, karın ağrısı, cilt kabarmaları, tümör ve idrar yolu iltihabı hastalıklarının tedavisinde hint yağının tohumu ve yağından faydalanılmaktadır [131]. Bağırsak röntgeni gibi radyolojik incelemelerde 60 g kullanılması tavsiye edilmektedir, çünkü hint yağı tüm bağırsakların boşaltılmasına neden olmaktadır. Hint yağının müshil etkisinin (200 yıldan beri bilinen) sebebi ise içinde bulunan risinoleik asittir. Hint yağı çok zehirli olmasına rağmen, bu etkiye neden olan risin maddesi anti tümör özelliğine de sahiptir bu nedenle kanser araştırmalarında ve kemoterapide kullanılmaya başlanmıştır [9]. Doğum kontrol ilaçlarındaki kullanımının yanı sıra, doğum sancısını azaltma etkisi de bulunmaktadır. Ayrıca bu bitki sindirim sisteminde, zehirlenme ve hazımsızlık gibi bazı problemlere de iyi gelmektedir.

2.5. Aktinobakteriler

2.5.1. Aktinobakterilerin Genel Özellikleri

Aktinobakteri isminin kökeni “lumpy jaw” (aktinomikosis) olarak adlandırılan hastalığa sebep olan bir mikroorganizmanın gözlemlendiği 1877’lere kadar uzanmaktadır. Bu mikroorganizma kemiklerde çoğalarak dokuya zarar vermektedir. Bu mikroorganizmanın yayılması sonucu yüzün yan tarafında şişme ve iltihap meydana gelmekte, hayvanın gıda tüketebilmesini engellemektedir. Carl Otto Harz, hastalık etmeni olan bu mikroorganizmayı incelemiş ve infektif dokunun merkezinde ince filamentlerin bulunduğunu, dışta ise konidiya olarak adlandırılan yuvarlak ya da oval yapıları tespit etmiştir. Konidiyaların bazı mantarlarda üreme biçimi olmasından ve filamentlerin fungal hiflere benzemesinden dolayı, bu mikroorganizmaya ineklerde bulunan ipliksi fungus anlamında *Actinomyces bovis* denilmiştir [2, 132].

Aktinobakteriler mantar benzeri filamentli bakterilerdir. Gram pozitifler [2]. İpliğimsi ya da yuvarlak şekilli dallanmalar gösterirler ve hif olarak adlandırılan bu yapılar miselyumları meydana getirir. Vejetatif büyüme sırasında havasal ve substrat hifleri gelişir. Üremeleri sporlanma ile gerçekleşir. Aktinobakteriler; prokaryot olmaları, filament uzunluklarının 1 µm’yi geçmemesi, hücre duvarında kitin ve glukan gibi maya ve küflerde bulunan polimerlerin olmayışı, anti-fungal ilçalardan etkilenmemesi, anaerobik formlarının bulunabilmesi gibi nedenlerden dolayı bakteri olarak sınıflandırılmaktadır [132].

2.5.1.1. *Streptomyces* spp.

Streptomyces üyeleri doğada geniş bir yayılma alanına sahiptir. Doğada, özellikle de karasal ortamlarda sayıca bol miktarda bulunurlar. Bu sayı saprofit organizmalar olmaları ile ilişkili olup, ortamdaki organik madde içeriğine bağlıdır. Bunun yanında *Streptomyces*'ler, tatlı su ve deniz suyu ortamlarında da dağılışı gösterirler. Araştırmacılar bu doğal ortamlardan sayısız *Streptomyces* izole etmişlerdir [133].

Topraktaki *Streptomyces*'lerin gelişmesi, çok sayıdaki diğer mikroorganizmaların gelişme davranışına benzer. Besin devamlılığının sağlanamadığı ortamlarda gelişmeyi durdururlar ve sporları dıştan besin gelmediği müddetçe dormant durumda kalmayı sürdürürler [134]. Pfenning [135], *Streptomyces*'lerin tipik hayat döngüsünü, toprak mikro-florası üzerinde direkt inceleme metodunu kullanmak suretiyle göstermiştir. Çimlenen sporlar, vejatatif miselyumlar ile kolonize olurken, havasal miselyumları toprak partiküllerine doğru büyür ve en son spor oluşumu ile hayat döngüsünü tamamlar. Oluşturdukları hareketsiz sporlar hem üreme hem de yayılma aracıdır.

Streptomyces dağılışı ve aktivitesine öncelikli olarak etki eden ekolojik faktörler pH, sıcaklık derecesi, organik madde muhtevası ve toprak tipidir. Asidofilik *Streptomyces*'ler asidik topraklarda yaygın olarak bulunurlar [136]. Asiditesi yüksek olan ortamlar genellikle nemli iklimin hüküm sürdüğü organik maddece fakir alanlardır. Bu tip asiditesi yüksek ortamlarda yüksek asiditeye adapte olmuş türler yayılışı gösterir. Bu türler, kitinaz [137] ve diastaz [138] enzimleri üretirler. *Streptomyces asidophilus* asidik topraklarda yaşamaya adapte olmuş bir türdür. Nötrofilik *Streptomyces*'lerin asidik topraklarda düşük sayısı bulunmasının nedeni ise asidik ortamlarda gelişme kabiliyetlerinin düşük olması [139] ve sporlarının asiditeye dirençli olmamasındandır [138].

Sıcaklık derecesi ve pH gereksinimine göre gruplanmış *Streptomyces*'ler doğada da farklı ortamlarda yaşama imkânı bulurlar. Bunun nedeni farklı fizyolojik grupların farklı gereksinimlerinin olmasındandır. Sıcaklık gereksinimine göre farklılaşan termotolerant ve termofilik *Streptomyces*'ler çürümüş bitki atıklarında, gübrede, küflü saman ve tahıl taneleri gibi sıcaklık derecesinin yüksek olacağı yaşama ortamlarında ilginç bir gelişme döngüsü gösterirler. Bu organizmalar toprak [140], domuz dışkısı [141], kanalizasyon çamuru [142] ve tatlı su gibi birçok farklı habitatlardan izole edilmişlerdir.

Streptomyces'ler çoğunlukla insanlar tarafından çeşitli amaçlar için kullanılan organik materyallerin ayrıştırılmasında da önemli rol oynarlar. Lacey [143], son zamanlarda doğal ve sentetik maddelerin ayrıştırılması üzerine geniş bir araştırmayı tekrar başlatmış ve bu çalışma ile *Streptomyces*'lerin çoğu maddeleri ayrıştırdıkları kanıtlanmıştır. Pamuk ve bitki fibrilleri,

yün, uçak yakıtındaki hidrokarbonlar ve endüstriyel emülsiyonlar, kauçuk ve plastikler gibi organik ve sentetik materyaller *Streptomyces* türleri tarafından ayrıştırılırlar [144, 145].

2.6. Çalışmanın Amacı

Aktinomisetlerin yeni tanımlanmış türleri olan halotolerant *Amycolatopsis cihanbeyliensis*, *Nocardia goodfellowi*, *Nocardia thraciensis* ve *Actinomadura geliboluensis* türlerinin yanı sıra, kompost ve toprak gibi habitatlardan izole edilerek lignoselülitik aktivite gösterdikleri tespit edilen yeni aktinomiset izolatlarının:

- i. Katı besiyerinde lignoselülitik aktivitelerinin belirlenmesi,
- ii. Lignoselülitik aktiviteye sahip izolatların *Ricinus communis* kaynaklı lignoselülitik materyal içeren sıvı kültürlerde endoksilanaz üretme düzeylerinin belirlenmesi,
- iii. Sıvı kültürde endoksilanaz enzimlerini yüksek düzeyde üreten ve tanımlanmamış olan izolatların, 16S rRNA gen bölgesi nükleotid dizisine dayalı filogenetik analizlerinin yapılması,
- iv. Endoksilanaz enzimlerinin biyofiziksel karakterizasyonunun yapılması,
- v. *Amycolatopsis cihanbeyliensis*, *Nocardia goodfellowi*, *Nocardia thraciensis* ve *Actinomadura geliboluensis* türlerinin yanı sıra, yeni izolatların *Ricinus communis* kaynaklı lignoselülitik materyali yıkma kapasitelerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar aksi belirtilmediği sürece Sigma (Sigma Chemical Co., Louis, USA), Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ve Alfa Easer (A Johnson Matthey Company, Ward Hill, USA) firmalarından mevcut olan en yüksek saflık derecesinde temin edilmiştir.

Çalışma sırasında kullanılan petri kutuları, erlenmayerler, beherler ve pipetler gibi tüm cam malzemeler otoklava dayanıklı olacak şekilde temin edilmiş olup deterjanlı su ile yıkandıktan sonra saf su ile durulanmış ve 60 °C'de 1 gece süresince kurutulduktan sonra kullanılmıştır. Pipetler ve petri kapları gibi steril olarak kullanılacak cam malzemeler ise yıkamaya ilaveten pastör fırınında 180 °C'de 3 saat inkübe edildikten sonra kullanılmıştır. Besiyeri içeren erlenler ve mikropipet uçları ise otoklavda 121 °C'de 0,124 MPa basınç altında 15 dakika süre ile steril edilmiştir.

Çalışma sırasında elde edilen izolatların ve tanımlı suşların katı besiyerlerinde geliştirilmesi için Nüve marka EN400 model (Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Ticaret A.Ş., Ankara, Türkiye) inkübatör kullanılmıştır. Mikroorganizmaların sıvı kültür ortamında geliştirilmesi için ise N-BIOTEK marka NB-205 model orbital çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

Besiyerleri içeren erlenlerin, izolasyon amaçlı kullanılan ¼ ringer çözeltisi gibi kimyasalların buhar basıncı temelli sterilizasyonu için J.P. Selecta marka Presoclave II 80 model otoklav kullanılmıştır. Otoklavlama işlemi numunelerin cihaz içerisinde 121 °C ve 15 psi (1,02 kg/cm³) basınçta 15 dakika süresince bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Santrifüjleme işlemleri için Eppendorf marka 5804 model (Eppendorf AG, Hamburg, Almanya) ve Hettich marka Universal 32R model (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Almanya) soğutmasız ve Sigma marka -30 K model soğutmalı santrifüjler kullanılmıştır. Cihazın kullanımı sırasında santrifüjlenecek çözeltinin hacmine göre 1,5 mL (F45-30-11 kodlu rotor), 15 mL (1271 kodlu rotor) ve 50 mL'lik (19776 kodlu rotor) falkon tüplere uyumlu farklı rotorlar kullanılmıştır.

Çalışma sırasında kültür sıvılarının değiştirilmesi amacıyla ultrafiltrasyon üniteleri olarak Amicon marka 8010 (10 mL) ve 8200 (200 mL) model (Millipore Corporation, Bedford, ABD) sistemler kullanılmıştır. 200 mL hacme sahip olan hücre, rutin olarak fermentasyon sıvısının değiştirilmesinde kullanılırken; 10 mL hacme sahip olan ünite daha çok değiştirilmiş

küçük hacimli örneğe ihtiyaç duyulduğunda kullanılmıştır. Ultrafiltrasyon üniteleri ile birlikte kullanılan 10 kDa moleküler kütle seçiciliğindeki Diaflo PM10 membranlar da Amicon'dan sağlanmıştır. Amicon hazneleri ile yürütülen deriştirme süreçlerinin tümü azot basıncı altında ve 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ultrafiltrasyon membranları %20 etanol ve %0,05 sodyum azid içeren çözelti içerisinde +4 °C'de saklanmıştır.

Hazırlanan besiyerlerinin, tamponların ve çözeltilerin pH'sı Hanna marka HI 2210 model (Hanna Instruments, Washington, ABD) pH ölçerle belirlenmiştir.

Enzimatik aktivitelerin tayini ve protein miktarı tayininin belirlenmesi sırasında Thermo Scientific marka Multiskan Go model Elisa Okuyucu (Thermo Scientific Inc., Waltham, ABD) kullanılmıştır.

Enzim analizlerinin elektroforetik tayinlerinde Atto firması tarafından üretilen AE6220 ve AE6450 modeli (Atto, Japonya) jel tankları kullanılmıştır. Minyatür, dikey tabaka jel ünitesi olan AE6450 sistemi, küçük hacimli protein örneklerinin hızlı elektroforezi için kullanmıştır. Güç kaynağı olarak ise Consort E312 kullanılmıştır.

Tez hazırlanırken metin düzenleyicisi olarak Word (v12, Microsoft Corporation, Washington, ABD), kimyasal formül düzenleyicisi olarak da ISIS Draw (v2.5, Symyx Technologies, California, ABD) yazılımları kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında elde edilen verilerin grafiklere dönüştürülmesi için ise Excel (v12, Microsoft Corporation, Washington, ABD) ve SigmaPlot (v11, Systat Software, Illinois, ABD) yazılımlarından yararlanılmıştır.

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında bakterilerin izolasyonu, saflaştırılması, çoğaltılması ve saklanması gibi amaçlar için içerikleri ve adları Tablo 3.1-Tablo 3.12'de belirtilen besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerleri distile su ile hazırlanmıştır. Otoklavlanmadan önce tüm besiyerlerinin pH'sı NaOH veya HCl kullanılarak pH 7,0-7,5'e ayarlanmıştır.

Tablo 3.1. Nişasta-Kazein Agar besiyerinin bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Nişasta	10 g
Kazein	0,3 g
KNO ₃	2 g
NaCl	2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 g
CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
K ₂ HPO ₄ (%20'lik stok solüsyon)	10 mL
Agar	12 g
Sikloheksimit	50 mg
Distile su	1000 mL

Tablo 3.2. Gause's No:1 Besiyeri bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Nişasta	20 g
KNO ₃	1 g
NaCl	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.3. ISP-4 Besiyeri bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Nişasta	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	3 g
Agar	20 g
Distile su	10000 mL

Tablo 3.4. Ksilanaz Tarama Besiyeri 1 bileşenleri.

Bileşen	Miktar
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,04 g
Oat spelt ksilan	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.5. Ksilanaz Tarama Besiyeri 2 bileşenleri.

Bileşen	Miktar
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,04 g
Birchwood ksilan	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.6. Selülaz Tarama Besiyeri bileşenleri.

Bileşen	Miktar
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,04 g
CMC	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.7. Amilaz Tarama Besiyeri bileşenleri.

Bileşen	Miktar
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,04 g
Nişasta	1 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.8. Lakkaz Tarama Besiyeri 1 bileşenleri.

Bileşen	Miktar
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,04 g
Glukoz	1 g
RBBR	0,04 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.9. Lakkaz Tarama Besiyeri 2 bileşenleri.

Bileşen	Miktar
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,04 g
Glukoz	1 g
Poly R-478	0,04 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.10. Lakkaz Tarama Besiyeri 3 bileşenleri.

Bileşen	Miktar
KNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,05 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,04 g
Guaiacol	1 mL
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.11. ISP-2 Besiyeri bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Maya özütü	4 g
Malt özütü	10 g
Glukoz	4 g
Agar	10 g
Distile su	1000 mL

Tablo 3.12. MS-YEM Besiyeri bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Karbon kaynağı	0-15 g
Maya özütü	6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g
NaCl	0,3 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
CaCO ₃	0,02 g
İz element solüsyonu	1mL
Distile su	1000cmL
İz element solüsyonu	
FeSO ₄ .	0,1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
Distile su	100 mL

İnokulasyondan sonra agar besiyerindeki kültürler 30 °C'de ve 50 °C'de etüvde, sıvı besiyerindeki kültürler ise amaca uygun olarak 30 °C'de ve 50 °C'de, 48-96 saat süre ile orbital çalkalamalı inkübatörde 120 rpm çalkalama hızında inkübe edilmişlerdir.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tamponların Hazırlanması

Nükleik asit elektroforezinde kullanılan 10X Tris-Borat-EDTA Tamponu stok çözeltisi (10X TBE) hazırlamak için ilk olarak 108 g Tris ve 55 g borik asit 800 mL distile su içinde çözülmüş ve üzerine 40 mL 0,5 M Na₂EDTA (pH 8,0) ilave edilmiştir. Daha sonra, karışım distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Çalışma sırasında stok çözelti 1/10 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılacak fosfat tamponu için ilk olarak 0,2 M sodyum dihidrojen fosfat dihidrat çözeltisi (A) ve 0,2 M di-sodyum hidrojen fosfat dodekahidrat çözeltisi (B) hazırlanmıştır. Tablo 3.13.'de belirtildiği gibi arzu edilen pH derecesine uygun olarak X mL A çözeltisi ve Y mL B çözeltisi birleştirilerek 0,2 M fosfat tamponu hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan bu tampon uygun oranda distile su ile seyreltilerek daha düşük molaritede fosfat tamponları elde edilmiştir.

Tablo 3.13. Fosfat tamponunun hazırlanması.

pH	6,0	6,4	7,0	7,2	7,6	8,0
X mL A	87,7	73,5	39,0	28,0	13,0	5,3
Y mL B	12,3	26,5	61,0	72,0	87,0	94,7

Çözeltilerdeki ya da kültür süpernatantında bulunan protein miktarının tahmini için kullanılan Bradford çözeltisi 50 mL metanol içerisinde çözündürülmüş 50 mg Coomassive Brilliant Blue G-250 üzerine 100 mL % 85'lik (v/v) fosforik asit (H_3PO_4) ve 850 mL distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti Whatman No: 1 filtre kâğıdından süzildükten sonra +4 °C'de koyu renkli şişede saklanmıştır.

3.1.4. Poli Akrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) ve Zimogram Sırasında Kullanılan Çözeltiler

Endoksilanaz aktivitesinin konumlarının ve izomer sayılarının belirlenmesi için Doğal-PAGE yöntemi kullanılmıştır.

Doğal-PAGE için akrilamid-bis akrilamid solüsyonu 30 g akrilamid ve 0,8 g bis akrilamidin toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözündürülmesi ile hazırlanmıştır.

Ayırıcı jel tamponun hazırlanması için 18,16 g (1,5 M) Trisma Base, önce yaklaşık 60 mL distile suda çözündürülmüş ve HCl ile pH'sı 8,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra çözelti distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Yükleme jel tamponunun hazırlanması için 6,8 g Trisma Base (0,5 M) yaklaşık 60 mL distile suda çözündürülmüş ve HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlanmıştır. Daha sonra çözelti distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Tank (rezervuar) tamponunun hazırlanması için ilk olarak 30,3 g Trisma Base ve 144 g Glisin 1 L suda çözündürülerek 10X'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanmış stok çözelti 10-kat seyreltilerek kullanılmıştır.

Jellerin hazırlanması esnasında, polimerizasyonun başlatılması amacıyla Amonyum persülfatın (APS) %10'luk çözeltisi kullanılmıştır.

Örnek yükleme tamponu, 1 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8), 2 mL gliserol ve % 0,05 bromfenol mavisi içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Boyama solüsyonu, 1 g Coomassive Blue (Brilliant Blue R)'nin 500 mL etanol, 100 mL glasiyel asetik asit ve 400 mL su bulunan karışım içerisinde çözündürülmesi ile hazırlanmıştır.

Boyanmış jellerdeki proteinin görünür hale gelmesi için kullanılan yıkama solüsyonu olarak 50 mL etanol, 850 mL su ve 100 mL glasiyel asetik asitten oluşan karışım kullanılmıştır.

3.1.5. PZR ve Agaroze Jel Elektrofrez İçin Gerekli Çözeltiler

27 Forward primeri (AGA GTT TGA TCA TCA TGG CTC AG) ve 1492 Revers primeri (TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T) liyofilize halde Sentromer DNA Teknolojileri'nden temin edildikten sonra 100 µM stok çözeltisinin hazırlanması için üzerlerine sırasıyla 634 µL ve 670 µL

nükleazsız su ilave edilmiştir. Hazırlanan çözelti $1/10$ oranında seyreltilerek $10 \mu\text{M}$ 'lık çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

DNA ladder (DNA merdiveni) hazırlanması için $40 \mu\text{L}$ nükleazsız su, $10 \mu\text{L}$ merdiven (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder) ve $10 \mu\text{L}$ 6X yükleme boyası (Thermo Scientific) karıştırılmıştır.

Jellerdeki DNA'nın görüntülenmesi amacıyla kullanılan EtBr 10 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışma sırasında, hazırlanan bu solüsyondan 100 mL 'lik jel içerisine $5 \mu\text{L}$ eklenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Alınması, Hazırlanması ve Bakterilerin İzolasyonu

Çalışma sırasında kullanılan aktinobakterilerin izolasyonu için toprak örnekleri Mersin'in Kale, Limonlu, Ayaş, Çiftlikköy ve Kuyuluk bölgelerinden alınmıştır.

Örnekler, tespit edilen bölgelerdeki organik maddece zengin, hayvan gübresince yoğun, lignoselülozik atığın bol bulunduğu topraklar, kompost, aktif çamur ve küflü yemlerden alınmıştır. Tespit edilen nokta steril bir spatula ile yüzeyden 5 cm derinliğe kadar kazılarak her bir noktadan 100 g 'dan fazla toprak örneği alınmıştır. Alınan topraklara $1/1$, $1/10$ ve $1/100$ (w/w) oranında CaCO_3 eklenerek 1 hafta bekletilmiştir. Bekletilen örnekler 45 dak boyunca 50°C 'ye ayarlı etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra, aseptik koşullarda fizyolojik tuzlu su içinde homojenize edilmiş, steril tüplerde 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} seyreltmeleri hazırlanmıştır. Tüplerden alınan $100 \mu\text{L}$ örnek Nişasta-Kazein Agar, Gause's No:1, ISP-4 besiyerine yayılmış ve petriler mezofilik bakterilerin izolasyonu için 30°C 'de, termofilik bakterilerin izolasyonu için ise 50°C 'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında yayma ekim yapılan agar yüzeyinde farklı renk ve biçimlerde gözlemlenen koloniler ayrı kod numaraları verilerek ardı ardına yapılan çizgi ekim ile saflaştırılmıştır. İzolatlar $+4^\circ\text{C}$ 'de ISP-2 besiyerinde korunmuştur.

3.2.2. Selüloz, Ksilanaz, Amilaz ve Lakkaz Aktivitelerinin Katı Besiyerinde Taranması

Selüloz ve ksilanaz aktivitesinin tespiti için ksilanaz tarama besiyeri 1 ve 2 kullanılmıştır. İzolatlar bu besiyerlerine nokta ekim yapıldıktan sonra petriler 30°C 'de ve 50°C 'de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petriler $10 \text{ dak } \%0,1$ 'lik Kongo Red çözeltisi ile boyanmıştır. Boyama sonrasında besiyeri yüzeyi 1M NaCl ile yıkanmıştır. Kırmızıya boyanan besiyeri üzerinde nokta ekim yapılan yerlerde gelişen kolonilerin etrafında açık renkli bir zon

oluşuyorsa bu izolatların potansiyel selüloz ve ksilanaz üreticisi olduğu düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak iki enzim için zon/koloni çapı oranı en büyük olan zonları meydana getiren izolatlar çalışmalarda kullanılmak için seçilmiştir.

Amilaz aktivitesinin tespiti için amilaz tarama besiyeri kullanılmıştır. İzolatlar bu besiyerlerine nokta ekim yapıldıktan sonra petriler 30 °C'de ve 50 °C'de 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra petriler %0,3 I₂ ve %0,6 KI karışımı ile boyanmıştır. Kolonilerin etrafında açık renkli bir zon oluşuyorsa bu izolatların amilaz üreticisi olduğu düşünülmektedir.

Lakkaz aktivitesinin tespiti için ise lakkaz tarama besiyeri 1, 2 ve 3 kullanılmıştır. Besiyerine nokta ekim yapılmış 30 °C'de ve 50 °C'de 7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonundaki açık renkli zonlar gözlemlenmiştir.

3.2.3. İnokulum Hazırlanışı

İzole edilen aktinobakterilerin spor ve/veya hif fragmentlerinin 10 mL steril fizyolojik tuzlu su (%0,9 NaCl) içerisinde, aseptik koşullar altında süspansiyonları hazırlanmış ve bu süspansiyon inokulum olarak kullanılmıştır. Hazırlanan bu örnek süspansiyonu her bir erlene, erlendeki besiyeri hacminin %2'sine denk gelen hacim kadar ilave edilmiştir. İnokulum sıvısından katı besiyerlerine de ekimler yapılarak, inokulumdaki koloni oluşturan birim (kob) hesaplanmıştır. Buna göre, kullanılan inokulumların mikrobiyal yükü ortalama $1,5 \times 10^5$ kob/mL olarak hesaplanmıştır.

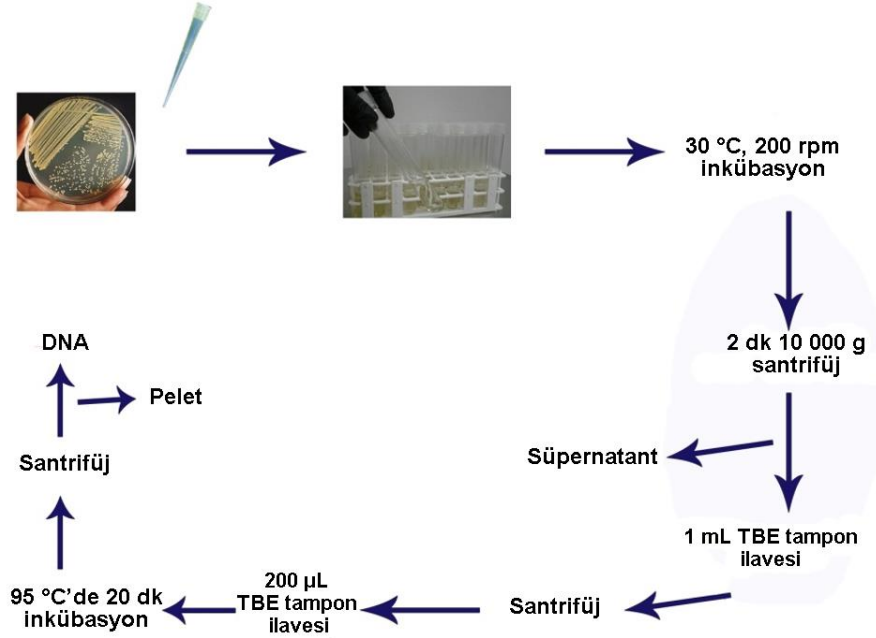
3.2.4. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu İçin DNA'larının İzolasyonu

İzolatlar 4 mL nutrient broth besiyerinde mezofilik suşlar 30 °C'de, termofilik izolatlar ise 50 °C'de, 200 rpm'de bir gece inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında kültür sıvısı 2 dak 10.000 g'de santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Tüp içerisinde kalan pellet üzerine 1 mL TBE tamponu ilave edilerek hafifçe çalkalanmış ve tekrar santrifüjlenmiştir. Bu işlem toplamda 2 kere yapılmıştır. Daha sonra, yıkanmış pellet üzerine 200 µL TBE eklenerek 95 °C'de 20 dak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tekrar santrifüj işlemi yapılmış ve süpernatant DNA kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1).

3.2.5. 16S rRNA Genlerinin PZR ile Çoğaltılması

PZR reaksiyon karışımı 3 µL bakteriyel genomik DNA, 3 µL 10X TBE tamponu, 2,4 µL MgCl₂, 0,8 µL deoksiniükleotid (dNTP) solüsyonu, 0,8 µL 10 mM 27 forward primer solüsyonu, 0,8 µL 10 mM 1492 revers primer solüsyonu, 0,25 µL Taq DNA polimeraz ve 18,95 µL distile

sudan oluşturulmuştur. Termal döngüleyicideki 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması (i) 94 °C'de 300 saniye, (ii) 94 °C'de 45 saniye ve 51°C'de 60 saniye, 72 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 600 saniye olmak üzere 35 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Bakteriyel DNA'nın izolasyonu.

3.2.6. Çoğaltılan DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi ile Gösterilmesi

Agaroz jel elektroforezi için %1'lik agaroz TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözündürülmüş ve uygun sıcaklıkta (50-60 °C) içerisine 10 mg/mL'lik EtBr çözeltisinden 50 µL ilave edilmiştir. Daha sonra, elektroferez tankı içerisine dökülerek donmaya bırakılmıştır.

Her bir damla yükleme boyası ile 3 µL örnek karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir ve örnekler DNA standardıyla birlikte 50 mA'de 20-30 dak yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında her bir hattaki DNA bandı ya da bantları UV ışık altında görüntülenmiştir (Quantum-ST4, Montreal Biotech).

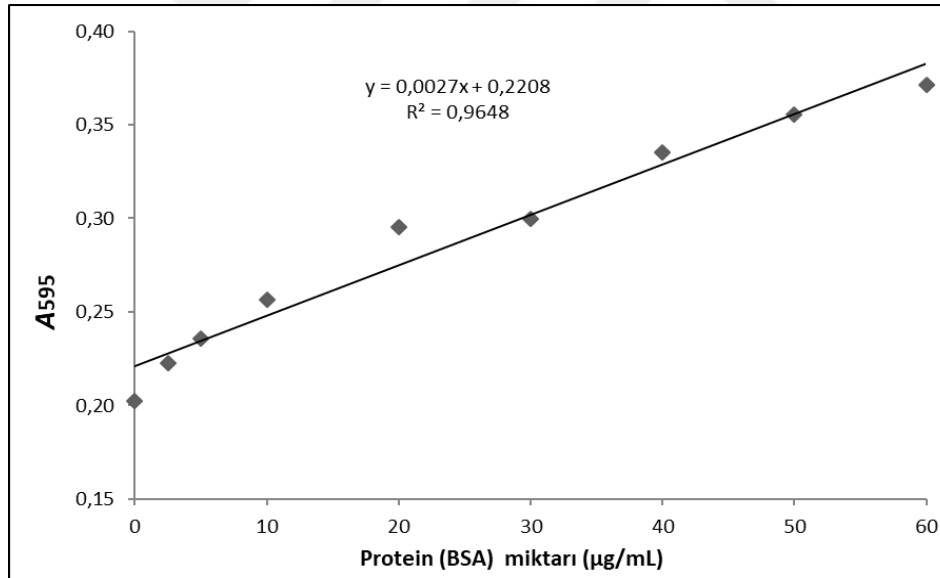
3.2.7. PZR Ürünlerinin Yoğunlukları ve Kalitesinin Tayini

PZR ürünlerinin 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonlarının oranları ve DNA yoğunlukları NanoDrop (NanoDrop ND-1000) ile spektrofotometrik ölçümler yapılarak belirlenmiştir.

3.2.8. Ekstraselüler Toplam Protein Miktarının Tayini

Enzimatik analizler için kullanılacak preparatların toplam protein derişimlerinin belirlenmesi Bradford protein analiz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [146]. Bradford stok solüsyonu için 100 mL %95 etanol, 200 mL %88'lik fosforik asit, 350 mg Coomassive Blue G-150 ile çözelti hazırlanır. Bradford çalışma solüsyonu için 425 mL distile suya 15 mL %95'lik etanol, 30 mL %88 fosforik asit, 30 mL bradford stok solüsyonu konularak solüsyon Whatman No: 1 filtre kağıdından geçirilmiştir.

Ekstraselüler sıvıdaki toplam protein miktarının tayini için önce miktarı bilinen bovin serum albumin (BSA) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.2). Kalibrasyon eğrisi için; protein derişimi 0-100 µg/mL arasında değişen 100 µL standart, 100 µL tampon (pH 7,2 fosfat tamponu) ve 1 mL Bradford çalışma solüsyonu karıştırılarak vortekslenmiş ve 10 dak sonra reaksiyon karışımının 595 nm dalga boyundaki absorbansı okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi çizildikten sonra aynı reaksiyon karışımında 100 µL standart yerine 100 µL örnek ilave edilerek ölçüm yapılmış ve protein miktarı grafikteki formüle göre hesaplanmıştır.



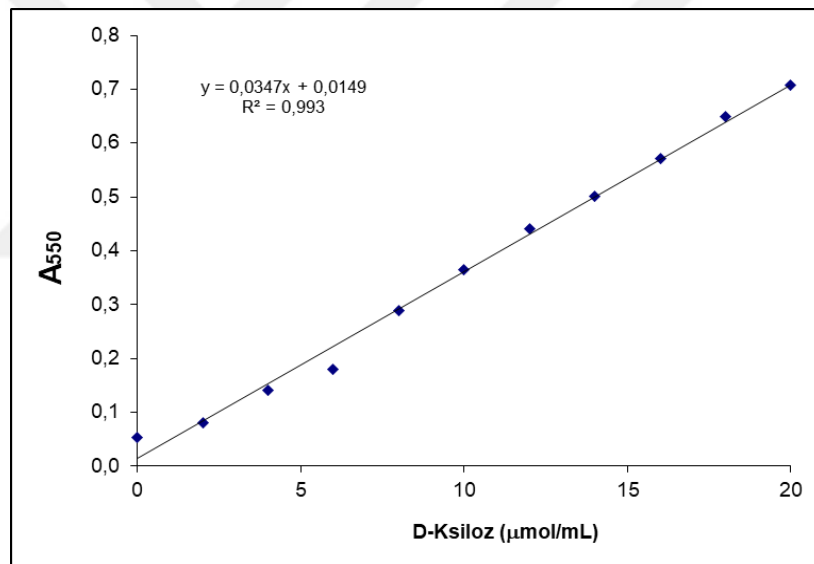
Şekil 3.2. Protein standardı olarak kullanılan BSA'nın farklı derişimlerinin Bradford metodu ile analizi sonucu elde edilen standart eğrisi.

3.2.9. Endoksilanaz Tahlili

Endoksilanaz aktivitesinin belirlenmesi için gerçekleştirilen rutin çalışmalar için 100 mM fosfat tamponu (pH 7,0) içerisinde %1 (w/v) birchwood ksilan solüsyonu kullanılmıştır. Yeterli miktardaki (100 µL) enzim preparatı, 300 µL birchwood ksilanı süspansiyonu ile mezofilik suşlar 30 °C'de, termofilik suşlar ise 50 °C'de (sıcaklığa bağlı çalışmalar sırasında 40-

80 °C arasında değişen sıcaklıklarda) 5 dakika (enzimatik aktivitenin bu süre boyunca lineer olarak arttığı ön çalışmalar ile belirlenmiştir) süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, ortamdaki katı substart partikülleri 12 000 g'de 5 dak süre ile santrifüjlenerek ayrılmış ve elde edilen süpernatant sıvısı, indirgenmiş şeker miktarlarının tayininde kullanılmıştır. İnkübasyon sıvısındaki indirgenmiş şeker miktarları ise Miller'in [147] dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir. Reaksiyon karışımında bulunan indirgenmiş şekerlerin derişimlerinin belirlenmesi, 0,0-10,0 µmol/mL arasında değişen D-ksiloz standardı kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.3) yardımı ile spektrofotometrik olarak 550 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Bir ünite (U) endoksilanaz aktivitesi, tahlil koşulları altında, mililitre başına 1 dakika da 1 µmol indirgenmiş şeker (ksiloz olarak ifade edilen) salınmasına neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Tüm tahlillerde enzim ve substrat kontrolleri de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. D-ksilozun farklı farklı derişimlerinin analizi sonucu elde edilen indirgenmiş şeker standardı.

İndirgenmiş şekerlerin tayini için dinitrosalisilik asit (DNS) metodu şu şekilde uygulanmıştır; 4,5 gr 3,5-dinitrosalisilik asit, 90,9 gr sodyum potasyum tartarat ve 7,3 gr sodyum hidroksitin 1 L distile su içerisinde çözünmesi ile hazırlanan DNS solüsyonu, enzimatik inkübasyon sonrasında elde edilen süpernatant sıvılara ve standartlara (400 µL) ilave edilmiştir. Vorteks yardımı ile bir süre karıştırmadan sonra karışımlar, 100 °C'de 5 dak kaynatılmışlardır. Musluk suyu altında bir süre soğumaya bırakıldıktan sonra, karışımların 550 nm'deki absorbansları spektrofotometre ile elde edilmiştir. Spektrofotometrede okunan ab-

sorbans değerleri ise standart eğri yardımıyla, indirgenmiş şeker miktarlarına dönüştürülmüştür.

3.2.10. Substratların Hazırlanması

Buğday samanı, mısır samanı ve hint yağı bitkisi blender ile iyice parçalanarak toz haline getirildikten sonra 0,25 mm ve 0,5 mm gözenek çaplı elekten (Alfa Laboratuvar Malzemeleri, Ankara, Türkiye) geçirilmiştir. Meşe ise talaş olarak elde edilmiştir.

3.2.11. Ekstrasellüler Endoksilanaz Üretim Optimizasyonu

3.2.11.1. Ekstrasellüler endoksilanaz üretiminin büyüme döngüsü ile olan ilişkisi

Bu çalışmada kullanılan bakteriyel suşlar tarafından üretilen ekstrasellüler endoksilanaz aktivitesinin, büyüme döngüsüne bağlı olarak nasıl değişim gösterdiğini belirlemek için organizmalar karbon ve enerji kaynağı olarak yalnızca hint yağı bitkisi (7,5 g/L) içeren MS-YEM sıvı besiyerinde, 30 °C'de veya 50 °C'de, 7 gün boyunca, 120 rpm'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresince 24 saat aralıklarla sıvı kültürlerden alınan örnekler ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak, organizmaların büyüme döngüsü boyunca endoksilanaz aktiviteleri standart tahlil metodu ile belirlenmiştir. Aynı zamanda, örneklerdeki ekstrasellüler protein miktarları da Bradford metodu [146] ile belirlenerek her bir enzimin özgül aktivitelerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tüm çalışmalar üçer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.11.2. Kültür sıcaklığının ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi

Streptomyces sp. BN212^T suşu ile endoksilanaz üretiminin optimum sıcaklığının belirlenmesinde karbon kaynağı olarak 0,25 mm partikül boyutlu 7,5 g/L hint yağı bitkisi içeren MS-YEM besiyeri kullanılmış, inkübasyon 45-90 °C aralığında, 120 rpm'de, 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun sonunda *Streptomyces sp.* BN212^T suşu tarafından üretilen endoksilanaz aktivitesi standart tahlil metodoula belirlenmiş ve sonuçlar görece olarak verilmiştir.

3.2.11.3. Kültür pH'sının ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi

Streptomyces sp. BN212^T suşu tarafından sentezlenen ekstrasellüler endoksilanaz enziminin üretimine, kültür pH'sının etkisini belirlemek için bakteriyel suş, pH değerleri 4,0-10,0

arasında değişen, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece hintyağı bitkisi (7,5 g/L) içeren MS-YEM sıvı besiyerinde, 50 °C'de 72'şer saat süreyle, 120 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürlerden alınan örnekler, ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak endoksilanaz aktiviteleri standart tahlil metodu ile protein miktarları ise Bradford metodu [146] ile belirlenmiştir. Tüm çalışmalar ikişer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.11.4. Azot kaynaklarının ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi

Streptomyces sp. BN212^T suşunun, farklı organik azot kaynaklarının üzerinde büyümele-ri sırasındaki ekstrasellüler endoksilanaz aktivitelerinin belirlenmesi için organizma, 7,5 g/L'lik hintyağı bitkisi içeren sıvı MS-YEM besiyerlerinde 50 °C'de, 72 saat, 120 rpm'de inkübe edilmiştir. Bu çalışmalar ile *Streptomyces sp.* BN212^T'nin ekstrasellüler endoksilanaz aktivitelerinin maksimuma ulaştığı azot kaynağının belirlenmesi amaçlanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürlerden alınan örnekler ham enzim preparasyonları olarak kullanılara endoksilanaz enzim aktiviteleri standart tahlil metodu ile tespit edilmiştir. Ayrıca, süpernatantaki protein miktarları ise Bradford metodu [146] ile belirlenerek enzimin özgül aktivitesinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tüm çalışmalar ikişer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.11.5. NaCl derişiminin ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisi

Streptomyces sp. BN212^T suşu tarafından sentezlenen ekstrasellüler endoksilanaz enziminin üretimine, NaCl derişiminin etkisini belirlemek için organizma, NaCl değerleri 0-1,5 g/L arasında değişen, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece hintyağı bitkisi (7,5 g/L) içeren MS-YEM sıvı besiyerinde, 50 °C'de 72'şer saat süreyle, 120 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda sıvı kültürlerden alınan örnekler, ham enzim preparasyonları olarak kullanılarak endoksilanaz aktiviteleri standart tahlil metodu ile protein miktarları ise Bradford metodu [146] ile belirlenmiştir. Tüm çalışmalar ikişer tekrarlı olarak yapılmış ve tekrarlamalı sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.12. Endoksilanazın Kısmi Karakterizasyonu

3.2.12.1. Endoksialnazın optimum sıcaklığının ve termostabilitesinin belirlenmesi

Streptomyces BN212^T suşu tarafından üretilen endoksilanaz enziminin optimal sıcaklığını belirlenmesi için enzimler, substratı ile birlikte 40 °C'den 80 °C'ye kadar olan sıcaklıklarda (10'ar °C atlamalı olacak şekilde) 5 dak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda endoksilanaz aktiviteleri, standart enzim tahlil metodu ile belirlenmiştir.

Zamanın ve sıcaklığın enzim kararlılığı üzerine olan etkisinin belirlenmesinde ise ultra-filtrasyon yöntemi ile 30-kat yoğunlaştırılmış olan enzim preparatları, substratın olmadığı ortamda, 40 °C'den 80 °C'ye kadar olan 10'ar °C atlamalı sıcaklıklarda, belirli aralıklarla örnek alınacak şekilde, 5 saat boyunca inkübe edilmiştir. Birer saat aralıklarla alınan örnekler, son örnek alınıncaya kadar -4 °C'da depolanmış, daha sonra bütün örneklerin endoksilanaz aktiviteleri 50° C'da standart enzim tahlili kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.12.2. Endoksilanazın optimum pH'sının belirlenmesi

Endoksilanaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği optimum pH aralığının belirlenmesinde, standart endoksilanaz tahlil reaksiyon karışımındaki sodyum fosfat tamponunun yerine Britton-Robinson Universal Buffer (Tablo 3.14) [148] kullanılmıştır.

Tablo 3.14. Britton-Robinson Universal Buffer.

Sitrik asit	6,008 g
Borik asit	1,769 g
KH ₂ PO ₄	3,839 g
Dietilbarbiturik asit	5,266 g
Distile su	1 L

pH değerleri 4,0 ile 9,0 aralığında olan solüsyonların pH'ları ise 1 M NaOH ve HCl kullanılarak ayarlanmıştır. pH değerleri ayarlanmış olan reaksiyon karışımının pH değerlerinin (4-9) değişmemesi için, endoksilanaz tahlilinde kullanılan bileşenlerin hepsi, son derişimleri standart enzim tahlil metodundaki derişimleri verecek şekilde, derişik olarak hazırlanmıştır. Böylece reaksiyon karışımı elde edildiğinde hem solüsyonun pH değerinin değişmesi önlenmiş, hem de bütün bileşenler standart tahlildeki derişimlerinde tutulmuştur.

3.2.12.3. Endoksilanazın metal iyonlarına duyarlılığının belirlenmesi

Endoksilanaz enziminin metal iyonlarına ve kimyasal ajanlara olan duyarlılığını belirlemek amacıyla ham enzim solüsyonları, $MnSO_4$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $FeSO_4$, $AgNO_3$, $HgCl_2$, SDS (Sodyum dodesil sülfat), ETDA (Etilendiamin tetraasetik asit), NaCl ve DTT (Dikloro difenil trikloroethan) varlığında substratı ile inkübe edilerek bu metallere ve kimyasal ajanlara karşı olan duyarlılığı aşağıda belirtildiği şekilde test edilmiştir.

Endoksilanaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı, 10 μ L, 1 ve 10 mM, metal grupları; kontrol grubu için 10 μ L, 50 mM, pH 7,0 fosfat tamponu; 100 μ L ham enzim ve 90 μ L birchwood ksilan içermektedir. Reaksiyon karışımı, endoksilanazın optimal aktivite sıcaklığı olan 60 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi standart DNS tahlili ile belirlenmiştir.

3.2.12.4. Endoksilanazın organik çözücülere duyarlılığının belirlenmesi

Endoksilanaz enziminin organik çözücülere duyarlılığını belirlemek amacıyla ham enzim solüsyonları, ksilen, n-bütanol, etanol, metanol ve propanol gibi organik çözücülerle inkübe edilmiştir. Sırasıyla tüm organik maddelerden 52 μ L, ham enzimden ise 156 μ L alınarak karışımlar hazırlanmış ve bu karışımlar 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bir saat sonunda, bu organik maddelerin enzim aktivitesi üzerine olan etkileri ise aşağıda belirtildiği şekilde test edilmiştir.

Endoksilanaz aktivitesi tayininde reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında bir saat bekletilen karışımdan alınan 100 μ L, 100 μ L birchwood ksilan ve kontrol grubu için 100 μ L 50 mM pH 7,0 fosfat tamponu içermektedir. Reaksiyon karışımı, endoksilanazın optimal aktivite sıcaklığı olan 60 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzim aktivitesi standart DNS tahlili ile belirlenmiştir.

3.2.13. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (Doğal-PAGE)

Endoksilanaz örneklerinin protein içeriğinin analizinde doğal poliakrilamid jel elektroforezi (Doğal-PAGE) kullanılmıştır. Hazırlanan bu Doğal-PAGE jellerine örnek materyalleri ve standart protein karışımı yüklenmiş ve yürütme işlemi gerilim altında (örnekler yürütme jeline ulaşana kadar 30 mA, yürütme jeline ulaştıktan sonra 20 mA) gerçekleştirilmiştir.

Doğal-PAGE ile ayrıştırılan endoksilanaz aktivitesinin zimogram (aktivite jeli) olarak geliştirilebilmesi için Kongo kırmızısı ile boyama metodu denenmiştir. Yapılan doğal jel çalışmaları sabit poliakrilamid derişimine [%10 (w/v)] sahip jeller tercih edilmiştir. Elektroforetik

ayırıştırma sonucunda jeller saf su ile yıkandıktan sonra, pH 7; 50 mM fosfat tamponu içinde bulunan %3'lük birchwood ksilan solüsyonuna daldırılarak 40 °C'de 1,5 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında jeller %0,1 (w/v) Kongo kırmızısı solüsyonu ile 15 dakika boyanmıştır. Boyama işleminin ardından fazla boyanın uzaklaştırılması için jellerin üzerine 1M NaCl çözeltisi uygulanmış ve oluşan açık renkli alanlar fotoğraflanmıştır.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Katı Besiyerinde Enzim Aktivitelerinin Taranması

Aktinomiset üyesi 37 adet yeni izolatın 5'i termofilik karakterde olup, bu izolatların enzim tarama besiyerlerine nokta ekiminden sonra elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de, Prof. Dr. Nevzat Şahin (19 Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun) ve arkadaşları tarafından yeni tanımlanmış *Nocardia thraciensis*, *Actinomadura geliboluensis*, *Amycolatopsis cihanbeyliensis* ve *Actinoplanes* sp. suşlarının enzim tarama besiyerlerine nokta ekiminden sonra elde edilen sonuçlar ise Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *Aktinomisetes* üyesi yeni izolatların karbon kaynağı olarak oat spelt ksılan (OSX), birchwood ksılan (BWX) ve karboksimetil selüloz (CMC) içeren katı besiyerlerinde büyümesi ve zon/koloni çapı oranları. -: Büyüme yok. ^T: Termofilik.

Mikrobiyal suş	OSX	BWX	CMC
	Zon/Koloni (oranı)	Zon/Koloni (oranı)	Zon/Koloni (oranı)
BN101	2/2 (1,00)	-	7/6 (1,16)
BN102	3/2 (1,50)	8/6 (1,33)	8/6 (1,33)
BN103	8/6 (1,33)	9/6 (1,50)	5/4 (1,25)
BN104 ^T	-	-	-
BN105	-	7/4 (1,75)	3/2 (1,50)
BN106	3/2 (1,50)	3/2 (1,50)	3/2 (1,50)
BN201	5/4 (1,25)	8/6 (1,33)	10/6 (1,66)
BN202	-	-	3/2 (1,50)
BN203	6/4 (1,50)	9/6 (1,50)	2/2 (1,00)
BN204	3/2 (1,50)	3/2 (1,50)	3/2 (1,50)
BN205 ^T	-	-	-
BN206	4/2 (2,00)	-	-
BN207	3/2 (1,50)	-	6/4 (1,50)
BN208	8/4 (2,00)	16/8 (2,00)	15/6 (2,50)
BN209	-	-	-
BN210	8/6 (1,33)	7/6 (1,16)	8/6 (1,33)
BN211	5/4 (1,25)	-	7/6 (1,16)
BN212 ^T	14/6 (2,33)	13/5 (2,60)	15/6 (2,50)
BN213	-	3/2 (1,50)	-
BN301	9/6 (1,50)	9/6 (1,50)	8/6 (1,33)
BN302	4/3 (1,33)	6/4 (1,50)	-

Tablo 4.1. Devamı

Mikrobiyal suş	OSX	BWX	CMC
	Zon/Koloni (oranı)	Zon/Koloni (oranı)	Zon/Koloni (oranı)
BN303	-	7/6 (1,16)	2/2 (1,00)
BN304	8/6 (1,33)	8/6 (1,33)	11/6 (1,83)
BN305	-	4/2 (2,00)	-
BN306 ^T	-	3/2 (1,50)	5/4 (1,25)
BN307	8/6 (1,33)	9/6 (1,50)	10/4 (2,50)
BN308 ^T	-	5/3 (1,66)	-
BN309	5/4 (1,25)	-	-
BN401	8/4 (2,00)	8/6 (1,33)	8/4 (2,00)
BN402	-	-	-
BN403	7/4 (1,75)	4/4 (1,00)	5/2 (2,50)
BN404	3/2 (1,50)	8/6 (1,33)	7/6 (1,16)
BN405	6/6 (1,00)	7/6 (1,16)	10/6 (1,66)
BN406	5/4 (1,25)	8/6 (1,33)	6/6 (1,00)
BN407	10/5 (2,00)	9/4 (2,25)	11/5 (2,20)
BN408	4/2 (2,00)	3/2 (1,50)	11/6 (1,83)
BN409	4/2 (2,00)	5/4 (1,25)	3/2 (1,50)

Tablo 4.2. Yeni tanımlanmış *Nocardia thraciensis*, *Actinomadura geliboluensis*, *Amycolatopsis cihanbeyliensis* ve *Actinoplanes* sp. suşlarının katı besiyerinde büyümesi ve zon/koloni çapı oranları. -: Büyüme yok.

Agar Besiyeri	Mikrobiyal suş ve Zon/Koloni çapı (oranı)			
	<i>Nocardia thraciensis</i>	<i>Actinomadura geliboluensis</i>	<i>Amycolatopsis cihanbeyliensis</i>	<i>Actinoplanes</i> sp.
OSX	5/4 (1,25)	8/6 (1,33)	5/4 (1,25)	2/2 (1,00)
BWX	2/2 (1,00)	15/6 (2,50)	3/2 (1,50)	5/4 (1,25)
CMC	-	7/4 (1,75)	-	2/2 (1,00)
Guaiakol	-	2/2 (1,00)	-	-
Poly R	-	4/4 (1,00)	2/2 (1,00)	-
RBBR	-	4/4 (1,00)	-	-
Niştasta	-	5/4 (1,25)	-	-

Mikroorganizmaların özgün bir enzim üretilip üretilmediği “katı besiyerinde tarama” yöntemi ile belirlenmiştir. Bu metotta, enzimin etki ettiği bir madde (substrat) besiyerine ilave edilir ve petrilere dökülerek soğumaya bırakılır. Daha sonra, bir öze ucu ya da steril bir kürdan yardımı ile taraması yapılacak bakteriye ait inokulum (aşı) hazırlanan besiyerine aktararak (nokta ekim) uygun koşullar altında inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında koloni etrafında şeffaf zon oluşumu gözlemlenirse, mikroorganizmanın ilgili substratı parçalayan enzimi ürettiği kanaatine varılır. Bundan dolayı tez kapsamında izole edilen bakteriyel suşların endoksilanaz üretilip üretilmedikleri ilk aşamada bu metod kullanılarak araştırılmıştır.

Bu yöntem *Streptomyces clavuligerus*'ta klavulanik asit üretiminin belirlenmesinde [149], saflaştırılan izolatların kütinaz üretiminin belirlenmesinde [150], saflaştırılan *Anoxybacil-*

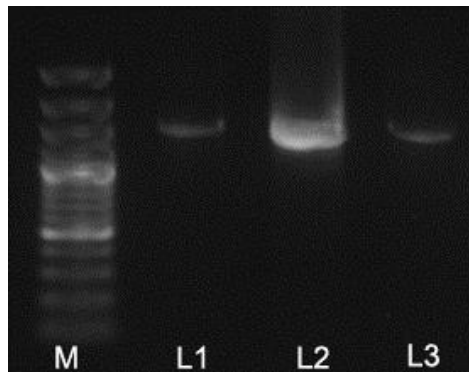
lus suşlarının ksilan üretiminin belirlenmesinde [151] kullanılmıştır. Bir başka çalışmada ise saflaştırılan *Bacillus* sp. suşlarının CMCaz enzim üretiminin belirlenmesinde yine bu yöntem kullanılmıştır [152].

Tarama besiyerlerine yapılan nokta ekim sonucunda lignoselülozik materyalleri etkili biçimde parçalayabileceği düşünülen yeni izole edilmiş olan BN208, BN212^T ve BN407 izolatlarının yanı sıra yeni tanımlanmış *Actinomadura geliboluensis* suşunun endoksilanaz aktivitesi için enzim kaynağı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Toplam 37 yeni izolat arasından seçilen BN208, BN212^T ve BN407 izolatlarının ve *A. geliboluensis* suşunun seçiminde ise sadece tarama besiyerinde görece olarak daha iyi açılma zonu/koloni çap oranı vermeleri değil, tarama besiyerlerinin hepsinde büyüebilmeleri ve en az iki farklı tarama besiyerinde aktivitelerinin gözlemlenmesi önemli rol oynamıştır.

Toplam 37 yeni izolat arasından seçilen BN208, BN212^T ve BN407 izolatları ise oat spelt ksilan (OSX), birchwood ksilan (BWX) ve karboksimetil selüloz (CMC) içeren katı besiyerlerinde büyümelerinin yanı sıra zon/koloni çapı oranları 2,16 ile 2,60 arasında değişmektedir. *A. geliboluensis* suşunun çalışılan katı besiyerlerinde oluşturduğu en yüksek zon/koloni çapı oranı (2,50) ise BWX agar besiyerinde belirlenmiştir. Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'deki sonuçlara uygun olarak yeni izolatlar arasından BN208, BN212^T ve BN407 izolatları ve *A. geliboluensis* suşunun ekstraseküler endoksilanaz üretimlerinin optimizasyonuna karar verilmiştir.

4.2. Yüksek Aktivite Gösteren BN208, BN212^T ve BN407 İzolatlarının 16S rRNA Gen Dizisine Göre Tanımlanması

Tarama deneyleri sonucunda oat spelt ksilan (OSX), birchwood ksilan (BWX) ve karboksimetil selüloz (CMC) içeren katı besiyerlerinde yüksek aktivite gösteren BN208, BN212^T ve BN407 izolatlarının 16S rRNA geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4.1) ve DNA miktarı ve kalitesi (260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanlarının oranı) NanoDrop ile tespit edilmiştir (Tablo 4.3).



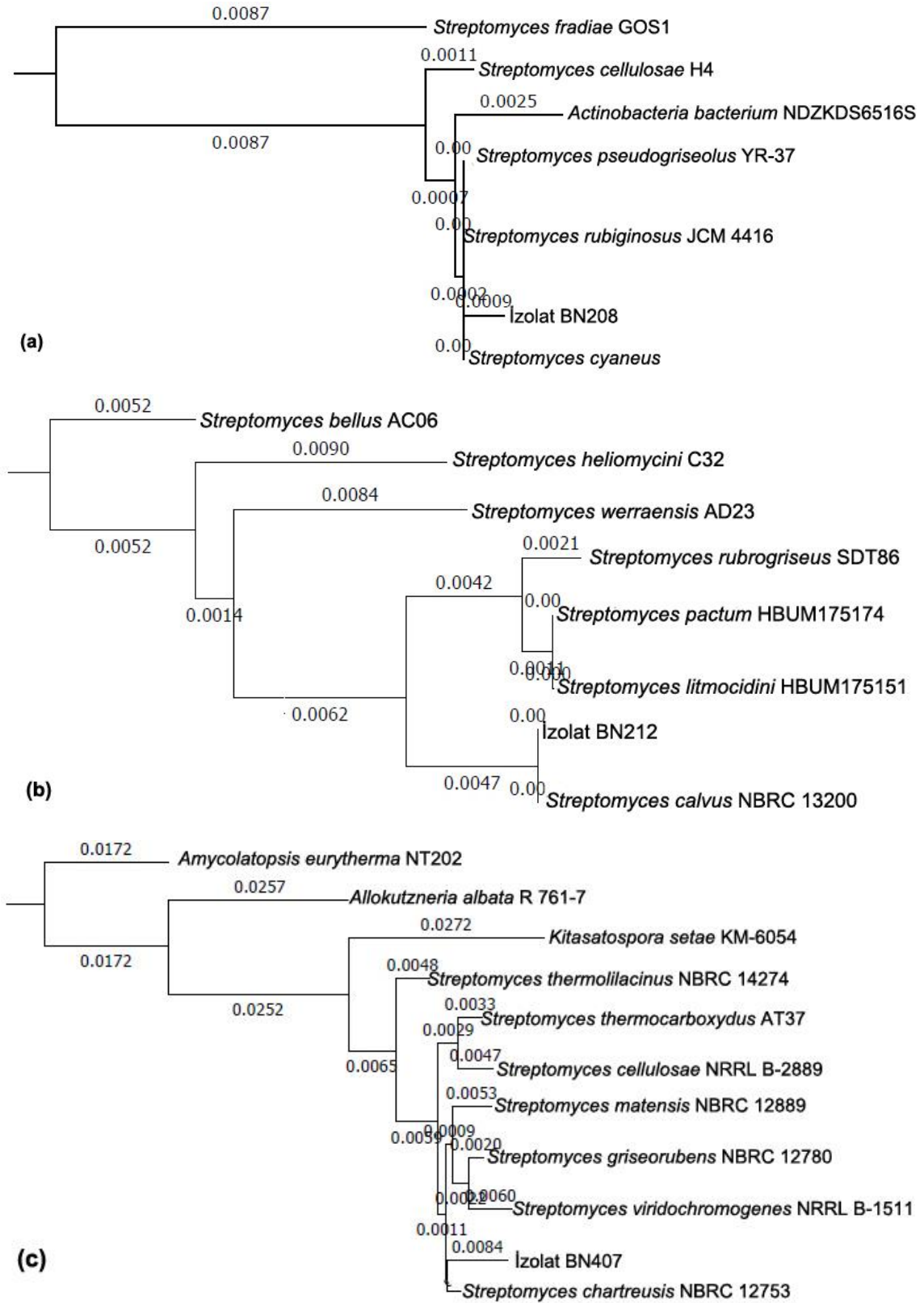
Şekil 4.1. L1: BN208, L2: BN212^T ve L3: BN407 izolatlarının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılan 16S rRNA genlerinin agaroz jelde görünüşleri. M: DNA merdiveni.

Tablo 4.3. PZR ürünlerinin A_{260}/A_{280} oranları ve yoğunlukları.

İzolat	A_{260}/A_{280}	Yoğunluk (ng/ μ L)
BN208	1,8100	497,53
BN212^T	1,8254	698,25
BN407	1,7883	427,30

PZR ürünleri “Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzers” marka cihaz ile BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizilendikten sonra, diziler BLAST yardımıyla NCBI veri tabanında bulunan 16S rDNA dizileri ile karşılaştırılmış ve dizi eşleşmesine göre izolatlar en yakın türler tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların 16S rDNA dizilerinin karşılaştırılmasına dayalı olarak MEGA 6 programı ile neighbour-joining metodu ile filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur. 16S rDNA gen dizilerinin gen banktaki dizilerle karşılaştırılması sonucunda tarama deneyleri sonucunda BN208, BN212^T ve BN407 izolatlarının *Aktinobakteria* şubesinin *Streptomyces* cinsine ait oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.2).

16S rRNA gen dizisi temelli karşılaştırma neticesinde BN208 izolatının *Streptomyces cyaneus*, *Streptomyces rubiginosus* JCM 4416 ve *Streptomyces pseudogriseolus* YR-37 ile %95 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. İzolatın sınıflandırılması hakkında tür düzeyinde kesin yorum yapılamasa da *Streptomyces* taksonu içerisinde sınıflandırılabilceği belirlenmiştir. Filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.2.a’da gösterilmektedir.



Şekil 4.2. *Streptomyces* genusu içerisinde yer alan ve endoksilanaz üreticisi olduğu tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş olan **(a)** BN208, **(b)** BN212^T ve **(c)** BN407 izolatlarının neighbour-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonları.

BN212^T izolatının 16S rRNA gen dizilerinin *Streptomyces calvus* NBRC 13200, *Streptomyces litmocidini* HBUM175151 ve *Streptomyces pactum* HBUM175174'ün dizileri ile %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatın filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.2.b'de gösterilmektedir.

İzolat BN407'nin 16S rRNA genine ait nükleotid dizilerin karşılaştırılması sonucunda en yüksek benzerliğin %95'lik oranla *Streptomyces chartreusis* NBRC 12753 ile olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, *Streptomyces viridochromogenes* NRRL B-1511 ile %94, *Kitasatospora setae* KM-6054 ile %91'lik dizi benzerliği belirlenmiştir. İzolat BN407'nin filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.2.c'de gösterilmektedir.

İzolatlardan elde edilen 16S rRNA gen dizilerinin NCBI veri tabanında bulunan 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmaları sonucunda yakın ilişkili oldukları belirlenen bakteri türleri ve ilgili gen dizisi arasındaki benzerlikler tespit edilmiştir. Her bir izolatın 16S rRNA gen dizilerine dayalı filogenetik pozisyonları Mega 6 programı kullanılarak neighbour-joining metodu ile çizilmiştir.

Streptomyces genusu içerisinde yer alan ve endoksilanaz üreticisi olduğu tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş olan BN208, BN212^T ve BN407 izolatlarının neighbour-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonları ise Şekil 4.2'de gösterilmiş olup, bu *Streptomyces* izolatlarının tür seviyesinde kesin bir tanımlanmasını yapabilmek için izolatların biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin de araştırılarak karşılaştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

4.3. Ekstrasellüler Endoksilanaz Üretiminin Optimizasyonu

4.3.1. Farklı Karbon Kaynaklarının *Streptomyces* Üyesi BN208, BN212^T ve BN407 İzolatları ve *A. geliboluensis* Suşunun Endoksilanaz Üretimine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının, endoksilanaz üretimi ve toplam ekstrasellüler protein miktarlarının üretimi üzerine olan etkisini araştırmak için, karbon kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanı, mısır samanı, meşe talaşı ve hint yağı bitkisi (*Ricinus communis*) içeren MS-YEM besiyerine karbon kaynakları %0,4 (w/v) oranında ilave edilmiş ve organizmalar 30 °C veya 50 °C sıcaklıkta, 120 rpm'de, 7 gün süreyle inkübe edilmişlerdir.

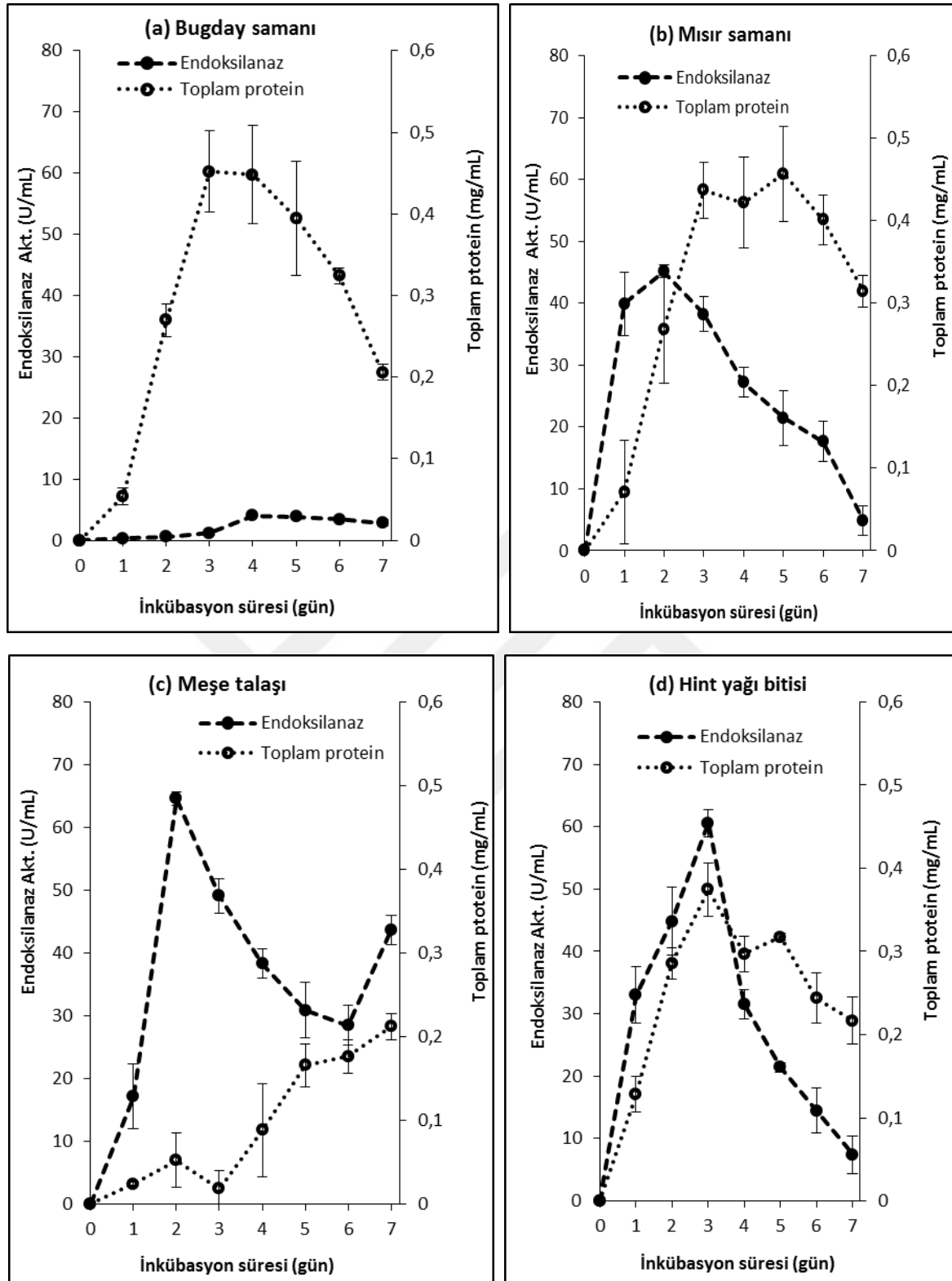
Streptomyces sp. BN208 suşunun, karbon kaynağı olarak buğday samanının kullanıldığı kültür ortamında 4. günde (4,00 U/mL) ve 5. günde (3,86 U/mL) ürettiği endoksilanaz aktivitesi, hemen hemen aynı değerlere sahip olup, en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını 3. günde (0,45 mg/mL) göstermiştir (Şekil 4.3. a). *Streptomyces* sp. BN208 suşunun bu inkübasyon

koşullarında ürettiği endoksilanaz enziminin en yüksek özgül aktivitesi ise inkübasyonun 7. gününde 13,59 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak mısır samanının kullanıldığı kültür ortamında ise *Streptomyces sp.* BN208 suşu en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını 5. günde (0,46 mg/mL), en yüksek endoksilanaz aktivitesini (45,11 U/mL) ise 2. günde göstermiştir (Şekil 4.3. b). *Streptomyces sp.* BN208 suşunun 1. gündeki endoksilanaz aktivitesi ise (39,92 U/mL) değerindedir. *Streptomyces sp.* BN208 suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 168,00 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak meşe talaşı kullanıldığında ise *Streptomyces sp.* BN208 suşu, en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını 5-7. günlerde (0,17-0,21 mg/mL), en yüksek endoksilanaz aktivitesini (64,60 U/mL) 2. günde göstermiştir (Şekil 4.3. c). Ancak, 3. günde endoksilanaz aktivitesi ani bir düşüşe geçip (49,08 U/mL), 7. günde tekrar yükselme (43,64 U/mL) göstermiştir (Şekil 4.3. c). *Streptomyces sp.* BN208 suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 1237,46 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisi kullanıldığında ise *Streptomyces sp.* BN208 suşu, en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını (0,37 mg/mL) ve en yüksek endoksilanaz aktivitesini (60,56 U/mL) 3. günde göstermiştir. Endoksilanaz aktivitesi 4. günde yarıya (31,53 U/mL) düşmüş ve giderek azalmıştır (Şekil 4.3. d). *Streptomyces sp.* BN208 suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 3. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 161,74 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.3. *Streptomyces* sp. BN208'in (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitki samanı içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstraselüler protein miktarları.

Kullanılan tüm karbon kaynakları karşılaştırıldığında *Streptomyces sp.* BN208 suşu da aynı *Streptomyces sp.* BN407 suşu gibi meşe talaşı (64,60 U/mL) ve hint yağı bitkisi (60,56 U/mL) kültürlerinde birbirlerine yakın en yüksek endoksilanaz aktivitelerini sergilemiştir.

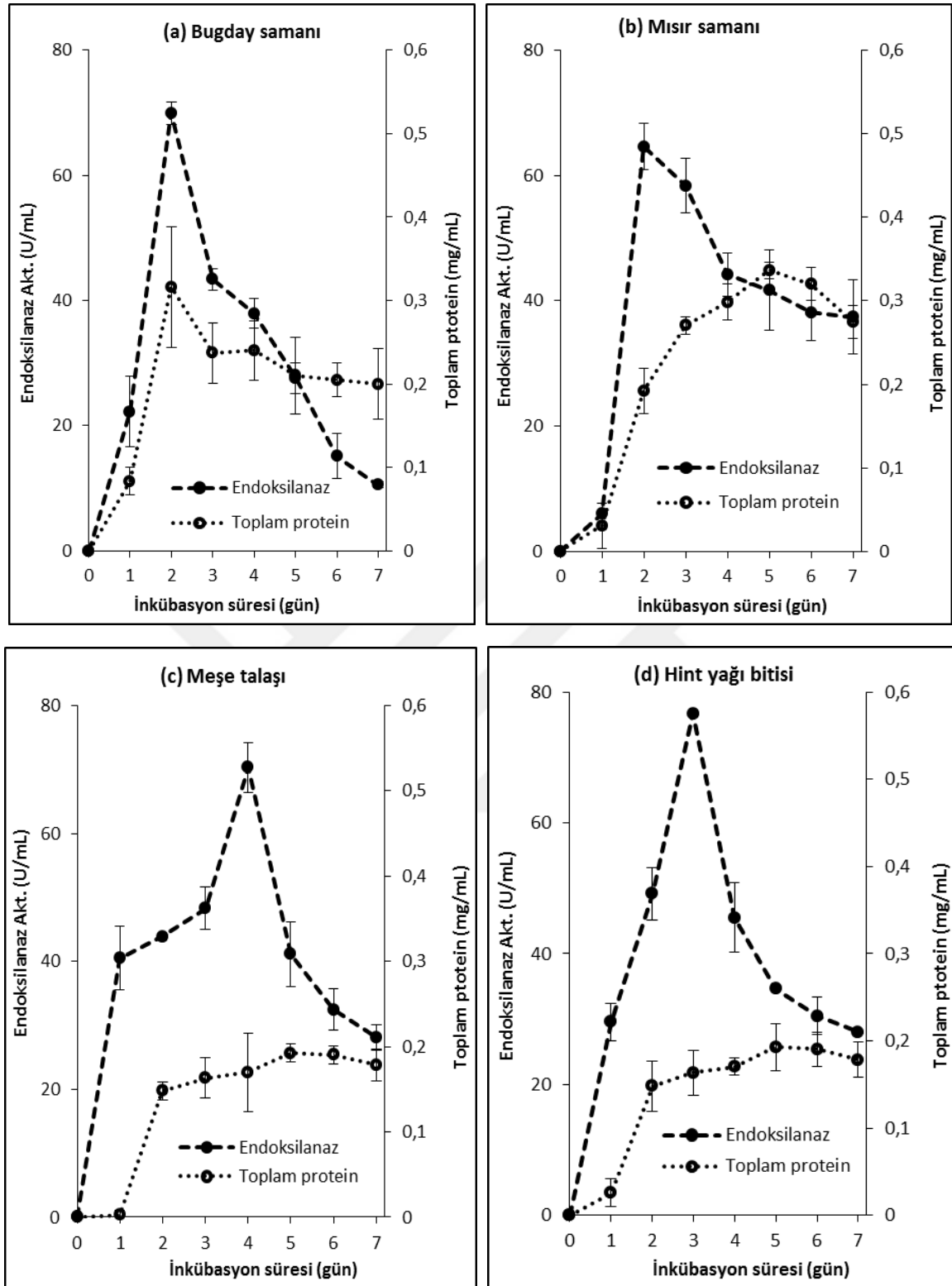
Streptomyces sp. BN212^T suşu, karbon kaynağı olarak buğday samanının kullanıldığı kültür ortamında en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını (0,32 mg/mL) ve endoksilanaz aktivitesini (69,94 U/mL) 2. günde göstermiştir (Şekil 4.4. a). İnkübasyonun 2. gününden sonra ise hem endoksilanaz hem de protein miktarları dereceli olarak azalmıştır. İnkübasyonun süresinin sonu olan 7. günde ise endoksilanaz aktivitesi 10,56 U/mL, ekstrasellüler protein ise 0,2 mg/mL olarak belirlenmiştir. *Streptomyces sp.* BN212^T suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 221,20 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak mısır samanının kullanıldığı kültür ortamında ise *Streptomyces sp.* BN212^T suşu tarafından üretilen endoksilanaz aktivitesi yine buğday samanındaki gibi en yüksek 2. günde (64,64 U/mL) ortaya çıkmış olup, en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarı ise (0,34 mg/mL) 5. günde ortaya çıkmıştır (Şekil 4.4. b). *Streptomyces sp.* BN212^T suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 336,19 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Streptomyces sp. BN212^T suşunun üremesi için karbon kaynağı olarak meşe talaşı kullanıldığında, en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını 5. günde (0,19 mg/mL), en yüksek endoksilanaz aktivitesini ise (70,37 U/mL) 4. günde göstermiştir (Şekil 4.4. c). Endoksilanaz aktivitesi, 4. güne kadar kademeli bir artış göstermiş, 4. günde en yüksek seviyeye ulaşmış, 5. günde ise 45,55 U/mL'ye düşerek bundan sonra dereceli düşüşe geçmiştir. *Streptomyces sp.* BN212^T suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 4. endoksilanaz gündeki özgül aktivitesi ise 413,48 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Hint yağı bitkisi karbon kaynağı olarak kullanıldığında ise *Streptomyces sp.* BN212^T suşu, en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını yine 5. günde (0,19 mg/mL) göstermiş olup, en yüksek endoksilanaz aktivitesini 3. günde (76,74 U/mL) göstermiştir (Şekil 4.4. d). *Streptomyces sp.* BN212^T suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 3. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 470,20 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Streptomyces sp. BN212^T suşu, her ne kadar dört farklı karbon kaynağında da yaklaşık aynı değerlerde endoksilanaz enzimi üretse de en yüksek endoksilanaz aktivitesini, karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisinin (76,74 U/mL) bulunduğu kültür ortamında göstermiştir.



Şekil 4.4. *Streptomyces* sp. BN212^r'nin (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitisi içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları.

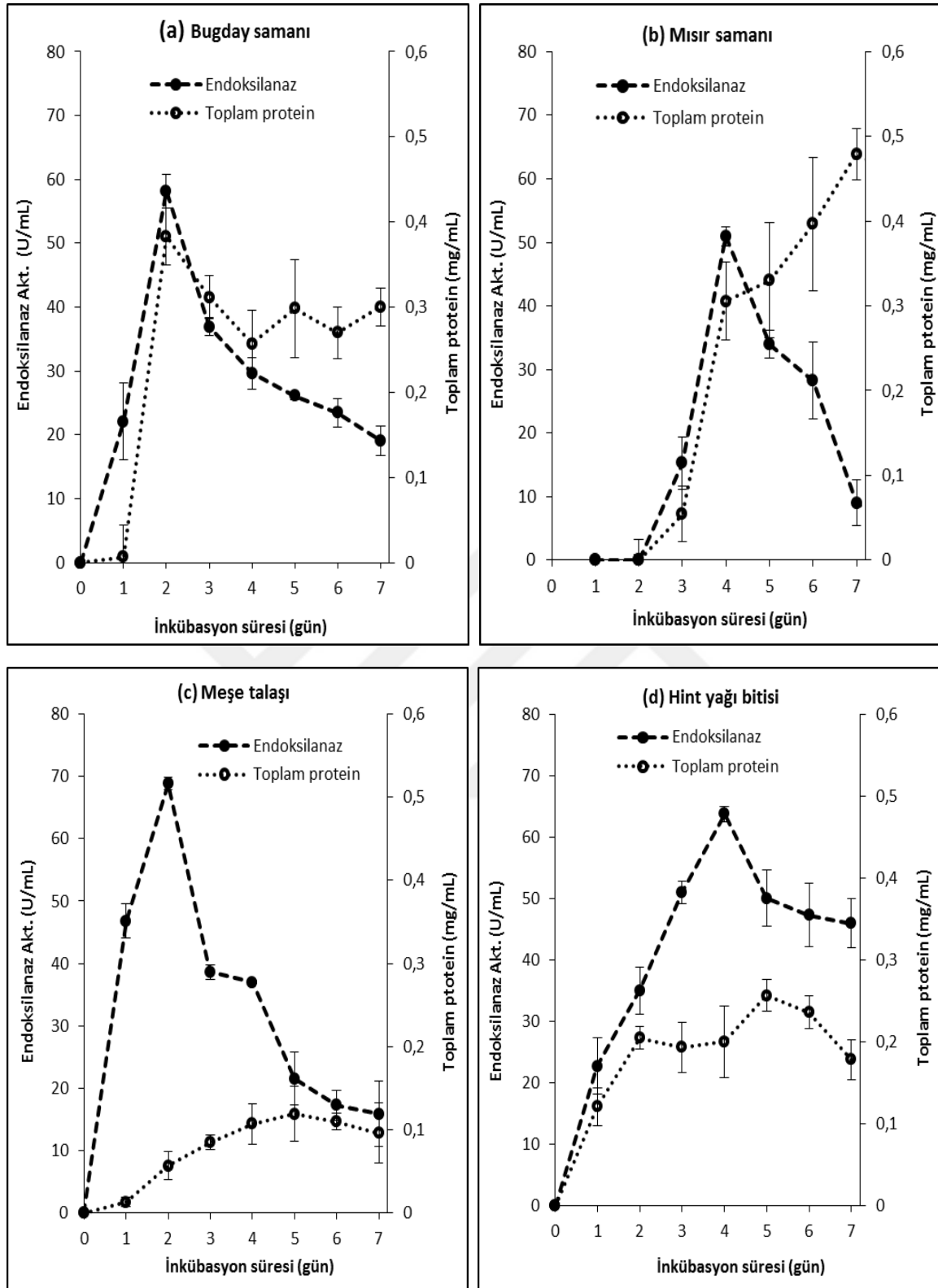
Streptomyces sp. BN407 suşu, karbon kaynağı olarak buğday samanının kullanıldığı kültür ortamında en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını (0,38 mg/mL) ve endoksilanaz aktivitesini (58,15 U/mL) inkübasyonun 2. gününde göstermiştir (Şekil 4.5. a). *Streptomyces sp.* BN407 suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 151,82 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Streptomyces sp. BN407 suşunun kültür ortamında karbon kaynağı olarak mısır samanı kullanıldığında ise en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarı 5. günde (0,48 mg/mL), en yüksek endoksilanaz aktivitesini (50,94 U/mL) 2. günde belirlenmiştir (Şekil 4.5. b). *Streptomyces sp.* BN407 suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 166,61 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak meşe talaşı kullanıldığında ise *Streptomyces sp.* BN407 suşu tarafından üretilen en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarı 5. günde (0,12 mg/mL), en yüksek endoksilanaz aktivitesi (68,84 U/mL) ise yine 2. günde belirlenmiştir (Şekil 4.5. c). *Streptomyces sp.* BN407 suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 1209,24 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisi kullanıldığında da *Streptomyces sp.* BN407 suşunun ürettiği en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarı 5. günde (0,26 mg/mL), en yüksek endoksilanaz aktivitesi (63,73 U/mL) ise diğer karbon kaynaklarından farklı olarak 4. günde belirlenmiştir (Şekil 4.5. d). *Streptomyces sp.* BN407 suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 4. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 318,41 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Kullanılan tüm karbon kaynakları karşılaştırıldığında *Streptomyces sp.* BN407 suşu tarafından en yüksek endoksilanaz üretiminin, karbon kaynağı olarak meşe talaşı (68,84 U/mL) ve hint yağı bitkisi (63,73 U/mL) kullanıldığında gerçekleştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.5. *Streptomyces* sp. BN407'in (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitki samanı içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasel-lüler protein miktarları.

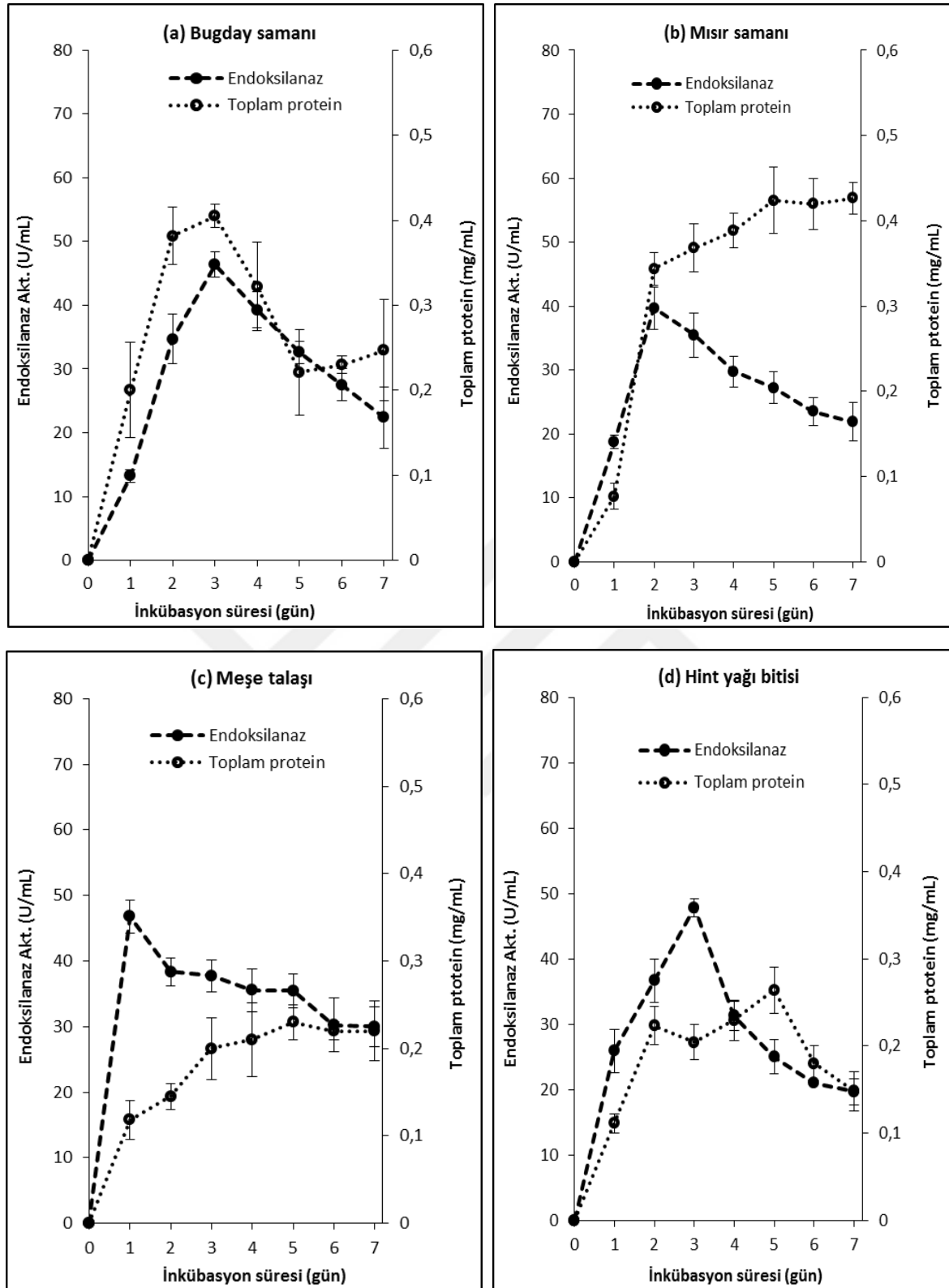
Bu çalışmada kullanılan ve daha önceden tanımlanmış bir suş olan *Actinomadura geliboluensis*, karbon kaynağı olarak buğday samanının kullanıldığı kültür ortamında en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarını (0,40 mg/mL) ve endoksilanaz aktivitesini (46,35 U/mL) inkübasyonun 3. gününde göstermiştir (Şekil 4.6. a). *A. geliboluensis* suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 3. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 114,46 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Karbon kaynağı olarak mısır samanının kullanıldığı kültür ortamında ise *A. geliboluensis* suşunun ürettiği endoksilanaz değerleri 2. günde (39,67 U/mL) ve 3. (35,48 U/mL) günde birbirine yakın görüne de; 2. günde üretmiş olduğu toplam ekstrasellüler proteinin (0,34 mg/ml), 3. günde üretmiş olduğu toplam ekstrasellüler proteine (0,37 mg/ml) nispeten daha düşük olması nedeniyle, 2. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi 115,47 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.6. b).

Karbon kaynağı olarak meşe talaşının kullanıldığı kültür ortamında ise *A. geliboluensis* suşunun ürettiği endoksilanaz miktarı 1. günde (46,78 U/mL) en yüksek düzeyde gerçekleşmiştir. Ancak, inkübasyonun 2.-5. günleri boyunca *A. geliboluensis* suşunun ürettiği endoksilanaz miktarı (38,32-35,44 U/mL) nispeten sabit olarak seyretmiş, daha sonra düşüşe geçmiştir (Şekil 4.6. c). *A. geliboluensis* suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 1. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi 395,83 U/mg protein olarak gerçekleşirken, inkübasyonun 2.-5. günleri arasındaki endoksilanaz özgül aktivitesi 264-16-154,07 U/mg olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.6. c).

Karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisi kullanıldığında da *A. geliboluensis* suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi inkübasyonun 3. gününde (47,81 U/mL), en yüksek toplam ekstrasellüler protein miktarı 5. günde (0,26 mg/mL) görülmüştür (Şekil 4.6. d). *A. geliboluensis* suşunun en yüksek endoksilanaz aktivitesi gösterdiği 3. gündeki endoksilanaz özgül aktivitesi ise 2,34,24 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Actinomadura geliboluensis suşu, her ne kadar en yüksek endoksilanaz aktivitelerini farklı karbon kaynakları üzerinde farklı günlerde gösterse dahi, buğday samanı (46,35 U/mL) meşe talaşı (46,78 U/mL) ve hint yağı bitkisinde (47,81 U/mL) birbirine en yakın değerleri göstermiştir.



Şekil 4.6. *Actinomadura geliboluensis*'in (a) buğday samanı, (b) mısır samanı, (c) meşe talaşı ve (d) hint yağı bitisi içeren sıvı besiyerlerindeki endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları.

Karbon ve enerji kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanı, mısır talaşı, meşe talaşı ve hint yağı bitkisinde endoksilanaz üretimi açısından test edilen *Streptomyces* üyesi BN208, BN212^T ve BN407 izolatları ve *A. geliboluensis* suşları arasından en yüksek endoksilanaz üretim değerine (sırasıyla, 69,94 U/mL; 64,64 U/mL; 70,37 U/mL ve 76,34 U/mL) *Streptomyces* sp. BN212^T suşu ulaşmıştır. En yüksek endoksilanaz özgül aktivitesi ise 3. günde 470,20 U/mg protein olarak hint yağı bitkisinin olduğu kültür ortamında belirlenmiştir.

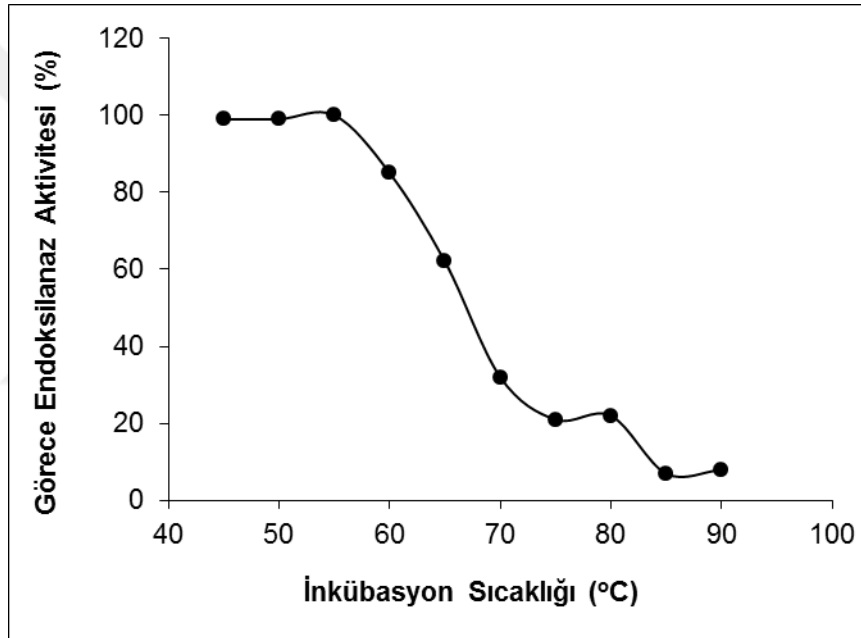
Fungusların bazı üyelerinde ise ksilanolitik ve selüloolitik enzim sistemlerinin düzenleyici bir kontrol mekanizması ile birbirlerinden ayrıldığı rapor edilmiştir [8]. Bunun sonucu olarak da ksilan üzerinde büyüme sırasında bu fungal türler, özgül endoksilanazlar sentezlerken ya çok az miktarda ya da hiç selüloz sentezlememektedirler. *S. lividans* [153] ve *S. flavogriseus*'da [154] ise bunun tersi bir durum gözlenmiştir; selüloz içeren besiyerinde çok düşük miktarda endoksilanaz sentezlenirken, ksilan üzerinde büyüme sırasında endoksilanaz ve endoglukanaz enzim sistemlerinin ikisi de etkin biçimde indüklenmiştir. Bu gözlemlerin doğruluğu, daha sonra *S. lividans*'ın yabancı tip bir suşu ile yapılan mutagenез deneyleri ile onaylanmıştır [155].

Streptomyces üyeleri söz konusu olduğunda, rapor edilmiş en yüksek endoksilanaz aktivitesi *Streptomyces* sp. Ab106 için 32 U/mL [156]; *Streptomyces* sp. NT508 için 18,89 U/mL [65]; *Streptomyces* sp. TA208 suşu için 22,474 U/mL [157]; *Streptomyces albus* için 12 U/mL [158] ve *Streptomyces cuspidosporus* için 22 U/mL [159], *Streptomyces* sp. CA24 için 60,00 U/mL [160] olduğundan, *Streptomyces* sp. BN212^T'nin endoksilanaz aktivitesi rapor edilen bu değerlerden daha yüksektir. *Streptomyces* sp. AMT-3 suşu için rapor edilen 70,00 U/mL [161] ise *Streptomyces* sp. BN212^T'nin hint yağı bitkisi üzerinde ürettiği endoksilanaz aktivitesine (76,34 U/mL) en yakın değerdir. *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ürettiği endoksilanaz aktivitesi ayrıca *Bacillus circulans* AB16 (19 U mL⁻¹) [162], *Thermomyces thalophilus* (18 U mL⁻¹) [163] ve *Clostridium absonum* CFR-702 (9,9 U mL⁻¹) [164] gibi termotolerant alkalifilik endoksilanaz üreticileri için rapor edilen değerlerden de daha yüksektir. Tüm bu çalışmalardaki sonuçlar kıyaslandığında hint yağı bitkisinin karbon kaynağı olarak kullanılmasının maliyeti düşük ve verimli sonuçlar verdiği söylenebilir.

Çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. BN208, BN212^T ve BN407 suşları ve *A. geliboluensis* suşu karşılaştırıldığında, dört farklı karbon kaynağının olduğu kültür ortamlarında en yüksek endoksilanaz aktivitelerini *Streptomyces* sp. BN212^T suşu göstermiş olup, bu suş da en yüksek endoksilanaz üretim değerine karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisinin kullanıldığı kültürlerde ulaşmıştır. Bu nedenle, bundan sonraki çalışmalara *Streptomyces* sp. BN212^T suşu ile devam edilmesine ve bu suş tarafından endoksilanaz üretiminin optimizasyonuna ve üretilen endoksilanazın kısmi karakterizasyonuna karar verilmiştir.

4.3.2. İnkübasyon Sıcaklığının *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanaz Üretimi Üzerine Olan Etkisi

Streptomyces sp. BN212^T suşu ile endoksilanaz üretiminin optimum sıcaklığının belirlenmesinde karbon kaynağı olarak 0,25 mm partikül boyutlu 7,5 g/L hint yağı bitkisi içeren MS-YEM besiyeri kullanılmış, inkübasyon 45-90 °C aralığında, 120 rpm'de, 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonun 3. gününün sonunda *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz üretiminin göreceli olarak 45 °C, 50 °C ve 55 °C'de maksimum düzeyde (%100) gerçekleştiği gözlemlenmiş olup, 60 °C'deki göreceli endoksilanaz üretiminin ise %85'e gerilediği belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T suşunun inkübasyon sıcaklığı 70 °C olduğunda ise göreceli endoksilanaz üretimi %32, 75 °C olduğunda ise %22 olmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Farklı inkübasyon sıcaklıklarının *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz üretimi üzerine etkisi.

Yapılan bir çalışmada Enez ve ark. [165] topraktan izole ettikleri *Streptomyces* sp.'nin maksimum endoksilanaz değerini belirlemek için 25 °C'den 5 °C artan sıcaklık aralıklarıyla 55 °C'ye kadar olan inkübasyon koşullarında, karbon kaynağının ksilan olduğu kültürlerde maksimum endoksilanaz üretiminin 35 °C'de gerçekleştiğini, 40 °C'den sonra enzim üretiminin göreceli olarak azaldığını rapor etmişlerdir. Porsuk ve ark. [160] tarafından yapılan çalışmada ise izole ettikleri *Streptomyces* sp. CA24 suşu 30-80 °C aralığında karbon kaynağı olarak oat spelt ksilanın kullanıldığı kültür ortamında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda en yüksek endoksilanaz aktivitesi göreceli olarak 50 °C ve 60 °C'de gözlemlenmiştir.

Bir başka çalışmada ise Keskar ve ark. [166] izole ettikleri *Streptomyces* T7'yi 28, 37, 45 ve 50 °C'de, buğday kepeğinin karbon kaynağı olarak kullanıldığı kültür ortamlarında inkübe etmişler ve 3 günlük inkübasyonun sonunda en yüksek endoksilanaz aktivitesi 50 °C'de kaydedilmiştir. Enez ve ark.'nın [165] izole ettiği *Streptomyces* sp. suşu (35 °C) dışında hemen hemen tüm çalışmalarda, termofilik *Streptomyces* sp. suşlarının maksimum endoksilanaz aktivitesi 50 °C civarındadır. Ayrıca çoğunlukla maksimum aktivite sadece bir sıcaklık değerinde verilmiştir.

Bir mikroorganizma ya da mikrobiyal enzimin endüstriyel uygulamalarda potansiyele sahip olabilmesi için yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite gösterebilmesi bir avantajdır. Bu çalışmada kullanılan *Streptomyces* sp. BN212^T tarafından üretilen endoksilanaz enziminin maksimum olarak üretildiği optimum inkübasyon sıcaklığı ise Şekil 4.7'de de görüldüğü üzere üç farklı sıcaklıkta korumuştur (45, 50 ve 55 °C).

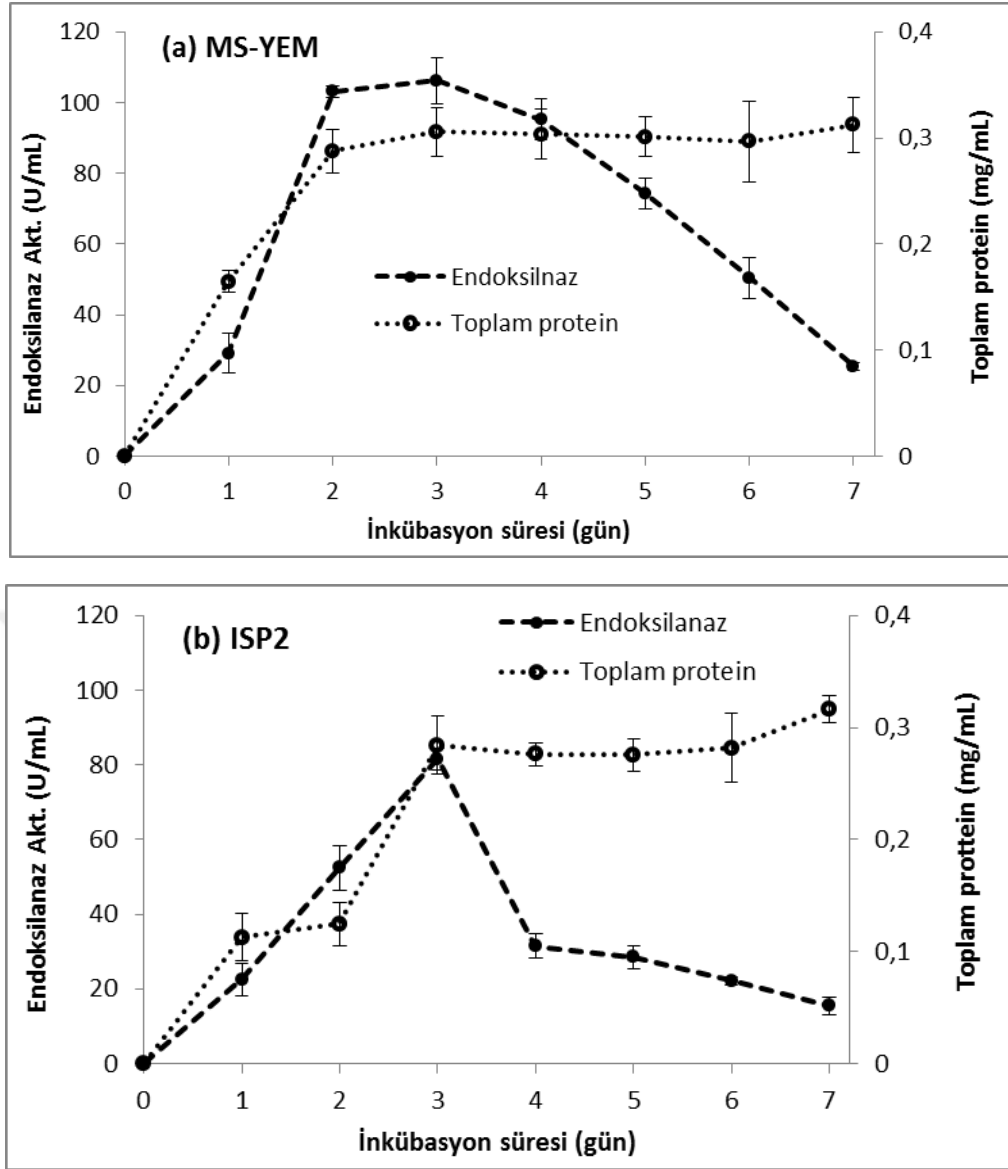
4.3.3. Besiyeri Çeşidinin *Streptomyces* sp. BN212^T ile Endoksilanaz Üretimine Etkisi

MS-YEM ve ISP-2 besiyerlerine karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisi %0,4 (w/v) oranında ilave edilmiş ve *Streptomyces* sp. BN212^T suşu 50 °C sıcaklıkta, 120 rpm'de, 7 gün süreyle inkübe edilmiştir.

Streptomyces sp. BN212^T suşunun MS-YEM besiyerindeki 7 günlük inkübasyon sonucunda en yüksek endoksilanaz aktivitesi 2., 3. ve 4. günlerde (sırasıyla, 103,17 U/mL, 106,19 U/mL ve 95,21 U/mL) belirlenmiş olup, aynı günlerdeki toplam ekstrasellüler protein miktarı ise sırasıyla, 0,29 mg/mL, 0,31 mg/mL ve 0,30 mg/mL olarak birbirine yakın bulunmuştur. En yüksek endoksilanaz aktivitesinin belirlendiği 3. günde ise özgül endoksilanaz aktivitesi ise 347,48 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.8. a).

Streptomyces sp. BN212^T suşunun ISP-2 besiyerindeki 7 günlük inkübasyonu sonucunda en yüksek endoksilanaz aktivitesi 3. günde 81,52 U/mL olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.8. b). Toplam ekstrasellüler protein miktarlarına bakıldığında 3. günden 7. güne kadar yakın değerler sergilemiş olup, 0,28-0,32 mg/mL arasında değişmektedir (Şekil 4.8. b). En yüksek endoksilanaz aktivitesinin belirlendiği 3. günde ise özgül endoksilanaz aktivitesi ise 286,74 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

Her iki besiyerindeki endoksilanaz aktivitesi ve üretilen ekstrasellüler protein miktarına bağlı olan özgül endoksilanaz aktivitesi değerlendirildiğinde ise MS-YEM besiyerinin enzim üretimi için ISP2 besiyerine nispeten daha uygun olduğu görülmektedir. Bu sebeple, *Streptomyces* sp. BN212^T suşu ile daha sonra yapılacak olan optimizasyon çalışmalarında MS-YEM besiyerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.8. *Streptomyces sp.* BN212^T'nin **(a)** MS-YEM ve **(b)** ISP-2 sıvı besiyerindeki üremesi, endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları.

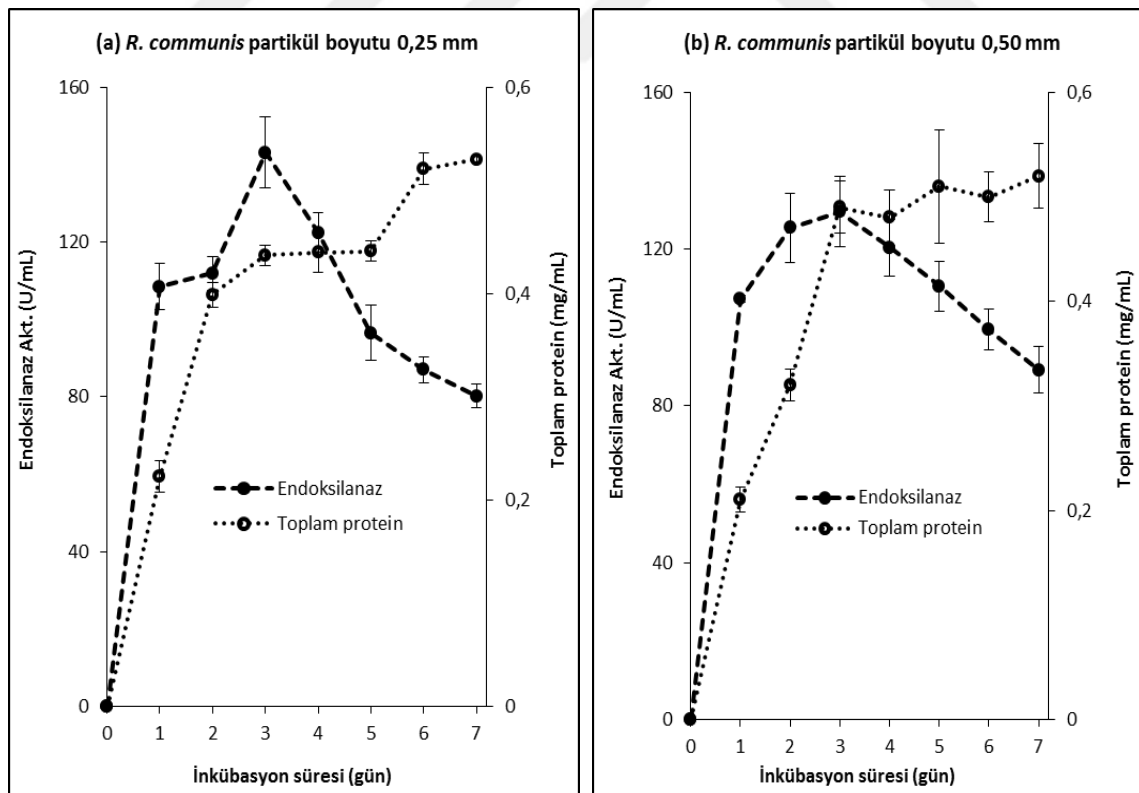
4.3.4. *Ricinus communis*'in (Hint Yağı Bitkisi) Farklı Partikül Boyutlarının ve Oranlarının *Streptomyces sp.* BN212^T Suşunun Endoksilanaz Üretimi Üzerine Etkisi

Bilgimiz dâhilinde, bu çalışmaya kadar hint yağı bitkisinin lignoselüloz yıkan mikroorganizmalar ve bu mikroorganizmaların ürettiği enzimlerle parçalanmasına ve ilgili enzimleri üretmek için substrat olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasına dair bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada ise *Streptomyces sp.* BN212^T suşu ile en yüksek endoksilanaz aktivitelerinin tespit edildiği toz haline getirilmiş hint yağı bitkisinin farklı boyutlarının enzim üretimi üzerine olan etkisi de araştırılmış olup, bu amaçla 0,25 mm ve 0,50 mm partikül boyutlarına sahip hint yağı bitkisi kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisi 0,25 mm ve 0,50 mm partikül

boyutlarında %0,4 (w/v) oranında kültür sıvısına ilave edilmiş ve *Streptomyces* sp. BN212^T suşu 50 °C sıcaklıkta, 120 rpm'de, 7 gün süreyle inkübe edilmiştir.

Hint yağı bitkisinin partikül boyutunun 0,25 mm olduğu kültür ortamında 1. ve 2. günlerde endoksilanaz aktivitelerinde yakın değerler görülmüş olup (sırasıyla, 108,48 U/mL ve 111,96 U/mL), en yüksek endoksilanaz aktivitesi ise 3. günde 143,11 U/mL olarak görülmüştür (Şekil 4.9. a). Toplam ekstrasellüler protein miktarı ise 2-5. günler arasında birbirine yakın (0,40-0,44 mg/mL) olup, en yüksek değerleri ise 6. ve 7. günde (sırasıyla, 0,52 mg/mL ve 0,53 mg/mL) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9. a). *Streptomyces* sp. BN212^T suşu tarafından 0,25 mm partikül boyutuna sahip hint yağı bitkisi üzerinde üretilen endoksilanaz enziminin en yüksek özgül aktivitesi ise inkübasyonun 3. gününde 327,39 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.

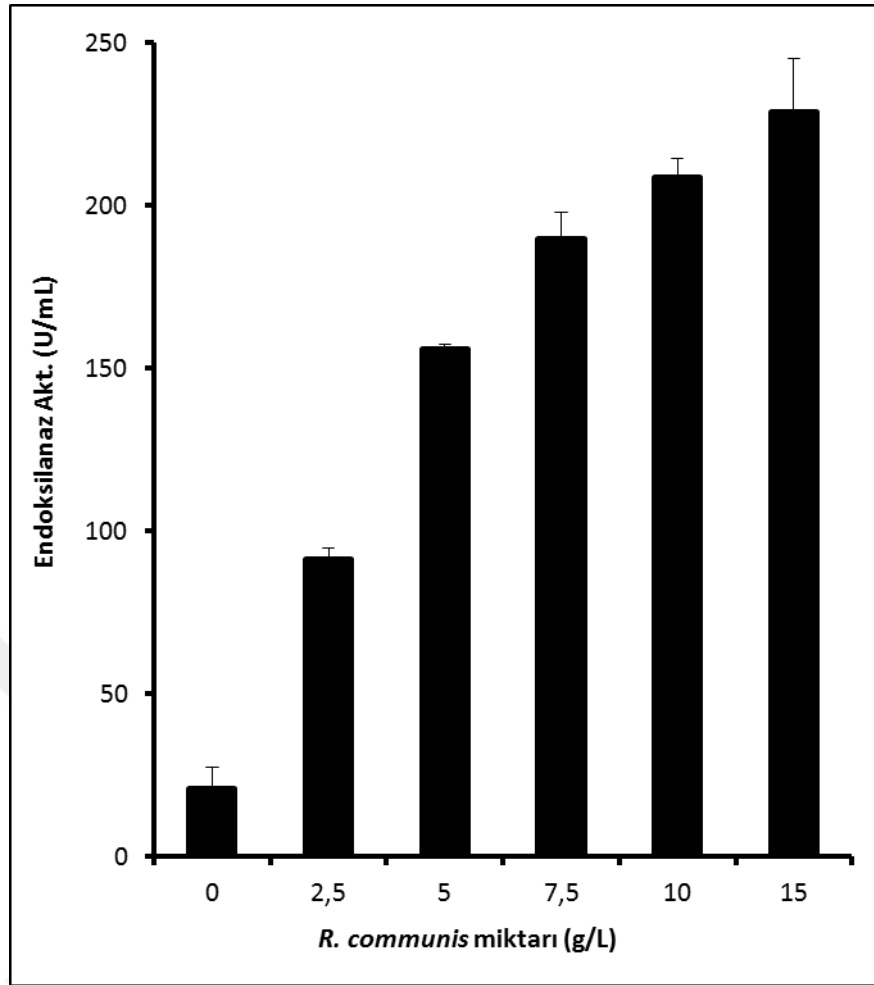
Hint yağı bitkisinin partikül boyutunun 0,50 mm olduğu kültür ortamında ise 2., 3. ve 4. günlerde endoksilanaz aktivitelerinde çok yakın değerler görülmüş olup (sırasıyla, 125,42 U/mL; 129,55 U/mL ve 120,36 U/mL) olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.9. b). Bu dönemlerdeki toplam ekstrasellüler protein miktarları ise yine sırasıyla 0,32 mg/mL, 0,49 mg/mL ve 0,48 mg/mL olarak belirlenmiştir. (Şekil 4.9. b). *Streptomyces* sp. BN212^T suşu tarafından 0,50 mm partikül boyutuna sahip hint yağı bitkisini üzerinde üretilen endoksilanaz enziminin en yüksek özgül aktivitesi ise inkübasyonun 2. gününde 391,94 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir.



Şekil 4.9. *Streptomyces* sp. BN212^T'nin *R. communis*'in farklı partikül boyutları **(a)** 0,25 mm ve **(b)** 0,50 mm üzerinde üremesi, endoksilanaz aktiviteleri ve toplam ekstrasellüler protein miktarları.

Karbon kaynağı olarak iki farklı partikül boyutuna sahip (0,25 mm ve 0,50 mm) hint yağı bitkisi üzerinde gelişen *Streptomyces* sp. BN212^T suşu tarafından üretilen endoksilanaz miktarları her iki partikül boyutunun kullanıldığı kültür ortamlarında neredeyse aynı değerlerdedir. Ancak, endoksilanaz aktiviteleri karşılaştırıldığında en yüksek endoksilanaz aktivitesi her iki partikül boyutunun kullanıldığı kültür ortamında da 3. günde gerçekleşmesine rağmen, 0,25 mm partikül boyutlu kültürde (143,11 U/mL ve 327 U/mg protein), 0,50 mm partikül boyutlu kültüre (129,55 U/mL ve 264,38 U/mg protein) kıyasla daha yüksek olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.9). Bu sonuçlara göre, en yüksek endoksilanaz aktivitesinin 0,25 mm partikül boyutlu hint yağı bitkisinde görüldüğüne karar verilerek, *Streptomyces* sp. BN212^T suşunun 0,25 mm partikül boyutundaki hint yağı bitkisinin farklı oranlarındaki endoksilanaz üretimleri incelenmiştir.

Karbon kaynağı olarak hint yağı bitkisi 0,25 mm partikül boyutunda 0, 2,5, 5, 7,5, 10 ve 15 g/L oranlarında kültür ortamlarına ilave edilmiş ve *Streptomyces* sp. BN212^T suşu ile inoküle edilen kültür kapları 50 °C sıcaklıkta, 120 rpm'de, 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T suşu tarafından üretilen endoksilanaz enziminin kültür ortamındaki hint yağı bitkisi oranının artışıyla doğru orantılı olarak gerçekleştiği; hint yağı bitkisi içermeyen kontrol kültürdeki endoksilanaz aktivitesi 20,75 U/mL olarak gerçekleşirken, 2,5-15 g/L arasında hint yağı bitkisi içeren kültürlerdeki endoksilanaz aktiviteleri ise 91,57 U/mL ile 229,01 U/mL arasında gerçekleşmiştir (Şekil 4.10).

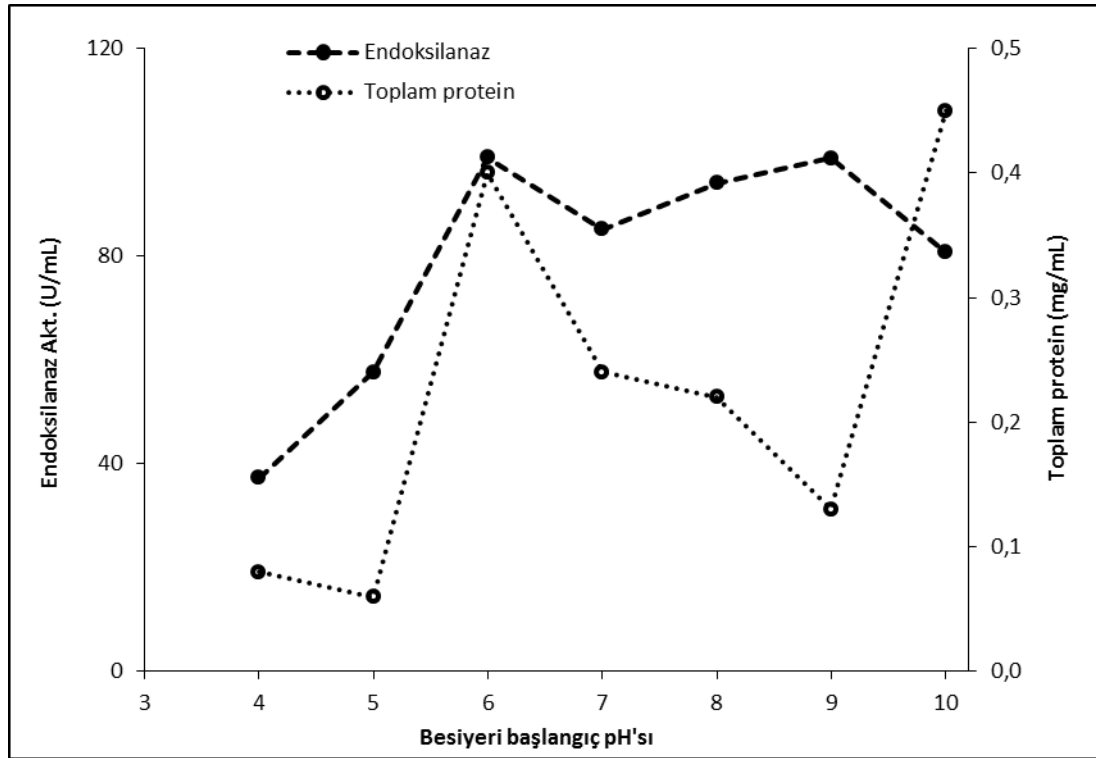


Şekil 4.10. 0,25 mm partikül boyutuna sahip *R. communis*'in farklı oranlarının *Streptomyces* sp. BN212^T'nin endoksilanaz üretimine etkisi.

4.3.5. Kültür pH'sının *Streptomyces* sp. BN212^T'nin Endoksilanaz Üretimi Üzerine Olan Etkisi

Kültür pH'sının, *Streptomyces* sp. BN212^T suşu tarafından üretilen ekstrasellüler endoksilanaz üretimi üzerine olan etkisinin belirlenmesinde, besiyeri pH'sı 4,0 ile 10,0 arasında değişecek şekilde ayarlanmıştır. Çalışmada karbon ve enerji kaynağı olarak 0,25 mm partikül boyutlu 7,5 g/L hint yağı bitkisi içeren MS-YEM besiyeri kullanılmış, inkübasyon 50 °C 'de, 120 rpm'de, 72 saat süreyle yapılmıştır.

Streptomyces sp. BN212^T tarafından üretilen endoksilanaz aktivitelerine bakıldığında pH 6, 8 ve 9'da (sırasıyla, 99,01 U/mL; 94,03 U/mL ve 98,88 U/mL) üretilen endoksilanaz enziminin miktarı yakın değerlerde gerçekleşmiştir (Şekil 4.11). pH 6, 8 ve 9'daki endoksilanaz özgül aktiviteleri ise sırasıyla, 247,53 U/mg protein, 427,40 U/mg protein ve 760,62 U/mg protein olarak gerçekleşmiştir. En düşük endoksilanaz aktivitesi ise pH 4 ve pH 5'de gerçekleşmiş olup sırasıyla, 37,33 U/mL ve 57,60 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Besiyeri başlangıç pH'sının *Streptomyces* sp. BN212^T'nin endoksilanaz üretimine etkisi.

Kültür ortamının başlangıç pH'sının 4-12 aralığında olduğu çalışmada Porsuk ve ark. [160] *Streptomyces* sp. CA24'ün inkübasyon süresinin 3. gününde en yüksek endoksilanaz aktivitesinin pH 10'da görüldüğünü rapor etmişlerdir. Enez ve ark. [165] ise besiyeri başlangıç pH'sının 4-10 aralığını kullanmış olup, inkübasyonun sonunda izole ettikleri *Streptomyces* sp.'nin en yüksek endoksilanaz aktivitesinin pH 7'de olduğunu kaydetmişlerdir.

Alışılmışın dışında Ding ve ark. [167] kültür besiyerinin pH aralığını 5-7,5 arasında tutmuştur. İnkübasyon sonunda *Streptomyces olivaceoviridis* E-86'nın en yüksek endoksilanaz aktivitesi pH 6'da (1635 U/mL) görülmüş olup, pH 5 (1434 U/ml) ve pH 5,5'de de (1503 U/ml) birbirine yakın yüksek endoksilanaz ektivitesi değerleri göstermiştir. Yine Enez ve ark. gibi Nour El-Dein ve ark.'da [168] izole ettikleri *Streptomyces* sp. K37 suşunu besiyeri başlangıç pH'sının 4-10 aralığında olduğu koşullarda inkübe etmişlerdir. İnkübasyonun sonunda *Streptomyces* sp. K37 suşu en yüksek endoksilanaz aktivitesine pH 8'de ulaşmıştır.

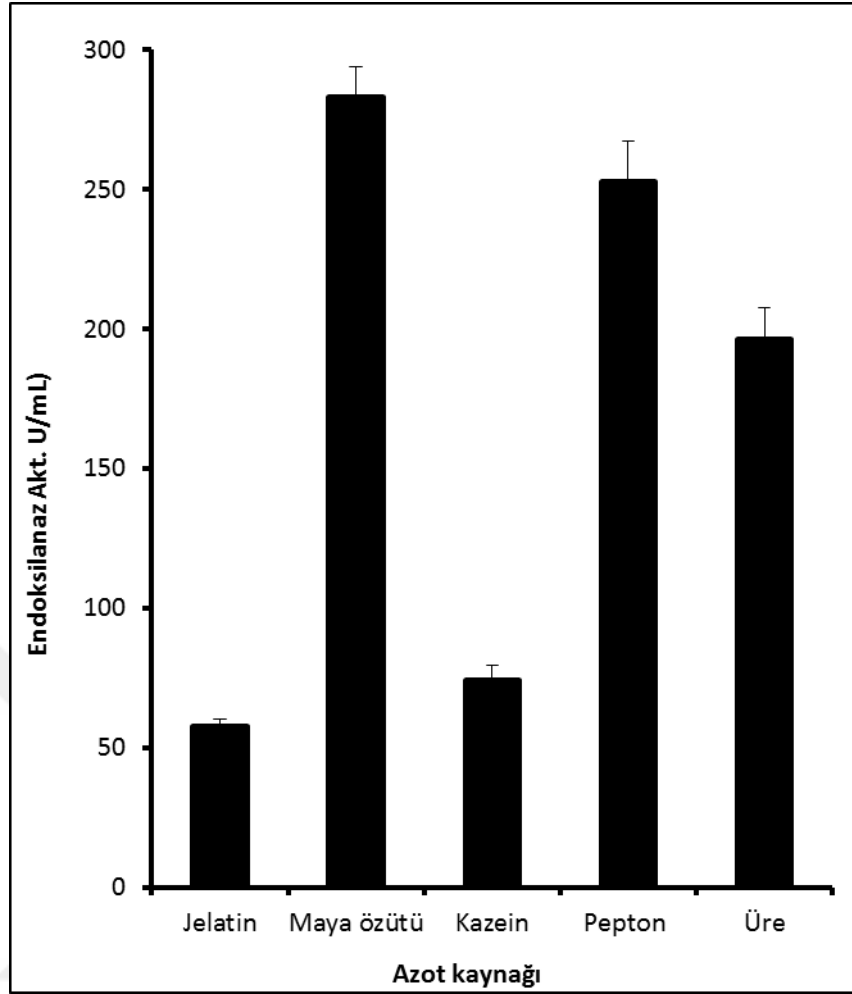
Şekil 4.11'de görüldüğü gibi *Streptomyces* sp. BN212^T suşu inkübasyon sonunda pH 6 (99,01 U/mL), pH 8 (94,03 U/mL) ve pH 9'da (98,88 U/mL) birbirine yakın endoksilanaz aktivitesi değerleri göstermiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T suşu da Ding ve ark.'larının ulaştığı pH 6'da ve Enez ve ark.'larının ulaştığı pH 8'de yüksek değerlerini göstermiştir. Ancak Ding ve ark.'larının ulaştığı değer ile *Streptomyces* sp. BN212^T suşunun ulaştığı değerler arasında büyük bir fark vardır (sırasıyla; 1635 U/mL ve 99,01 U/mL).

4.3.6. Farklı Azot Kaynaklarının *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanaz Üretimi Üzerine Etkisi

Streptomyces sp. BN212^T suşunun farklı karbon kaynakları üzerindeki endoksilanaz üretimi belirlendikten sonra, farklı azot kaynakları üzerindeki endoksilanaz üretimi incelenmiştir. Çalışmada karbon kaynağı olarak 0,25 mm partikül boyutlu 7,5 g/L hint yağı bitkisi içeren, MS-YEM besiyeri kullanılmıştır. Ancak, MS-YEM besiyerinde bulunan maya özütü alternatif azot kaynağı olarak denenilen jelatin, kazein, pepton ve üre ile değiştirilmiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T suşu ile inoküle edilen kültür sıvıları ise 50 °C 'de, 120 rpm'de, 72 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Bu koşullarında hazırlanmış olan kültür ortamlarına 3. günün sonunda endoksilanaz aktiviteleri ölçüldüğünde ise maya özütü (283,15 U/mL), pepton (252,85 U/mL) ve üre (196,37 U/mL) içeren kültür ortamlarında fazlaca aktivite görülmüş, jelatin (57,71 U/mL) ve kazein (74,24 U/mL) içeren kültürlerde ise düşük aktiviteler ortaya çıkmıştır (Şekil 4.12). Tüm azot kaynakları karşılaştırıldığında maya özütü içeren kültür ortamında en yüksek endoksilanaz aktivitesinin olduğu görülmüştür.

Genellikle birçok çalışmada en verimli sonuçlar azot kaynağı olarak maya özütü kullanıldığı zaman elde edilmiştir. Sanjivkumar ve ark. [168] *Streptomyces olivaceus* (MSU3) suşu azot kaynağı olarak maya özütünün varlığında en yüksek endoksilanaz aktivitesini gösterdiğini belirtmiştir. Porsuk ve ark. ise [160] *Streptomyces* sp. CA24'ün maya özütü varlığında en yüksek aktiviteyi gösterdiğini (197 U/mL), pepton varlığında ise maya özütüne nazaran yaklaşık 100 U/mL değer gösterdiğini belirtmiştir. Şekil 4.12'de gösterildiği gibi *Streptomyces* sp. BN212^T suşu da azot kaynağı olarak maya özütü kullanıldığında en yüksek aktiviteye (283,15 U/mL) ulaşmış olup, pepton varlığında *Streptomyces* sp. CA24 suşuna kıyasla yine yüksek endoksilanaz aktivitesine (252,85 U/mL) sahiptir.

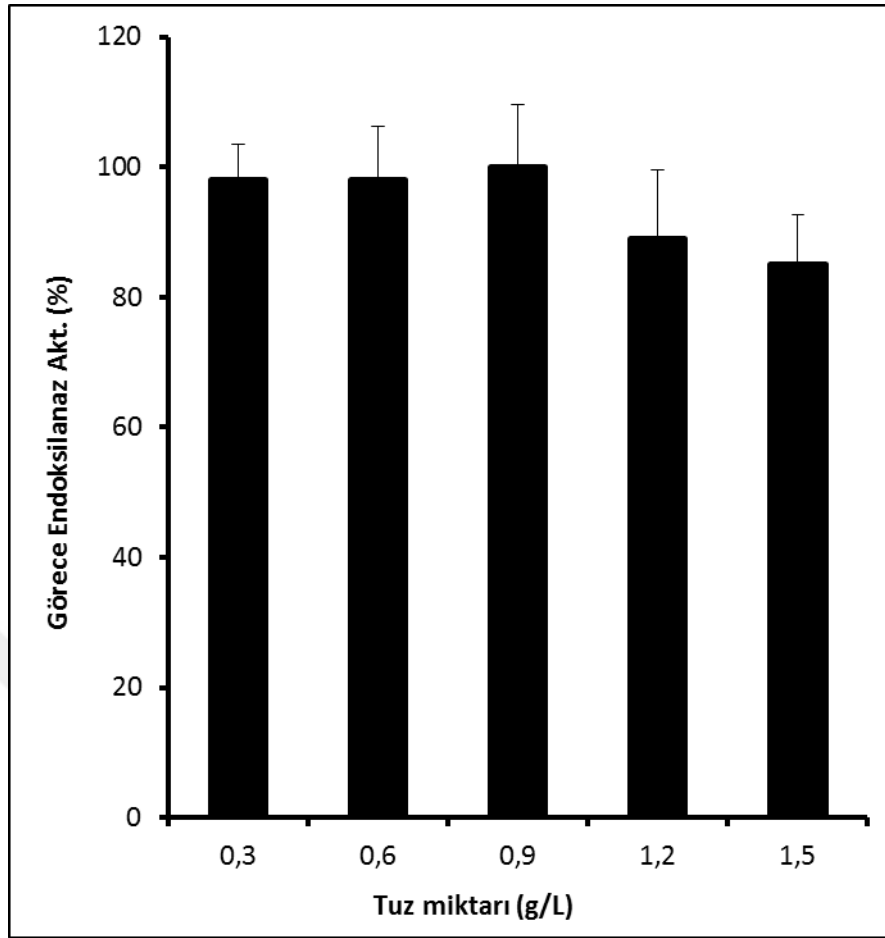
Ding ve ark. [167] sığır eti peptonu kullanıldığında *Streptomyces olivaceoviridis* E-86'nın en yüksek aktivite gösterdiğini söylemiştir. Bir başka çalışmada ise Adıgüzel ve Tunçer [169], *Actinomadura geliboluensis*'in en yüksek endoksilanaz aktiviteye azot kaynağı olarak maya özütü varlığında (193,27 U/mL) ulaşmıştır. Sonrasında sırasıyla pepton varlığında 144,55 U/mL, kazein varlığında 76,25 U/mL ve jelatin varlığında 46,27 U/mL değerlerindedir. Yine *Actinomadura geliboluensis* suşuna da kıyasla *Streptomyces* sp. BN212^T suşu maya özütü ve pepton varlığında daha yüksek (sırasıyla, 283,15 U/mL ve 252,85 U/mL) aktivite göstermiştir. Bunun yanı sıra jelatin (57,71 U/mL) ve kazein (74,24 U/mL) varlığında *Actinomadura geliboluensis* suşuna yakın aktivite değerleri gözükmemektedir.



Şekil 4.12. Farklı azot kaynaklarının *Streptomyces* sp. BN212^T'nin endoksilanaz üretimine etkisi.

4.3.7. Farklı NaCl Derişimlerinin *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanaz Üretimi Üzerine Etkisi

Streptomyces sp. BN212^T'nin farklı tuz derişimlerindeki endoksilanaz üretiminin incelenmesi, karbon kaynağı olarak 0,25 mm partikül boyutlu 7,5 g/L hint yağı bitkisi içeren, MS-YEM besiyerinde gerçekleştirilmiş ve inkübasyon 50 °C 'de, 120 rpm'de, 72 saat süreyle yapılmıştır. Kültür ortamlarına sırasıyla 3, 6, 9, 12 ve 15 g/L NaCl eklenmiştir. İnkübasyon süresinin sonu olan 3. günün sonunda endoksilanaz aktivitelerine bakıldığında 3-9 g/L NaCl varlığında endoksilanaz üretiminin görece olarak %98-100 olduğu, tuz miktarının 12 g/L olması durumunda görece endoksilanaz üretiminin %89, 15 g/L olması durumunda ise %85 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).

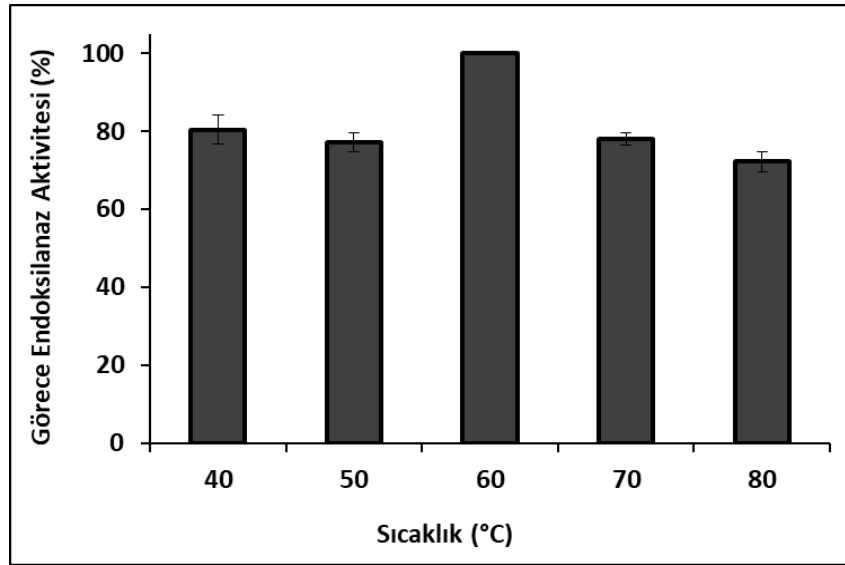


Şekil 4.13. Farklı NaCl oranlarının *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz üretimi üzerine etkisi. *Streptomyces* sp. BN212^T farklı oranlarda NaCl içeren MS-YEM besiyerinde inkübe edilmiş ve örneklerin endoksilanaz aktiviteleri standart enzim analiz ile belirlenmiştir.

4.4. *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanazının Kısmi Karakterizasyonu

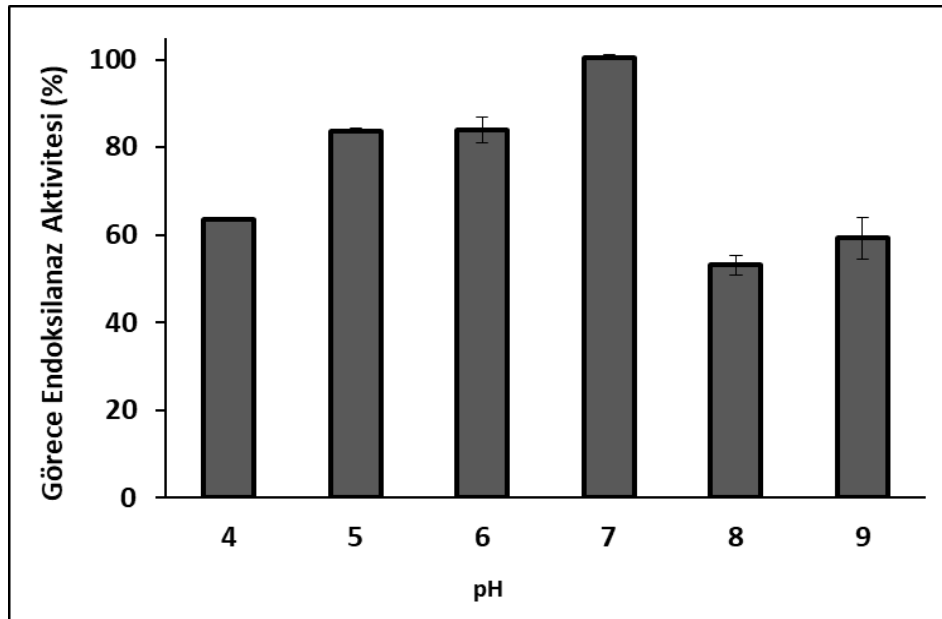
4.4.1. Sıcaklığın ve pH'nın *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanaz Aktivitesi Üzerine Olan Etkisi

Streptomyces sp. BN212^T'nin üretmiş olduğu endoksilanaz enziminin optimum aktivite sıcaklığını ve pH değerinin belirlenmesi için, bu suşun kültür sıvısının ultrafiltrasyon yöntemi ile deriştirilmesi sonucu elde edilen ham enzim prepatları kullanılmıştır. Enzim aktivitesi, reaksiyon karışımının 40-80 °C arasında inkübe edilmesinden sonra, standart tahlil metodu kullanılarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda *Streptomyces* sp. BN212^T'nin üretmiş olduğu endoksilanaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 60 °C olduğu, bu sıcaklığın altındaki değerlerde ise görece aktivitenin %80 civarında olduğu, optimal sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklar olan 70 °C ve 80 °C'de ise görece aktivitenin, sırasıyla %78 ve %72 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz enziminin optimal aktivite sıcaklığı. Endoksilanaz içeren reaksiyon örnekleri değişen sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.

Streptomyces sp. BN212^T'nin üretmiş olduğu endoksilanaz enziminin optimum pH aralıklarını tayin etmek için ise reaksiyon ortamlarının pH değerleri 4 ile 9 arasında ayarlanmış, inkübasyon sonucundaki enzim aktiviteleri standart tahlil metodu kullanılarak belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T'nin endoksilanaz enziminin en yüksek göreceli aktivitesi pH 7'de (%100) gözlemlenmiştir (Şekil 4.15). Endoksilanaz aktivitesinin en düşük olduğu pH 8'de ise göreceli aktivite %53, pH 4'de ise %63 olarak belirlenmiştir. pH 5 ve pH 6'da ise göreceli aktivite %83 olurken, pH 9'da ise %59 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz enziminin optimal pH'sı. Endoksilanaz içeren reaksiyon örnekleri değişen pH'larda inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada Beg ve ark. [170] izole ettikleri *Streptomyces* sp. QG-11-3 suşunun ürettiği ekstrasellüler endoksilanazın optimum sıcaklık değerinin 60 °C, optimal pH değerinin ise 8,6 olduğunu rapor etmişlerdir. Enez ve ark.'nın [165] yaptığı çalışmada ise izole ettikleri *Streptomyces* sp. suşu en yüksek enzim aktivitesine 40 °C ve pH 7,0'de göstermiştir. Keskar ve ark. [166] izole ettikleri *Streptomyces* T7 suşunun ürettiği endoksilanazın optimum aktivitesini ise 60 °C ve pH 4,5-5,5 aralığında gösterdiğini rapor etmişlerdir. Nour El-Dein ve ark. ise [168] izole ettikleri *Streptomyces* sp. K37 suşunun ürettiği endoksilanazın optimum aktivitesine 50 °C ve pH 8,0'de ulaştığını bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise Adıgüzel ve Tunçer [169], *Actinomadura geliboluensis*'in ürettiği endoksilanazın optimal olarak 60 °C ve pH 6,0'da aktif olduğunu kaydetmişlerdir. Aygan ve Arıkan topraktan multifonksiyonel endoksilanaz üreten *Bacillus* sp. X13 suşunu izole etmiştir. Bu suşun optimum endoksilanaz aktivitesini 40 °C ve pH 6,0'da bulmuşlardır [171]. Luo ve ark. [172] izole ettikleri alkafilik *Streptomyces althioticus* LMZM suşunun optimum endoksilanaz aktivitesini 60 °C ve pH 8,0'de kaydetmiştir.

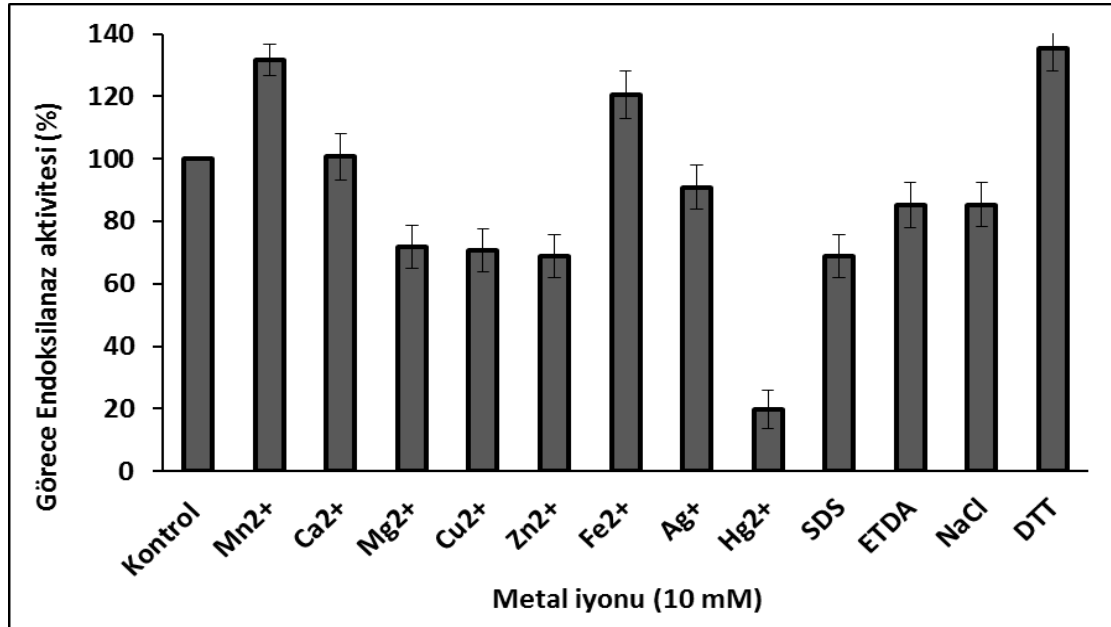
Genel olarak yapılan çalışmalarda *Thermomonospora fusca* BD25 suşunun [173] ulaştığı 70 °C dışında optimum sıcaklık 40-60 °C aralığında, optimum pH değerine ise 4,5-8,6 aralığında ulaşılmıştır. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de görüldüğü üzere *Streptomyces* sp. BN212^T suşu tarafından üretilen endoksilanaz da optimum aktiviteye 60 °C'de ve pH 7'de ulaşmıştır. pH 8,0'de ise göreceli olarak en düşük aktivitesini sergilemiştir.

4.4.2. Farklı Metal İyonlarının ve Organik Çözücülerin *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

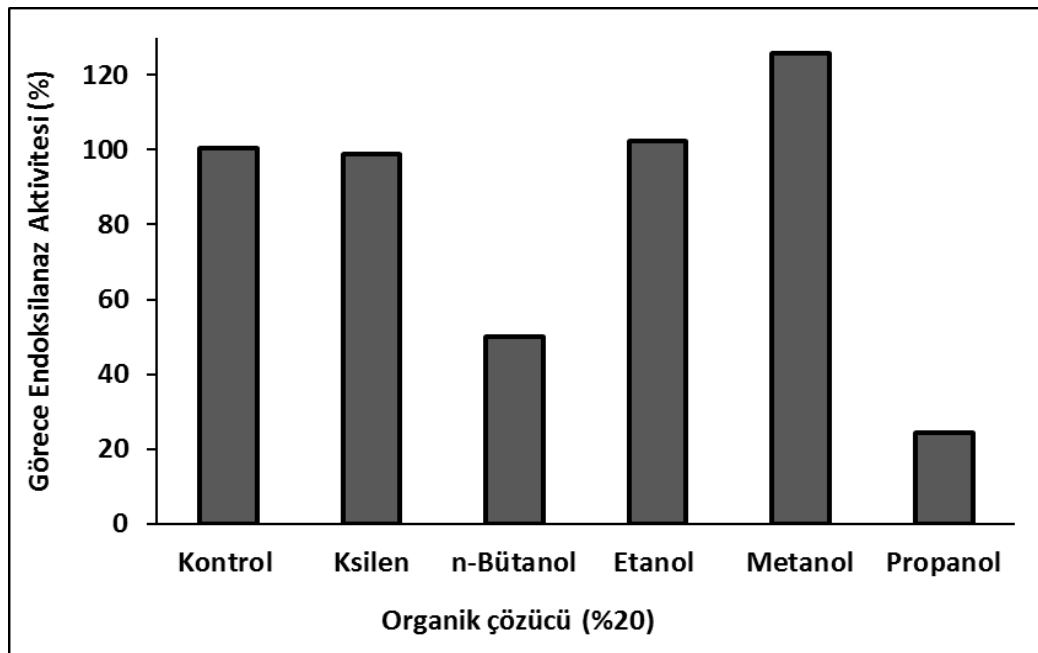
Bazı metal iyonlarının ve kimyasalların *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması için yapılan çalışmada ise reaksiyon artamına her bir metal iyonundan ve kimyasaldan, reaksiyon ortamındaki derişimleri 10 mM olacak şekilde Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Ag⁺, Hg²⁺, SDS, ETDA, NaCl ve DTT eklenmiş ve inkübasyon sonundaki endoksilanaz aktiviteleri standart tahlil metoduyla belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstrasellüler endoksilanaz aktivitesi Mn²⁺ (%131), Fe²⁺ (%120) ve DTT (%135) varlığında indüklenirken, Ca²⁺ (%100), Mg²⁺ (%71), Cu²⁺ (%70), Ag⁺ (%90), SDS (%68), EDTA (%85) ve NaCl (%85) varlığında büyük ölçüde korunduğu, Hg²⁺ (%19) varlığında ise büyük ölçüde inhibisyona uğradığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.16).

Farklı organik çözücülerin *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması için yapılan çalışmada ise reaksiyon artamına her bir organik çözücünün reaksiyon ortamındaki son oranı %20 (v/v) olacak şekilde ksilen, *n*-bütanol, etanol, metanol ve propanol eklenmiş ve inkübasyon sonundaki endoksilanaz aktiviteleri standart tahlil metoduyla belirlenmiştir. *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstrasellüler endoksilanazı göreceli olarak sadece

metanol (%125) varlığında indüklenirken, ksilen (%98) ve etanol (%102) varlığında büyük ölçüde korunduğu, *n*-bütanol (%50) ve propanol (%24) varlığında ise büyük ölçüde inhibisyona uğradığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Farklı metal iyonlarının ve kimyasalların *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz aktivitesi üzerine etkisi. Metal iyonlarını ve kimyasalları içeren reaksiyon örnekleri 60 °C’de inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.



Şekil 4.17. Farklı organik çözücülerin *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz aktivitesi üzerine etkisi. Organik çözücülerini içeren reaksiyon örnekleri 60 °C’de inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.

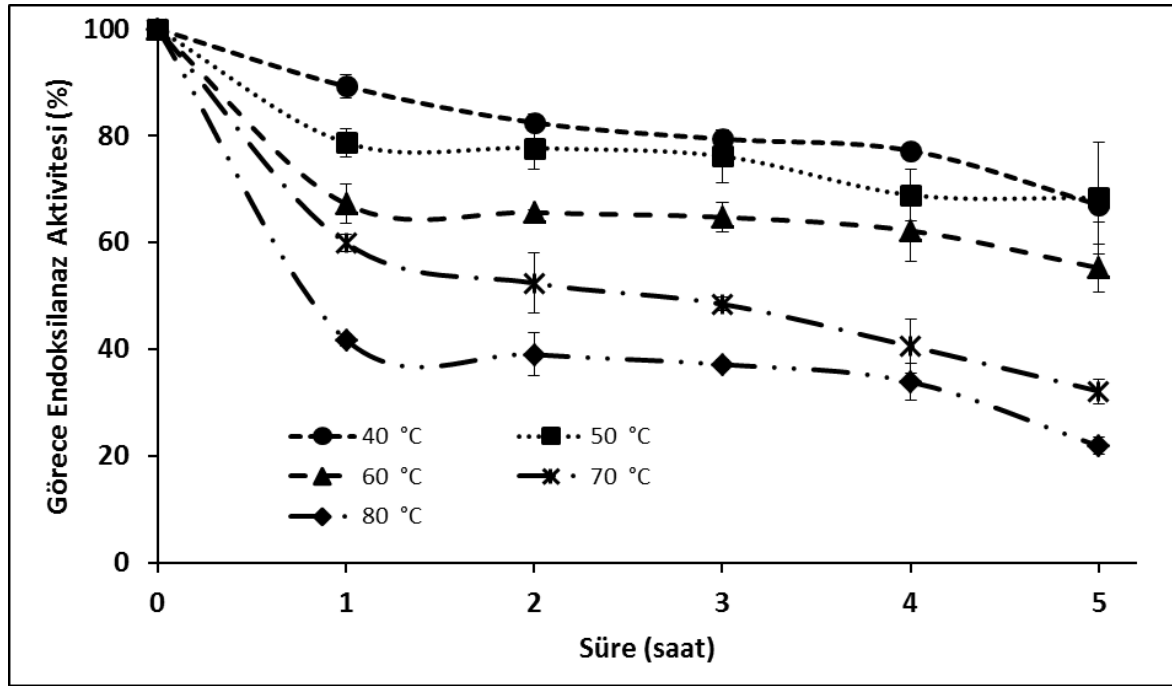
Meryandini ve ark. [174] *Streptomyces* sp. SKK1-8 suşunun endoksilanaz aktivitesinin 5 mM Cu^{2+} varlığında inhibisyona uğradığını, Ca^{2+} , Fe^{2+} ve Mg^{2+} varlığında aktivitenin büyük ölçüde korunduğunu belirtmiştir. Enez ve ark. [165] izole ettikleri *Streptomyces* sp. suşunun aktivitesinin %5'lik SDS varlığında büyük ölçüde inhibisyona uğradığını (%22), 1,5 mM Hg^{2+} ve Fe^{2+} varlığında aktivitenin inhibisyona uğradığını ve Ca^{2+} , Mn^{2+} ve Mg^{2+} varlığında ise aktivitenin korunduğunu belirtmiştir. Keskar ve ark.'nın [166] izole ettiği *Streptomyces* T7 suşu, Hg^{2+} varlığında tamamen inhibisyona uğramıştır.

Bir başka çalışmada ise Adıgüzel ve Tunçer [169], *Actinomadura geliboluensis*'in endoksilanaz aktivitesinin 1 mM ve 10 mM Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , EDTA, DTT ve SDS varlığında korunduğunu, Ca^{2+} ve Mg^{2+} varlığında indüklendiğini ve Hg^{2+} varlığında inhibisyona uğradığını belirtmiştir. Aynı çalışmada *A. geliboluensis*'in endoksilanaz aktivitesinin %20'lik metanol, etanol ve bütanol varlığında inhibisyona uğradığını belirtmiştir.

Şekil 4.16 ve 4.17 incelendiğinde Enez ve ark., Keskar ve ark. ile Adıgüzel ve Tunçer'in çalışmalarında alınan sonuçlar gibi *Streptomyces* sp. BN212^T suşunun endoksilanaz aktivitesi Hg^{2+} varlığında (%19) de büyük ölçüde inhibisyona uğramıştır. Ancak Adıgüzel ve Tunçer'in sonuçlarının aksine *Streptomyces* sp. BN212^T suşunun endoksilanaz aktivitesi metanolün varlığında (%125) indüklenirken, etanolün varlığında (%102) ise aktivite korunmuştur.

4.4.3. *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanaz Enziminin Isıl Kararlılığı

Streptomyces sp. BN212^T endoksilanazının kararlılığı üzerine sürenin ve sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmalar, enzim preparatlarının substratın olmadığı ortamda 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C ve 80 °C'lik sıcaklıklarda gerçekleştirilen 5 saatlik inkübasyonları sırasında düzenli olarak 1 saat aralıklarla alınan örneklerin standart endoksilanaz tahlil yöntemi ile incelenmesini içermiştir. Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen enzim preparatlarından 1 saat aralıklarla alınan örnekler incelendiğinde, *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstraselüler endoksilanaz aktivitesinin yarılanma ömrünün 40 °C ve 50 °C'de yaklaşık 8 saat olduğu, enzim preparatının 60 °C'de gerçekleştirilen inkübasyonunda ise endoksilanaz aktivitesinin yarılanma ömrünün 6 saat; 70 °C'de 4 saat olduğu ve 80 °C'de ise yaklaşık 3,5 saat olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.18).



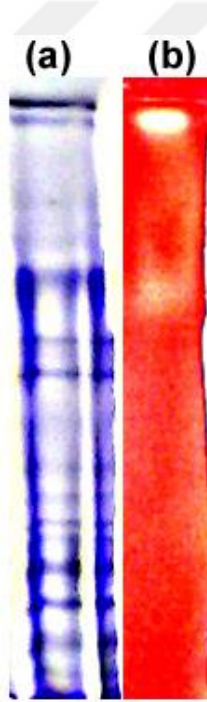
Şekil 4.18. *Streptomyces* sp. BN212^T endoksilanaz enziminin farklı sıcaklıklardaki ısıl kararlılığı. Reaksiyon örnekleri 60 °C'de inkübe edilmiş ve enzimatik aktivite standart enzim analiz metoduyla belirlenmiştir.

Ninawe ve ark. *Streptomyces cyaneus* SN32 suşunu izole etmişlerdir. Bu suşun endoksilanaz enziminin yarılanma ömrü 50 °C'de yaklaşık 3,5 saat iken, 60 °C'de yarılanma ömrü yaklaşık 50 dakikadır [175]. Meryandini ve ark.'nın [174] çalıştığı *Streptomyces* sp. SKK1-8 suşunun 50 °C'deki inkübasyonunda enzim aktivitesinin yarılanma ömrü 1 saat 45 dakikadır. Başka bir çalışmada ise Adıgüzel ve Tunçer [169] *A. geliboluensis*'in ürettiği endoksilanaz enziminin yarılanma ömrünün 70 °C'de 3 saat, 80 °C'de 1 saat olduğunu belirtmişlerdir. Kuru [65] ise *Streptomyces* sp. NT508'in ekstraselüler endoksilanaz aktivitesinin yarılanma ömrünün 60 °C'de yaklaşık 6 saat olduğunu, 70 °C'de gerçekleşen inkübasyonunda da endoksilanaz aktivitesinin yarılanma ömrünün 2 saate kadar düştüğü sonucuna varmıştır.

Şekil 4.18'de görüldüğü üzere *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstraselüler endoksilanaz aktivitesinin yarılanma ömrünün 40 °C ve 50 °C'de yaklaşık 8 saat olduğu, enzim preparatının 60 °C'de gerçekleştirilen inkübasyonunda ise endoksilanaz aktivitesinin yarılanma ömrünün 6 saat; 70 °C'de 4 saat olduğu ve 80 °C'de ise yaklaşık 3,5 saat olduğu hesaplanmış olup, *Streptomyces cyaneus* SN32, *Streptomyces* sp. SKK1-8, *A. geliboluensis* ve *Streptomyces* sp. NT508 [175, 174, 169, 65] suşlarından fazladır.

4.4.4. *Streptomyces* sp. BN212^T Endoksilanaz Aktivitesinin Elektroforetik Çalışmalar ile Gösterilmesi

Streptomyces sp. BN212^T'nin ürettiği ekstraselüler endoksilanaz aktivitesinin elektroforetik çalışmalar ile gösterilmesi için hazırlanan doğal jeller ve Doğal-PAGE uygulaması kısım 3.2.13'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Doğal-PAGE uygulaması için jele yüklenen protein örnekleri, *Streptomyces* sp. BN212^T'nin kültür sıvısının ultrafiltrasyon ile kısmi olarak saflaştırılması ve deriştirilmesiyle elde edilmiştir. Enzim örneğinin elektroforez ile ayrıştırılmasından sonra, jelin bir hattı kesilerek ayrılmış ve protein bantlarının görselleştirilmesi için boyanmış (Şekil 4.19. a), jelin diğer hattı ise zimogram olarak geliştirilmiştir (Şekil 4.19. b). Elektroforetik sonuçlara göre *Streptomyces* sp. BN212^T suşu iki farklı moleküler kütle ve karaktere sahip endoksilanaz enzimi üretmektedir.



Şekil 4.19. *Streptomyces* sp. BN212^T tarafından üretilen endoksilanaz enziminin **(a)** Doğal- PAGE ve **(b)** aktivite jeli olan zimogramı.

Doğal-PAGE çalışmasından elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstraselüler endoksilanolitik aktivitesini iki farklı enzim izoformu ile gerçekleştirdiği sonucuna ulaşılmaktadır.

Actinobacteria üyeleri arasında endoksilanazların çok sayıda izoformlarının olduğu bilinmektedir [173]. *Streptomyces* üyeleri de çok çeşitli moleküler kütle büyüklüklerine sahip ve sayıları 1 ile 5 arasında değişen endoksilanaz izoformlarının sekresyonlarını gerçekleştirmektedirler. Örneğin, çeşitli *Streptomyces* üyeleri tarafından üretilen endoksilanazların moleküler

kütleleri *Streptomyces* sp. B-12-2 için 26,4 ile 40,5 kDa arasında değişen 5 endoksilanaz izoformu [176]; *Streptomyces cyaneus* SN32 için 20,5 kDa olarak tespit edilen bir endoksilanaz izoformu [175]; *Streptomyces* sp. S38 için 24,5 ile 38 kDa arasında değişen 3 endoksilanaz izoformu [177]; *S. olivaceoviridis* E-86 için 23 kDa olarak tespit edilen bir endoksilanaz izoformu [178]; *S. roseiscleroticus* NRRL B-11019 için 5,5 ve 22,6 kDa olarak tespit edilen 2 endoksilanaz izoformu [179] ve *Streptomyces* sp. K37 ile yapılan çalışmada ise yaklaşık moleküler kütleleri 26,4 ve 24,3 kDa olarak tespit edilen 2 endoksilanaz izoformu rapor edilmiştir [180].

Streptomyces sp. BN212^T ile gerçekleştirilen bu çalışmada mikroorganizmanın ekstraselüler endoksilanaz aktivitesini gerçekleştiren izoformların doğal moleküler kütleleri ise birbirinden oldukça farklı olup, birisi oldukça büyük iken diğeri orta büyüklüktedir. Özellikle bir izoformun nispeten düşük moleküler kütleyle sahip olması, bu mikroorganizmanın ekstrasellüler endoksilanaz enzimlerinin kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisindeki biyoteknolojik beyazlatma süreçleri için uygun olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, bu çalışmada endoksilanaz örnekleri homojen saflıkta elde edilemedikleri için moleküler kütlelerin hesaplanması sırasında Doğal-PAGE kullanıldığı ve *Streptomyces* hemiselülazlarının moleküler kütlelerinin hesaplamaları sırasında doğal ve denatüre proteinler ile gerçekleştirilen ölçümler arasında ciddi büyüklük farklılıklarının ortaya çıkabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yüzyılımızda, bilim insanları ve politikacıların çözüm üretmesi gereken en büyük sorunlardan ikisi, gerekli olan enerji kaynaklarının teminini sağlamak ve çevresel kirliliğe çözüm bulmaktır. Petrol, 19. yüzyıldaki sanayi devriminden bu yana temel enerji kaynağını oluşturmuştur, fakat petrol gibi fosil yakıtlara karşı zamanla bağımlılığa dönüşen ilimiz bugün yaşadığımız en büyük çevresel tehlike olan küresel ısınmanın en önemli nedenlerinden birisini oluşturmıştır. Ayrıca, doğal bir kaynak olan petrol söz konusu olduğunda bir diğer tehlike de bu değerli enerji kaynağının tükenbilir rezervlere sahip olmasıdır. Dolayısı ile doğa ile dost, yeni ve yenilenebilir enerji kaynaklarının bulunması gerekmektedir.

Tarım, ormancılık ve endüstriyel atıklardan köken alan lignoselüloz, alternatif bir enerji kaynağı oluşturmak için uygun bir materyaldir. Lignoselülitik atıkların miktarı, bütün dünyada giderek artmaktadır. Özellikle tahıl üretiminden kaynaklanan saman bazı ülkelerde tarlalarda yakılması yasaklandıktan sonra, büyük problem oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra Türkiye’de genellikle Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgeleri olmakla birlikte, özellikle Adana, Aydın, Antalya, Bursa, Diyarbakır ve Elazığ illerinde üretilen hint yağı bitkisinin lignoselülozik atıklarının da alternatif enerji kaynağı olarak değerlendirilmesine yönelik olan bu çalışma bilginiz dahilinde ilk çalışmayı oluşturmaktadır. Bu problemlerin en azından bir kısmına biyoteknolojik yaklaşımla çözüm üretilebilir.

Biyoteknoloji endüstrisi, her ne kadar daha çok insan ve hayvanlar için tıbbi materyallerin (örneğin; antibiyotikler, proteinler, aşılar vs.) üretimi ile ilgilenirse de birçok çevresel sorunu da, lignoselülozun biyolojik yıkım mekanizmasının anlaşılması ile biyoteknolojik olarak çözmek mümkündür. Lignoselülozik yapı içerisinde bulunan karbonhidratlar biyoteknolojik süreçler ile fermente edilebilir monomerik karbonhidratlara kadar hızlı ve ekonomik olarak indirgenebilirse, bitki hücre duvarının temel bileşeni olması nedeni ile dünyanın en yaygın biyolojik molekülü olma ünvanını elinde bulunduran lignoselüloz, biyoetanole dönüştürülerek karbon nötr yakıt olarak kullanılabilir. Böyle bir başarı lignoselülozu doğal bir “atık” olarak değerlendirilmekten kurtararak doğal ve değerli bir “hammaddeye” dönüştürebilir.

Bu gibi teknolojilerin geliştirilebilmesi, uygulanabilir ekonomik süreçlere geçilmeden önce, potansiyel biyoyıkım gerçekleştiren mikroorganizmaların tanımlanmasını, genel büyüme koşullarının optimizasyonunu, enzimlerin karakterizasyonunu, genetik olarak geliştirilmiş suşların kullanımını ve genellikle *in vivo* lignoselüloz biyoyıkım fenomeni hakkında iyi bir bilgi birikimini gerektirir.

Yüksek lignoselülitik aktivitesinden dolayı, beyaz-çürükçül bir fungus olan *P. chrysosporium*, lignoselüloz biyoyıkım çalışmaları için model bir sistem oluşturmıştır. Doğada lig-

noselüloz, aynı zamanda *Actinobacteria* bireyleri tarafından da biyolojik olarak parçalanabilmektedir ve bundan dolayı da önemleri göz ardı edilmemelidir.

Bu tezle ortaya konulan çalışmada, önceden izole edilerek tanımlanmış olan halotolerant *Amycolatopsis cihanbeyliensis*, *Nocardia goodfellowi*, *Nocardia thraciensis* ve *Actinomadura geliboluensis* türlerinin yanı sıra, kompost ve toprak gibi habitatlardan bu tez çalışması kapsamında izole edilerek lignoselüloolitik aktivite gösterdikleri tespit edilen yeni aktinomiset izolatlarının oat spelt ksilan (OSX), birchwood ksilan (BWX) ve karboksimetil selüloz (CMC) içeren katı besiyerlerinde büyümesi ve zon/koloni çapı oranlarına göre en aktif olanları ekstraselüler endoksilanaz üretimi açısından seçilmişlerdir. Seçilen suşlar arasında en yüksek düzeylerde ekstraselüler endoksilanaz aktivitesine sahip olduğu bilinen BN212^T izolatı ise 16S rRNA gen dizilimine göre filogenetik olarak *Streptomyces* sp. BN212^T olarak tanımlanmış ve bu suşun ekstraselüler endoksilanazı ise bu tezde çalışma konusu olarak seçilmiştir.

Bu suşun karbon kaynağı olarak öğütülmüş buğday samanı, mısır samanı, meşe talaşı ve hint yağı bitkisi (*Ricinus communis*) içeren besiyerlerinde, lignoselüloz biyoyıkımında rol alan ekstraselüler endoksilanazının üretim seviyeleri, önceki çalışmaları destekleyecek biçimde, farklı karbon kaynaklarının kullanılması ile optimize edilmiştir. Ekstraselüler endoksilanaz üretimi, birincil metabolizma sırasında gerçekleşmiş; endoksilanaz aktivitelerinin en yüksek sekresyon değerlerine ise logaritmik büyüme fazının sonunda ulaştıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlar, daha önceden çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da belirtilen ekstraselüler lignoselüloz yıkıcı enzimler arasında kooperatif bir etki mekanizması olduğu fikrini desteklemektedir.

Bu çalışmalar sonrasında, *Streptomyces* sp. BN212^T tarafından üretilen ekstraselüler endoksilanaz aktivitesinin en yüksek değerlerine inkübasyonun 24-48. saatleri arasında ulaştığı ve bu enzim için optimal üretim pH'sının 6,0; optimal üretim sıcaklığının ise 55 °C olduğu tespit edilmiştir. Optimal endoksilanaz üretiminin gerçekleştiği öğütülmüş hint yağı bitkisinin oranının 10 g/L, partikül boyutunun ise 0,25 mm olduğu görülmüştür. Ayrıca, gerçekleştirilen inhibisyon çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular da *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstraselüler endoksilanazının endüstriyel potansiyelini destekler niteliktedir.

Yine çalışmalar sırasında, *Streptomyces* sp. BN212^T tarafından üretilen ekstraselüler endoksilanaz aktivitesinin 2 farklı izoform ile gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Düşük moleküler kütleye sahip ksilanazların kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi açısından çekici beyazlatma ajanları oldukları bilinmektedir ve *Streptomyces* sp. BN212^T'nin ekstraselüler endoksilanazlarının oldukça küçük moleküler kütleye sahip olduğunun tespit edilmesi bu mikroorganizmanın endoksilanazlarının endüstriyel potansiyele sahip olabileceğine işaret etmektedir. Bu kullanım alanları kağıt ve kağıt endüstrisini içerisine aldığı kadar, lignoselüloz kökenli şekerlerin yakıt

dönüştürülmesini, fırıncılığı ve meyve suları ve biranın bulanıklılığının giderilmesini içerisine alan gıda işlemlerini, tek hücre proteini üretimini de içerisine alır.

Günümüzde, Kraft hamurunun ksilanazlar ile öncül olarak beyazlatılması söz konusu olduğunda, yöntem bu koşulları karşılamaktadır, fakat başarının en önemli kriteri sürekliliktir ve kağıt ve kağıt hamuru sanayinde yakalanan başarı gibi diğer sektörlerde de biyoteknolojinin başarı kazanmaya devam etmesi, geleneksel endüstrilerin enzimatik proseslere bakış açısını değiştirecektir. Bununla birlikte, ekonomik olarak kullanılabilir enzimatik teknolojilerin elde edilebilmesi için büyük miktarda finansal desteğin sağlanması ve bilim adamlarınca yoğun çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- [1]. Horn, G. M., *Biofuels*; Chelsea house; New York, 2010; p 48.
- [2]. Adıgüzel, A.O., Kimyasal ön-işlemlerden geçirilmiş lignoselülozik atıkların *Streptomyces sp.* AOA40 enzimleriyle şeker şurubuna dönüştürülmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2012.
- [3]. Viikari, L.; Kantelinen, A.; Sundquist, J.; Linko, M., Xylanases in blaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994; 13, 335-350.
- [4]. Visser, J.; Beldman, G.; Kusters-van-Someren, M.A.; Varagen, A.G.J., *Xylans and Xylanases*; Elsevier; The Netherlands, 1992; p 325-337.
- [5]. Reid, I.D.; Paice, M.G., Effects of manganese peroxidase on residual lignin of softwood kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998; 64, 2273-2274.
- [6]. Visser, J.; Beldman, G.; Kusters-van-Someren, M.A.; Varagen, A.G.J., *Xylans and Xylanases*; Elsevier; The Netherlands, 1992; p 555-558.
- [7]. McCarthy, A.J., Lignocellulose Degrading Actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1987;46, 145-163.
- [8]. Biely, P., Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnol.*, 1985; 3(11), 286-290.
- [9]. Pashazadeh, M., Hintyağı bitkisinde (*Ricinus communis* L.) farklı azot dozlarının verim ve tarımsal özellikleri üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.
- [10]. Dashtban M.; Schraft H.; Qin W., Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities and Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 2009; 5(6), 578-595.
- [11]. Saha, B.C., Hemicellulose bioconversion. *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 30, 279-291.
- [12]. Öztürk, H.H.; Başçetinçelik, A., Energy exploitation of agricultural biomass potential in Turkey. *Energy Exploration and Exploitation*, 2006; 24(1), 95-112.
- [13]. W.B. Betts, *Biodegradation. Natural and Synthetic Materials*; Springer-Verlag; London, 1992; p 139-156.
- [14]. Fengel, D.; Wegener, G., *Chemical composition and analysis of wood*, In *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*; Walter de Gruyter; Berlin, 1984; p 26-65.
- [15]. Şahin, H.T., Kağıt ve kompozit ürünleri için hammadde kaynakları. *Orman Mühendisliği*, 2002; 43, 21-25.
- [16]. Quintero-Ramirez, R., Hydrolysis of lignocellulosic biomass, 2008. (www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/paper_quintero_Brasil.pdf)
- [17]. Laka, M.; Chernyavskaya, S., Obtaining microcrystalline cellulose from softwood and hardwood pulp. *Bioresources*, 2007; 2(3), 583-589.
- [18]. Köksel, H., *Karbonhidratlar, Gıda Kimyası*, İ. Hacettepe Üniversitesi Yayınları; Ankara, 1998; s 37-105.
- [19]. Howard, R.L.; Abotsi, A.; Jansen, E.L; Howard, S., Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2003; 2(12), 602-619.
- [20]. Festucci-Buselli R.A.; Otoni W. C.; Joshi C.P., Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 2007; 19(1), 1-13.

- [21]. Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y.Y.; Holtzapple M.; Ladisch M., Features Of Promising Technologies For Pretreatment Of Lignocellulosic Biomass. *Bioresource Technology*, 2005; 96, 673–686.
- [22]. Girio, F.M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Eukasik, R., Hemicelluloses for fuel ethanol. *A review, Biores. Technol.*, 2010; 101, 4775-4800.
- [23]. Burdurlu, S., Gıdalarda diyet lifinin önemi. *Gıda mühendisliği dergisi*, 2003; 15, 18-25.
- [24]. Wong, K.K.Y.; Tan, L.U.L.; Saddler, J.N., Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbiological Reviews*, Vol. 52, 1988; No. 3, 305-317.
- [25]. Seyis, I., Fungal kaynaklardan ksilanaz eldesi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1997.
- [26]. Beg, Q.K.; Hoondal, G.S.; Kapoor, M.; Mahajan, G., Microbial xylanases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001; 56, 326-338.
- [27]. Ebringerova, A.; Heinze, T., Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromol. Rapid Commun*, 2000; 21, 542–556.
- [28]. Previato, L.-M.; Gorin, P. A. J.; Previato, J. O., Investigations on polysaccharide components of cells of *Herpetomonas samuelssoni*. *Biochemistry*, 1979; 18, 149-154.
- [29]. Jones, C.; Previato, J. O.; Wat, R.; Mendoca-Previato, L., Structural variation in the glycoinositolphospholipids of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. 10th Eur. Carbohydr. Symp.*, 1999; 11-16, 90.
- [30]. Rosner, H.; Grimnecke, H. D.; Knirel, Y. A.; Shasko, A. S., Hyaluronic acid and a (1-4)-beta-D-xylan, extracellular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. 1992; *Carbohydr. Res.* 223, 329-333.
- [31]. Smith P.J.; Wang H- T; York W. S.; Peña M. J.; Urbanowicz B. R., Designer biomass for next- generation biorefineries: leveraging recent insights into xylan structure and biosynthesis. *Biotechnol Biofuels*, 2017;10:286.
- [32]. K.-E. Eriksson, *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*; Springer Series in Wood Sciences, Springer-Verlag; Berlin, 1990; p 407-450.
- [33]. Ebringerová, A.; Hromadková, Z.; Heinze, T., Hemicellulose, *Adv Polym Sci*, 2005; 186, 1-67.
- [34]. Palonen, H., Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *VTT Publications*, 2004; 60.
- [35]. York, WS; O'Neill, MA., Biochemical control of xylan biosynthesis—which end is up?, *Curr Opin Plant Biol.*, 2008; 11(3):258, 65.
- [36]. Atall, R., Hemicelluloses as structure regulators in the aggregation of native cellulose. *Int J Biol Macromol*, 1993; 15(2):109, 12.
- [37]. Vian, B., The glucuronoxylans and the helicoidal shift in cellulose microfibrils in linden wood: cytochemistry in muro and on isolated molecules. *Protoplasma*, 1986; 131(2):185, 99.
- [38]. Vian, B., Distribution and possible morphogenetic role of the xylans within the secondary vessel wall of linden wood. *IAWA J*, 1992; 13(3):269, 82.
- [39]. Neville, AC., A pipe-cleaner molecular model for morphogenesis of helicoidal plant cell walls based on hemicellulose complexity. *J Theor Biol.*, 1988; 131(2):243, 54.
- [40]. Mora, F., Aspect of native and redeposited xylans at the surface of cellulose microfibrils. *Holzforsch Int J Biol Chem Phys Technol Wood.*, 1986; 40(2):85, 91.

- [41]. Kabel, MA., Structural differences of xylans affect their interaction with cellulose. *Carbohydr Polym.*, 2007; 69(1), 94–105.
- [42]. Köhnke, T.; Östlund, Å.; Brelid, H., Adsorption of arabinoxylan on cellulosic surfaces: influence of degree of substitution and substitution pattern on adsorption characteristics. *Biomacromol.*, 2011; 12(7):2633, 41.
- [43]. Martínez-Abad, A., Regular motifs in xylan modulate molecular flexibility and interactions with cellulose surfaces. *Plant Physiol.*, 2017; 175(4), 579-1592.
- [44]. Pereira, CS., Effects of xylan side-chain substitutions on xylan-cellulose interactions and implications for thermal pretreatment of cellulosic biomass. *Biomacromol.*, 2017; 18(4), 1311–21.
- [45]. Grabber, JH.; Lu F., Formation of syringyl-rich lignins in maize as influenced by feruloylated xylans and p-coumaroylated monolignols. *Planta.*, 2007; 226(3), 741–51.
- [46]. Oliveira, D.M., Ferulic acid: a key component in grass lignocellulose recalcitrance to hydrolysis. *Plant Biotechnol J.*, 2015; 3(9), 1224–32.
- [47]. Ralph, J., Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem Rev.*, 2010; 9(1), 65–83.
- [48]. Johnson, A.M., Natural acetylation impacts carbohydrate recovery during deconstruction of *Populus trichocarpa* wood. *Biotechnol Biofuels*, 2017; 10(1), 48.
- [49]. Das, H.; Singh, S.K.; Useful by products from cellulosic wastes of agriculture and food industry-A critical appraisal. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2004; 44, 77-89.
- [50]. Sjostrom, E., *Wood Chemistry*; Academic Press, New York, 1993.
- [51]. Guiraud, P.; Steiman, A.; Ait-Laydi, M., Degradation of phenolic and chloroaromatic compounds by *Coprinus spp.* *Chemosphere*. 38, 1998; 2775-2789.
- [52]. Adosinda, M.; Martins, M.; Ferreira, I.C., Biodegradation of bioaccessible textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, 2001; 89, 91-98.
- [53]. Akmaz, S., Selülozun Enzimli Hidroliz Yolu ile Glükoza Dönüştürülmesi ve Tepkime Kinetikinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ocak, 2001.
- [54]. Hamelinck, C.N.; Van Hooijdonk, G.; Faaij, A.P.C., Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short- middle- and long-term. *Biomass Bioenergy*, 2005; 28, 384-410.
- [55]. Kireççi, M., Farklı Ortamlardan İzole Edilen Bakterilerle Lignin Biyodegradasyonunun Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 2006.
- [56]. Chrestini, C.; Sermanni, G.G.; Argyropoulos, D.S., Structural Modifications Induced During Biodegradation of Wheat Lignin by *Lentinula Edodes*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1998; 6, 957-973.
- [57]. Novaes, E.; Kirst, M.; Chiang, V.; Sederoff, H.W.; Sederoff, R., Lignin and biomass: a native correlation for wood formation and lignin content in trees. *Plant Physiol*, 2010; 154(2), 555-561.
- [58]. Castro, F.B., The use of steam treatment to upgrade lignocellulosic materials for animal feed, Doctor of Philosophy, University of Aberdeen, 1994.
- [59]. Sfountoulakis, M.; Dokianakis, S.N., Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, 2002; 36, 4735-4744.
- [60]. Michizoe, J.; Okazaki, S., Catalytic properties of lignin peroxidase alip-P3 hosted in reversed micelles. *Biochemical Engineering Journal*, 2001; 8, 129-134.

- [61]. Higuchi, T.; Chang, H.M.; Kirk, T.K., *Recent Advances in Lignin Biodegradation Research*. Uni. Publ.; Tokyo, 1983; p 12-23.
- [62]. Higuchi, T., Biodegradation of lignin. *Wood Res.*, 1981; 67, 47-58.
- [63]. Vance, C.P.; Kirk, T.K.; Sherwood, R.T., Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1980; 18, 259-288.
- [64]. Alma, M.H., Ligninin materyallerde değerlendirilmesi. *ÇEV-KOR*, 1999; 8, 32.
- [65]. Kuru, A., Termofilik *Streptomyces* sp. NT508 Suşundan İzole Edilen Peroksidaz ve Endoksinaz Enzimlerinin Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2009.
- [66]. Roy, B.P.; Paice, M.G.; Archibald, F.S.; Misra, S.K.; Misiak, L.E., Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide, and promotion of manganese-peroxidase-mediated Mn(III) production by cellobiose: quinine oxidoreductase from *Trametes versicolor*. *J. Biol. Chem.*, 1994; 269(31), 19745-19750.
- [67]. Ryu, D.D.Y.; Mandels, M., Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.*, 1980; 2, 91-102.
- [68]. Kulkarni, N.; Shendye, A.; Rao, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 1999; 23, 411-456.
- [69]. Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005; 29(1), 3-23.
- [70]. Sun J.; Tian C.; Diamond S.; Glass N.L., Deciphering Transcriptional Regulatory Mechanisms Associated with Hemicellulose Degradation in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 2012; 11(4), 482-493.
- [71]. Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; McFrgan, M.A.; Gold, M.H., Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Fems Lett.*, 1984; 169, 247.
- [72]. Leisola, M.S.A.; Kozulic, B.; Meussdoerffer, F.; Fiechter, A., Homology among multiple extracellular peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262, 419-424.
- [73]. Farrell, R.L.; Murtagh, K.E.; Tien, T.; Mozuch, M.D.; Kirk, T.K., Physical And Enzymatic Properties Of Lignin Peroxidase Isoenzymes From *Phanerochaete Chrysosporium*. *Enzyme Microbial Technol*, 1989; 11, 322-328.
- [74]. Tien, M.; Kirk, T.K., Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterisation and catalytic properties of a unique H_2O_2 requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81, 2280-2284.
- [75]. Rob, A.; Ball, A.S.; Tuncer, M.; Wilson, M.T., Thermostable novel non-haem extracellular glycosylated peroxidase from *Thermomonospora fusca* BD25. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1996; 24, 161-170.
- [76]. Rob, A.; Hernandez, M.; Ball, A.S.; Tuncer, M.; Arias, M.E.; Wilson, M.T., Production and partial characterization of extracellular peroxidase produced by *Streptomyces avermitilis* UAH30. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 1997; 62, 159-74.
- [77]. Tien, M.; Kirk, T.K., Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 1988; 161, 238-249.
- [78]. Tuncer, M.; Ball, A.S.; Rob, A.; Wilson, M.T., Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998; 25, 38-47.

- [79]. Li, D.; Alic, M.; Brown, J.A.; Gold, M.H., Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 53, 341-345.
- [80]. Paszczynski, A.; Pasti, M.B.; Goszczyński, S.; Crawford, R.L.; Crawford, D.L., New approach to improve degradation of recalcitrant azo dyes by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme Microbiol. Biotechnol.*, 1991; 13, 378-383.
- [81]. Bogan, B.W.; Lamar, R.T.; Hammel, K.E., Flourene oxidation *in vivo* by *Phanerochaete chrysosporium* and *in vitro* during manganese-dependent lipid peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996; 62, 1788-1792.
- [82]. Glenn, J.K.; Gold, M.J., Purification and characterization of an extracellular Mn (II) dependent peroxidase from the lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1985; 242, 329-341.
- [83]. Wariishi, H.; Akileswaran, L.; Gold, M.H., Manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and the catalytic cycle. *Biochemistry*, 1988; 27, 5365-5370.
- [84]. Reinhammar, B., *Laccase*, In *Copper Proteins and Copper Enzymes*; CRC Press; Boca Raton, 1984; p 1-35.
- [85]. Tuncer, M., Lakkaz, kısım 1: yapısı, katalitik Özellikleri ve dağılımları. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2010; 22, 19-63.
- [86]. Sjöblad, R.D.; Bollag, J.M., *Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms*, in *Soil Biochemistry*; Vol. 5. Paul, E.A.; Ladd, J.N. Ed. Marcel Dekker, Inc.; New York, 1981; p 113-152.
- [87]. Endo, K.; Hosono, K.; Beppu, T.; Ueda, K., A novel extracytoplasmatic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology*, 2002; 148, 1767-1776.
- [88]. Arias, M.E.; Arenas, M.; Rodríguez, J.; Soliveri, J.; Ball, A.S.; Hernández, M., Kraft pulp bio-bleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003; 69, 1953-1958.
- [89]. Suzuki, T.; Endo, K.; Iro, M.; Tsujibo, H.; Miyamoto, K.; Inamori, Y., A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Biosci. Biochem.*, 2003; 67, 2167-2175.
- [90]. Machczynski, M.C.; Vijgenboom, E.; Samyn, B.; Canters, G.W., Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 2004; 13, 1-10.
- [91]. Niladevi, K.N.; Prema, P., Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresource Technology*, 2008; 99, 4583-4589.
- [92]. Endo, K.; Hayashi, Y.; Hibi, T.; Hosono, K.; Beppu, T.; Ueda, K., Enzymological characterization of Epo A, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.*, 2003; 133, 671-677.
- [93]. Enguita, F.J.; Martins, L.O.; Henrique, A.O.; Carrondo, M.A., Crystal structure of a bacterial endospore coat component: a laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278, 19416-19425.
- [94]. Endo, K.; Hosono, K.; Beppu, T.; Ueda, K., A novel extracytoplasmatic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology*, 2002; 148, 1767-76.

- [95]. Machczynski, M.C.; Vijgenboom, E.; Samyn, B.; Canters, G.W., Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 2004; 13, 1–10.
- [96]. Dubé, E.; Shareck, F.; Hurtubise, Y.; Daneault, C.; Beauregard, M., Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolorisation of an indigo dye. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008; 79(4), 597-603.
- [97]. Thurston, C.F., The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994; 140, 19-26.
- [98]. Bourbonnais, R.; Paice, M.G., Oxidation of non-phenolic substrates. an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett*, 1990; 267, 99-102.
- [99]. Sayadi, S.; Ellouz, R., Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995; 61, 1098-1103.
- [100]. Limura, Y.; Katayama, Y.; Kawai, S.; Morohoshi, N., Degradation and solubilization of ¹⁴C-side chain labelled synthetic lignin (dehydrogenative polymerizate) by laccase of *Coriolus versicolor*. *Biosci Biotech Biochem*, 1995; 59, 903-905.
- [101]. Käärik, A., The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Stud. For. Suec*, 1965; 31, 4.
- [102]. Hofrichter, M.; Steinbüchel, A., *Biopolymers, Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications*; Wiley-VCH, Weinheim; Germany, 2011; p 129-180.
- [103]. Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D.; Eriksson, K.-E.L., A fungal metabolite mediates oxidation of non-phenolic lignin model compounds and synthetic lignin by laccase (II). *FEBS Lett*, 1996; 391, 144-148.
- [104]. Ducros, V.; Brzozowski, A.M.; Wilson, K.S.; Brown, S.H.; Ostergaard, P.; Schneider, P.; Yaver, D.S.; Pedersen, A.H.; Davies, G.J., Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nature Struct Biol*, 1998; 5, 310-316.
- [105]. Cheng, C.L.; Chang, J.S., Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas* sp. CL3 for fermentative hydrogen production. *Bioresource Technology*, 2011; 102:18, 8628-8634.
- [106]. Sharma, A.; Tewari, R.; Soni, S.K., Application of Statistical Approach for Optimizing CMCase Production by *Bacillus tequilensis* S28 Strain via Submerged Fermentation Using Wheat Bran as Carbon Source. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering Vol:9*, 2015.
- [107]. Buswell, J.A.; Odier, E., Lignin biodegradation, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 1987; 6, 1-60.
- [108]. Blanchette, R.A., Degradation Of The Lignocellulose Complex In Wood, *Can J Bot*, 1995; 73, 999-1010.
- [109]. Rodriguez, A.; Falcon, M.A.; Carnicero, A.; Perestelo, F.; De La Fuente, G.; Trojanowski, J., Laccase activities of *Penicillium chrysogenum* in relation to lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996; 45, 399-403.
- [110]. Duarte, J.C., Costa-Ferreira, M., Aspergilli and lignocellulosics: enzymology and biotechnological applications. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994; 13, 377-386.
- [111]. Qaisar, S.; Zohra, R.R.; Aman, A.; Qader, S.A.U.; Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*. *Carbohydrate Polymers*, 2014; 104, 199-203.

- [112]. Waksman, S.A.; Cordon, T.C., Thermophilic decomposition of plant residues in composts by pure and mixed cultures of microorganisms. *Soil Sci.*, 1983; 47, 217-224.
- [113]. Freitas, Y.J.M.; Bhat, J.V., Micro-organisms associated with the deterioration of fish-nets and cordage. *J. Univ. Bombay*, 1954; 23, 53-59.
- [114]. Crawford, D.L., Growth of *Thermomonospora fusca* on lignocellulosic pulps of varying lignin content. *Can. J. Microbiol.*, 1974; 31, 714-717.
- [115]. Crawford, D.L.; Crawford, R.L.; Pometto III, A.L., Preparation of specifically labeled ^{14}C -(lignin)- and ^{14}C -(cellulose)-lignocelluloses and their decomposition by the microflora of soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977; 33, 1247-1251.
- [116]. Crawford, D.L., Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1978; 35, 1041-1045.
- [117]. Godden, B.; Ball, A.S.; Helvenstein, P.; McCarthy, A.J.; Penninckx, M.J., Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, 1992; 138, 2441-2448.
- [118]. Berrocal, M. M.; Rodríguez, J.; Ball, A.S.; Pérez-Leblic M.I.; Arias, M.E., Solubilisation and mineralisation of ^{14}C -lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997; 43, 379-384.
- [119]. Zimmermann, W.; Broda, P.; Umezawa, T.; Higuchi, T., Degradation of a non-phenolic aryl-glycerol-p-aryl ether by streptomyces cyaneus. *FEBS Lett.*, 1988; 239, 5-7.
- [120]. McCarthy, A.J.; Broda, P., Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterisation of their activity against (^{14}C)-lignin-labeled wheat lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.*, 1984; 130, 2905-2913.
- [121]. Tuncer, M.; Ball, A.S., Degradation of lignocelluloses by extracellular enzymes produced by *Thermomonospora fusca* BD25. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002; 58, 608-611.
- [122]. Macedo, E.P.; Cerqueira, C.L.O.; Souza, D.A.J.; Bispo, A.S.R.; Coelho, R.R.R.; Nascimento, R.P., Production of cellulose-degrading enzyme on sisal and other agro-industrial residues using a new Brazilian actinobacteria strain *Streptomyces* sp., SLBA-08. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2013; 30(4), 729-735.
- [123]. Zeng, J.; Singh, D.; Laskar, D.D.; Chen, S., Degradation of native wheat straw lignin by *Streptomyces viridosporus* T7A. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2013; 10, 165-174.
- [124]. Anonymous, *Ricinus communis* (Castor bean), 2005.
(<http://www.ansci.cornel.edu/plants/castorbean.htm>)
- [125]. Duke, J.A., Handbook of Energy Crops, 1986.
(http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/dukeindex.html)
- [126]. Başalma, D.; Pashazadeh, M., Hintyağının (*Ricinus communis* L.) Önemi, Bitkisel Özellikleri ve Tarımı. *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2011; 25, 2, 57-67.
- [127]. Babagiray, Z., Hintyağı Elde Etme Metodları ve Hintyağının Kullanım Alanları. *Araştırma, 1 yıl (Sayı: 2)*, 1989; 39-40.
- [128]. Duke, J. A., Handbook of Energy Crops, Purdue University, The Handbook of Energy Crops exists only as an electronic publication on the New CROPS web site, 1983.
(http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/dukeindex.html).
- [129]. Ombrello, T., Castor Bean Plant, 2009.
(http://faculty.ucc.edu/biologyombrello/POW/castor_bean.htm).

- [130]. Onwuliri, V.A.; Anekew, G.E., Amino Acids and other Biochemical Component of *Ricinus communis* (Variety Minor), an Anti-conceptive seed. *Department of Biochemistry*, 2001.
- [131]. Rastegar, M.A., *Zeraate Giyahane Sanaatii (Endüstri Bitkilerin Tarımı)*; Berahmand 1 cilt; Iran, 2005; s 964.
- [132]. Kaya, D.; Demirezen, Ş.; Beksaç, M.S., Aktinomyces türlerinin biyolojik özellikleri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2009; 2(2), 25-28.
- [133]. McCarthy, A.J.; Williams, S.T., Methods for studying the ecology of actinomycetes. *Methods in Microbiology*, 1990; 22, 533-563.
- [134]. Mayfield, C. L.; Williams, S. T.; Ruddick, S. M.; Hatfield, H. L., Studies on the ecology of actinomycetes in soil: observations on the form and growth of the streptomycetes in soil. *Soil Biology And Biochemistry*, 1972; 4, 79-91.
- [135]. Pfennig, N., Beobachtungen des wachstumsverhaltens von streptomyceten auf rossischolodny-aufwuchs-platten im boden. *Arch. Mikrobiol*, 1958; 31, 206-216.
- [136]. Goodfellow, M.; Simpson, K. E., Ecology of the streptomycetes. *Frontiers In Applied Microbiology*, 1987; 2, 97-125.
- [137]. Williams, S. T.; Robinson, C. S., The Role of streptomycetes in decomposition of chitin in acidic soils. *Journal Of General Microbiology*, 1981; 127, 55-63.
- [138]. Williams, S. T.; Flowers, T. H., The Influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes. *Microbios*, 1978; 20, 99-106.
- [139]. Williams, S. T., Mayfield, C. I., Studies on ecology of actinomycetes in soil II. the behaviour of neutrophilic streptomycetes in acid soil. *Soil Biology And Biochemistry*, 1971; 3, 197-208.
- [140]. Craveri, R.; Pagani, H., Thermophilic microorganisms among actinomycetes in the soil. *Annali Di Microbiologia*, 1962; 12, 115-130.
- [141]. Ohta, Y.; Ikeda, M., Deodorization of pig feces by actinomycetes. *Applied And Environmental Microbiology*, 1978; 36, 487-491.
- [142]. Millner, P.D., Thermophilic And Thermotolerant Actinomycetes In Sewage- Sludge Compost. *Developments In Industrial Microbiology*. 1982; 23, 61-78.
- [143]. Goodfellow, M.; Williams, S.T.; Mordarski, M., *Actinomycetes in Biotechnology*; Academic Press; London, 1988; p 359-432.
- [144]. Khan, M. R.; Williams, S. T.; Saha, M. L., Studies on the microbial degradation of jute. *Bangladesh J. Jute Fibre Res.*, 1978; 3, 45-52.
- [145]. Lacey, J.; Lacey, M. E., Airborne spores in cotton mills. *Ann. Occupational Hyg.*, 1987; 31, 1-19.
- [146]. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72, 248-254.
- [147]. Miller, G.L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 1959; 31, 426-428.
- [148]. Johnson, W.C.; Lindsey, A.J., An improved universal buffer. *Analyst*, 1939; 64, 958-993.
- [149]. Kızıldoğan, A., Farklı bitkisel yağların *Streptomyces clavuligerus*'ta klavulanik asit üretimi üzerine etkisi. *Anadolu Tarım Bilim. Derg.*, 2017; ISSN: 1308-8750.
- [150]. Adıgüzel, A.O., Kütinaz Üreticisi Mikroorganizmaların Polietilenterafitalat(Pet) Film Yüzeylerinden İzolasyonu, Filogenetik Yöntemlerle Tanısı Ve Kütinaz Enziminin Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2017.

- [151] İnan, K.; Çanakçı, S.; Beldüz, A.O., Isolation and characterization of xylanolytic new strains of *Anoxybacillus* from some hot springs in Turkey. *Turk J Biol*, 2011; 35, 529-542.
- [152] Coşkun, A., Endüstriyel Enzimler Üreten Yeni *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2010.
- [153]. Kluepfel, D.; Shareck, F.; Mandau, F.; Morosoli, R., Characterisation of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1986; 24 230-234.
- [154]. Kluepfel, D.; Ishaque, M., Xylan induced cellulolytic enzymes in *Streptomyces flavogriseus*. *Dev. Ind. Microbiol.*, 1982; 23, 389-395.
- [155]. Morosoli, R.; Bertrand J.L.; Mondou, F.; Shareck, F.; Kluepfel, D., Purification and properties of xylanase from *Streptomyces lividans*. *Biochem. J.*, 1986; 239, 587-592.
- [156]. Techapun, C.; Poosaran, N.; Watanabe, M.; Sasaki, K., Optimization of Aeration and Agitation Rates to Improve Cellulase-Free Xylanase Production by Thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab 106 and Repeated Fed-Batch Cultivation Using Agricultural Waste. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003; 95(3), 298-301.
- [157] Işıklı, M., Lignin Degredasyonunu Gerçekleştiren Aktinomiset Enzimler Hakkında Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, 2004.
- [158]. Antanopoulos, V.T.; Hernandez, M.; Arias, M.E.; Mavrakos, E.; Ball, A.S., The use of extra-cellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000; 57, 92-97.
- [159]. Maheswari, M.U.; Chandra, T.S., Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2000; 16, 257-263.
- [160] Porsuk, İ.; Özakin, S.; Bali, B.; Yılmaz, E., A cellulase-free, thermoactive, and alkali xylanase production by terrestrial *Streptomyces* sp. CA24, *Turk J Biol*, 2013; 37, 370-375.
- [161] Nascimento, R.P.; Coelho, R.R.R.; Marques, S.; Alves, L.; Girio, F.M.; Bon, E.P.S.; Amaral-Collaco, M.T., Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil, *Enzyme and Microbial Technology*, 2002; 31, 549-555.
- [162]. Dhillon, A.; Gupta, J.K.; Khanna, S., Enhanced production, purification and characterisation of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochemistry*, 2000; 35, 849-856.
- [163]. Kohli, U.; Nigam, P.; Singh, D.; Chaudhary K., Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C., *Enzyme and Microbial Technology*, 2001; 28, 606-610.
- [164]. Rani, D.S.; Nand, K., Production of thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702. *Process Biochem.*, 2000; 36, 355-362.
- [165]. Enez, B.; Fincan, S., Topraktan İzole Edilen *Streptomyces* sp.'den Ksilanaz Üretimi ve Karakterizasyonu. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 2017; 7(3), 115-123.
- [166]. Keskar, S.; Srinivasan, C.; Deshpande, V.V., Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces* Evidence for essential tryptophan and cysteine residues at the active site. *Biochem. J.*, 1989; 261, 49-55.
- [167]. Ding, C.H.; Jiang, Z.Q.; Li, X.T.; Li, L.T.; Kusakabe, I., High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2004; 20, 7-10.
- [168]. Nour El-Dein, M.M.; Shereif, A.E.A.; Mansour, F.A.; Abou-Dobara, M.I.; Ball, A.S., Optimization of xylanase and peroxidase production from *Streptomyces* sp. K37. *J. BioSci. Biotech*, 2014; 3(1), 29-42.

- [169]. Adıgüzel, A.O.; Tunçer, M., Thermostable enzymes. *BioResources*, 2017; 12(2), 2528-2547.
- [170]. Beg, Q.K.; Bhushan, B.; Kapoor, M.; Hoondal, G.S., Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000; 24, 396-402.
- [171]. Aygan, A.; Arıkan, B., Production and characterization of multifunctional endoxylanase by *Bacillus* sp. X13. *Turk J Biol*, 2009; 33, 231-237.
- [172]. Luo, L.; Cai, Jun.; Wang, C.; Lin, J.; Du, X.; Zhou, A.; Xiang, M., Purification and characterization of an alkaliphilic endo-xylanase from *Streptomyces althoticus* LMZM and utilization in the pulp paper industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015.
- [173]. Tuncer, M., Characterization of Endoxylanase Activity From *Thermomonospora Fusca* BD25. *Turk J Bio.*, 2000; 24, 737-752.
- [174]. Meryandini, A.; Hendarwin; T.; Saprudin, D.; Lestari, Y., Characterization of Xylanase *Streptomyces* spp. SKK1-8. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2006; 13, 151-155.
- [175]. Ninawe, S.; Kapoor, M.; Kuhad, R.C., Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, 2008; 99, 1252-1258.
- [176]. Elegir, G.; Szakacs, G.; Jeffries, T.W., Purification, Characterization, and Substrate Specificities of Multiple Xylanases from *Streptomyces* sp. Strain B-12-2. *Applied And Environmental Microbiology*, 1994; 60(7), 2609-2615.
- [177]. Georis, J., Giannotta, F., De Buyl, E., Granier, B. and Frère, J.M. "Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000; 26, 178-186.
- [178]. Kaneko, S.; Kuna, A.; Muramatsu, M.; Iwamatsu S.; Kusakabe, I.; Hayashi, K., Purification and Characterization of a Family G/11 β -Xylanase From *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2000; 64(2), 447-451.
- [179]. Grabski, A.C.; Jeffries, T.W., Production, Purification, and Characterization of β -(1-4)-Endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991; 57(4), 987-992.
- [180]. Mansour, F.A.; Shereif, A.A.; Nour El-Dein, M.M.; Abou-Dobara M.I.; Ball, A.S., Purification and Characterization of Xylanase from a Thermophilic *Streptomyces* sp. K37. *Acta. Microbiologica Polonica*, 2003; 52(2), 159-172, .

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Bengü EVCİOĞLU
Doğum Tarihi : 07/05/1990
E-mail : bngnane@hotmail.com
Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Ankara Üniversitesi	2008-2012
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2013-2018

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Kalite Sorumlusu	Narpak Narenciye ve Dış Ticaret A.Ş.	2012-2013
Resmi İlişkiler Sorumlusu	MyCRO Sağlık Hizmetleri Ltd. Şti.	2017-2018
Merkez Sorumlusu	MyCRO Sağlık Hizmetleri Ltd. Şti.	2018- Devam

ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

1. Nane B., Adıgüzel A.O. ve Tuncer M. (2015) Hint yağı (*Ricinus communis*) bitkisi atıklarının *Streptomyces* sp. BN212 ile endoksilanaz enzimi üretimi için değerlendirilmesi. Sayfa 86, Abstract # P-EB-5. 18. Biyoteknoloji Kongresi. 18-19 Aralık 2015, Konya-Türkiye. (Poster-Özet).