



**ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI KSİLANAZ
ENZİMİNİN REKOMBİNANT OLARAK
ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Sema BİLGİN ŞENTÜRK

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. İsa GÖKÇE

2013

Her hakkı saklıdır

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI KSİLANAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT
OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sema BİLGİN ŞENTÜRK

TOKAT
2013

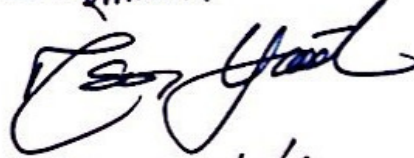
Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. İsa GÖKÇE danışmanlığında, Sema BİLGİN ŞENTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma 05/07/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN



Üye : Prof. Dr. İsa GÖKÇE



Üye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ



Üye : Prof. Dr. Şaban TEKİN



Üye : Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI



Yukarıdaki sonucu onaylarım



Doç. Dr. Naim ÇAGMAN
Enstitü Müdürü
28.7.2013



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdığı yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Sema BİLGİN ŞENTÜRK



ÖZET

Doktora Tezi

ENDÜSTRİYEL KULLANIM AMAÇLI KSİLANAZ ENZİMİNİN REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Sema BİLGİN ŞENTÜRK

Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Hemiselüloz, bitki hücrelerinin çeperlerinde selüloz ve pektinlerle birlikte bulunan bazı karmaşık karbohidrat ya da polisakaritlerin ortak adıdır. Ksilan, hemiselülozun başlıca bileşenidir. Ksilanın iskelet yapısı, β -1,4-glikozit bağlarıyla bağlanmış ksiloz rezidülerinden oluşur. Ksilanı hidroliz eden enzimlerin tamamına ksilanolitik enzim sistemi adı verilir. Bu grupta β -1,4-Endoksilanaz, β -Ksilozidaz, β -L-araninofuranozidaz, β -Glukuronidaz, Asetil ksilan esteraz ve Fenolik asit (Ferulik ve p-Kumarik asit) esteraz yer almaktadır. Ksilanaz, kağıt ve kağıt hamuru başta olmak üzere gıda ve hayvan yemi endüstrisi gibi alanlarda temel endüstriyel enzim olarak çok büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada ksilanaz (endo-1,4- β -ksilanaz) enziminin rekombinant olarak üretimi hedeflenmiştir. Ksilanaz üreticisi mikroorganizmalar topraktan izole edilerek moleküler tanılaması yapılmıştır. Asidik ortamda ksilanaz aktivitesi gösteren *Bacillus subtilis* suşundan izole edilen ksilanaz enzimini kodlayan gen (*xyn*), pET28b vektör sistemine klonlanmış ve ekspresyon amacıyla *E.coli* BL21(DE3) pLysE hücrelerine transfer edilmiştir. Böylece ksilanaz enzimi rekombinant olarak üretilmiştir. Üretilen enzim aktivite göstermiş, optimum sıcaklığı 60 °C, optimum pH'sı ise 6,0 olarak bulunmuştur.

2013, 91 sayfa

Anahtar kelimeler: Ksilanaz, Ksilan, Rekombinant enzim, *E. coli*

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

EXPRESSION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT XYLANASE FOR INDUSTRIAL USAGE

Sema BİLGİN ŞENTÜRK

Gaziosmanpaşa University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Hemicellulose is common name of complicated carbohydrates and polysaccharides exist with celluloses and pectines in plant cell walls. Xylan is main component of hemicellulose. Xylan's backbone comprises xylose residues linked by β -1,4-glycosidic bonds. All of the enzymes that hydrolise xylan called as xylanolytic enzyme systems. β -1,4-endoxylanase, β -xylosidase, β -L-arabinofuranosidase, β -glucuronidase, acetyl xylan esterase and ferulic acid (ferulic ve p-coumaric acid) esterase are in this group. Xylanase has a big importance as main industrial enzyme in paper manufacturing, food and animal feed industries. In this study it is aimed that production of recombinant xylanase (endo-1,4- β -xylanase). Molecular identification of xylanase producer microorganisms isolated from soil was made. *xyn* gene is isolated from *Bacillus subtilis* strain which has xylanase activity in the acidic medium, it is cloned pET28b vector system and then transformed to BL21(DE3) pLysE cells for expression of protein. Thus, xylanase enzyme was produced as a recombinant. The enzyme produced was active and it is found that optimum temperature and optimum pH of enzyme are 60 °C and 6,0 respectively.

2013, 91 pages

Keywords: Xylanase, Xylan, Recombinant enzyme, *E. coli*

ÖNSÖZ

Doktora çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden danışman hocam Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye, tezimin mikrobiyoloji ve enzim kinetiği başta olmak üzere birçok aşamasında maddi ve manevi yardımlarıyla her zaman yanımda olan bilgi ve tecrübesinden yararlanmama fırsat veren değerli hocam Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI'ya, tez izleme komitesinde bulunan, öneri ve fikirlerinden yararlandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. Şaban TEKİN ve Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ'a, laboratuvar imkanlarından yararlanma fırsatı verdiği için sayın Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ'a, çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Yakup ULUSU'ya ve Arş. Gör. Hülya KUDUĞ'a, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na, doktora eğitimim süresince 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı çerçevesinde verdiği bursla gerek bilimsel aktivitelere katılarak gerekse zengin bir kütüphane oluşturarak kendimi yetiştirmeme maddi katkılarından dolayı TÜBİTAK'a, doktoram süresince sabırla ve fedakarlıkla yanımda yer alan bana güç veren eşim Yrd. Doç. Dr. İsmail ŞENTÜRK'e, bana şans getirdiğine inandığım canım kızıma, hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ (KURAMSAL TEMELLER / GENEL BİLGİLER) ...	2
2.1. Enzim Nedir?	2
2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....	2
2.3. Enzim Üretiminde Mikroorganizmalar.....	4
2.4. Enzim Üretiminde Rekombinant DNA Teknolojisi	5
2.5. Endüstriyel Enzimler	6
2.6. Ksilan	7
2.7. Mikrobiyal Ksilanolitik Sistemde Ksilanın Enzimatik Hidrolizi	8
2.8. Ksilanolitik Enzimler	8
2.9. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları	11
2.10. Ksilanaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	20
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	21
3.1.3. Kullanılan Enzimler	23
3.1.4. Primerler	23
3.1.5. Klonlama ve Ekspresyon İşlemlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar	24
3.1.6. Klonlama ve Ekspresyon İşlemlerinde Kullanılan Plazmitler	25
3.1.7. Kullanılan Çözeltiler	27
3.1.7.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları	27
3.1.7.2. Sıvı ve Katı Besiyerleri	28
3.1.7.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.1.7.4. Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Çözeltiler.....	29
3.1.7.5. Enzim Saflaştırmada Kullanılan Çözeltiler:	30
3.1.7.6. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	30
3.1.7.7. Diğer Çözeltiler.....	31
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Ksilanaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu	31
3.2.2. Ksilanaz Üreticisi Mikroorganizmaların Taranması.....	32
3.2.3. Ksilanaz Üreticisi Mikroorganizmaların Moleküler Tanılanması	33
3.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu	33
3.2.3.2. PCR ile 16s rDNA Bölgesinin Çoğaltılması.....	33
3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	34

3.2.3.4. DNA Dizileme	34
3.2.4. <i>xyn</i> Geninin pET28b(+) Vektörüne Klonlanması ve Protein Ekspresyonu.....	35
3.2.4.1. <i>xyn</i> Genini Elde Etmek Amacıyla Primer Tasarlanması	35
3.2.4.2. PCR ile Genomik DNA'dan <i>xyn</i> Geninin Çoğaltılması	35
3.2.4.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	36
3.2.4.4. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim	37
3.2.4.5. DNA Ligasyonu	39
3.2.4.6. <i>E. coli</i> DH5 α Hücresinin Rekombinant pET-28(+) Plazmidi ile Transformasyonu	39
3.2.4.6.1. PİPES'li Kompetent Hücre Hazırlanması	39
3.2.4.6.2. Transformasyon	40
3.2.4.6.3. Plazmid DNA Saflaştırılması.....	41
3.2.4.6.4. Klonlama Sonrası Plazmid DNA'ların PCR ile Analizi	42
3.2.4.6.5. Klonlama Sonrası Plazmid DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Analizi ...	43
3.2.4.7. <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE Hücresinin pET28b(+)- <i>xyn</i> Plazmidi ile Transformasyonu ve Ksilanaz'ın Ekspresyonu	44
3.2.4.7.1 FSB'li Kompetent Hücre Hazırlanması.....	44
3.2.4.7.2. <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysE Hücresinin pET28b(+)- <i>xyn</i> Plazmidi ile Transformasyonu	45
3.2.4.7.3. Ksilanaz'ın <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysE'de Ekspresyonu	45
3.2.4.7.4. <i>E. coli</i> BL21 pLysE Hücrelerinin Parçalanması	46
3.2.5. <i>E.coli</i> BL21(DE3) pLysE'de Ekspres Edilen Ksilanaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	46
3.2.6. Ksilanaz Enziminin Karakterizasyonu.....	47
3.2.6.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	47
3.2.6.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	48
3.2.6.2.1. DNS Yöntemi	48
3.2.6.2.2. Plate Analizi.....	48
3.2.6.3. Bazı Parametrelerin Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	49
3.2.6.3.1. pH'nın Etkisi	49
3.2.6.3.2. Sıcaklığın Etkisi	49
3.2.6.3.3. Sıcaklık Stabilitésinin Belirlenmesi	50
3.2.6.3.4. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	50
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	51
4.1. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu.....	51
4.2. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Taranması	51
4.3. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Moleküler Tanılanması.....	52
4.4.1. PCR ile Genomik DNA'dan <i>xyn</i> Geninin Çoğaltılması	66
4.4.2. Klonlama Sonrası Plazmid DNA'ların PCR ile Analizi	66
4.4.3. Klonlama Sonrası Plazmid DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Analizi	67
4.4.4. DNA Dizileme	68
4.5. Ksilanaz Enziminin Karakterizasyonu.....	72
4.5.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	72
4.5.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	74
4.5.2.1. Plate Analizi.....	74
4.5.3. Bazı Parametrelerin Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	75
4.5.3.1. pH'nın Etkisi	75
4.5.3.2. Sıcaklığın Etkisi	75

4.5.3.3. Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi	76
4.5.3.4. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	77
5. SONUÇ	78
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
bç	baz çifti
µl	mikro litre
nm	nano metre
P	Fosfat
rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)
Kısaltmalar	Açıklama
Amp	Ampisilin
APS	Amonyumpersülfat
BSA	Sığır (Bovine) Serum Albümini
ddH ₂ O	Çift distile su (Double distilled water)
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FSB	Dondurulmuş depolama tamponu (Frozen Storage Buffer)
IPTG	β-D-izopropil tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir (chain) reaksiyonu
PİPES	Piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
PMSF	Fenil metil sülfonil florit

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
SOB	Super Optimal Broth
TAE	Tris-asetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1	pET-28a(+) vektörünün dairesel haritası ve poli-linker bölgesinin detaylı restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi	26
Şekil 3.2	Ksılanaz üreticisi mikroorganizmaların seçimi	32
Şekil 3.3	Ksılanaz genini çoğaltmak amacıyla kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotit sıraları.....	35
Şekil 4.1	Ksılanaz üreten mikroorganizmalara ait hidroliz zonları	51
Şekil 4.2	Organizmaların PCR ile çoğaltılmış 16s rDNA bölgesinin agaroz jel görüntüsü	52
Şekil 4.3	6 kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı	53
Şekil 4.4	10 kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı	54
Şekil 4.5	11A kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı	55
Şekil 4.6	11B kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı.....	56
Şekil 4.7	12 kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı	57
Şekil 4.8	66 kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı	58
Şekil 4.9	6 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı.....	62
Şekil 4.10	10 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı.....	63
Şekil 4.11	11-A kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı.....	63
Şekil 4.12	11-B kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı.....	64
Şekil 4.13	12 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı.....	64
Şekil 4.14	66 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı.....	65
Şekil 4.15	PCR ile genomik DNA'dan <i>xyn</i> geninin çoğaltılması ile elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	66
Şekil 4.16	Klonlama sonrası pET28b- <i>xyn</i> rekombinant plazmitinin kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan doğrulama PCR'ı sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	67
Şekil 4.17	Saflaştırılan plazmid DNA'nın (pET28b- <i>xyn</i>), NcoI ile kesildikten sonra agaroz jeldeki görüntüsü.....	67

Şekil 4.18	NEBcutter V2.0 programı kullanılarak elde edilen pET28b klonlama bölgesi- <i>xyn</i> genine ait restriksiyon enzim haritası.....	68
Şekil 4.19	pET28b- <i>xyn</i> plazmidinin DNA dizi analiz kromotogramı.....	69
Şekil 4.20	<i>xyn</i> geninin pET-28b(+) vektörüne aktarıldığı bölgenin şematik olarak gösterimi.	71
Şekil 4.21	ClustalW2 programı kullanılarak, <i>Bacillus</i> 'un farklı türlerine ait ksilanaz enziminin amino asit dizileriyle <i>Bacillus</i> 'dan izole edilerek klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılan ksilanaz enziminin amino asit dizisinin çoklu hizalanması (.....	72
Şekil 4.22	SDS PAGE elektroforezi	73
Şekil 4.23	Plate analizi 1.....	74
Şekil 4.24	Plate analizi 2.....	74
Şekil 4.25	Ksilanaz enziminin pH bağımlılık eğrisi	75
Şekil 4.26	Ksilanaz enziminin sıcaklık bağımlılık eğrisi.....	76
Şekil 4.27	Ksilanaz enziminin ısı kararlılık eğrisi.....	77
Şekil 4.28	Ksilanaz enzimi için Linewear-Burk eğrisi	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Ksılanazların izole edildiği mikroorganizmalar ve ürettikleri ksılanazların temel özellikleri	14
Çizelge 2.2	Farklı sistemler kullanılarak farklı ksılanaz genlerinin klonlanması ve karakterizasyonu	18
Çizelge 3.1	Kullanılan cihazlar	20
Çizelge 3.2	Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler.....	21
Çizelge 3.3	Kullanılan enzimler	23
Çizelge 3.4	PCR ile 16s rDNA bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerler.....	23
Çizelge 3.5	<i>xyn</i> genini elde etmek amacıyla kullanılan primerler	24
Çizelge 3.6	Ksılanaz genini çoğaltmak amacıyla PCR’de kullanılan primerler	24
Çizelge 3.7	Klonlama ve ekspresyon işlemlerinde kullanılan mikroorganizmalar	25
Çizelge 3.8	Klonlamada ve ekspresyonda kullanılan plazmitler.....	25
Çizelge 3.9	Kesimin birinci aşaması için gereken madde miktarları	37
Çizelge 3.10	Kesimin ikinci aşaması için gereken madde miktarları	38
Çizelge 3.11	Ligasyon için gereken madde miktarları	39
Çizelge 3.12	SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları.....	47
Çizelge 4.1	İzole edilen ksılanaz üreticisi mikroorganizmaların tanılanması	65
Çizelge 4.2	<i>Bacillus</i> ’dan izole edilerek klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılan ksılanaz enziminin amino asit dizisinin <i>Bacillus</i> ’un farklı strainlerine ait ksılanaz enziminin amino asit dizisine benzerliği.....	71

1. GİRİŞ

Hücrelerde oldukça önemli metabolik görevleri olan enzimler, biyokimyasal reaksiyonları katalizyen protein yapısında moleküllerdir ve çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere gündelik ve ekonomik hayata girmişlerdir. Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Çünkü mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha kararlı ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri gibi avantajları vardır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerlerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır (Wiseman, 1987). Stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessese, 1998).

Türkiye büyük bir biyoteknoloji ürünleri tüketicisidir. Tüketicisi olduğumuz bu pazarın en önemli alanlarından birisini “enzimler” oluşturmaktadır. Türkiye’nin yerli enzim arzı hemen hemen yok gibidir. Enzimler farklı kategorilerde farklı isimler, sektörler ve kalemler altında yerli pazara girdikleri ve tüketildikleri için pazar hacminin bütününe tek bir rakam halinde tespiti de mümkün değildir. Bilinen kadarıyla tüketimimiz milyar dolarlar seviyesindedir. Enzimlerin endüstriyel kullanım alanları incelendiğinde ne kadar yaygın, yüksek hacimli ve ticari fırsatlarla dolu bir pazar oluşturduğu görülmektedir (Özer, 2002).

Söz konusu pazardaki büyük boşluk dikkate alınarak çalışma grubumuz tarafından rekombinant enzim üretim sistemleri üzerine araştırmalara odaklanılmıştır. Bu tez kapsamında endüstride geniş kullanım alanına sahip ksilanaz enzimi rekombinant olarak üretilerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ (KURAMSAL TEMELLER / GENEL BİLGİLER)

2.1. Enzim Nedir?

Enzimler, canlı organizmalardaki kimyasal reaksiyonları hızlandıran ve hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100'lük bir ürün verimi sağlayan biyolojik katalizörlerdir. Katalitik RNA moleküllerinin küçük bir grubu hariç olmak üzere, bütün enzimler protein yapısındadır. Proteinlerin en büyük ve en çok özelleşmiş gurubunu teşkil ederler (Keha ve Küfrevioğlu,2004).

Enzimlerden günlük hayatta yararlanma olgusu oldukça eskidir. İnsanlar farkında olmadan enzimlerden; ekmek, peynir, bira, şarap vb. maddelerin yapımında ve ayrıca ilaç olarak yararlanmışlardır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

Çağdaş enzim kimyası çalışmaları, enzimatik reaksiyonlarla ilgili Michaelis-Menten denklemi ve Summer tarafından 1926 yılında saf kristal bir enzimin (üreaz) izolasyonu ile başlamıştır. Bu alandaki çalışmalar gün geçtikçe daha da yoğunlaşmakta olup yeni enzimler izole edilip saflaştırılmaktadır. Bu güne kadar binlerce enzimin amino asit dizisi aydınlatılmış olup bunlardan çoğunun üç boyutlu yapısı bilinmektedir (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

Enzimlerin yapılarının aydınlatılmasına paralel olarak enzim katalizli reaksiyonların kinetik ve termodinamik açıdan incelenmesi çalışmaları da hızla ilerlemiştir. Enzimlerin katalitik güçleri gerçekten şaşırtıcıdır. Enzimler molekülleri parçalar, birleştirir veya belirli grupları bir molekülden diğerine taşırlar. Katalitik fonksiyonları bakımından enzimler altı ana grupta toplanmıştır (Telefoncu ve Pazarlıoğlu, 2010).

2.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Bilinen enzimlerin sayısı 1950'lerin sonuna kadar çok hızlı bir şekilde artmış ve birçok kişinin aynı enzime farklı isimler vermelerinden dolayı adlandırmada karmaşa ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda adlandırılması yapılan birçok enzimin katalizlediği reaksiyonun tabiatı hakkında herhangi bir bilgi içermemesi de bu karmaşayı artırmıştır.

Bu karışıklığın düzenlenmesi amacı ile 1956 yılında bir Uluslararası Enzim Komisyonu (International Commission on Enzyme) kurulmuştur. Bu komisyon tarafından, enzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi için kabul edilen sistem 3 genel prensibi içermektedir.

Birincisi, -az (-ase) eki ile sonlanan enzim isimleri, tek enzimler için kullanılmalıdır. Bu durum birden fazla sistem içeren enzimler için kullanılmamalıdır. İkincisi, enzimler katalizledikleri reaksiyonlara göre sınıflandırılır ve adlandırılırlar. Son prensip ise katalizlenen reaksiyonların tipine göre adlandırılır ve sınıflandırılır. Bu sistem, enzim komisyonu (E.C.) tarafından belirlenen kod numaraları kullanılarak enzimlerin açık bir şekilde tanımlanmalarını sağlar. Bir enzimin genellikle iki ismi mevcuttur. Biri sistematik ya da tavsiye edilen, diğeri ise yaygın olarak kullanılan, daha kısa ve kolayca uygulanan genel ismidir. Bir enzim, sistematik ismi ve E.C. kod numarası ile tanımlandıktan sonra önerilen isim herhangi bir karışıklık olmaksızın sorunsuzca kullanılabilir. Bu tür yaklaşımlar literatürde yaygın olarak uygulanmaktadır (Aehle, 2004).

Enzim komisyonu raporuna göre enzimler katalizledikleri reaksiyona göre 6 ana sınıfa ayrılır ve kod numaraları ile tanımlanırlar. E.C. ön eki ile başlayan numaralar noktalarla birbirinden ayrılmış 4 temel ögeyi ifade ederler.

1. İlk rakam, enzimin altı sınıftan hangisine ait olduğunu belirtir.
2. İkincisi, enzimin alt sınıfını (Subclass) ifade eder.
3. Üçüncü rakam, ikinci alt grubu (Sub-Subclass),
4. Dördüncü rakam ise enzimin sub-subclass içindeki seri numarasını ifade eder.

Bu sisteme göre ilk rakamın ifade ettiği sınıflar kısaca aşağıdaki gibidir.

1. Oksidoredüktazlar,

2. Transferazlar,

3. Hidrolazlar,

4. Liyazlar,

5. İzomerazlar,

6. Ligazlar. (Aehle, 2004)

Örneğin, E.C. 3.2.1.8 1,4-β-D-ksilan ksilanohidrolaz enziminin kod numarası ile ifade edilmesidir.

2.3. Enzim Üretiminde Mikroorganizmalar

Tarihsel gelişim açısından bakıldığında enzimlerin çok farklı kaynaklardan elde edildiği görülmektedir. Bunlar bitkisel, hayvansal ya da endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir (Gupta ve ark, 2003). Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao ve ark, 1998). Ayrıca daha hızlı çoğalmaları, gelişme koşullarının kontrolünün kolay olması ve üretimlerinin mevsimlere bağlı olmaması vb. nedenler de mikroorganizmaları ticari enzimlerin üretiminde tercih edilen önemli kaynaklar haline getirmiştir. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların fermentasyonu ile üretilmektedir (Godfrey ve West, 1996). Ekstremofilik mikroorganizmalar; volkanların yüksek sıcaklıklarında, kutupların düşük sıcaklıklarında, çok düşük ve çok yüksek pH değerlerinde (pH 0-3 veya pH 10-12) veya çok yüksek tuz konsantrasyonlarında (%5-30) yaşamak için adapte olmuşlardır (Niehaus ve ark., 1999). Bu şekilde farklı ekolojik koşullarda yaşayan mikroorganizmalar termofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik bakteriler şeklinde sınıflandırılmıştır (Zeikus, 1979). Buralarda yaşayan termoasidofilik ve alkalifilik bakterilerden elde edilen enzimler ekstrem pH ve sıcaklık koşullarına

dayanıklı olduğu için endüstriyel alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kindle, 1983).

2.4. Enzim Üretiminde Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA terimi, doğal olarak bir arada bulunması mümkün olmayan DNA moleküllerinin birleştirilerek yeni bir kombinasyonun oluşturulmasını ifade eder. Rekombinant DNA teknolojisi, bakteri ve virüslerle yapılan çalışmalarda geliştirilen genetik teknikleri ve nükleik asit biyokimyası metotlarını birlikte kullanır (Klug ve Cummings, 2003). Rekombinant DNA teknolojisinin temelini gen klonlama süreci oluşturur. Bu sürecin temel basamaklarını Klug ve Cummings aşağıdaki gibi açıklamıştır:

1. Doku ya da hücrelerden DNA izole edilir.
2. DNA moleküllerini özgül dizilerden tanıyıp kesen restriksiyon endonükleazlar ya da restriksiyon enzimleri denilen enzimlerle DNA parçaları oluşturulur.
3. Restriksiyon enzimleri ile oluşturulan DNA parçaları, vektör ya da taşıyıcı molekül adı verilen diğer DNA molekülleri ile birleştirilir. İçine bir DNA parçası sokulmuş olan vektör, bir rekombinant DNA molekülüdür.
4. Kendi DNA'sı ile birlikte, üzerinde yabancı DNA molekülünü taşıyan vektörün oluşturduğu rekombinant molekül konakçı içerisinde kendini eşler ve klon olarak bilinen, birbirine özdeş düzinelerce kopyasını oluşturur.
5. Konakçı hücre kendini eşlerken, rekombinant DNA molekülleri de yavru hücrelere geçer ve her biri klonlanmış DNA dizisinin kopyalarını taşıyan konakçı hücre topluluğu oluşur.
6. Klonlanmış DNA konakçı hücrelerden izole edilebilir ve incelenebilir.

7. Potansiyel olarak, klonlanmış DNA transkripsiyona uğrayabilir, mRNA'sı translasyona yönlendirilebilir, gen ürünü izole edilebilir ve araştırma için ya da ticari amaçlarla satılmak için kullanılabilir.

Bir genin klonlanması, protein ürününün büyük miktarlardaki üretimi gibi çok daha büyük bir tasarımda, sadece ilk basamaktır. Aslında asıl ilgilenilen klonlanmış genin kendinden çok protein ürünüdür. Özellikle proteinin ticari, tedavi edici ya da araştırma değeri olan bir ürün özelliği varsa bu çok daha ilginçtir (Nelson ve Cox, 2005).

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak endüstriyel bir enzim olan ksilanaz üretilmiş ve üretilen ksilanaz çeşitli karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

2.5. Endüstriyel Enzimler

Dünya geneli incelendiğinde endüstriyel enzimlerin ticari pazar payının yaklaşık 1,6 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir (Schallmey ve ark, 2004). Bu enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında, %29'unun gıda endüstrisinde, %15'inin hayvan yemi sektöründe ve %56'sının ise genel amaçlı teknik alanlarda yer aldığı görülmektedir (Outtrup ve Jorgensen, 2002). Endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %75'ini hidrolitik enzimler oluşturmaktadır. Proteaz grubundaki enzimler kullanımda ilk sırayı alırken, karbohidratları parçalayan enzimler ikinci sırada yer almaktadır (Harwood, 1992; Bhat, 2000). Karbonhidrat parçalayan enzimlerden amilazlar, enzim piyasasında yaklaşık %25'lik bir paya sahiptir (Sidhu ve ark, 1997; Rao ve ark, 1998). Son zamanlarda kağıt hamurunun beyazlatılması için ksilanazların endüstride kullanılması Viikari ve arkadaşlarının (1986) buluşu ile artışa geçmiştir. Hidrolazlardan selülazların ise selülozik materyallerin şekerlere dönüştürülerek biyo-etanol gibi biyolojik temelli ürünlere dönüştürülmesi söz konusu olduğunda enzim piyasasındaki payının ciddi bir şekilde artması beklenmektedir (Cherry and Fidantsef, 2003). Sellülazların, bitkisel atıkların hidrolizinde kullanılması durumunda Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık 400 milyon dolarlık bir ticaret hacmine sahip olabileceği tahmin edilmektedir. Bu durum, endüstriyel enzim pazarının %33'lük bir orana yükselebileceğini göstermektedir (Percival Zhang ve ark, 2006).

2.6. Ksilan

Hemiselüloz, bitki hücrelerinin çeperlerinde selüloz ve pektinlerle birlikte bulunan bazı karmaşık karbonhidrat ya da polisakaritlerin ortak adıdır. Hemiselüloz, tek ve çok yıllık bitkilerin hücre duvarında selüloz ve ligninle beraber bulunur ve bunlar toplu olarak lignoselülozik maddeler olarak adlandırılır. Farklı şeker ünitelerinin farklı şekillerde birleşmesi ile oluşmuş dallı bir heteropolisakarittir. Selülozda 7000-15000 glukoz molekülü düz zincir şeklinde birleşmişken hemiselülozda yaklaşık 200 farklı şeker birimi kısa zincirler şeklinde birleşmiştir. Hemiselülozlar doğada toplam biyokütlenin %30-35'ini oluşturmaktadır (Kulkarni ve ark., 1999).

Hemiselüloz, 5 C'lu pentoz şekerler (ksiloz, arabinoz gibi) ile 6 C'lu heksoz şekerler (mannoz, glukoz, galaktoz gibi) ve şeker asitlerinden oluşmuş heterojen polimerdir. Hemiselülozların sınıflandırılması, içerdikleri şeker birimlerine göre yapılır. Hemiselülozların çoğunda bulunan temel monomerler, D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz ve D-arabinozdur. Hemiselülozlar topluca ksilanlar, glikomannanlar, arabinogalaktanlar olmak üzere üç grupta sınıflandırılır (Beg ve ark., 2001).

Hemiselüloz, selülozun aksine kimyasal bakımdan homojen yapı göstermez. Sert odun hemiselülozu daha çok ksilan içerirken yumuşak odun hemiselülozu daha çok glukomannan içermektedir. Dallanma tekrarı ve kompozisyonu ksilanın kaynağına bağlıdır. Değişik kaynaklardaki ksilanların kompozisyonları farklılık gösterir örneğin; Huş ağacı ksilanı: % 89,3 ksiloz, % 1 arabinoz, % 1,4 glukoz, % 8,3 anhidrouronik asit içerir. Pirinç kepeği ksilanı: % 46 ksiloz, % 44,9 arabinoz, % 6,1 galaktoz, % 1,9 glukoz, % 1,1 anhidrouronik asit içerir. Buğday arabinoksilan: % 65,8 ksiloz, % 33,5 arabinoz, % 0,1 mannoz, % 0,1 galaktoz, % 0,3 glukoz içerir. Mısır lifi ksilanı β -1,4 bağı ile bağlı ksiloz ünitelerinden oluşmuş kompleks heteroksilanlardan biridir. % 48-54 ksiloz, % 33-35 arabinoz, % 5-11 galaktoz, % 3-6 glukouronik asit içerir.

Ksilan, hemiselülozun başlıca bileşenidir. Ksilan iskelet yapısı β -1,4-glikozit bağlarıyla bağlanmış ksiloz rezidülerinden ve yaklaşık % 80'i ksiloz ünitelerine C-2 ve/veya C-3 ile bağlı arabinoz veya gluköronik asitten oluşan monomerik yan zincirlerden oluşur. Yumuşak odun heteroksilanında arabinofuranosil birimleri p-kumarik asit ve ferulik

asitle esterleşmiştir. Sert odun ksılanında ksiloz birimlerinin % 60-70'i asetillenmiştir. Sert odun ksılanının polimerizasyon derecesi (150-200) yumuşak odun ksılanınkinden (70-130) yüksektir (Obembe ve ark., 2006).

2.7. Mikrobiyal Ksilanolitik Sistemde Ksılanın Enzimatik Hidrolizi

Ksılanın temel bileşeni, en ucuz “kimyasal fabrikalar” olan mikrobiyal hücreler tarafından kimyasal yakıtla dönüştürülebilen 5 karbonlu şeker D-ksilozdur (Biely, 1985). Bitki ksılanlarının heterojenitesi ve kompleks kimyasal yapısından dolayı tamamen parçalanması birkaç hidrolitik enzimin birlikte çalışmasını gerektirir. Bu nedenle ksılan parçalayıcı hücreler için polimer parçalayıcı bir çok enzimi üretmesi şaşırtıcı değildir. Ksılan hidrolizini gerçekleştiren ksilanolitik enzim sistemi genellikle çeşitli hidrolitik enzimlerden oluşur: β -1,4-endoksilanaz, β -ksilozidaz, α -L-arabinofuranozidaz, α -glukuronidaz, asetil ksılan esteraz ve fenolik asit (ferulik ve p-kumarik asit) esteraz (Şekil 2.3). Bu enzimlerin tümü ksılanı şeker bileşenlerine çevirmek için birlikte görev yapmaktadır. Böyle bir multifonksiyonel ksilanolitik enzim sistemi funguslar (Belancic ve ark., 1995; Biely ve ark., 1985), aktinomisetler (Elegir ve ark., 1995) ve bakteriler (Dey ve ark., 1992) arasında oldukça yaygındır.

2.8. Ksilanolitik Enzimler

Ksılanın kompleks yapısı nedeniyle molekülün tamamen hidrolizi için farklı enzimlere gereksinim duyulmaktadır. Ksılanı hidroliz eden enzimlerin tamamına ksilanolitik enzim sistemi adı verilir. Bu grupta β -1,4-Endoksilanaz, β -Ksilozidaz, β -L-araninofuranozidaz, β -Glukuronidaz, Asetil Ksılan Esteraz ve Fenolik asit (Ferulik ve p-Kumarik asit) esteraz yer almaktadır.

Endo-1,4- β -ksilanaz

Endo-1,4- β -ksilanaz (1,4- β -D-ksılan ksılanohidrolaz; E.C. 3.2.1.8) ksılan iskeletinde glikozidik bağları parçalar. Başlangıçta hidroliz ürünleri β -D-ksilopiranozil oligomerleridir fakat daha sonraki aşamada β -D-ksilopiranozilin mono-, di-, ve trisakkaritleri gibi küçük moleküllerdir (Polizeli ve ark., 2005).

β -D-Ksilozidazlar

β -D-Ksilozidazlar (1,4- β -D-ksilan ksilohidrolaz; E.C. 3.2.1.37) ksilobioz ve daha büyük ksilooligosakkaritlere karşı relatif afinitesine göre sınıflandırılabilir. β -Ksilozidazlar genellikle ksilanı hidroliz etmezler; onların en iyi substratı ksilobiozdur ve ksilooligosakkaritlere karşı afinitesi ksilooligosakkaritlerin polimerizasyon derecesiyle ters orantılıdır. Ksilozidazlar p-nitrofenil- ve o-nitrofenil- β -D-ksilopiranozid gibi yapay substratları parçalayabilirler. β -Ksilozidazlar, ksilan ksilanaz tarafından ardı ardına hidroliz edildiğinde önemli bir rol oynarlar. Ksilanın ksilanaz tarafından ardı ardına hidrolizi, β -D-ksilopranozil oligomerlerinin birikimine neden olur ki bu endoksilanazı inhibe edebilir. β -Ksilozidaz, bu ürünleri hidroliz ederek inhibisyon nedenini ortadan kaldırır ve ksilan hidrolizinin etkinliğini artırır (Andrade ve ark. 2004; Zanoelo ve ark. 2004).

Asetilksilan esteraz

Asetilksilan esteraz (E.C. 3.1.1.6) asetil ksilanın β -D-ksilopiranosil rezidüleri üzerinde 2. ve/veya 3. pozisyonlardaki O-asetil gruplarını uzaklaştırır. Asetilksilan esteraz ksilanın hidrolizinde önemli bir rol oynar. Çünkü, sterik engel oluşturduğu için ksilan iskeletini parçalayan enzimlerin iskelete yaklaşmasını engelleyen asetil yan gruplarını uzaklaştırarak endoksilanazların etkinlik göstermesine olanak sağlar (Polizeli ve ark. 2005).

Arabinaz

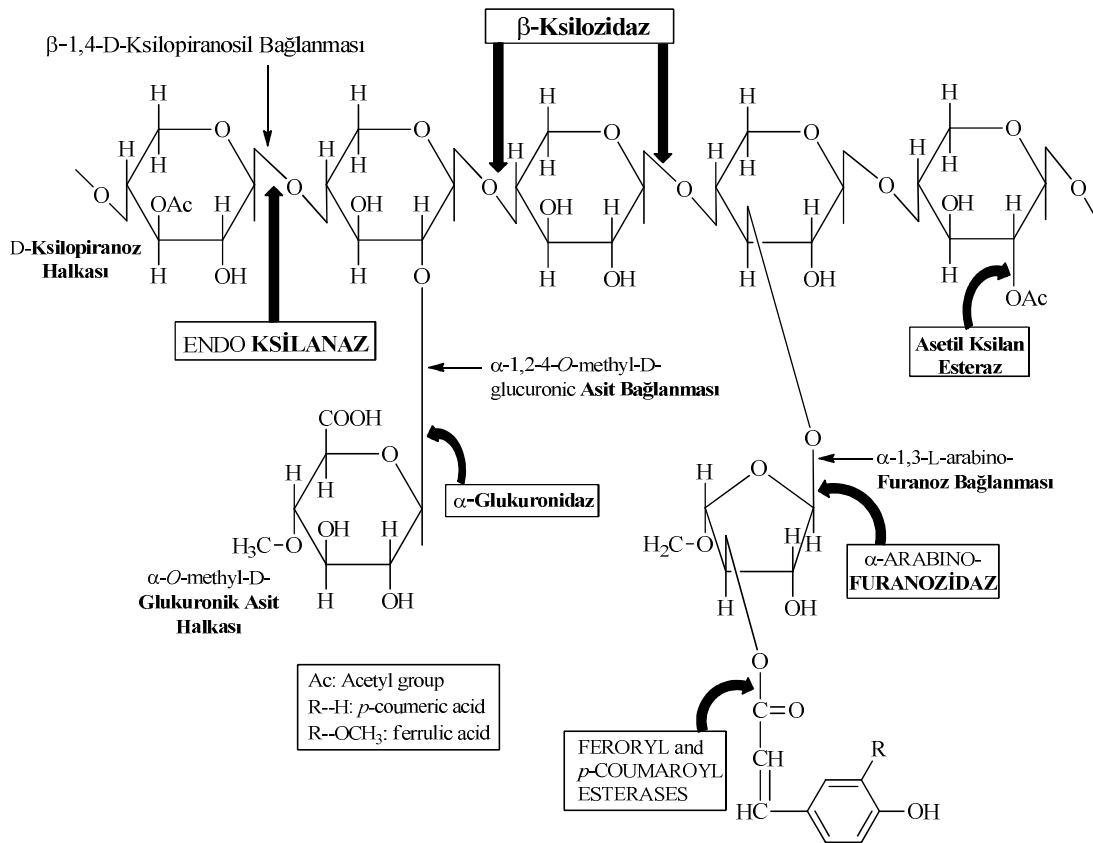
Arabinaz β -D-ksilopranozilin 2. ve 3. pozisyonlarında yer alan L-arabinoz rezidülerini uzaklaştırır. İkiye ayrılır: p-nitrofenil- α -L-arabinofuranozitleri ve dallanmış arabinanları parçalayan ekzo- α -L-arabinofuranozidaz (E.C. 3.2.1.55) ve yalnızca lineer arabinankları hidroliz eden endo-1,5- α -L-arabinaz (E.C. 3.2.1.99) (Kaneko ve ark. 1993; de Vries ve ark. 2000).

α -Glukuronidaz

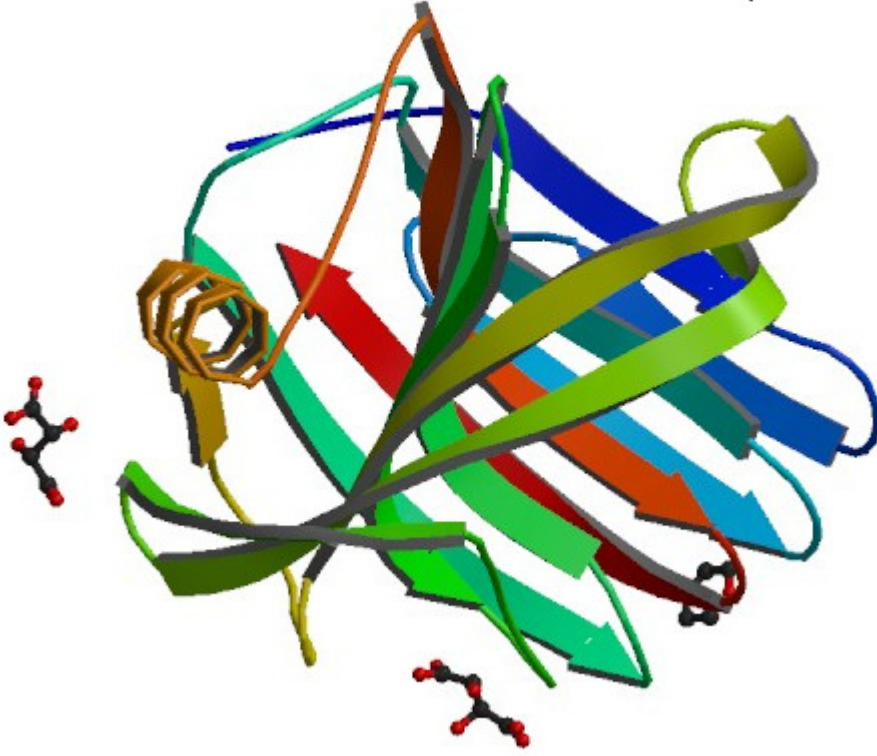
α -Glukuronidaz 3.2.1 glukuronoksilanda bulunan glukuronik asit rezidüleri ve β -D-ksilopranosil üniteleri arasındaki α -1,2 glikozidik bağlarını hidrolizler (Polizeli ve ark., 2005).

Ferulik asit esteraz (EC 3.1.1) ve p-kumarik asit esteraz (EC 3.1.1)

Ferulik asit esteraz (E.C. 3.1.1.-) ve p-kumarik asit esteraz (E.C. 3.1.1.-), ksilan üzerindeki ester bağlarını parçalar Ferulik asit esteraz arabinoz ve ferulik asit arasındaki bağı parçalarken p-kumarik asit esteraz da arabinoz ve p-kumarik asit arasındaki bağı parçalar (Christov ve Prior, 1993; Williamson ve ark., 1998; Crepin ve ark., 2004).



Şekil 2.1 Ksilanın tam hidrolizinde gerekli enzimler ve etki bölgeleri (Beg ve ark, 2001)



Şekil 2.2 *Bacillus subtilis* glikozil hidrolaz aile-11 ksilanazının kristal yapısı (Anonim, 2013)

2.9. Ksilanazların Bazı Uygulama Alanları

Mikroorganizmalardan elde edilen ksilanolitik enzimler, birçok endüstriyel işlemlerde biyoteknolojik potansiyellerinden dolayı büyük bir ilgi odağı olmuştur. Özellikle kağıt ve kağıt hamuru başta olmak üzere gıda ve hayvan yemi endüstrisi gibi alanlarda temel endüstriyel enzim olma yolunda çok büyük öneme sahiptir (Beg ve ark., 2001).

Ksilanaz enziminin kullanım alanları;

a) Ksilanazların en ümit verici uygulamalarından birisi, kağıt hamuru hazırlamada beyazlaştırma ajanı olarak klor kullanımının azaltılması ve kağıt hamurundan lignini ayırma özelliğidir. Enzim uygulaması kağıt hamurunun fibrilasyonunu ve su tutuşunu artırır, işlenmemiş kağıt hamurunda dövme sayısını düşürür, hurda kağıt hamurunda bağları onarır, çözünen hamurdan ksilanların selektif giderimini sağlar. Ksilanazlardan

ayrıca odun hamurunda biobeyazlatma, sentetik ipek üretiminde ise hamurdan selüloz eldesinde faydalanılır (Viikari ve ark., 1986; Beg ve ark., 2001).

b) Çavdardan elde edilen yemler ile beslenen et tavuklarında yemden geri dönüşüm oranı ve kilo kaybı intestinal viskozite ile ilişkilendirilmiştir. Et tavukçuluğunda çavdar temelli yemlere ksilanaz uygulamaları intestinal viskoziteyi düşürmüş ve böylece yemden etkin yararlanma, dolayısıyla kilo artışı sağlanmıştır. Ksilanazların etkinliği ekmek kalitesi artışında da ekmek hacmini artırarak gözlenmiştir. Bu durum ksilanazlarla birlikte amilazların kullanılmasıyla daha da artmıştır (Maat ve ark, 1992).

c) Ksilan tarım ve gıda endüstrisi atıklarında bol miktarda bulunmaktadır. Ksilanaz uygulamaları ile atık sulardaki ksilan ksiloza dönüştürülür (Rani ve Nand,1996).

d) Meyve ve sebzelerin suyunun çıkarılması ve meyve sularının berraklaştırılması amacıyla pektinaz ve selülaz ile birlikte kullanılır. Ayrıca ruminantların beslenmesinde sindirimi artırmak amacıyla yem bitkilerinin ön işleminde kullanılmaktadır (Gilbert ve Hazlewood, 1993).

e) Bazı ksilanazlar bitki hücrelerinden protoplast üretimi için hücre duvarının yumuşatılmasında da kullanılır (Wong ve ark., 1988).

g) Mannanaz, ligninaz, ksilozidaz, glukanaz, glukozidaz gibi çeşitli enzimlerle birlikte ksilanazlar, lignoselülozik biyokütleden etanol ve ksilitol gibi biyolojik yakıt üretimi için kullanılabilir (Dominguez, 1998; Kuhad ve Sing, 1993; Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996).

h) Ksilanolitik enzim sistemlerinin pektinolitik enzim sistemleri ile birlikte önemli uygulamalarından biri de, keten ve kenevir gibi lif bitkilerinin reçine benzeri maddelerden arındırılmasıdır (Puchart ve ark., 1999; Sharma, 1987). Ksilanaz-pektinaz kombinasyonu odun işlemede ilk basamak olan kabuktan arındırma işlemlerinde de kullanılabilir (Bajpai, 1999; Wong ve Saddler, 1992).

2.10. Ksilanaz İçeren Organizmalar ve Yapılan Çalışmalar

Ksilanazlar, başlıca bakterilerden, funguslardan, aktinomisetlerden ve mayalardan izole edilmektedir. Ksilanazların izole edildiği farklı mikroorganizmalar ve ürettikleri ksilanazların bazı temel özellikleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Farklı mikroorganizmalardan izole edilen ksilanazlara ait genler *Pichia pastoris*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi çeşitli protein üretim sistemleri kullanılarak rekombinant olarak üretilmiştir. Rekombinant ksilanaz üretiminde kullanılan sistemler ve üretilen ksilazlara ait temel özellikler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Ksilanazların izole edildiği mikroorganizmalar ve ürettikleri ksilanazların temel özellikleri

Mikroorganizma	Molaküler ağırlık (kDa)	Optimum		Stabilite		pI	Km (mg/ml)	Vmax (µM/mine per mg)	Referans
		pH	Sıcaklık (°C)	pH	Sıcaklık (°C)				
Bakteri									
Acidobacterium capsulatum	41	5	65	3-8	20-50	7,3	3,5	403	Inagaki ve ark.,1998
Bacillus sp. W-1	21,5	6	65	4-10	40	8,5	4,5	-	Okazakive ark., 1985
Bacillus circulans WL-12	15	5,5-7	-	-	-	9,1	4	-	Esteban ve ark.,1982
Bacillus stearothermophilus T-6	43	6,5	55	6,5-10	70	7,9	1,63	288	Khasin ve ark.,1993
Bacillus sp. strain BP-23	32	5,5	50	9,5-11	55	9,3	-	-	Blanco ve ark.,1995
Bacillus sp. strain BP-7	22-120	6	55	8-9	65	7-9	-	-	Lopez ve ark.,1998
Bacillus polymyxa CECT 153	61	6,5	50	-	-	4,7	17,1	112	Morales ve ark., 1995
Bacillus sp. strain K-1	23	5,5	60	5-12	50-60	-	-	-	Ratannakanokchai ve ark.,1999
Bacillus sp. NG-27	-	7-8,4	70	6-11	40-90	-	-	-	Gupta ve ark.,1992
Bacillus sp. SPS-0	-	6	75	6-9	85	-	-	-	Bataillonve ark., 1998
Bacillus sp. Strain AR-009	23,48	9-10	60-75	8-9	60-65	-	-	-	Gessesse 1998
Bacillus sp. NCIM 59	15,8-35	6	50-60	7	50	4,8	1,58-3,50	0,0017-0,742	Dey ve ark., 1992

Çizelge 2.1 devam

<i>Cellulomonas</i> sp. N.C.I.M. 2353	22-33-53	6,5	55	-	-	8	1,7-1,5	380-690	Chaudhary and Deobagkar 1997
<i>Micrococcus</i> sp. AR- 135	56	7,5-9	55	6,5-10	40	-	-	-	Gessesse and Mamo 1998
<i>Staphylococcus</i> sp. SG-13	60	7,5-9,2	50	7,5-9,5	50	-	4	90	Gupta ve ark., 2000
<i>Thermoanaerobacteriu</i> <i>m</i> sp. JW/SL–YS 485	24-180	6,2	80	-	-	4,37	3	-	Shao ve ark., 1995
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	40-120	5,4-6,2	92-105	-	-	5,6	1,1-0,29	374-4760	Winterhalter and Liebel 1995
Fungus									
<i>Acrophialophora</i> <i>nainiana</i>	17	6	50	5	50	-	0,731- 0,343	-	Ximenes ve ark., 1999
<i>Aspergillus niger</i>	13,5-14,0	5,5	45	5-6	60	9	-	-	Frederick ve ark., 1985
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	26-35	2-5,5	50-60	1-10	30-60	3,5-6,7	-	-	Ito ve ark., 1992
<i>Aspergillus nidulans</i>	22-34	5,4	55	5,4	24-40	-	-	-	Fernandez-Epsinar ve ark., 1992
<i>Aspergillus fischeri</i> Fxn1	31	6	60	5-9,5	55	-	4,88	5,88	Raj and Chandra 1996
<i>Aspergillus sojae</i>	32,7-35,5	5-5,5	60-50	5-8,5-9	50,35	3,5- 3,75	-	-	Kimura ve ark., 1995
<i>Aspergillus sydowii</i> MG 49	30	5,5	60	-	-	-	-	-	Ghosh and Nanda 1994

Çizelge 2.1 devam

<i>Cephalosporium</i> sp.	30-70	8	40	8-10	-	-	0,15	-	Bansod ve ark., 1993
<i>Fusarium oxysporum</i>	20,8-23,5	6	60-55	7-10	30	-	9,5-8,45,8,7	0,41-0,37	Christako- polous ve ark., 1996
<i>Geotrichum candidum</i>	60-67	4	50	3-4,5	45	3,4	-	-	Radionova ve ark., 2000
<i>Paecilomyces varioti</i>	20	4	50	-	-	5,2	49,5	-	Kelly ve ark., 1989
<i>Penicillium purpurogenum</i>	33-23	7-3,5	60-50	6-7,5	40	8,6-5,9	-	-	Belancic ve ark., 1995
<i>Thermomyces lanuginosus</i> DSM 5826	25,5	7	60-70	5-9	60	4,1	7,3	-	Cesar and Mrsa 1996
<i>Thermomyces lanuginosus</i> -SSBP	23,6	6,5	70-75	5-12	60	3,8	3,26	6300	Lin ve ark., 1999
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	5	50	-	40		0,58	0,106	Tan ve ark., 1985
Yeast									
<i>Aureobasidium pullulans</i> Y-2311-1	25	4,4	54	4,5	55	9,4	7,6	2650	Li ve ark., 1993
<i>Cryptococcus albidus</i>	48	5	25	-	-	-	5,7	-	Morosoli ve ark., 1986
<i>Trichosporon cutaneum</i> SL409	-	6,5	50	4,5-8,5	50	-	-	-	Liu ve ark.,1998

Çizelge 2.1 devam

Actinomycete									
<i>Streptomyces</i> sp. EC 10	32	7-8	60	-	-	6,8	3	-	Lumba and Pennickx 1992
<i>Streptomyces</i> sp. B-12-2	23,8-40,5	6-7	55-60	-	-	4,8-8,3	0,8-5,8	162-470	Elegir ve ark., 1994
<i>Streptomyces</i> T7	20	4,5-5,5	60	5	37-50	7,8	10	7610	Kesker 1992
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	33-54	7	60-70	-	-	4,2-8	-	-	Tsujibo ve ark., 1992
<i>Streptomyces chattanoogensis</i> CECT 3336	48	6	50	5-8	40-60	9	4-0,3	78,2-19,1	Lopez-Fernandez ve ark., 1998
<i>Streptomyces viridisporus</i> T7A	59	7-8	65-70	5-9	70	10,2-10,5	-	-	Magnuson and Crawford 1997
<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	-	8,6	60	5,4-9,2	50-75	-	1,2	158,85	Beg ve ark., 2000a
<i>Thermomonospora curvata</i>	15-36	6,8-7,8	75	-	-	4,2-8,4	1,4-2,5	-	Stutzenberger and Bodine 1992

Çizelge 2.2 Farklı sistemler kullanılarak farklı ksilanaz genlerinin klonlanması ve karakterizasyonu

Kaynak organizma	Gen	Vektör	Host	Seçicilik	Rekombinant ksilanaz için optimum aktivite şartları		Rekombinant ksilanaz aktivitesi	Referans
					pH	Sıcaklık		
<i>Chaetomium thermophilum</i>	xyn11A	pPIC9K	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Genetisin	6.5	70°C	15,6U/ml	Ghaffar ve ark., 2010
<i>Bispora sp.MEY-1</i>	xylD	pPIC9	<i>Pichia pastoris</i> GS115	His ^{+q}	3.0	60°C	500 U/ml	Luo ve ark., 2009
<i>Bispora sp.MEY-1</i>	xyl10C	pPIC9	<i>Pichia pastoris</i> GS115	His ^{+q}	4.5-5.0	85°C	73,4U/ml	Luo ve ark., 2009
<i>Penicillium sp. CGMCC 1669</i>	xyn11F63	pPIC9	<i>Pichia pastoris</i> GS115	His ^{+q}	4.5	40°C	516U/ml	Liu ve ark., 2009
<i>Aspergillus niger</i>	Anx	pPIC9K	<i>Pichia pastoris</i> GS115	His ⁺	5.0	50°C	175U/mg	Liu ve ark., 2006
<i>Aspergillus niger</i>	xynB xyn6	pPICZαA	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Zeosin	5.0 3.5	50°C	34U/ml 27U/ml	Korona ve ark., 2005
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	XynA	pPIC9	<i>Pichia pastoris</i> GS115	His ⁺	*	75°C	272 U/mg	Damaso ve ark., 2003
<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn2	pPICZαA	<i>Pichia pastoris</i> X-33	Zeosin	6.0	60°C	4,350 nkat/ml	He ve ark., 2009
<i>Aspergillus sulphureus</i>	xynB	pGAPzαA	<i>Pichia pastoris</i> X-33	Zeosin	5.0	50°C	105U/ml	Li ve ark., 2009
<i>Aspergillus fumigatus MKU1</i>	xynf11a	pPICZB	<i>Pichia pastoris</i> X-33	Zeosin	6.0	60°C	14U/ml	Jeya ve ark., 2009

Çizelge 2.2 devam

<i>Aspergillus niger</i> <i>CGMCC1067</i>	xynB	pGAPzαA	<i>Pichia pastoris</i> X-33	Zeosin	5.0	50°C	2265,3 IU/mg	Deng ve ark., 2006
<i>Rhodothermus</i> <i>marinus</i>	xyn10A	pPICZαB	<i>Pichia pastoris</i> SMD1168H	Zeosin	*	*	3130 U/l	Ramchuran ve ark., 2005
<i>Trichoderma</i> <i>harzianum</i> C4	xynII	pVT-103-U YE _p -IPT	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Ura3 Trp1	5.5	50°C	430 U/mg	Min ve ark., 2009
<i>Alicyclobacillus</i> <i>sp.A4</i>	XynA4	pET-22b(+)	<i>Escherichia coli</i>	Ampisillin	7.0	55°C	420,2U/mg	Bai ve ark., 2009
<i>Bacillus subtilis</i> AMX-4	xylA	pUC19	<i>Escherichia coli</i>	Ampisillin	6.0-7.0	50-55°C	*	Ki-Hong, 2009
<i>Paenibacillus</i> <i>curdlanolyticus</i> B-6	Xyn10A	pET-28a	<i>Escherichia coli</i>	Kanamisin	7.0	60°C	97,6 U/mg	Rattiya ve ark., 2008
<i>Bacillus subtilis</i> strain R5	*	pT7-7	<i>Escherichia coli</i>	Ampisillin	6.0	40-50°C	11450 nkat/l	Jalal ve ark., 2008
<i>Bacillus sp.</i> BP-7	xynA	pXA30	<i>Escherichia coli</i>	Ampisillin	6.0	60°C	*	Gallardo ve ark., 2003
<i>Bacillus subtilis</i> strain B10	*	pUC18	<i>Escherichia coli</i>	Ampisillin	6.0	50°C	*	Huang ve ark., 2005

*Enzime ait bu özellik, çalışmada mevcut değildir ya da tanımlanmamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Firma-Model
Mikrodalga fırın	Arçelik- MD ₅₀₀
PCR cihazı	Biorad- DNA Engine
Güç kaynağı (SDS ve agaroz jel elektroforezi için)	Biorad
Termostatlı blok ısıtıcı	Biorad-Bio TDB-100
Spin cihazı	Biosan-Combi Spin FVL 2400N
Çalkalayıcı inkübatör	Biosan-ES 20
Agaroz jel fotoğraf makinesi	Gel logic 200
Mikro 22R santrifüj	Hettich
Dondurucu (-80°C)	Hettich
Otoklav	HMC-Hirayama
UV/VIS Spektrofotometresi	Varian carry 50,
Etüv	Memmert
Tarayıcı	Optic-Pro 4830P
Sonikatör	Sonics (VCX130)
UV Gösterici	Syngene- SYTC/1422
Yüksek hızlı santrifüj	Vision-VS 30 000i
Isıtıcı-Magnetik karıştırıcı	Velp Scientifica ARE
Buzdolabı	Vestel-GTP 455A
Kar makinesi	Vision
Çalkalayıcı inkübatör	Zhicheng-ZHWY-111C

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan kitler ve kimyasal malzemeler

Kimyasal malzeme-Kit	Firma
LB Broth Base	Invitrogen- lennox L Broth Base
Agar	BD Bacto™ Agar
Maya ekstraktı	Difco
Malt ekstraktı	Difco
Dekstroz	Merck
Pepton	BD
Trypton	BD- Bacto™
D-Glukoz monohidrat	Alfa Aesar
Gliserol	Euromedex
KCH ₃ COO	Merck
KCl	Sigma
NaCl	Carlo Erba
MgCl ₂	Riedel de Haën
MgSO ₄ .7H ₂ O	Riedel de Haën
CaCl ₂ .2H ₂ O	Carlo Erba
Kanamisin	Sigma Aldrich
Kloramfenikol	Sigma
IPTG	Amresco
DMSO	Merck
Agaroz	Bioron
Etidyum bromür	ICN
Akrilamid	Amresco
SDS	Serva
APS	Biorad
TEMED	Biorad
PIPES	Alfa Aesar

Çizelge 3.2 devam

Trisma baz	Sigma Aldrich
HCl	Merck
PMSF	Sigma Aldrich
Bezamidin	Merck
İmidazol	Merck
Etanol	Merck
Metanol	Merck
$C_6H_5Na_3O_7$	Sigma-Aldrich
Q solution	Qiagen
Tampon D	Promega
Tampon K	Takara
Tampon E	Promega
T ₄ DNA ligaz tamponu	Promega
Pfu DNA Polimeraz Tamponu	Laboratuvarımız tarafınan üretilen
Triton X100	Takara
BSA	Promega /Takara
Congo red	Amresco
DNS	Alfa Aesar
Na-K-tartarat	Carlo Erba
Ksilan	TCI
Genomik DNA saflaştırma kiti	Fermantes
Plazmid DNA saflaştırma kiti	Promega
PCR ürünleri temizleme kiti	Bio Basic

3.1.3. Kullanılan Enzimler

Çalışmada kullanılan enzimler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Kullanılan enzimler

Enzim	Firma
Pfu DNA Polimeraz	Laboratuvarımız tarafınan üretilen
Taq DNA Polimeraz	Fermentas/Promega
DNA Poimeraz	Qiagen
<i>Bam</i> HI	Promega
<i>Nco</i> I	Takara
<i>Xho</i> I	Promega
T ₄ DNA ligaz	Promega/Takara

3.1.4. Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.4, 3.5, 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.4 PCR ile 16s rDNA bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan primerler

Primer	Primer dizisi	T _m °C	Sentezleyen firma
Unv-Bac-27F	5’-agagtttgatcmtggctcag-3’	49	IDT
Unv-Bac-1525R	5’-aaggaggtgwtccarcc-3’	45	IDT

Çizelge 3.5 *xyn* genini elde etmek amacıyla kullanılan primerler

Primer	Primer dizisi	T _m °C	Sentezleyen firma
<i>xyn</i> 1 Fwd	5'-ttttccgcggaatgtttaagtttaaaaagaa-3'	55	Metabion
<i>xyn</i> 1 Rev	5'-ttttctctagaccacactgttacgtagaa-3'	58	Metabion
<i>xyn</i> 2 Fwd	5'-ttttccgcggaatgaagattatcaatccagt-3'	59	Metabion
<i>xyn</i> 2 Rev	5'-ttttctctagattttctttatagcgaaaa-3'	52	Metabion
<i>xyn</i> 3 Fwd	5'-ttttccgcggaatgattccacgcataaaaaa-3'	59	Metabion
<i>xyn</i> 3 Rev	5'-ttttccgcggacgatttacaacaaatgttg-3'	60	Metabion
<i>xyn</i> 4 Fwd	5'-ttttccgcggaatgaggaaaaagtgtagcgt-3'	62	Metabion
<i>xyn</i> 4 Rev	5'-ttttctctagatctttgcgtaaactgccag-3'	59	Metabion
<i>xyn</i> 5 Fwd	5'-ttttctagattaacgatttgcgacaaatg-3'	55	Metabion
<i>xyn</i> 5 Rev	5'-ttttctctagaacgatttgcgacaaatgt-3'	56	Metabion
<i>xyn</i> 6 Fwd	5'-ttttccgcggaatgaacaaaaagaatgaagttttgtagcag-3'	64	Metabion
<i>xyn</i> 6 Rev	5'-ttttctagattatttacttttcctccaatagtcagtacattag-3'	62	Metabion

Çizelge 3.6 *Ksilanaz* genini çoğaltmak amacıyla PCR'de kullanılan primerler

Primer	Primer dizisi	T _m °C	Sentezleyen firma
pET28 <i>xyn</i> 1 <i>Bam</i> HI Fwd	5'-ttttgatccgatgtttaagtttaaaaag-3'	53	Metabion
pET28 <i>xyn</i> 1 <i>Xho</i> I Rev	5'-ttttctcgagttaccacactgttacgtt-3'	57	Metabion

3.1.5. Klonlama ve Ekspresyon İşlemlerinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Klonlama ve ekspresyon işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Klonlama ve ekspresyon işlemlerinde kullanılan mikroorganizmalar

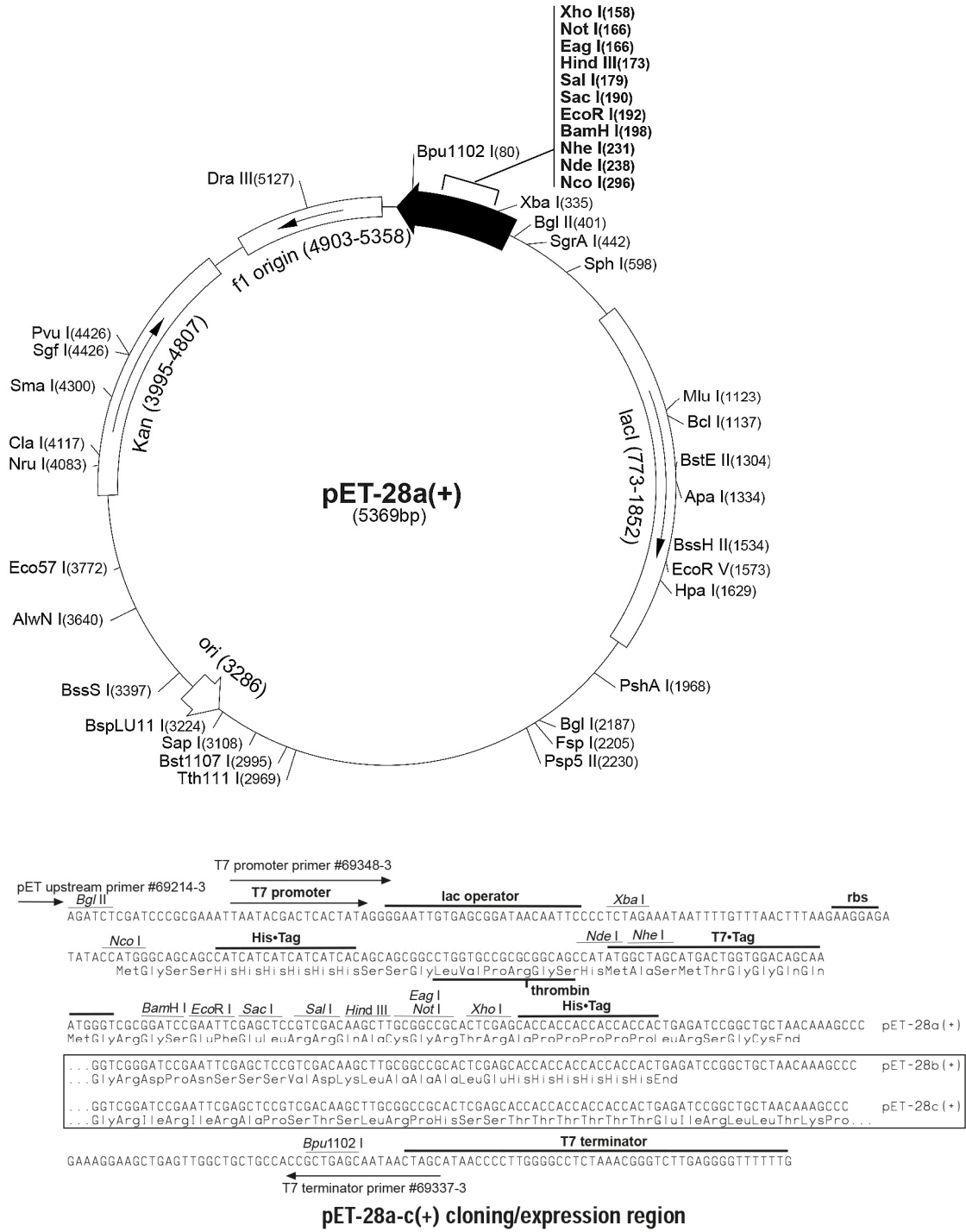
Tür	Suş	Kullanım amacı
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Klonlama
<i>Escherichia coli</i>	BL21(DE3)pLysE	Ekspresyon

3.1.6. Klonlama ve Ekspresyon İşlemlerinde Kullanılan Plazmitler

Klonlama ve ekspresyon işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanılan plazmitler Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8 Klonlamada ve ekspresyonda kullanılan plazmitler

Plazmit	Firma	Kullanım amacı
pET28b(+)	Novagen	Klonlama ve ekspresyon vektörü



Şekil 3.1 pET-28a(+) vektörünün dairesel haritası ve poli-linker bölgesinin detaylı restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi (Novagen).

3.1.7. Kullanılan Çözeltiler

3.1.7.1. Tampon Çözeltiler ve Hazırlanışları

FSB çözeltisi: 7,4 g KCl, 7,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100g gliserol, 10 ml 1M (pH=7,5) KCH_3COO alınarak pH=6,2'ye ayarlandı ve hacim 1 l'ye tamamlandı. Otoklavlandı.

PIPES'li tampon çözeltisi: 0,5 M, 50 ml PIPES çözeltisi hazırlandı. KOH ile pH 6,7'e getirildi. Ardından 6,92 g MnCl_2 , 1,66 g CaCl_2 ve 18,64 g KCl 980 ml suda çözüldü. Üzerine 20 ml PIPES çözeltisi eklendi ve hacim 1 l'ye tamamlandı. 0,45 μm 'lik filtreden geçirildi ve steril şişelere bölünerek, -20°C 'de saklandı.

Sitrik asit- Na_2HPO_4 (McIlvaine) tamponu (pH 4): 61,45 ml 0,1 M sitrik asit ve 38,55 ml 0,2 M Na_2HPO_4 çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

Sitrik asit- Na_2HPO_4 (McIlvaine) tamponu (pH 5): 48,50 ml 0,1 M sitrik asit ve 51,50 ml 0,2 M Na_2HPO_4 çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

Sitrik asit- Na_2HPO_4 (McIlvaine) tamponu (pH 6): 39,85 ml 0,1 M sitrik asit ve 63,15 ml 0,2 M Na_2HPO_4 çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

Sitrik asit- Na_2HPO_4 (McIlvaine) tamponu (pH 7): 17,65 ml 0,1 M sitrik asit ve 82,35 ml 0,2 M Na_2HPO_4 çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

Tris-HCl tamponu (100 mM pH 8): 1,21 g Tris yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1M HCl ile 8'e ayarlanarak toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH tamponu (100 mM pH 9): 0,75 g glisin yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1M NaOH ile 9'a ayarlanarak toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH tamponu (100 mM pH 10): 0,75 g glisin yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1M NaOH ile 10'a ayarlanarak toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

3.1.7.2. Sıvı ve Katı Besiyerleri

LB Agar: 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base (10 g pepton, 5 g maya özütü, 5 g NaCl) 1 l suda çözüldü. Hazırlanan 1 l'lik çözelti 400'er ml olacak şekilde 2 tane stok şişesine alındı ve üzerlerine 6'şar g agar ilave edilip karıştırıldı, otoklavlandı.

Artan LB çözeltisi yaklaşık 5'er ml olacak şekilde deney tüplerine konuldu ve ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatıldı, otoklavlandı.

(LB: 10 g yeast ekstrakt, 10 g tripton, 5 g NaCl)

SOB: (Super Optimal Broth) 20 g tripton, 5 g maya özütü, 2 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 1 M KCl, 10 ml 1 M MgCl₂ ve 10 ml 1 M MgSO₄.7H₂O büyük bir behere alınarak üzeri deiyonize su ile 1 l'ye tamamlandı, iyice karıştırıldı ve otoklavlandı.

Katı PCA (Plate Count Agar): 5,0 g pepton, 2,5 g maya özütü, 1,0 g D(+) glukoz, 20,0 g agar 990 ml saf suda çözüldükten sonra ortam pH'sı derişik HCl ile 4,8 ve 5,5'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dk otoklavlandı.

Sıvı PCA: 5,0 g pepton, 2,5 g maya özütü, 1,0 g D(+) glukoz 990 ml saf suda çözüldükten sonra ortam pH'sı derişik HCl ile 4,8 ve 5,5'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dk otoklavlandı.

Katı ISP2: 4,0 g maya özütü, 10,0 g malt özütü, 4,0 g, dekstrozu, 20,0 g agar 990 ml saf suda çözüldükten sonra ortam pH'sı derişik HCl ile 4,8 ve 5,5'e ayarlandıktan sonra 121°C'de 20 dk otoklavlandı.

Ksylanlı ksilanaz aktivite tarama ortamı: 1,0 g ksilan yaklaşık 80 ml saf suda magnetik karıştırıcıyla karıştırılarak ısıtıldı. 2-3 dk kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 gece boyunca magnetik karıştırıcıyla karıştırılarak çözünmesi sağlandı. Üzerine 0,5 g pepton, 0,25 g maya özütü ve 2,0 g agar konuldu. pH derişik HCl ile 4,8'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dk otoklavlandı. Bu besiyeri izole edilen organizmaların ksilanaz aktivitelerinin taranması amacıyla kullanıldı.

3.1.7.3. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

Ayırma jeli tamponu: 18,2 g Tris (1,5 M) ve 0,4 g SDS (%0,4 w/v) yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M HCl ile 8,8'e ayarlanıp toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Yükleme jeli tamponu (4xTris-HCl/SDS): 6,05 g Tris (0,5 M) yaklaşık 90 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M HCl ile 6,8' ayarlanıp toplam hacmi saf suyla 100 ml'ye tamamlandı. 0,4 g SDS (%0,4 w/v) ilave edildi. +4°C'de muhafaza edildi.

Numune tamponu (2x): 25 ml 4x Tris-HCl/SDS (pH6,8), 20 ml gliserol (%20 w/v), 4 g SDS (%4 w/v), 2 ml β -merkaptoetanol, 1 mg bromfenol mavisi ve 53 ml suyun karıştırılmasıyla hazırlandı. Küçük kısımlara ayrılarak -20°C'de muhafaza edildi.

Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10w/v): 0,1 g APS 1 ml saf suda çözüldü.

SDS-PAGE yürütme tamponu (5X): 15 g Tris, 72 g glisin ve 5 g SDS yaklaşık 900 ml suda çözüldükten sonra toplam hacmi saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

Jel boyama çözeltisi: 0,5 g Coomassie brilliant blue 250 ml metanol, 50 ml glasiyel asetik asitte çözüldükten sonra toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.

Boya uzaklaştırma çözeltisi: 250 ml metanol ve 50 ml glasiyel asetik asit karıştırılarak toplam hacim saf suyla 500 ml'ye tamamlandı.

3.1.7.4. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

Etilendiamin tetra asetik asit (0,5 M pH 8 EDTA): 186,1 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 700 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 1 M NaOH ile 8,0'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

Tris Asetat EDTA (50xTAE) tamponu: 242 gr Tris, 57,1 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) bir miktar suda çözüldükten sonra pH'sı glasiyel asetik asitle 8,5'e ayarlanarak toplam hacim saf suyla 1000 ml'ye tamamlandı.

Örnek yükleme boyası (6x): 25 mg bromfenol mavisi ve 3 ml gliserol saf su ile iyice karıştırılarak toplam hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

3.1.7.5. Enzim Saflaştırma Kullanılan Çözeltiler:

NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponu (100 mM pH 7,6): 65 ml 0,2 M NaH_2PO_4 ve 0,2 M 435 ml Na_2HPO_4 karıştırıldıktan sonra toplam hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Yükleme tamponu (Loading Buffer)(100 mM NaCl-100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH 7,6): 2,92 g NaCl 500 ml NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (100 mM pH 7,6) çözüldü.

Yıkama tamponu (Wash Buffer)(25 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH 7,6): 0,85 g imidazol, 2,92 g NaCl 500 ml NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (100 mM pH 7,6) çözüldü.

Elüsyon tamponu (Elution Buffer)(300 mM imidazol 100 mM NaCl-100 mM NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 pH 7,6): 10,21 g imidazol, 2,92 g NaCl 500 ml NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 tamponunda (100 mM pH 7,6) çözüldü.

3.1.7.6. Enzim Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Dinitrosalisilik asit (DNS): 1 g DNS 50 ml saf suda çözüldü, üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 ml 2N NaOH ilave edilerek toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de muhafaza edildi.

Kongo Kırmızısı (%1 w/v): 1 g kongo kırmızısı 100 ml saf suda çözüldü.

Ksilan substratı (%1'lik(w/v)): Çözelti konsantrasyonu %1'lik (w/v) olacak şekilde beechwood xylan tartıldı ve üzerine çalışılacak tampon çözeltiden ilave edildi. Birkaç dakika kaynatıldıktan sonra bir gece boyunca magnetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Ksiloz standart çözelti: Konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde, hesaplanan miktarda ksiloz saf suda çözülerek ana stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden saf suyla seyreltmeler yapılarak çalışılacak farklı konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

3.1.7.7. Diğer Çözeltiler

IPTG: 1 g IPTG, 10 ml steril suda çözüldü ve nitro selüloz membrandan süzüldü. 1'er ml olacak şekilde ependorflara bölündü ve dondurucuya (-20 °C) kaldırıldı.

PMSF çözeltisi: 200 µg PMSF %99'luk 1 ml etanol ile çözüldü. -20°C'de muhafaza edildi.

Benzamidine çözeltisi: 15,66 mg benzamidin hidroklorür 1 ml suda çözüldü. -20°C'de muhafaza edildi.

İmidazol çözeltisi: (300 mM) 2,045 g imidazol, bir miktar tris tamponunda çözüldü. Son hacim tris tamponuyla 100 ml'ye getirildi.

Kloramfenikol Çözeltisi: Kloramfenikol 34 mg/ml olacak şekilde mutlak etanolde çözüldü ve 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. -20°C'de saklandı.

Kanamisin çözeltisi: 0,25 g kanamisin 5 ml otoklavlanmış ultra saf suda çözüldü ve 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Ardından küçük hacimler halinde steril ependorf tüplerine dağıtılarak -20°C'de muhafaza edildi.

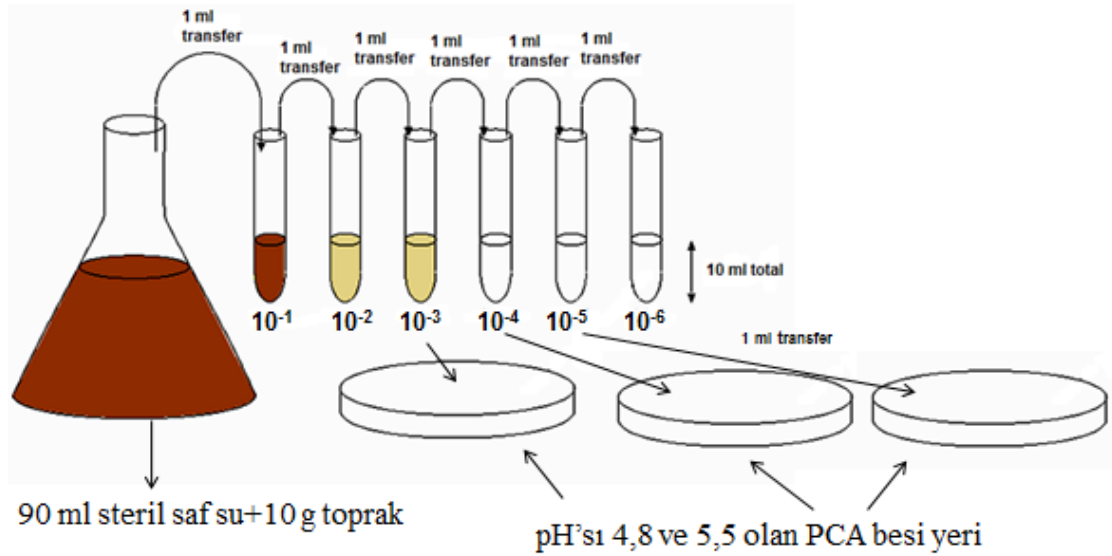
3.2. Yöntem

3.2.1. Ksilanaz Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu

Ksilanaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonu için örnekleme yapılacak en uygun ortamların, tomruk depoları, küçükbaş, büyük baş hayvancılık ve kanatlı hayvan besiciliği yapılan besi çiftlikleri olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle bu yerlerden toplam

9 toprak örneği steril kaplara alınarak laboratuara getirilmiş, ksilanaz üreticisi mikroorganizmaların izolasyonunda kaynak olarak kullanılmıştır.

İçinde 90 ml steril saf su bulunan steril erlenlerin darası alındıktan sonra 10 g toprak ilave edildi. Manuel olarak karıştırılarak bir süre oda sıcaklığında inkübe edildi. İçinde 9'ar ml steril saf su bulunan falkon tüplerine 10^{-10} 'luk derişime kadar seyreltmeler yapıldı. 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 'lik derişimlerdeki numunelerden petrilere 1'er ml konuldu. Ardından 1'er ml numune bulunan bu petrilere pH'sı 4,8 ve 5,5 olan PCA ve ISP2 besi yerleri ilave edildi. Her tüp için üç paralelli ekim yapıldı. PCA besi yerine ekilenler 37°C 'de, ISP2 besi yerine ekilenler 30°C 'de 24-48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası üremenin olduğu kültürlerden birkaç kez tek koloni ekimi yapılarak saf kültürler elde edildi. Koloni saflığı, basit boyama yöntemi ile boyanan preparatlar mikroskop altında incelenerek tespit edildi.



Şekil 3.2 Ksilanaz üreticisi mikroorganizmaların seçimi

3.2.2. Ksilanaz Üreticisi Mikroorganizmaların Taranması

Ksilanaz üreticisi mikroorganizmalar nitel olarak belirlendi. Nitel ölçümler, ksilanaz substratı olan birchwood xylan kullanılarak gerçekleştirildi. pH'sı 4,8 olan PCA ve ISP2 besi yerlerinde üreyen organizmalar pH'sı 4,8 olan 500'er µl'lik sıvı PCA besi yerine inoküle edilerek 250 rpm'de, 37°C 'de yaklaşık 30 saat ön inkübasyon ile aktive edildi. Yaklaşık 30 saat boyunca aktive edilmiş kültürler, 9000 rpm'de 1 dk santrifüjlenerek

üstteki sıvı kısmın 200 µl'si uzaklaştırıldı. Peletin çözünmesi sağlandıktan sonra derişikleştirilmiş mikroorganizmalardan 15'er µl, ksilanlı ksilanaz aktivite tarama ortamına spotlandı ve 37°C'de üreme gözleninceye kadar inkübe edildi. İnkübasyondan sonra zon oluşturan koloniler ksilanaz üretici mikroorganizma olarak belirlendi.

3.2.3. Ksilanaz Üreticisi Mikroorganizmaların Moleküler Tanılanması

Ksilanaz üreticisi mikroorganizmalar hem MALDI-TOF yöntemiyle hem de 16s rDNA dizi analiziyle tanılanmıştır.

3.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Ksilanaz üreticisi olduğu tespit edilen 6, 10, 11A, 11B, 12, 66, 68 kodlu mikroorganizmalar, pH'sı 5,5 olan 5 ml'lik PCA besiyerine inoküle edildi ve 1 gece 37°C'de 250 rpm çalkalama hızında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası gecelik kültürden genomik DNA izolasyonu, "Fermantes Genomik DNA purification" kiti kullanılarak üretici firmanın önerisine uygun olarak yapılmıştır.

3.2.3.2. PCR ile 16s rDNA Bölgesinin Çoğaltılması

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) işlemleri için satın alınan Unv-Bac-27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') ve Unv-Bac-1525R (5'-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3') primerleri 5 µM olacak şekilde, yüksek saflıktaki oligonükleotidler ise PCR işlemlerinde kullanılacak konsantrasyonda hazırlanarak aşağıda içeriği ve koşulları verilen PCR gerçekleştirildi.

50 µl'lik PCR karışımı:

ddH ₂ O	21,5 µl
Q-solution (Qiagen 5x)	10 µl
Tampon (Qiagen 10x)	5 µl
MgCl ₂ (Qiagen 25 mM)	3 µl

dNTPmix (10 mM)	3 µl
Unv-Bac-27F (5 µM)	3 µl
Unv-Bac-1525R (5 µM)	3 µl
DNA	1 µl
Taq DNA polimeraz	0,5 µl

PCR protokolü:

4°C	10 dk	
95°C	2 dk	
94°C	1 dk	} 35 döngü
50°C	1 dk	
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	
4°C	∞	

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra her bir PCR karışımından alınarak %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jeller jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.2.3.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, eğer sadece tek bir ürün meydana gelmiş ise DNA PCR karışım çözeltisinden, birden fazla ürün meydana gelmiş ise de agaroz jelden “Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up” kiti kullanılarak saflaştırıldı.

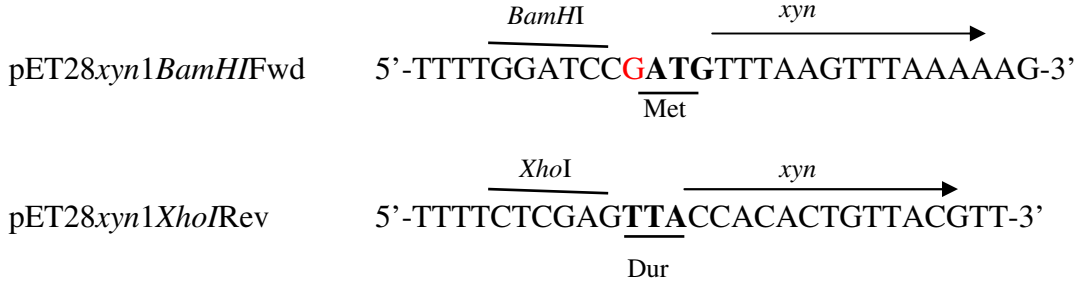
3.2.3.4. DNA Dizileme

Saflaştırılan DNA'lardan 70'er µl ve beraberinde 90'ar µl 5 µM'lık Unv-Bac-27F, Unv-Bac-1525R primerler “Refgen” firmasına DNA dizilemeye gönderildi.

3.2.4. *xyn* Geninin pET28b(+) Vektörüne Klonlanması ve Protein Ekspresyonu

3.2.4.1. *xyn* Genini Elde Etmek Amacıyla Primer Tasarlanması

DNA kütüphanelerinden farklı ksilanaz enzimlerine ait DNA dizilerine ulaşıldı. Bu DNA dizilerinden yararlanılarak bir dizi primer tasarlandı.



Şekil 3.3.3 Ksilanaz genini çoğaltmak amacıyla kullanılan ileri ve geri primerlerin nükleotit sıraları. Koyu yazılan nükleotitler *xyn* geninin başlangıç ve bitiş bölgelerini ifade etmektedir. G çerçeve kayması mutasyonunu önlemek için kullanılmıştır.

3.2.4.2. PCR ile Genomik DNA'dan *xyn* Geninin Çoğaltılması

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) işlemleri için satın alınan primerler 5 µM olacak şekilde, yüksek saflıktaki oligonükleotidler ise PCR işlemlerinde kullanılacak konsantrasyonda hazırlanarak aşağıda içeriği ve koşulları verilen PCR gerçekleştirildi.

50 µl'lik PCR karışımı:

ddH ₂ O	21,5 µl
Q-solution (Qiagen 5x)	10 µl
Tampon (Qiagen 10x)	5 µl
MgCl ₂ (Qiagen 25 mM)	3 µl
dNTPmix (10 mM)	3 µl
Primer "forward" (5 µM)	3 µl
Primer "reverse" (5 µM)	3 µl
DNA	1 µl

Taq DNA polimeraz 0,5 µl

PCR koşulu:

4°C	10 dk	
95°C	2 dk	
94°C	1 dk	} 35 döngü
50°C	1 dk	
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	
4°C	∞	

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra her bir PCR karışımından belirli miktarda alınarak %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jeller, jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.2.4.3. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, eğer sadece tek bir ürün meydana gelmiş ise DNA, PCR karışım çözeltisinden, birden fazla ürün meydana gelmiş ise de agaroz jelden “Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up” kiti kullanılarak saflaştırıldı.

3.2.4.4. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

Kesimin birinci aşaması:

Çizelge 3.9 Kesimin birinci aşaması için gereken madde miktarları

<i>xyn</i>	pET28b(+)
20 µl saf <i>xyn</i> (PCR ürünü)	15 µl saf pET28b(+)
4,1 µl 10xTampon D	3,1 µl 10xTampon D
4,1 µl 10x BSA	3,1 µl 10x BSA
2 µl <i>XhoI</i>	2 µl <i>XhoI</i>
9,8 µl H ₂ O	6,8 µl H ₂ O

► Çizelge 3.9'daki gibi olmak üzere, PCR ürünü için toplam hacmi 40 µl, vektör için 30 µl olan tüpler hazırlandı ve vortekslendi. Ardından mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

► 4 saat boyunca her saat başı tüpler mikrosantrifüjde hızlıca döndürüldü ve 37°C'de inkübasyona devam edildi.

► 3 saat sonra tüpler alınarak; sadece vektörün kesildiği tüplere 1'er µl *XhoI* eklendi. Ardından tüm tüpler hızlıca döndürülerek tekrar 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

► 4. saatin sonunda tüpler hızlıca döndürülerek kesim işlemi sonlandırıldı

► Plazmid DNA ve PCR ürünleri ayrı ayrı kesildikten sonra "Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up" kiti kullanılarak saflaştırıldı. Ardından kesimin ikinci aşamasına geçildi.

Kesimin ikinci aşaması:

Çizelge 3.10 Kesimin ikinci aşaması için gereken madde miktarları

<i>xyn</i>	pET28b(+)
29,8 µl saf <i>xyn</i>	21,8 µl saf pET28b(+)
4,1 µl 10xTampon E	3,1 µl 10xTampon E
4,1 µl 10x BSA	3,1 µl 10x BSA
2 µl <i>Bam</i> HI	2 µl <i>Bam</i> HI

► Çizelge 3.10.'daki gibi olmak üzere, PCR ürünü için toplam hacmi 40 µl, vektör için 30 µl olan tüpler hazırlandı ve vortekslendi. Ardından mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

► 4 saat boyunca her saat başı tüpler mikrosantrifüjde hızlıca döndürüldü ve 37°C'de inkübasyona devam edildi.

► 3 saat sonra tüpler alınarak; sadece vektörün kesildiği tüplere 1'er µl *Bam*HI eklendi. Ardından tüm tüpler hızlıca döndürülerek tekrar 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

► 4. saatin sonunda tüpler hızlıca döndürülerek kesim işlemi sonlandırıldı

► Plazmid DNA ve PCR ürünleri ayrı ayrı kesildikten sonra "Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up" kiti kullanılarak saflaştırıldı.

3.2.4.5. DNA Ligasyonu

*Bam*HI ve *Xho*I ile kesilen plazmid DNA'lar ve PCR ürünleri Promega T4 DNA Ligaz kullanılarak birleştirildi.

Ligasyon karışımı için pipetlemeler, Çizelge 3.11'de verildiği şekilde yapıldı.

Çizelge 3.11 Ligasyon için gereken madde miktarları

1	2
16,5 µl kesilmiş <i>xyn</i> geni	14,5 µl kesilmiş <i>xyn</i> geni
0,5 µl kesilmiş pET28b plazmiti	2,5 µl kesilmiş pET28b plazmiti
2 µl T ₄ DNA ligaz tamponu (10x)	2 µl T ₄ DNA ligaz tamponu (10X)
1 µl T ₄ DNA ligaz	1 µl T ₄ DNA ligaz

Çizelge 3.11'de verilen miktarlarda yapılan pipetlemenin ardından, hazırlanan ligasyon karışımı mikrosantrifüjde hızlıca döndürüldü ve +16 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından transformasyon işlemlerinde kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

3.2.4.6. *E. coli* DH5α Hücresinin Rekombinant pET-28(+) Plazmidi ile Transformasyonu

3.2.4.6.1. PİPES'li Kompetent Hücre Hazırlanması

- Petriye DH5α ekildi ve 16 saat inkübe edildi.
- 16 saatlik inkübasyonun petriden 1 koloni alındı, içinde 25 ml SOB bulunan 250 ml'lik erlene inoküle edilerek, 250 rpm ve 37°C de 6 saat inkübe edildi.
- 6 saatlik inkübasyonun ardından 250 ml SOB bulunan 3 tane erlene kültürden 10 ml, 4 ml ve 2 ml inoküle edildi. Hazırlanan erlenler 18-22°C arası 14 saat boyunca 150 rpm'de inkübe edildi.

- Kùltürlerin 600 nm'deki OD'leri her 45 dakikada bir okundu ve değeri 0,55'e ulaştığında kùltür çalkalayıcıdan alındı.
- 10 dakika buzlu-su banyosunda bekletildi.
- Ardından hücreler +4°C'de 2500 g (3900 rpm)'de 10 dakika santrifüjlendi.
- Besiyeri boşaltıldı ve santrifüj şişesinin içinde kalan besiyeri temizlendi.
- Hücrelere 0°C'deki 80 ml PİPES'li tampon ilave edilerek, hassas olarak yeniden süspansiyon haline getirildi.
- Hücreler, +4°C 2500 g (3900 rpm)'de 10 dakika santrifüjlendi. Tüpün içindeki tampon boşaltıldı ve temizlendi.
- Hücrelere 0°C'de 20 ml PİPES'li tampon ilave edildi ve hassasça yeniden süspansiyon hale getirildi.
- 1,5 ml DMSO eklendi, hafifçe karıştırıldı. Buz banyosuna alındı ve 10 dakika bekletildi.
- Hızlı bir şekilde hücreler steril ependorf tüplerine bölündü ve hızlıca donması için sıvı azota atıldı. Ardından hücreler -80°C'de saklandı (Inoue ve ark., 1990).

3.2.4.6.2. Transformasyon

- Buzda bulunan kompetent hücrelerden 200 µl'lik kısımlar alındı. Gerekli sayıda ependorfa pipetleme yapıldı. Üzerine 3,3 µl ligasyon karışımından ilave edildi ve 1 saat buz banyosunda inkübasyona bırakıldı.
- 1 saatin ardından buzdan çıkarıldı ve 2 dakika 42°C'de ısı şokuna maruz bırakıldı.
- Tekrar buza gömülerek 5 dakika inkübe edildi.

► Buzdan alınarak üzerine 330 µl LB eklendi ve yarım saat 37°C ve 250 rpm’de inkübasyona bırakıldı.

► Yarım saatlik inkübasyonun ardından her bir ependorf içeriği seçici besiyerine (kanamisin içeren LB-Agar) döküldü ve yayma yöntemi ile ekildi. 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

3.2.4.6.3. Plazmid DNA Saflaştırılması

Petri tabaklarından elde edilen koloniler 4 ml’lik kanamisin ihtiva eden sıvı LB içerisine tek koloni olarak inoküle edildikten sonra 37 °C de gece boyu inkübe edilerek yetiştirildiler. Santrifüjlenerek ependorf tüplerinde toplanan hücrelerden “Promega Wizard® Plus SV minipreps” kiti kullanılarak plazmid DNA’lar aşağıda verilen protokole göre saflaştırıldı.

► Peletlerin üzerine 250 µl “hücreleri yeniden süspansiyon haline getirme çözeltisi” eklendi ve vortekslenerek peletin tamamının çözünmesi sağlandı.

► Üzerine 250 µl “hücre parçalama çözeltisi” eklendi. Birkaç sefer manuel olarak alt üst edilerek karıştırıldı.

► 10 µl “alkalin proteaz” eklendi ve birkaç sefer alt-üst edilerek karıştırıldı. 5 dakika inkübe edildi.

► 350 µl “nötralizasyon çözeltisi” eklendi ve birkaç sefer alt-üst edilerek karıştırıldı.

► Ependorf tüpleri maksimum hızda (15000 rpm) 10 dakika santrifüjlendi. Ardından süpernatant kısım pipetle alındı (peletin gelmemesine özen gösterildi).

► Kolon toplama tüpüne yerleştirildi. Süpernatant, mini kolona verildi. 15000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.

► 750 µl kolon yıkama çözeltisi kolona verildi ve 15000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.

- 250 µl kolon yıkama çözeltisi kolona verildi ve 15000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- Kolon boş olarak 15000 rpm’de 2 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- Kolon steril ependorf tüplerine yerleştirildi. 100 µl “nükleaz bulunmayan su” kolona verildi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
- Ardından 15000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek, plazmid DNA’lar saflaştırıldı. Klonlama sonrası plazmid DNA’ların PCR ile analizinde ve restiriksiyon enzim analizinde kullanılmak üzere -20 °C’de muhafaza edildi.

3.2.4.6.4. Klonlama Sonrası Plazmid DNA’ların PCR ile Analizi

PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) işlemleri için satın alınan primerler 5 µM olacak şekilde, yüksek saflıktaki oligonükleotidler ise PCR işlemlerinde kullanılacak konsantrasyonda hazırlanarak aşağıda içeriği ve koşulları verilen PCR gerçekleştirildi. PCR’da kalıp olarak rekombinant plazmit pET28b-*xyn* kullanıldı.

25 µl’lik PCR karışımı:

ddH ₂ O	15,75 µl
Tampon (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
dNTPmix (10 mM)	1,5 µl
Primer “forward”(5 µM)	1,5 µl
Primer “reverse” (5 µM)	1,5 µl
DNA	0,5 µl
Taq DNA polimeraz	0,25 µl

PCR protokolü

4°C	10 dk	
95°C	2 dk	
94°C	1 dk	} 35 döngü
50°C	1 dk	
72°C	1 dk	
72°C	5 dk	
4°C	∞	

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra her bir PCR karışımından belirli miktarda alınarak %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve jeller jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

3.2.4.6.5. Klonlama Sonrası Plazmid DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Analizi

Saflaştırılan plazmid DNA (pET28b-*xyn*), *Nco*I ile kesildikten sonra bu plazmidlerin istenilen uzunlukta DNA parçalarını (insertleri) (5326 bç ve 651 bç) ihtiva edip etmedikleri %1'lik agaroz jel üzerinde analiz edildi.

pET28b-*xyn* için kesme;

5 µl H₂O (DNAz & RNAz free)

2 µl 10x Tampon K

2 µl 10x BSA

10 µl plazmid DNA

1 µl *Nco*I

► Olmak üzere tüpler hazırlandı, vortekslendi. Mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürüldü ve 37°C'ye ayarlanmış bir ısıtıcı blok üzerinde 4 saatlik inkübasyona bırakıldı.

► 4 saatlik inkübasyon süresince her saat başı tüpler alınarak hızlıca döndürüldü ve inkübasyona devam edildi.

► 3 saat sonra tüplere 1 µl *NcoI* eklendi, hızlıca döndürüldü ve tekrar inkübasyona bırakıldı.

► 4 saat sonra tüpler alınarak hızlıca döndürüldü. Alınan belirli miktardaki numunelerin üzerine DNA boyası eklenerek agaroz jele yaklaşık olarak 25 µl yükleme yapıldı. Yürütme tamamlandıktan sonra jelin fotoğrafı alındı.

Restriksiyon enzim analizi sonucu pozitif sonuç veren 12,13 ve 15 nolu plazmid DNA'lar dizi analizine gönderildi.

3.2.4.7. *E. coli* BL21(DE3) pLysE Hücresinin pET28b(+)-*xyn* Plazmidi ile Transformasyonu ve Ksilanaz'ın Ekspresyonu

3.2.4.7.1 FSB'li Kompetent Hücre Hazırlanması

► Protein ekspresyon çalışmaları için *E. coli* BL21 pLysE suşu kullanıldı. -80°C derin dondurucudan çıkarılan stok hücreler 4 µl kloramfenikol içeren 4 ml'lik LB besiyerine inoküle edilerek bir gece 37°C'de 250 rpm çalkalama hızında yetiştirildi.

► 50 ml'lik LB'ye, gecelik kültürden 1 ml ve 0,5 ml alınarak inoküle edildi. Üzerine 50 ml LB (Luria Bertani) eklenerek; 37°C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

► Optik dansite, 600 nm'de absorbans yaklaşık olarak 0,7 olduğunda erlenler inkübatörden alındı ve +4°C 5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.

► Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 50 ml soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisi eklendi çok iyi vortekslendi. Ardından 1 saat buz banyosunda inkübe edildi.

► 1 saatin ardından; +4°C, 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 8 ml soğuk FSB çözeltisi eklendi ve tüpe vurarak çözünme sağlandı.

► Peletin tamamı çözününce üzerine 560 µl DMSO eklendi ve 3 saat buza gömüldü.

► 3 saatin ardından kompetent hücre hazır hale geldi (Hanahan, 1983).

3.2.4.7.2. *E. coli* BL21(DE3) pLysE Hücresinin pET28b(+)-xyn Plazmidi ile Transformasyonu

- Buzda bulunan kompotent hücrelerden 200 µl'lik kısımlar alındı. Gerekli sayıda ependorfa pipetleme yapıldı. Üzerine 3,3 µl ligasyon karışımından ilave edildi ve 1 saat buz banyosunda inkübasyona bırakıldı.
- 1 saatin ardından buzdan çıkarıldı ve 2 dakika 42°C'de ısı şokuna maruz bırakıldı.
- Tekrar buza gömülerek 5 dakika inkübe edildi.
- Buzdan alınarak üzerine 330 µl LB eklendi ve yarım saat 37°C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Yarım saatlik inkübasyonun ardından her bir ependorf içeriği seçici besiyerine (kanamisin ve kloramfenikol içeren LB-Agar) döküldü ve sprader ile yayıldı. 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

3.2.4.7.3. Ksilanaz'ın *E.coli* BL21(DE3) pLysE'de Ekspresyonu

- Transformasyon sonrası seçici besiyerinde üreyen hücrelerden birer koloni alınarak 4 µl kloramfenikol (34 mg/ml) ve 2 µl kanamisin (50mg/ml) içeren 4 ml'lik LB besiyerine inoküle edildi. Hücreler bir gece 37°C'de 250 rpm çalkalama hızında yetiştirildi.
- Yetişen hücreler, 500 ml seçici besiyeri (kanamicin ve kloramfenikol içeren LB) bulunan 2 l'lik steril erlenlere inoküle edildi. Hücreler, belirli aralıklarla 600 nm'deki absorbansları okunarak yetiştirildi.
- OD₆₀₀ yaklaşık 0,6-0,7 olduğunda 500 µl 1 M IPTG ilave edilerek indüksiyon işlemi gerçekleştirildi.

► IPTG'li 37°C'de 250 rpm çalkalama hızında 3 saatlik inkübasyonun ardından erlenler alınarak; 250 ml'lik santrifüj kaplarında, +4°C'de 8000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.

► Süpernatant tamamen uzaklaştırılarak, toplanan *E. coli* BL21 pLysE hücreleri parçalama işlemi yapılınca kadar -20°C'de muhafaza edildi (Guda ve ark., 1995).

3.2.4.7.4. *E. coli* BL21 pLysE Hücrelerinin Parçalanması

► İndüklemenin ardından -20°C'de saklanan hücreler çıkarılarak buza gömüldü. Üzerine 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponundan (pH = 7,6) 30 ml eklenerek süspansiyon haline getirildi.

► Süspansiyona 50 µl 100 mM benzamidin ve 50 µl 100 mM PMSF ilave edildi ve buz üzerine alındı. Buz üzerindeki hücreler 3 mm ucu olan sonikatörle 1 saat süresince parçalandı.

► +4°C ve 6000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Peletin renginden (kahverengi) parçalama işleminin istenen düzeyde gerçekleştiği sonucuna varıldı.

► Süpernatantlar ayrı bir tüpe alındı, +4°C'de 30000 rpm 2 saat santrifüjlenerek, karışımdaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürüldü.

3.2.5. *E.coli* BL21(DE3) pLysE'de Ekspres Edilen Ksilanaz Enziminin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

► Önce küçük bir polikarbonat kolon içerisine Ni-NTA agaroz (Qiagen) 3 ml kadar konulduktan sonra, kolon 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,6) tamponuyla yıkandı.

► Santrifüj sonrasında alınan süpernatant (protein karışımı) kolona tatbik edildi ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplandı.

► Protein yüklenmiş kolon, öncelikle 30 ml 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,6) tamponuyla ardından sırasıyla 20 ml 10 mM imidazol 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,6) tamponuyla, 10 ml 25 mM imidazol 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ (pH = 7,6) tamponuyla yıkanarak safsızlıkların ayrılması sağlandı.

► Son olarak 300 mM imidazol 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄

(pH = 7,6) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein elüe edildi.

3.2.6. Ksilanaz Enziminin Karakterizasyonu

3.2.6.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrillamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE Sambrook ve arkadaşlarına (1989) göre %4'lük yükleme jeli ve %12'lik ayırma jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12 SDS-PAGE elektroforezinde kullanılan bileşenler ve oranları

Bileşenler	Yükleme Jeli (ml)	Ayırma Jeli (ml)
Saf su	2,55	4
%40 akrilamid	0,35	2,7
Ayırma jeli tamponu	-	2,25
Yükleme jeli tamponu	1	-
%10 Amonyum persülfat	0,05	0,05
TEMED	0,01	0,02

Hazırlanan jel karışımı plakalar arasına yüklendikten sonra tanka yerleştirildi ve tank SDS-PAGE yürütme tamponu ile dolduruldu. Saflaştırma aşamasında toplanan her fraksiyondan alınan 200 µl'lik numuneler 200 µl numune tamponuyla karıştırılıp, 100°C'de 2 dakika denatüre edilerek SDS-PAGE jelinin kuyucuklarına 10'ar µl yüklendi. Proteinler, boya ayırma jelinden uzaklaşmaya kadar 46 mA'de yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra tanktan çıkarılan jel üzerine jel boyama çözeltisi ilave edildi ve yavaş bir şekilde 15 dk çalkalanarak bekletildi. Boyanan jel, boyanın fazlasını uzaklaştırarak protein bantlarını görünür hale getirmek amacıyla boya uzaklaştırma

çözeltisi ile yıkandı. Jel görüntüsü, protein bantları görünür hale geldikten sonra jel bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alındı.

3.2.6.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

3.2.6.2.1. DNS Yöntemi

Ksilanaz aktivitesi, enzim substrat etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarının belirlenmesi esasına dayanan 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) metodu kullanılarak belirlendi (Miller, 1951). Bir numunedeki indirgeyici şeker miktarını belirlemek için DNS metodu G. Miller tarafından önerilmiştir. DNS bazik şartlar altında indirgeyici şekerin serbest karbonil grubu ile reaksiyona girer. Reaksiyon sonucu 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) 3-amino-5-nitrosalisilik asite dönüşür. Aromatik bir bileşik olan 3-amino-5-nitrosalisilik asit oluşumu 540 nm dalga boyunda absorblanan ışık miktarında değişikliğe yol açar. Spektrofotometre kullanılarak ölçülen absorbans değeri, indirgeyici şeker miktarıyla doğru orantılıdır (Negulescu ve ark., 2012).

pH'sı 6 olan mcllvaine tamponunda çözünen beech-wood xylan (kayın kerestesi ksilanı) ve saflaştırılmış enzimden oluşan reaksiyon karışımı 60°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 1:1 oranında DNS ilave edilip 5 dk kaynatıldı, rengin stabilizasyonu için soğutulup 540 nm'de absorbans ölçüldü. Ksilanaz aktivitesi, standart olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan xylose (ksiloz) çözeltisi kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinden hesaplandı.

3.2.6.2.2. Plate Analizi

Rekombinant plazmit pET28b-*xyn*'yi taşıyan *E.coli* BL21(DE3) ve kontrol olarak kullanılmak üzere pET28b'yi taşıyan *E.coli* BL21(DE3) %1 (w/v) beech-wood xylan, 100mg/ml IPTG ve 50mg/ml kanamisin, 34mg/ml kloramfenikol içeren LB-agar (glukoz içermeyen) besiyerine 15'er µl'lik hacimler halinde spotlandı. 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyerine %1'lik kongo red çözeltisi dökülerek 30 dk boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama süresinin sonunda besiyerine önce 1 M NaCl sonra 0,1 N NaOH çözeltisi dökülerek boyanın fazlası ortamdan uzaklaştırıldı.

Koloni çevresinde açık renk hidroliz zonu bulunanlar ksilanaz pozitif olarak değerlendirildi (Jalal ve ark., 2008).

Saflaştırılmış enzim 5 µl'lik, 10 µl'lik ve 15 µl'lik hacimler halinde %1 (w/v) beech-wood xylan (kayın kerestesi ksilanı) içeren LB-agar (glukoz içermeyen) besiyerine spotlandı. 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından besiyerine %1'lik kongo red çözeltisi dökülerek 30 dk boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama süresinin sonunda besiyerine önce 1 M NaCl sonra 0,1 N NaOH çözeltisi dökülerek boyanın fazlası ortamdan uzaklaştırıldı. Ksilanaz aktivitesi, koloni çevresinde oluşan açık renk hidroliz zonunun çapı dikkate alınarak değerlendirildi.

3.2.6.3. Bazı Parametrelerin Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

3.2.6.3.1. pH'nın Etkisi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için, pH 4-7 arasında McIlvaine tamponu, pH 8'de Tris-HCl tamponu ve pH 9-10'da Glisin-NaOH tamponları kullanılarak farklı pH değerlerine sahip (pH 4-10) %1'lik ksilan içeren substrat çözeltileri hazırlandı.

Aktivite tayini için, enzim ve substrat karışımı 37°C'de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışıma eşit hacimde DNS ilave edilerek 5 dk kaynatıldı, soğutma işleminden sonra 540 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri kaydedildi. Kör, eşit hacimde substrat ve DNS çözeltisi kullanılarak hazırlandı.

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak % bağıl enzim aktivitesi bulundu.

3.2.6.3.2. Sıcaklığın Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 30, 40, 50, 60, 70°C'lik sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Enzim ve substrat karışımı belirlenen optimum pH değerinde, belirtilen sıcaklık aralığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası karışıma eşit hacimde DNS ilave edilerek 5 dk kaynatıldı, soğutma işleminden

sonra 540 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri kaydedildi. Kör, eşit hacimde substrat ve DNS çözeltisi kullanılarak hazırlandı.

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak % bağıl enzim aktivitesi bulundu.

3.2.6.3.3. Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi

Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için enzimler 50, 55, 60°C'lik sıcaklıklarda 30 dakikalık aralıklarla 180 dk boyunca inkübe edildi. Ön inkübasyon uygulamasından sonra optimum şartlarda aktivite tayini yapıldı.

3.2.6.3.4. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, optimum şartlarda enzim aktivitesi değişen substrat miktarına (1-10 mg/ml) karşı belirlendi.

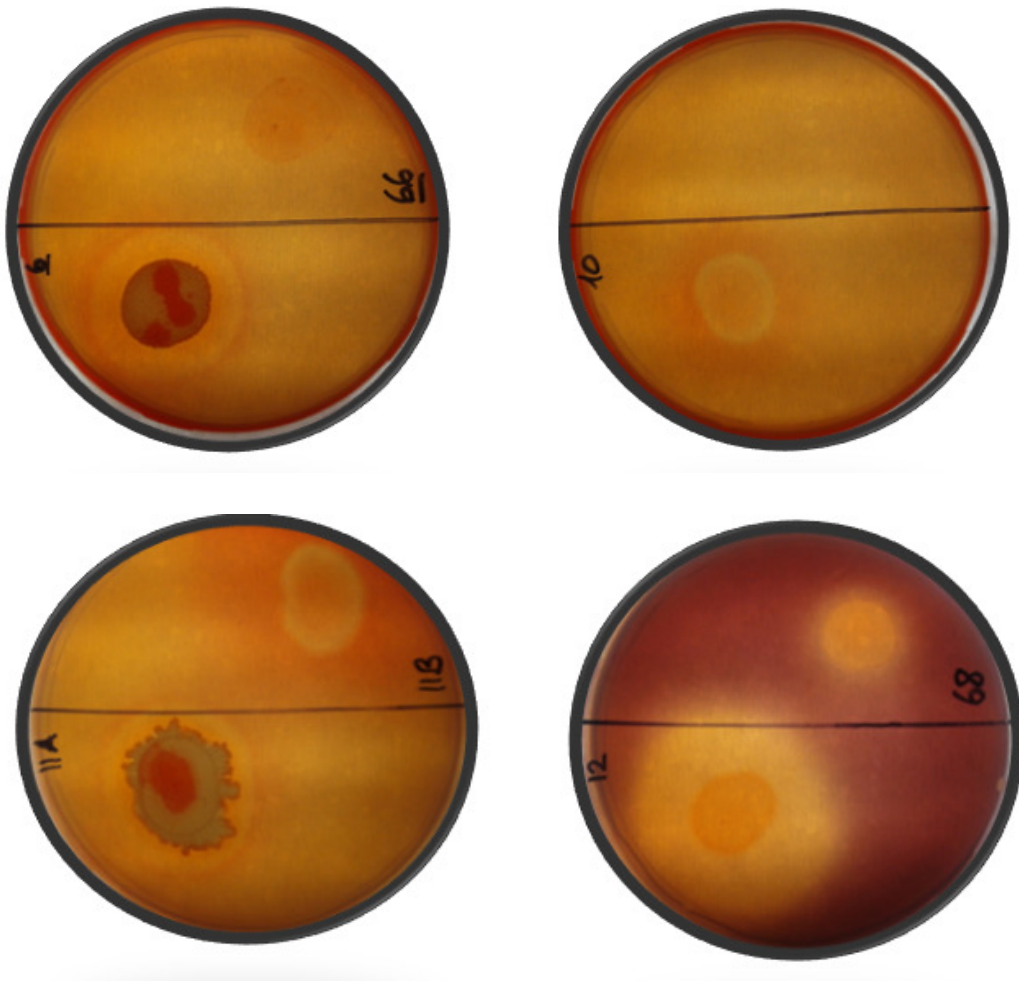
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu

Ksilanaz üreten mikroorganizmalar, Ordu İli'nin Akkuş İlçe'sindeki kayın ormanından ve kayın ağaçlarının bulunduğu tomruk deposundan alınan toprak örneklerinden izole edilip pH'sı 4,8 olan besiyerinde çoğaldığı tespit edilen 16 mikroorganizmanın taranması sonucu tespit edilmiştir.

4.2. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Taranması

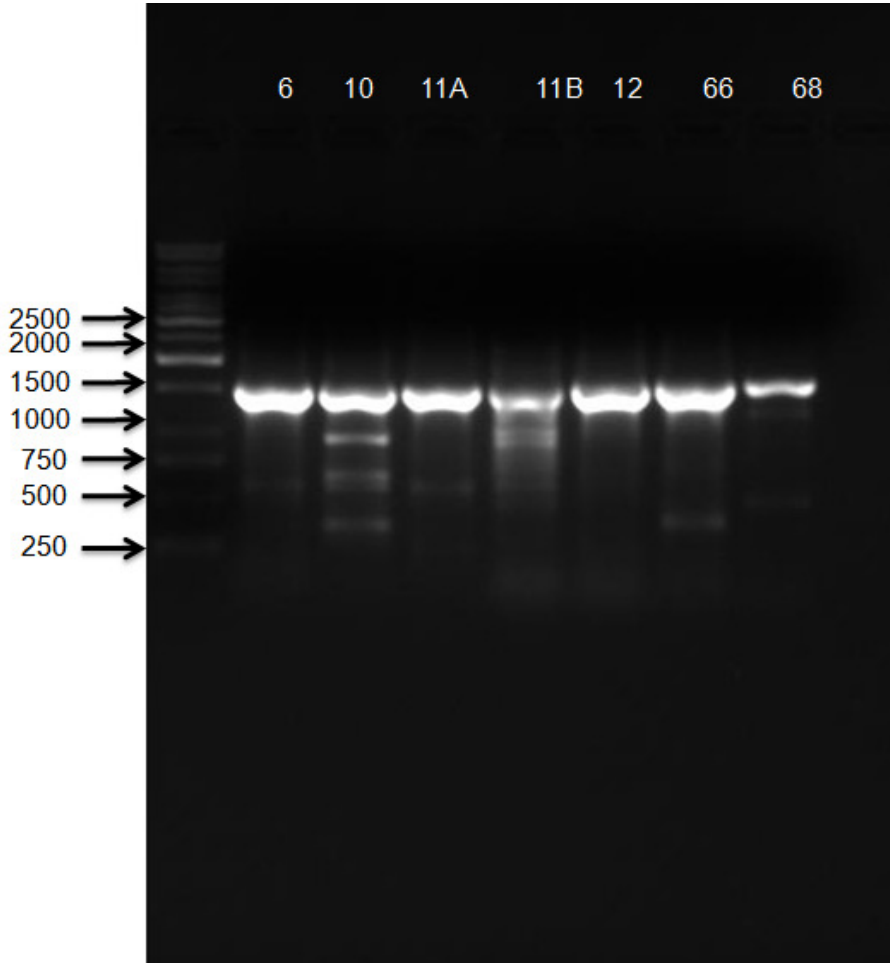
Elde edilen 16 izolattan 6, 10, 11, 12, 66, 68 olmak üzere 6 tanesi hidroliz zonu vermiştir.



Şekil 4.1 Ksilanaz üreten mikroorganizmalara ait hidroliz zonları

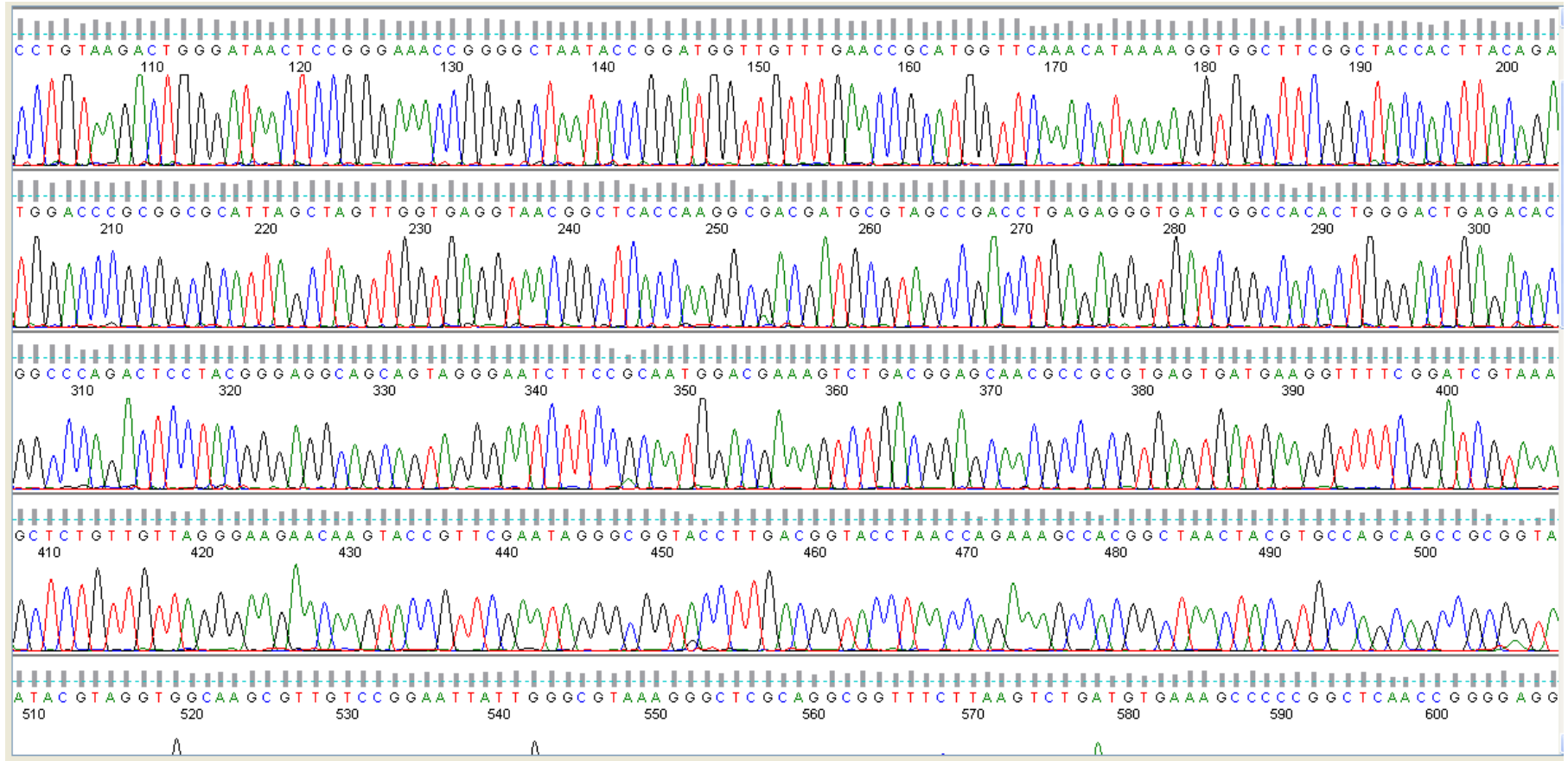
4.3. Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Moleküler Tanılanması

16s rDNA analizi için kültürden genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra Unv-Bac-27F, Unv-Bac-1525R primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde 100 mA'de yürütüldüğünde 1499 bp'lik DNA parçaları elde edildi.

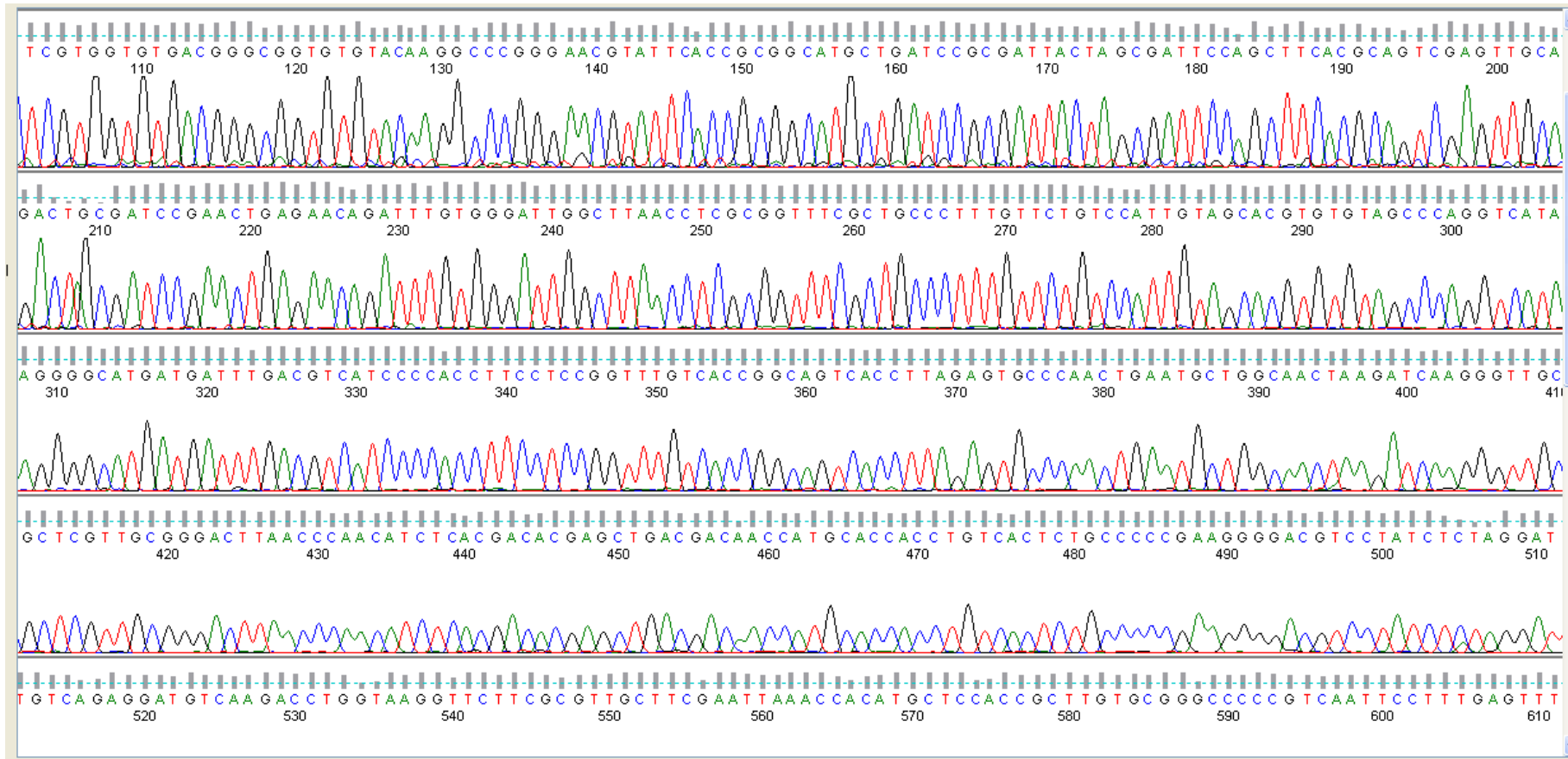


Şekil 4.2 Organizmaların PCR ile çoğaltılmış 16s rDNA bölgesinin agaroz jel görüntüsü. 1. DNA standardı, 2-8. sırasıyla 6 nolu genomik DNA, 10 nolu genomik DNA, 11A nolu genomik DNA, 11B nolu genomik DNA 12 nolu genomik DNA, 66 nolu genomik DNA, 68 nolu genomik DNA ve Unv-Bac-27F, Unv-Bac-1525R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu elde edilen 1499 bp'lik DNA parçaları.

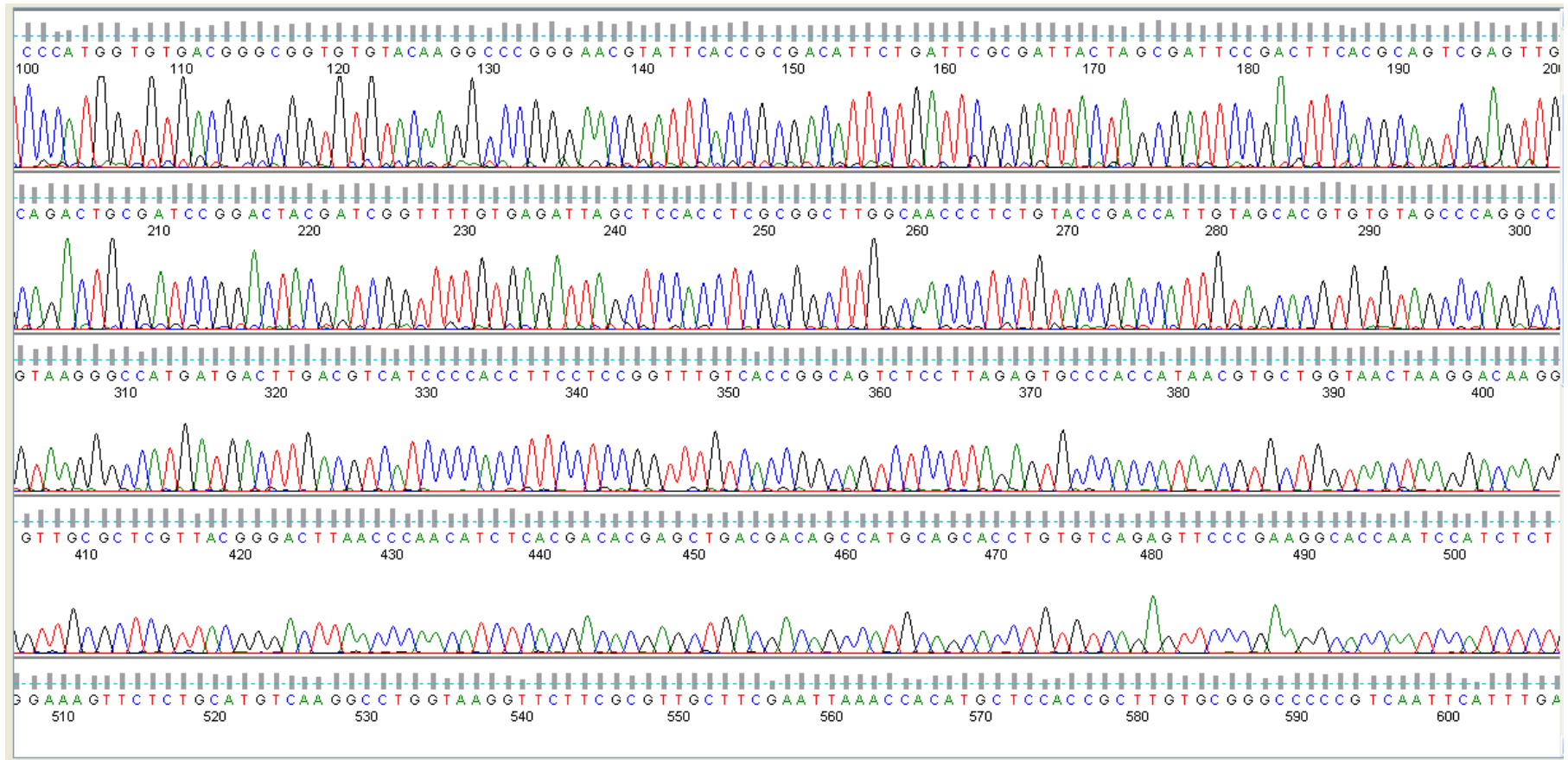
Dizi analizi sonucu elde edilen kromatogramlar şekil 4.3-4.8'de verilmiştir.



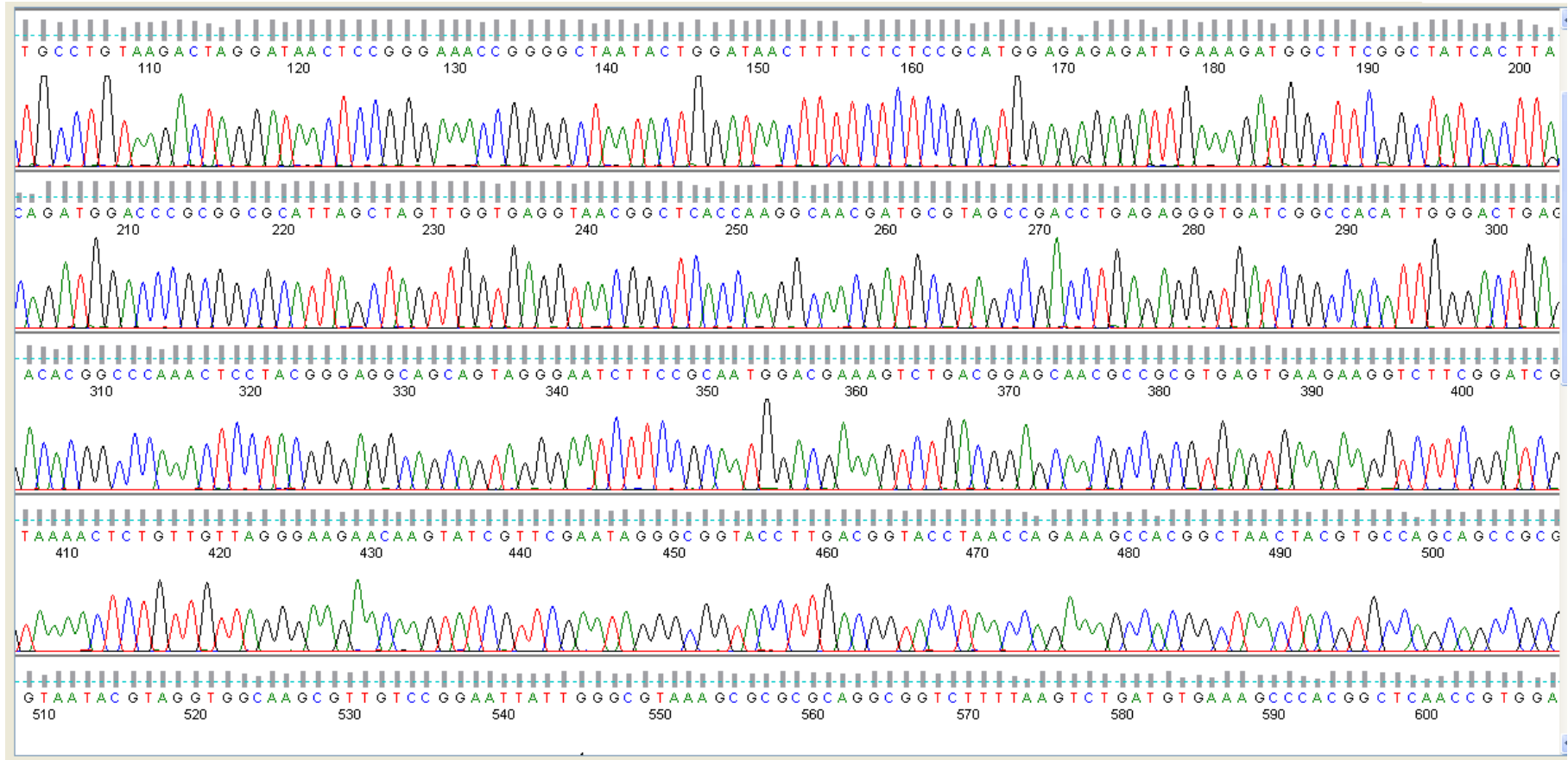
Şekil 4.3 6 kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı



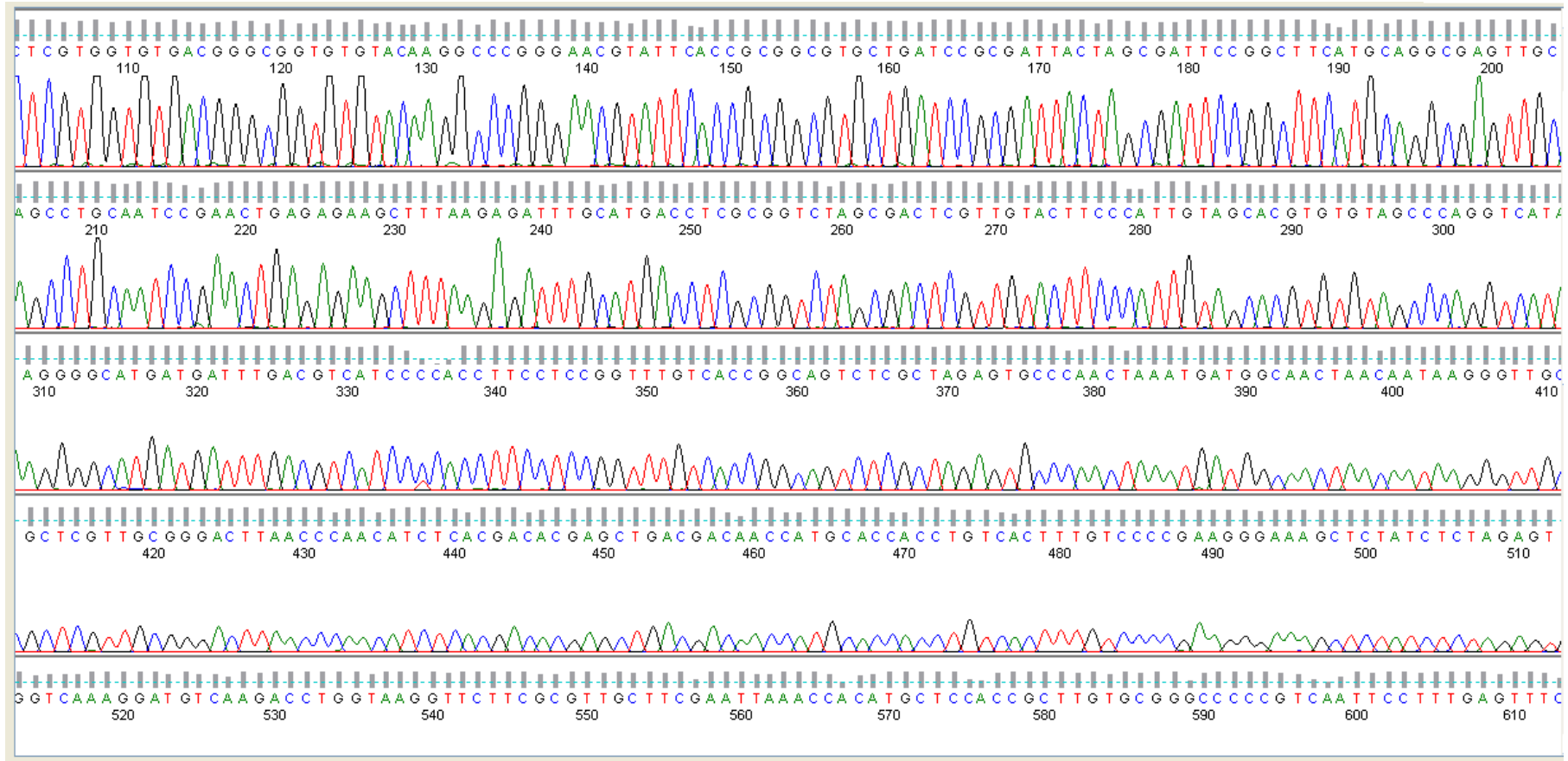
Şekil 4.5 11A kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı



Şekil 4.6 11B kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı



Şekil 4.7 12 kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı



Şekil 4.8 66 kodlu numuneye ait DNA dizi analiz kromotoğramı

Kromatogramlar Finch TV programı kullanılarak okundu. İleri ve geri olmak üzere 2 primer kullanılarak analiz edilen dizilerin çakışma noktaları belirlendi. Böylece 6 nolu numune için 1444, 10 nolu numune için 1434, 11A nolu numune için 1436, 11B nolu numune için 1429, 12 nolu numune için 1449 bazdan oluşan diziler elde edildi.

6 nolu koloniden elde edilen bölgenin dizi analizi aşağıda verilmiştir.

```
5' CTATACTGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAA
CCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGT
TCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAG
TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCC
GCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACCAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAG
GACGTCCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG
CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAG
TTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGT
GAGGTAACCATTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGAT 3'
```

10 nolu koloniden elde edilen bölgenin dizi analizi aşağıda verilmiştir.

```
5' AATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATGACCTC
GAAAGAGCAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGT
GAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA
ACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCACTTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATCACACTTAA
TACGTGTGGTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTTGTTAAGTCAGATGTG
AAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAAGAGGGGGGTAGAA
```

TTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAA
 AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAA
 CGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGG
 GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACGGAATTCGCCAGAGATGGCTTAGTG
 CCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCACGTGATGGTGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGGT
 GATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCT
 ACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTATGTCTAGTCCGG
 ATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAA
 TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTT
 AACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTTGTGATTCATGACTGGGG 3'

11A nolu koloniden elde edilen bölgenin dizi analizi aşağıda verilmiştir.

5' TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
 TAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCAT
 GGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAAC
 GCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAAT
 AGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGA
 AAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA
 TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGT
 AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
 GATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGG
 GGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCC
 CCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGA
 CAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC
 AATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGAT
 CGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
 CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAA
 CCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGAC 3'

11B nolu koloniden elde edilen bölgenin dizi analizi aşağıda verilmiştir.

5' TGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCC

TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAG
AAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAT
GGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCG
TGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGC
TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTG
CAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCC
GGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGAC
ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCA
ACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGG
AACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACG
AGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGT
CGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGT
CTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCG
GGAGGGACGGTTACCACGGTGTGATTTCATGACTGGG 3'

12 nolu koloniden elde edilen bölgenin dizi analizi aşağıda verilmiştir.

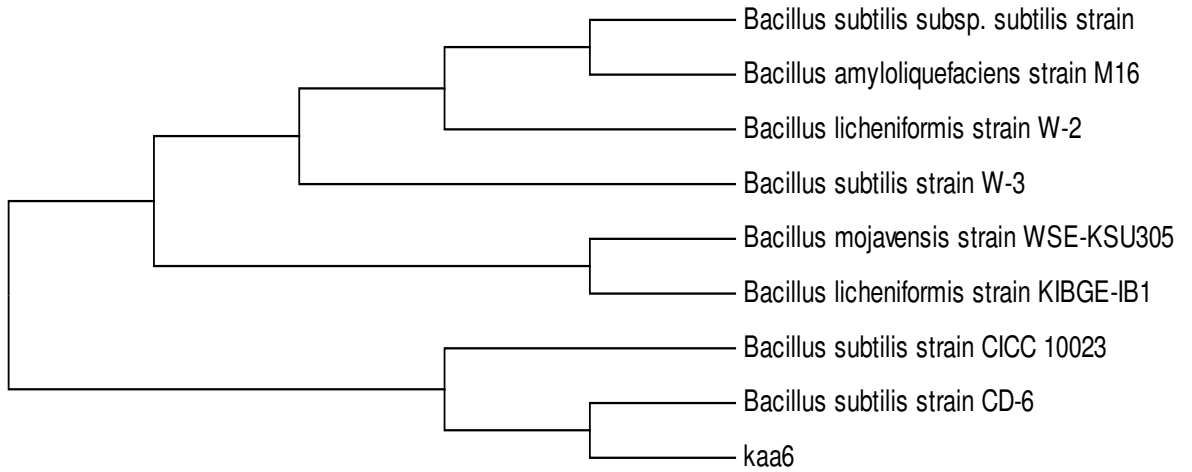
5' AATACATGCAGTCGAGCGAACTGATGAAGAGCTTGCTTTTGATCAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
CACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTAGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACTGGATAACTTTTCT
CTCCGCATGGAGAGAGATTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
GGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATC
GTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAG
AGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTC
TGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACCTCCCTAGAGAT
AGGGCCTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGACCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTG
ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCGAGACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCATAAAACCATTC

TCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGT
CGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATGGG 3'

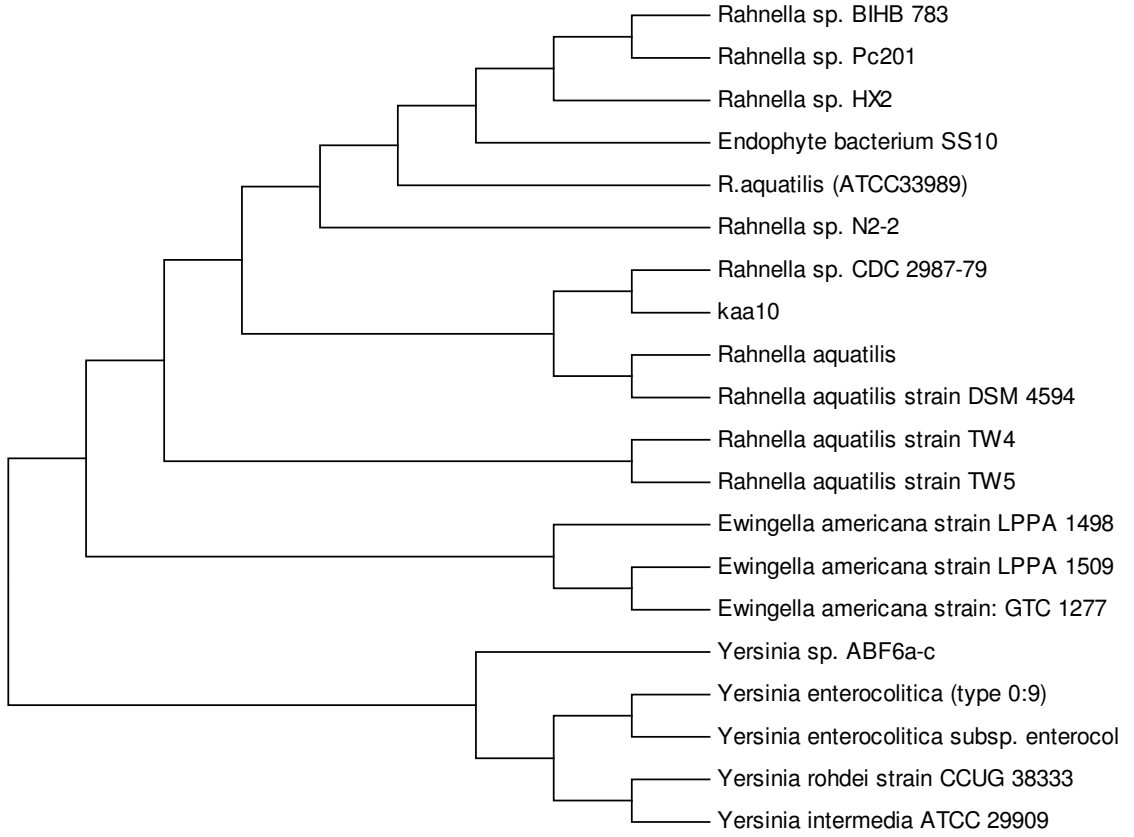
66 nolu koloniden elde edilen bölgenin dizi analizi aşağıda verilmiştir.

5' GGCGGAACTGGGGCGGCGTGCTATACATGCAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAA
TTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTG
GAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTTCGGGTGTC
GCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGT
AAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC
GTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGG
AAACTGGGAGACTTGATGCAGAAAAGGAAGGGAATTCCAGTGTAATAAATGCTAAATTATGGAGGAAACC
GTGG 3'

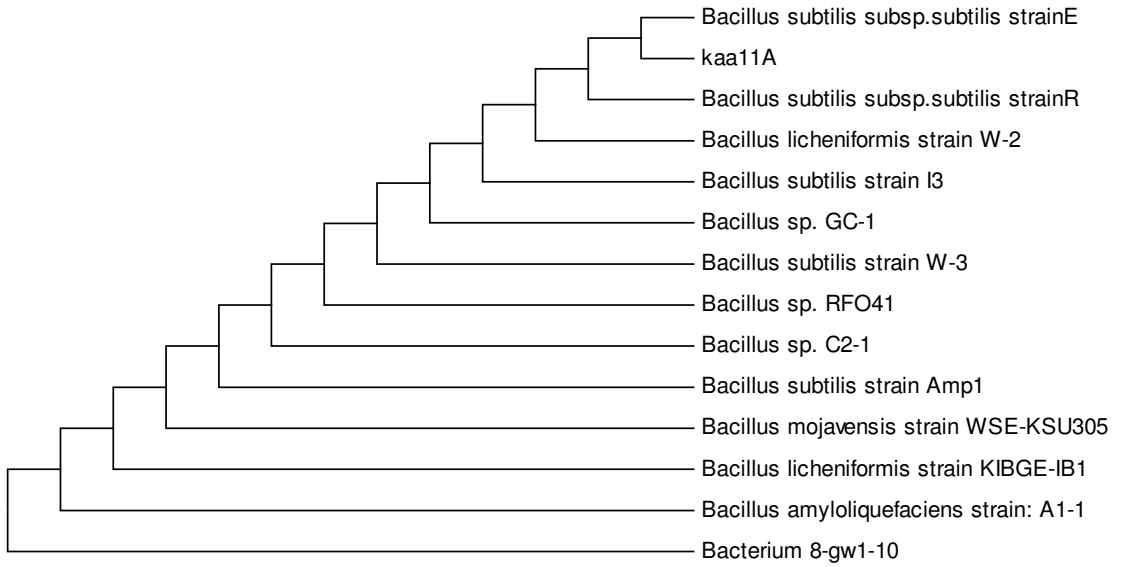
Elde edilen dizilerin, NCBI veri bankasındaki BLAST programı kullanılarak benzerlik gösterdiği türler belirlendi. Benzerlik gösterdikleri türler ile uzaklıklarını MEGA 4 programı kullanılarak clustalW programına göre sıralandı ve soy ağaçları çizildi.



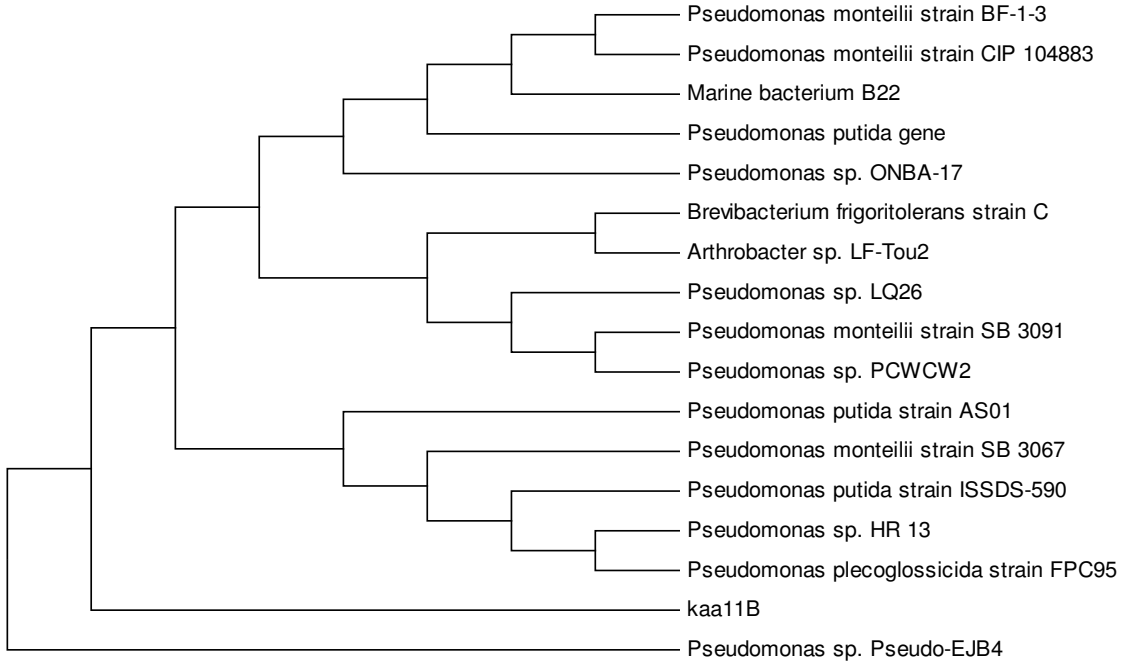
Şekil 4.9 6 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı



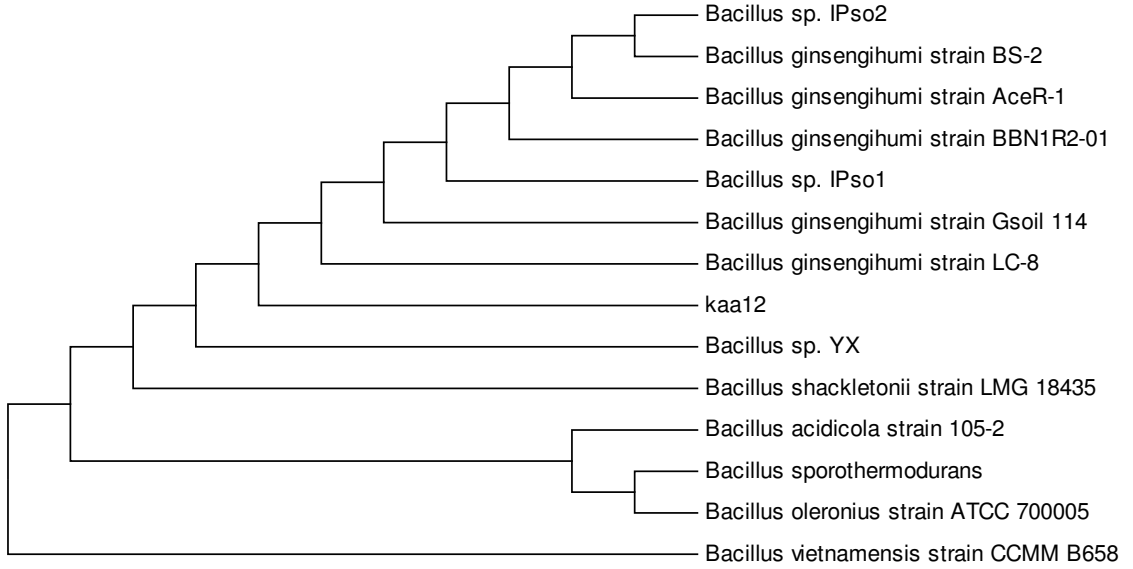
Şekil 4.10 10 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı



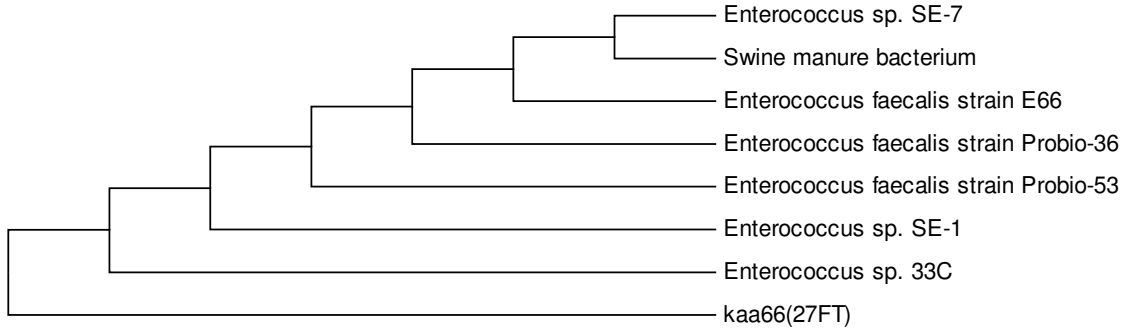
Şekil 4.11 11-A kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı



Şekil 4.12 11-B kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı



Şekil 4.13 12 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı



Şekil 4.14 66 kodlu mikroorganizmaya ait soy ağacı

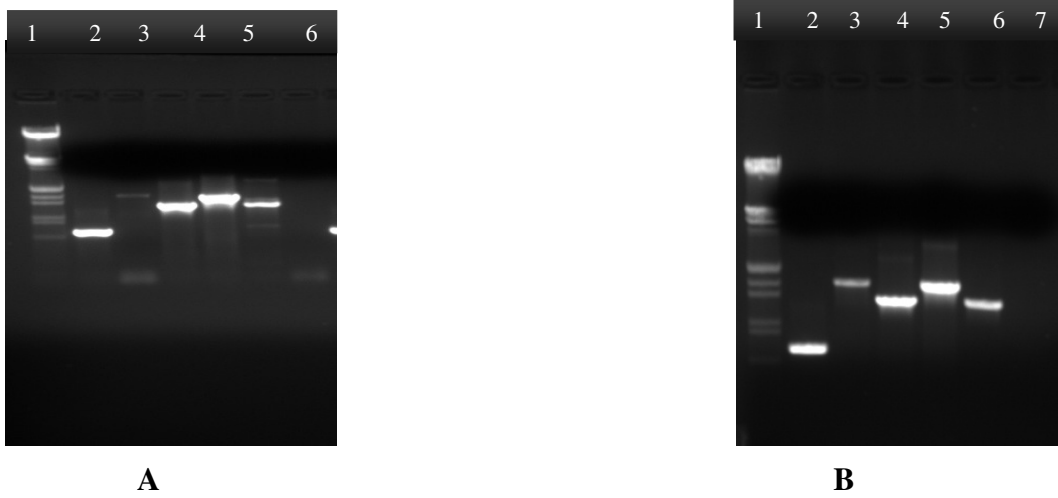
Ksilanaz üreticisi mikroorganizmalar, hem MALDI-TOF yöntemiyle hem de 16s rDNA dizi analiziyle tanılanmış olup elde edilen sonuçlar aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 4.1 İzole edeilen ksilanaz üreticisi mikroorganizmaların tanılanması

Koloni Kodu	MALDI-TOF	16s rDNA
6. PCA	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
10. PCA	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Rahnella aquatilis</i>
11-A. PCA	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
11-B. PCA	<i>Pseudomonas monteilii</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
12. PCA	<i>Bacillus koreensis</i>	<i>Bacillus ginsengihumi</i>
66. PCA	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus sp.</i>
68. PCA	<i>Candida lambica</i>	Maya

4.4. *xyn* Geninin pET28b(+) Vektörüne Klonlanması ve Protein Ekspresyonu

4.4.1. PCR ile Genomik DNA'dan *xyn* Geninin Çoğaltılması



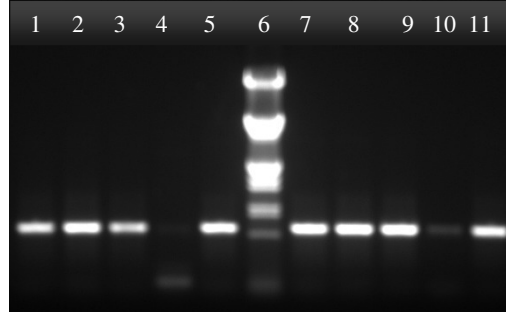
Şekil 4.15 PCR ile genomik DNA'dan *xyn* geninin çoğaltılması ile elde edilen agaroz jel görüntüsü. A'da 11A kodlu mikroorganizmaya ait genomik DNA ve *xyn* 1, *xyn* 2, *xyn* 3, *xyn* 4, *xyn* 5, *xyn* 6 kodlu primerlerle yapılan PCR sonrası elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası UV transilüminatörden elde edilen görüntüsü verilmiştir. 1. DNA standardı (λ / *EcoR* I+*Hind* III), 2. *xyn* 1, 3. *xyn* 2, 4. *xyn* 3, 5. *xyn* 4, 6. *xyn* 5, 7. *xyn* 6. B'de 6 kodlu mikroorganizmaya ait genomik DNA ve *xyn*1, *xyn*2, *xyn* 3, *xyn* 4, *xyn* 5, *xyn* 6 kodlu primerlerle yapılan PCR sonrası elde edilen ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonrası UV transilüminatörden elde edilen görüntüsü verilmiştir. 1. DNA standardı (λ / *EcoR* I+*Hind* III), 2. *xyn*1, 3. *xyn* 2, 4. *xyn* 3, 5. *xyn* 4, 6. *xyn* 5, 7. *xyn* 6

Agaroz jel görüntüleri incelendiğinde, 11A kodlu mikroorganizmadan sırasıyla 642 bp, 1289 bp, 1562 bp, 1020 bp, 6 kodlu mikroorganizmadan 642 bp, 1622 bp, 1289 bp, 1562 bp, 1020 bp olmak üzere farklı büyüklüklerde *xyn* genleri elde edildiği görüldü. Bunlardan 11A kodlu mikroorganizmadan elde edilen 622 bp büyüklüğüne sahip *xyn*1 geniyle çalışılmasına karar verildi.

4.4.2. Klonlama Sonrası Plazmid DNA'ların PCR ile Analizi

Klonlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğini belirleyebilmek amacıyla saflaştırılmış rekombinant plazmit (pET28b-*xyn*) ve *xyn* genine ait primerler kullanılarak

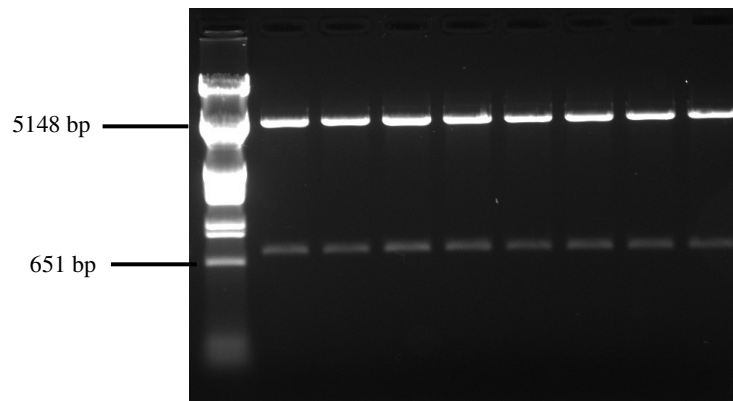
gerçekleştirilen doğrulama PCR'ı sonrası aşağıda verilen agaroz jel görüntüleri elde edildi. Agaroz jel görüntüleri incelendiğinde çalışılan 10 numunenin 8'inin pozitif sonuç verdiği görüldü. Pozitif sonuç veren 8 plazmid DNA restriksiyon enzim analizinde kullanıldı.



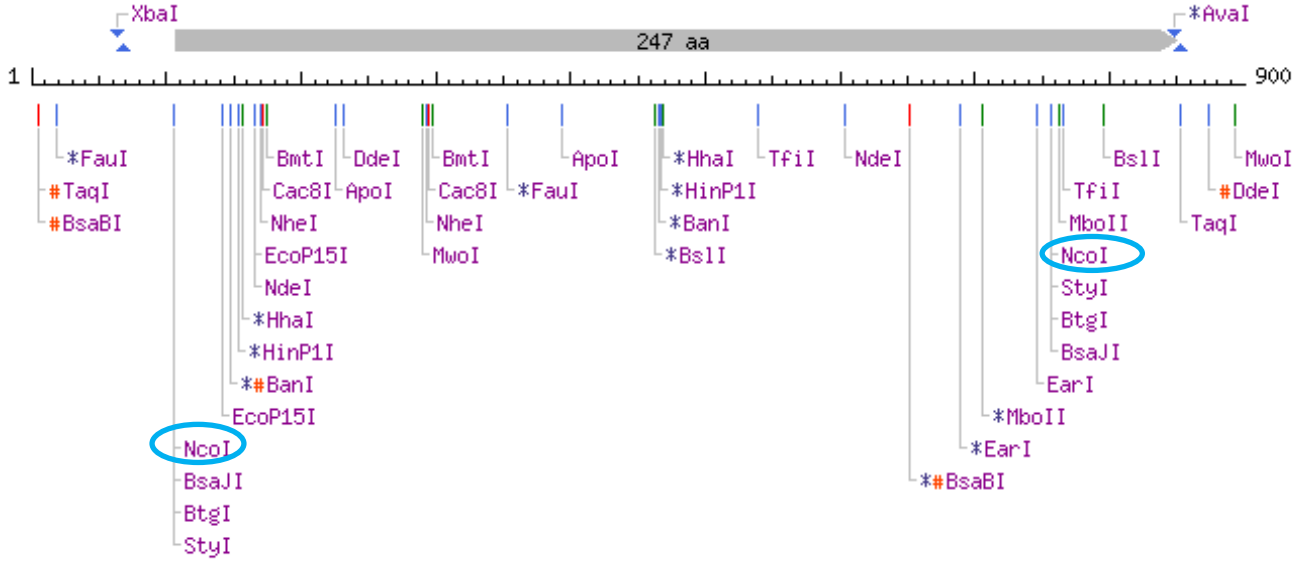
Şekil 4.16 Klonlama sonrası pET28b-*xyn* rekombinant plazmitinin kalıp olarak kullanılmasıyla yapılan doğrulama PCR'ı sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü. 1-5. PCR ürünü, 6. DNA standardı (λ / *EcoR* I+*Hind* III), 7-11. PCR ürünü.

4.4.3. Klonlama Sonrası Plazmid DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Analizi

Klonlama sonrası yapılan PCR ile doğrulama analizinde pozitif sonuç veren 8 numune (pET28b-*xyn*) *Nco*I ile kesilip agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra aşağıda verilen jel görüntüsü elde edildi. Jel görüntüsü incelendiğinde, 8 numunenin kesim sonrası beklenildiği gibi 5326 bp ve 651 bp olmak üzere iki farklı uzunlukta DNA'ya parçalandığı görüldü.



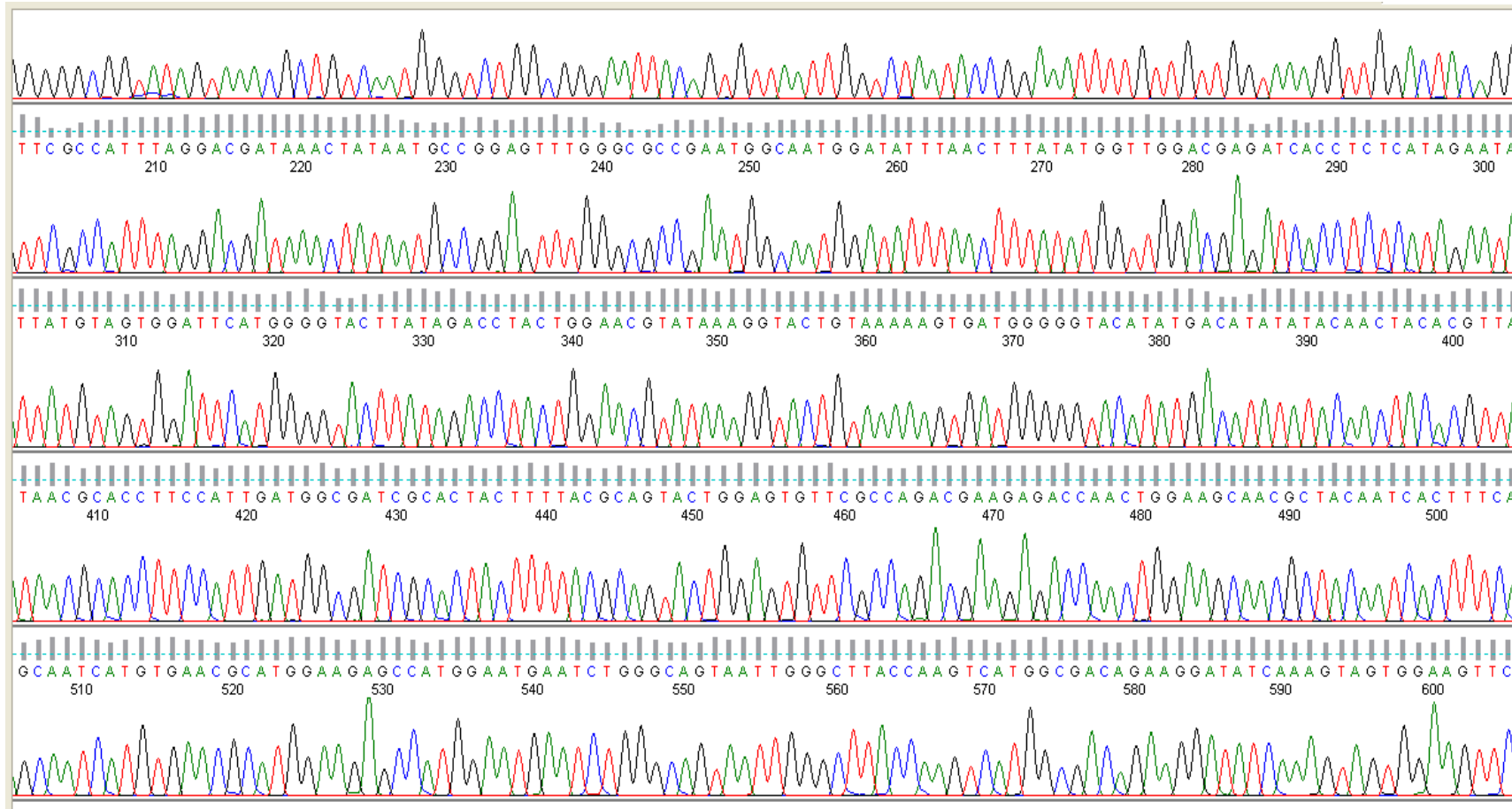
Şekil 4.17 Saflaştırılan plazmid DNA'nın (pET28b-*xyn*), *Nco*I ile kesildikten sonra agaroz jeldeki görüntüsü. 1. DNA standardı (λ / *EcoR* I+*Hind* III), 2-9. Kesim sonrası elde edilen 5326 bp ve 651 bp uzunluklarındaki DNA parçaları.



Şekil 4.18 NEBcutter V2.0 programı kullanılarak elde edilen pET28b klonlama bölgesi-*xyn* genine ait restriksiyon enzim haritası (Anonim, 2013)

4.4.4. DNA Dizileme

Dizi analizi sonucu elde edilen ktomotogramlar şekil 4.19’da verilmiştir.



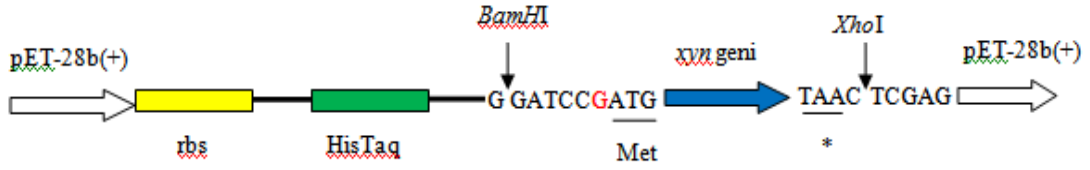
Şekil 4.19 pET28b-xyn plazmidinin DNA dizi analiz kromotogramı

Kromotogramlar FinchTV programı kullanılarak okunmuştur. Şekilde de görüldüğü üzere elde edilen pikler oldukça temizdir. Analiz sonucu elde edilen DNA dizisi, klonlama işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir. Analiz sonucu elde edilen DNA dizisi, biyoinformatik araçlardan Expasy kullanılarak amino asit dizisine çevrilerek aşağıda verilmiştir.

5'3' Frame 1

```
atgggcagcagccatcatcatcatcacagcagcggcctggcgccgcggcagccat
M G S S H H H H H S S G L V P R G S H
atggctagcatgactggtagcagcaaagggtcgggatccgatgtttaagtttaaaag
M A S M T G G Q Q M G R D P M F K F K K
aatttcttagttggattatcggcagctttaatgagtattagcttgttttcggcaaccgcc
N F L V G L S A A L M S I S L F S A T A
tctgcagctagcacagactactggcaaaattggactgatggggcggtatagtaaaccgt
S A A S T D Y W Q N W T D G G G I V N A
gtcaatgggtctggcggaattacagtgttaattgggtctaataccggaaattttgttgtt
V N G S G G N Y S V N W S N T G N F V V
ggtaaagggttgactacaggttcgccatttaggacgataaaactataatgccggagtttgg
G K G W T T G S P F R T I N Y N A G V W
gcgccgaatggcaatggatatttaactttatatgggttgacgagatcacctctcatagaa
A P N G N G Y L T L Y G W T R S P L I E
tattatgtagtggattcatgggtacttatagacactactggaacgtataaaggtagtga
Y Y V V D S W G T Y R P T G T Y K G T V
aaaagtgatgggggtacatatgacatatatacaactacacgttataacgcaccttccatt
K S D G G T Y D I Y T T T R Y N A P S I
gatggcgatcgactacttttacgcagtactggagtgttcgccagacgaagagaccaact
D G D R T T F T Q Y W S V R Q T K R P T
ggaagcaacgctacaatcacttttcagcaatcatgtgaacgcatggaagagccatggaatg
G S N A T I T F S N H V N A W K S H G M
aatctgggcagtaattgggcttaccagtcagtcggcagagaaggatatcaaagtagtgga
N L G S N W A Y Q V M A T E G Y Q S S G
agttccaacgtaacagtggtgtaactcgagcaccaccaccaccactgagatccggct
S S N V T V W - L E H H H H H H - D P A
gctaacaagccc
A N K A
```

xyn geninin tamamı PCR ile çoğaltıldıktan sonra 5'-ucundan *Bam*HI ve 3'-ucundan ise *Xho*I ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilen pET-28b(+) vektörüne klonlandığında oluşan rekombinant vektör *xyn* geninin başlama kodonundan önce 6 tane histidin kodlayan kodon içermektedir (Şekil 20). Bu durumda *xyn* N-ucunda 6 tane histidin amino asidi içeren bir kuyruğa sahip olacak şekilde hücre tarafından ekspres edilmiştir.



Şekil 4.20 *xyn* geninin pET-28b(+) vektörüne aktarıldığı bölgenin şematik olarak gösterimi. Sarı ile gösterilen bölge ribozom bağlanma bölgesini (rbs), yeşil ile gösterilen bölge 6 tane histidin birimini, yıldızla gösterilen kodon ise “DUR” sinyalini göstermektedir.

DNA dizileme sonucu elde edilen DNA dizisinin, biyoinformatik araçlardan expasy translate kullanılarak amino asit dizisine dönüştürüldükten sonra NCBI BLAST programında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) incelenmesi ile, elde edilen genin amino asit dizisinin *Bacillus*'un farklı strainlarından izole edilen endo-1,4-beta-xylanase enziminin amino asit dizine çeşitli oranlarda benzediği görüldü (Çizelge 4.2). Benzerlik gösteren protein dizilerinin çoklu (multiple alignment) ClustalW2 programı (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) kullanılarak yapıldı.

Çizelge 4.2 *Bacillus*'dan izole edilerek klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılan ksilanaz enziminin amino asit dizisinin *Bacillus*'un farklı strainlerine ait ksilanaz enziminin amino asit dizisine benzerliği

Bakteri Adı	Protein	Benzerlik(%)
<i>Bacillus pumilus</i>	endo-1,4-beta-xylanase	100
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>	endo-1,4-beta-xylanase	99
<i>Bacillus subtilis BSn5</i>	endo-1,4-beta-xylanase	99
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	endo-1,4-beta-xylanase	99
<i>Bacillus megaterium</i>	endo-1,4-beta-xylanase	98
<i>Bacillus licheniformis</i>	endo-1,4-beta-xylanase	98
<i>Bacillus circulans</i>	endo-1,4-beta-xylanase	98

```

B.subtilis168      MFKFKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
B.licheniformis   MFKFKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
B.subtilisBSn5    MFKFKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
B.subtilis*       MFKFKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
B.pumilus         MFKFKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
B.amyloliquefaciens MFKFKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
B.circulans       MFKFKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
B.megaterium      MFKFKNFLVGLTAAFMSSIMFSATASAACTDYQNWTDGGGTAVNAVNGSGGNYSVNWSN 60
                  *****;*: * :*****.*.*****

B.subtilis168      TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
B.licheniformis   TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
B.subtilisBSn5    TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
B.subtilis*       TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
B.pumilus         TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
B.amyloliquefaciens TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
B.circulans       TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
B.megaterium      TGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG 120
                  *****.*****

B.subtilis168      TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNA 180
B.licheniformis   TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNHVNA 180
B.subtilisBSn5    TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA 180
B.subtilis*       TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA 180
B.pumilus         TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA 180|
B.amyloliquefaciens TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA 180
B.circulans       TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA 180
B.megaterium      TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQTKRPTGSNATITFSNHVNA 180
                  *****.*****;*****:*****:*****

B.subtilis168      WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW- 213
B.licheniformis   WKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYKSSGSSNVTW- 213
B.subtilisBSn5    WKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYQSSGSSNVTW- 213
B.subtilis*       WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW- 213
B.pumilus         WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW- 213
B.amyloliquefaciens WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW- 213
B.circulans       WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW- 213
B.megaterium      WKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW- 213
                  *****;** **:*****

```

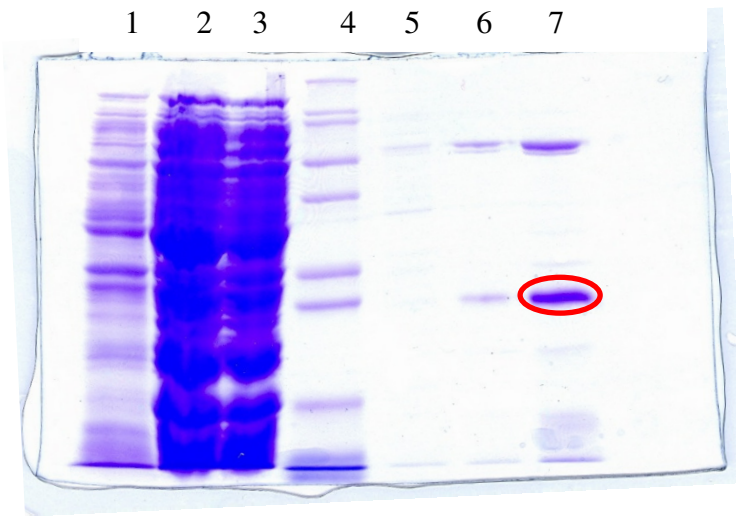
Şekil 4.21 ClustalW2 programı kullanılarak, *Bacillus*'un farklı türlerine ait ksilanaz enziminin amino asit dizileriyle *Bacillus*'dan izole edilerek klonlama ve ekspresyon çalışmalarında kullanılan ksilanaz enziminin amino asit dizisinin çoklu hizalanması (multiple alignment)

4.5. Ksilanaz Enziminin Karakterizasyonu

4.5.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrillamit Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Saflaştırma sonrasında SDS-PAGE yapıldı. Elektrofrez jelinin Coomassie Brilliant Blue ile boyanıp fazla boyanın uzaklaştırılması sonucunda *xyn* geninin *E.coli*'de üretildiği görüldü (Şekil 4.22).

Sadece amino asit sırasından faydalanarak yapılan teorik hesaplamada (Expassy Protparam kullanılarak) ksilanazın molekül ağırlığı 23,359 kDa olarak bulundu. Fakat rekombinant enzimin molekül ağırlığı belirlenirken, *xyn* geni pET28b(+) vektöründe üretildiği için *xyn* geninin başlama sinyalinin önce var olan polihistidin kuyruğunun ve diğer amino asitlerin de dikkate alınması gerekmektedir. Bunlar dikkate alınarak yapılan hesaplama sonucunda pET-28b(+) vektöründe üretilen ksilanazın moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 26,971 kDa olmaktadır. Jel incelendiğinde üretilen ksilanazın molekül ağırlığının teorik olarak hesaplanan değere oldukça yakın olduğu görülmektedir.



Şekil 4.22 SDS PAGE elektroforezi. Kuyucuklara yüklenen numuneler sırasıyla şunlardır: 1. pET28b plazmitini içeren indüklenmiş *E. Coli* BL21 pLysE hücre lizatı, 2. pET28b-*xyn* rekombinant plazmiti içeren indüklenmiş *E. Coli* BL21 pLysE hücre lizatı, 3. Load (Santrifüj sonrasında alınan süpernatantın kolona tatbik edilmesi sonrasında kolondan alınan fraksiyonlar), 4. Marker, 5. Protein yüklü kolonun 10 mM imidazol 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponuyla yıkanması sonucu kolondan alınan fraksiyon, 6. 25 mM imidazol 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponuyla yıkanması sonucu kolondan alınan fraksiyon, 7. Elüat (300 mM imidazol 100 mM NaCl içeren 100mM NaH₂PO₄-Na₂HPO₄ tamponuyla kolona tutunmuş olan proteinin elüe edilmesiyle elde edilen fraksiyon)

4.5.2. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.

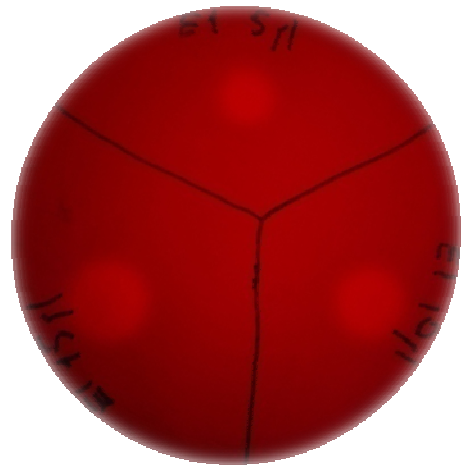
4.5.2.1. Plate Analizi

Rekombinant plazmiti taşıyan ve taşımayan (kontrol) *E.coli* BL21(DE3) mikroorganizmasının %1 (w/v) beech-wood xylan (kayın kerestesi ksilanı), 100mg/ml IPTG ve 50 mg/ml kanamisin, 34 mg/ml kloramfenikol içeren LB-agar besiyerine spotlanmasıyla gerçekleştirilen plate analizi sonucu, pET28b'yi taşıyan *E.coli* BL21 (DE3) mikroorganizmasının kayda değer bir ksilanaz aktivitesi göstermediği ancak rekombinant plazmit pET28b-xyn'yi taşıyan *E.coli* BL21(DE3) mikroorganizmasının belirgin bir ksilanaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.23, plate analizi 1).

Saflaştırılmış enzimin 5 µl'lik, 10 µl'lik ve 15 µl'lik hacimler halinde %1 (w/v) beech-wood xylan içeren LB-agar besiyerine spotlanmasıyla gerçekleştirilen plate analizi sonucu, enzim miktarındaki artışla beraber enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür (Şekil 4.24, plate analizi 2).



Şekil 4.23 Plate analizi 1

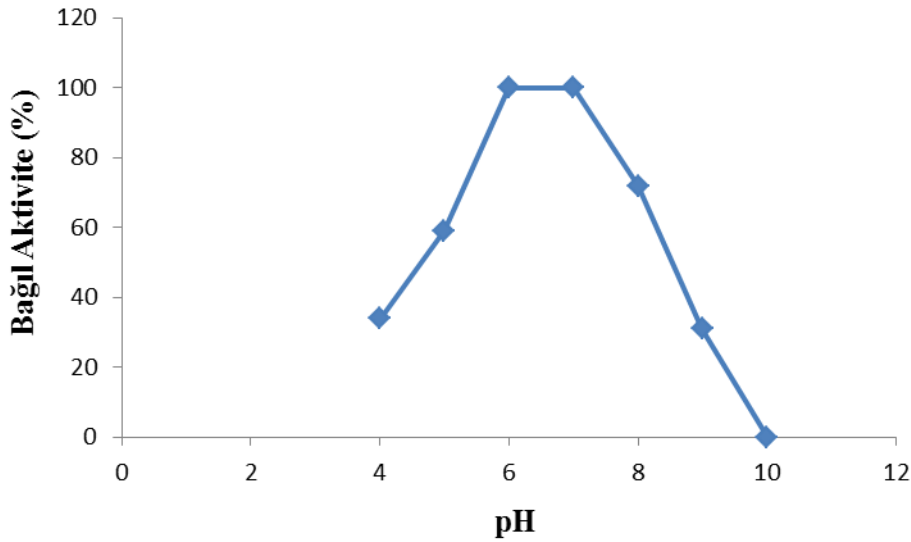


Şekil 4.24 Plate analizi 2

4.5.3. Bazı Parametrelerin Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

4.5.3.1. pH'nın Etkisi

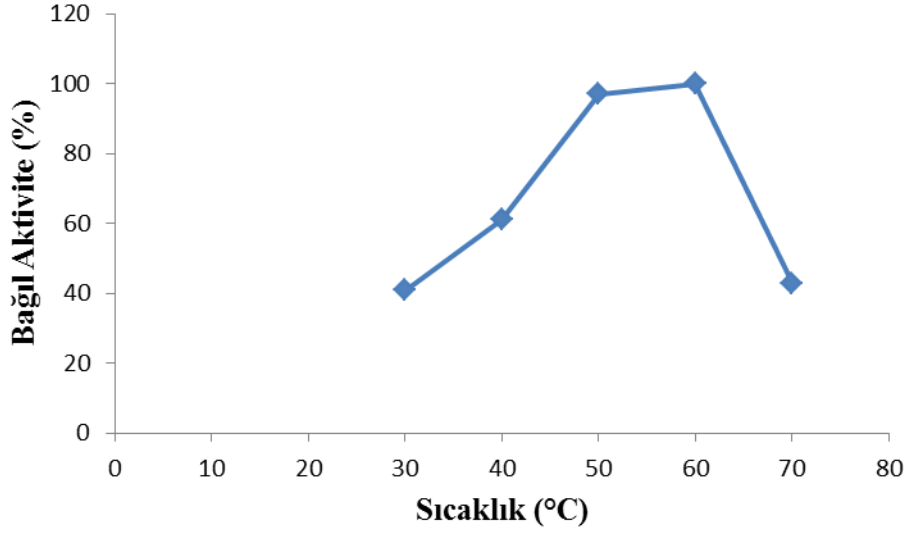
Ksilanaz enziminin en yüksek aktiviteyi gösterdiği pH değerini belirleyebilmek amacıyla, beech-wood ksilan substratı varlığında farklı pH değerlerindeki tamponlar kullanılarak enzim aktivite tayinleri yapıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak pH-%bağıl aktivite eğrisi çizildi (Şekil 4.25). Çizilen eğriye göre, optimum pH'nın 6,0 olduğu görülmektedir.



Şekil 4.25 Ksilanaz enziminin pH bağımlılık eğrisi

4.5.3.2. Sıcaklığın Etkisi

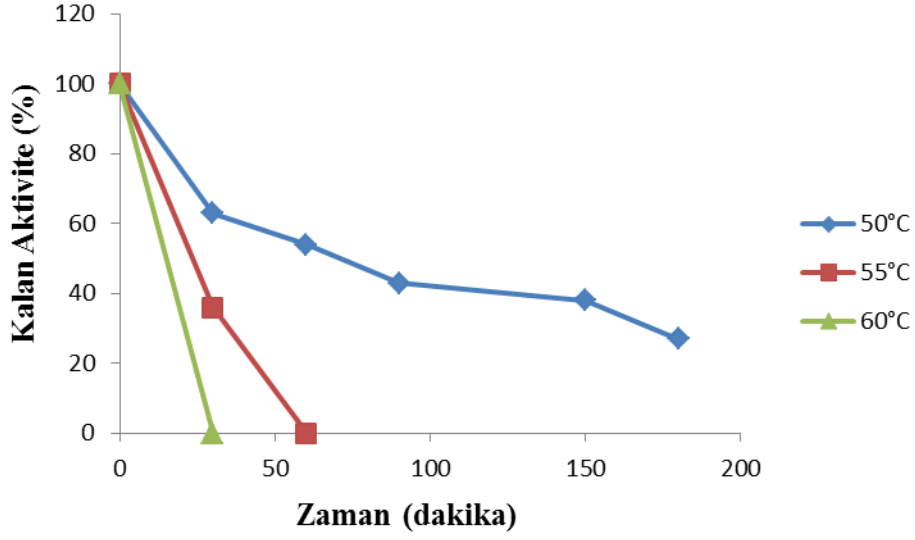
Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirleyebilmek amacıyla, 30, 40, 50, 60, 70°C'lik sıcaklık değerlerinde ölçümler yapıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak sıcaklık-%bağıl aktivite eğrisi çizildi (Şekil 4.26). Çizilen eğriye göre, optimum sıcaklık 60°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.26 Ksilanaz enziminin sıcaklık bağımlılık eğrisi

4.5.3.3. Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi

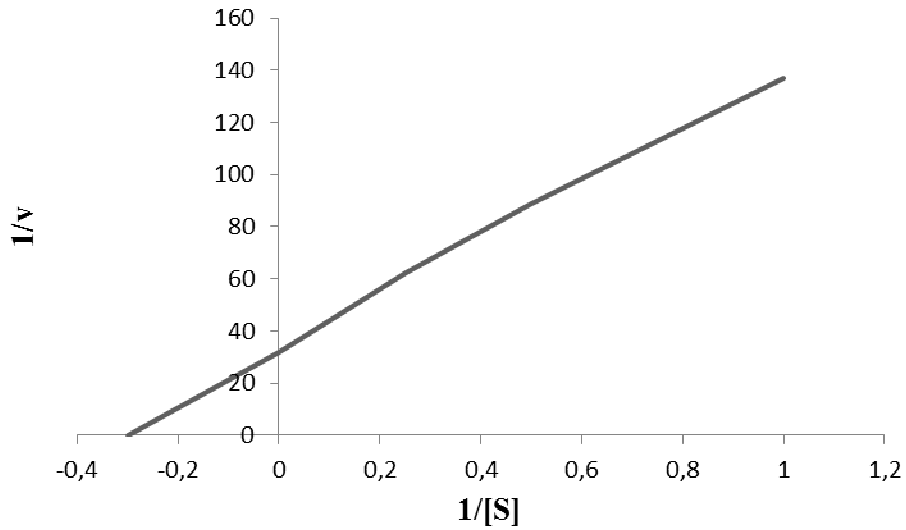
Sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için enzimler 50, 55, 60°C'lik sıcaklıklarda 30 dakikalık aralıklarla 180 dk boyunca inkübe edildi. Ön inkübasyon uygulamasından sonra optimum şartlarda aktivite tayini yapıldı. Elde edilen aktivite değerleri kullanılarak zaman-kalan aktivite (%) eğrisi çizildi (Şekil 4.26). Enzimin 60°C'de 30 dk sonunda, 55°C'de 60 dk sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği belirlendi. 50°C'de ise 180 dk sonunda aktivitesini yaklaşık %70 oranında kaybettiği belirlendi.



Şekil 4.27 Ksilanaz enziminin ısı kararlılık eğrisi

4.5.3.4. Substrat Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla, enzim konsantrasyonu sabit tutularak optimum şartlarda değişen substrat miktarlarında (1-10 mg/ml) enzim aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Elde edilen veriler kullanılarak Lineweaver-Burk eğrisi çizildi. K_m değeri, 3,33 mg/ml olarak belirlendi.



Şekil 4.28 Ksilanaz enzimi için Lineweaver-Burk eğrisi

5. SONUÇ

Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Özellikle son yıllarda stratejik alan şeklinde değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden yararlanılarak enzim üretimi büyük boyutlara ulaşmış ve kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (Gessese, 1998).

Bu çalışmada rekombinant olarak üretilen ksilanazın substratı olan ksilan, hemiselülozun başlıca bileşenidir ve hemiselülozlar doğada toplam biyokütlenin % 30-35'ini oluşturmaktadır (Kulkarni ve ark.,1994). Yenilenebilen bu kaynaktan bugün gıda ve yem sanayi çeşitli şekillerde yararlanırken (Biely,1985; Berovic ve ark., 1995), kağıt sanayi (Haarhoff ve ark., 1999) ve ayrıca atık arıtım ve değerlendirme proseslerinde de (Biely, 1985; Carmona ve ark., 1997; Duarte ve ark., 1994) ksilana yönelik uygulamalar bulunmaktadır. Ksilanın tüm bu sanayilerdeki işleme ve değerlendirme basamaklarında enzimatik hidrolizi ön plana çıkmaktadır. Ksilanın enzimatik hidrolizinde yer alan başlıca enzim ise β -1,4 bağları ile bağlanmış ksiloz birimlerinden oluşan iskeleti hidrolizleyen endo-1,4- β -ksilanazlar (1,4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz) (EC 3.2.1.8) dir (Singh ve ark., 2003). Ksilanaz enzimi, ülkemizde yararlanılabileceği çeşitli alanlar içinde özellikle kanatlı yemi katkısı olarak kullanılmaktadır.

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Bu mikroorganizmalar yalnızca enzim üretme yeteneklerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmiştir. Bugün endüstride kullanılan birçok enzim mikrobiyal kökenli olduğu için, endüstriyel enzimlerin kullanımında, mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon, 1981).

Bu çalışmada mikroorganizma kaynaklı ksilanaz rekombinant olarak üretilmiştir. Bunun için 9 farklı yerden alınan toprak örneklerinden toplam 71 mikroorganizma izole edilmiştir. Elde edilen 16 izolattan 6 tanesi hidroliz zonu vermiştir. Ksilanaz üreticisi mikroorganizmaların moleküler tanımlanması 16s rDNA analizi ve MALDI-TOF yöntemleriyle yapılmıştır. Tanısı yapılan ksilanaz üreticisi mikroorganizmalardan ksilanaz aktivitesi en yüksek olan *Bacillus subtilis* suşundan ksilanaz geni izole edilmiş, izole edilen gen pET28b vektörüne klonlanarak, *E.coli* BL21(DE3)pLysE hücresinde ekspresyon işlemi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Üretilen enzim, afinite kromatografisi ile saflaştırılarak karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucu enzimin optimum pH'sı 6,0, optimum sıcaklığı 60°C, Km değeri, 3,33 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada yem endüstrisi hedef alınarak ksilanaz enzimi üretilmiştir. Literatür incelendiğinde yem endüstrisinde kullanılan ksilanaz enziminin optimum pH'sının 4,8 olduğu görülmüştür. *Bacillus subtilis* tarafından üretilen ksilanaz, ekstraselüler bir enzimdir. pH 4,8'de çoğalan mikroorganizmaların ürettiği enzimin bu pH'da aktivite göstermesi beklendiği için ksilanaz üreten mikroorganizmalar, pH'sı 4,8 olan besiyerinde çoğalan mikroorganizmalar arasından seçilmiştir. Ancak üretilen enzimin beklenildiği gibi yem endüstrisinde kullanıma uygun olmadığı, aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH profili açısından değerlendirildiğinde kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde kullanılabilir nitelikte olduğu belirlenmiştir. . Ancak üretilen enzim, miktar ve saflık açısından değerlendirildiğinde endüstriyel kullanım için yeterince uygun değildir. Bu nedenle *P. pastoris*, *K. lactis* gibi sekresyon yapabilen ökaryotik sistemler kullanılarak enzim üretim çalışmalarına devam edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Adsul, MG., Bastawde, KB., Varma, AJ., Gokhale, DV. Strain improvement of *Penicillium janthinellum* NCIM1171 for increased cellulase production. *Bioresource Technol* 2007, 98:1437-1473.
- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 484s.
- Ahmed, S., Riaz, S., Jamil, A., 2009. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84, 19–35.
- Andrade SV, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA, 2004. Effect of carbon source on the biochemical properties of the β -xylosidase produced by *Aspergillus versicolor*. *Process Biochem*, 39, 1931–1938.
- Bailey, J.E., Ollis, D.F., 1977 *Biochemical Engineering Fundamentals: International Student Edition*, Chapter, 1-7, 39-50.
- Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yang, P., Shi, P., Luo, H., Meng, K., Huang, H., Yao, B., 2009. A new xylanase from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with broad-range pH activity and pH stability. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37, 187–194.
- Bajpai P, 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog*, 15, 147–157.
- Balaa, B. A., Wouters, J., Dogne, S., Rossini, C., Schaus, J., Depiereux, E., Vandenaute, J., Housen, I., 2005. Identification, Cloning and Expression of the *Scytalidium acidophilum* XYL1 Gene Encoding for an Acidophilic Xylanase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (1), 269-272.
- Bataillon M, Cardinali APN, Duchiron F, 1998. Production of xylanases from a newly isolated alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett*, 20, 1067–1071.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoonda, G. S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 326–338.
- Belancic A, Scarpa J, Peirano A, Diaz R, Steiner J, Eyzaguirre J, 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. *J Biotechnol*, 41, 71–79.
- Berovic, M. and Ostroversnik, H., 1997, Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by solid state bioprocessing of apple pomace. *Journal of Biotechnology*, 53:47-53.
- Berrin, J., Williamson, G., Puigserver, A., Chaix, J., McLauchlan, W. R., Juge, N. 2000. High-Level Production of Recombinant Fungal Endo- β -1,4-xylanase in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 19, 179–187.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355-383.
- Biely P, 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol*, 3, 286–290.
- Biely P, Puls J, Schneider H, 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett*, 186, 80–84.
- Biely, P., 1985, Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*, 3: 286-290.
- Blanco, A., Vidal, T., Colom, J. F., Pastor, F. I. J., 1995. Purification and Properties of Xylanase A from Alkali-Tolerant *Bacillus* sp. Strain BP-23. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (12), 4468–4470.

- Bradford, MM., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Buchert, J., Ranua, M., Kantelinen, A., Viikari, L.: The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in bleaching of pine kraft pulp. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992, 37, 825-839.
- Buckholz, RG., Gleeson, MAG.: Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Protein. *Biotechnology* 1991, 9:1067-1072.
- Carmona, E.C., Pizzironi, A.A., Monterio, R.T.R. and Jorge, J.A., 1997, Xylanase production by *Aspergillus versicolor*. *Journal of Basic Microbiology*, 38 (6): 387-394.
- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P., Eurwilaichitr, L., 2006. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 46, 143-149.
- Chen, X., Whitmire, D., and Bowem, J.P., 1996. Xylanase Homology Modeling Using The Inverse Protein Folding Approach. *Protein Science*, 5, 705-708.
- Chen, X., Whitmire, D., and Bowem, J.P., 1996. Xylanase Homology Modeling Using The Inverse Protein Folding Approach. *Protein Science*, 5, 705-708.
- Cherry, J.R., and Fidantsef A.I., 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 438-443.
- Christov LP, Szakacs G, Balakrishnan H, 1999. Production, partial characterization and use of fungal cellulase-free xylanases in pulp bleaching. *Process*, 34, 511-517.
- Christov, L.P., Akhtar, M., and Prior, B.A., 1996. Impact of Xylanase And Fungal Pretreatment on Alkali Solubility And Brightness of Dissolving Pulp. *Biobleaching of Sulphite Pulp* 50, 579-582.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2004. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3-23.
- Crepin VF, Fauld CB, Connerton IF, 2004. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(6), 647-652.
- Damaso, M. C. T., Almeida, M. S., Kurtenbach, E., Martins, O. B., . Pereira, N, Andrade, 3C. M. M. C., Albano, R. M., 2003. Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10), 6064-6072.
- de Vries RP, Kester HC, Poulsen CH, Benen JA, Visser J, 2000. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydr Res*, 327(4), 401-410.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco.
- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*, pp. 3-14. Scientific American, Freeman & Comp., San Francisco.
- Deng, P., Li, D., Cao, Y., Lu, W., Wang, C., 2006. Cloning of a gene encoding an acidophilic endo- β -1,4-xylanase obtained from *Aspergillus niger* CGMCC1067 and constitutive expression in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1096-1102.

- Dey D, Hinge J, Shendye A, Rao M, 1992. Purification and properties of extracellular endo-xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Can J Microbiol*, 38, 436–442.
- Dominguez JM, 1998. Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*. *Biotechnol Lett*, 20, 53–56.
- Duarte, J.C and Ferreira, M. C., 1994, Aspergilli and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications, *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 377–386.
- Elegir, G., Szakacs, G., Jeffries, T. W., 1994. Purification, Characterization, and Substrate Specificities of Multiple Xylanases from *Streptomyces* sp. Strain B-12-2. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7), 2609–2615.
- Elegir G, Sykes M, Jeffries TW, 1995. Differential and synergistic action of *Streptomyces* endoxylanases in prebleaching of kraftpulp. *Enzyme Microb Technol*, 17, 954–959.
- Esteban R, Villanueva JR, Villa TG, 1982. β -D-xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Can J Microbiol*, 28, 733–739.
- Fogarty, W.M., and Kelly, C.T., 1979. Developments in microbial extracellular enzymes. (A. Wisemann editor) *Topics in Enzyme and fermentation biotechnology*, Wiley, New York, s.45–108.
- Galante, Y.M., DE Conti, A., Monteverdi, R., 1998. Application of *Trichoderma* Enzymes in Food and Feed Industries. *Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*, 327–42.
- Gallardo, O., Diaz, P., Pastor, F.I.J., 2003. Cloning and Characterization of Xylanase A from the Strain *Bacillus* sp. BP-7: Comparison with Alkaline pH-Low Molecular Weight Xylanases of Family 11. *Current Microbiology*, 48, 276–279.
- Gamerith, G., Groicher, R., Zeilinger, S., Herzog, P., Kubicek, C.P., 1992. Cellulase-Poor Xylanases Produced by *Trichoderma reesei* RUTC-30 on Hemicellulase Substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 38: 315–322.
- Gauthier, C., Li, H., Morosoli, R., 2004. Increase in Xylanase Production by *Streptomyces lividans* through Simultaneous Use of the Sec- and Tat-Dependent Protein Export Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6), 3085–3092.
- Georis, J., Giannotta, F., Lamotte-Brasseur, J., Devreese, B., Beeumen, J. V, Granier, B., Frere J., 1999. Sequence, overproduction and purification of the family 11 endo- β -1,4-xylanase encoded by the *xyII* gene of *Streptomyces* sp. S38. *Gene*, 237, 123–133.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (9), 3533–3535.
- Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases From an Alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 3533–3535.
- Ghaffar, A., Khan, S.A., Mukhtar, Z., Rajoka, M.I., Latif, F., 2010. Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115,
- Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139, 187–194.
- Godfrey, T. and West, S., 1996. *Introduction to Industrial Enzymology*. (T. Godfrey and S. West editor) *Industrial Enzymology*, 2nd Edition, Stockton Press, New York.

- Gupta, N., Vohra, R.M., Hoondal, G.S., 1992. Thermostable Extracellular Xylanase from Alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27. *Biotechnology Letters*, 14 (11), 1045-1045.
- Gupta, R., Gıgras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., Chauhan, B., 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochem.*, 1-18.
- Haarhoff, J., Moes, C.J., Cerff, C., Wyk, W.J., Gerischer, G. and Janse, B.J.H., 1999, Characterization and biobleaching effect of hemicellulases produced by thermophilic fungi, *Biotechnology Letters*, 21: 415-420.
- Harwood, C.R., 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: Molecular Biological and Industrial Workhorses. Elsevier Science Publishers Ltd (U.K.), 10:247-256.
- He, J., Yu, B., Zhang, K., Ding, X., Chen, D., 2009. Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. *BMC Biotechnology*, 9(56), 1-10.
- Hongpattarakere, T. 2002. Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 24(3); 481-491.
- Horikoshi, K., Atsukawa, Y., 1973. Xylanase Produced by Alkalophilic *Bacillus* No. C-59-2. *Agr. Biol. Chem.*, 37 (9), 2097-2103.
- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>
- <http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/plasmid.php>(29.04.13)
- <http://www.pdb.org/pdb/explore/images.do?structureId=2DCY> (20.04.2013)
- Huang, J., Wang, G., Xiao, L., 2005. Cloning, Sequencing and Expression of the xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 97, 802-808.
- in *Pichia pastoris* and its action on xylan. *Protein Expression and Purification*, 48, 292–299.
- Jalal, A., Rashid, N., Rasool, N., Akhtar, M., 2008. Gene Cloning and Characterization of a xylanase from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain R5. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107 (4), 360-365.
- Jeffries, T.W., Yang, V.W., and Davis, M.W., 1998. Comparative Study of Xylanase Kinetics Using Dinitrosalicylic, Arsenomolybdate, and Ion Chromatographic Assays. All rights of any Nature Whatsoever Reserved 0273-2289/98/70-72.
- Jeya, M., Thiagarajan, S., Lee, J., Gunasekaran, P., 2009. Cloning and expression of GH11 xylanase gene from *Aspergillus fumigatus* MKU1 in *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108 (1), 24–29.
- Jiang, ZQ., Deng, W., Zhu, YP., Li, LT., Sheng, YJ., Hayashi, K.: The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2004, 27:207-213.
- John, F.K., 1987. *Enzyme Technology* (H.J. Rehm., G. Reed editor). *Biotechnology Vol. 7A*. New York s 37-62.
- Jun, H., Keying, Z., Bing, Y., Xuemei, D., Daiwen, C., 2009. Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene in *Escherichia coli* and the activity of the enzyme on fiber-bond substrates. *Protein Expr Purif*, 67, 1-6.
- Kaneko, S., Shimasaki, T., Kusakabe, I., 1993. Purification and some properties of intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5–16. *Biosci Biotechnol Biochem*, 57, 1161–1165.

- Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., 2002. Kağıt Endüstrisinde Enzim Kullanımına Genel Bir Bakış. K.S.Ü. Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1);61-67s.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2004. Biyokimya. Aktif Yayınevi, No:640, TÜRKİYE.
- Khasin A, Alchanati I, Shoham Y, 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Appl Environ Microbiol, 59, 1725–1730.
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(1).
- Kimura, T., Ito, J., Kawano, A., Makino, T., Kondo, H., Karita, S., Sakka, K., Ohmiya, K., 2000. Purification, Characterization and Molecular Cloning of Acidophilic Xylanase from *Penicillium* sp. 40, Biosci. Biotechnol, Biochem., 64 (6), 1230-1237.
- Kindle, K.L., 1983.Characterization and Production of thermostable α -Amylase.Appl. Biochem. Biotechnol. 8,153.
- Kirk, O., Borchert, TV., Fuglsang, CC.: Industrial enzyme application. *Curr Opin Biotechnol* 2002, 13:345-351.
- Klug, W., Cummings, M., 2003. Genetik Kavramlar. Palme ayıncılık, 500, Türkiye.
- Korona, B., Korona, D., Bielecki, S.,2005. Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* directed by their native signal peptides and the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor. Enzyme and Microbial Technology, 39, 683–689.
- Kuhad, RC., Singh, A., 1993. Lignocellulosic biotechnology: currentand future prospects. Crit Rev Biotechnol, 13, 151–172.
- Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M., 1999, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, FEMS Microbiology Reviews, 23: 411-456.
- Kulkarni,N., Shendye,A., Rao, M.,1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiology Reviews 23, 411-456.
- La Grange DC, Pretorius IS, Van Zyl WH: Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 1996, 62:1036-1044.
- Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970, 227:680-685.
- Lee, C.C., Wong, D.W.S., Robertson, G.H.,2005.Cloning and Characterization of the
- Li, Y., Zhang B., Chen X., Chen Y., Cao Y.,2009.Improvement of *Aspergillus sulphureus* Endo- β -1,4-Xylanase Expression in *Pichia pastoris* by Codon Optimizationand Analysis of the Enzymic Characterization.Appl Biochem Biotechnol, 160, 1321–1331.
- Lin, J., Ndlovu, L.M., Singh, S., and Pillay, B., 1999. Purification and Biochemical characteristics of B-DXylanase From a Thermophilic Fungus, *Thermomyces lanuginosus*-SSBP. Biotechnol. Appl. Biochem. 30, 73-79.
- Liu M., Liu G.,2007. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in
- Liu, M., Weng, X., Sun, J., 2006,Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A
- Liu, W., Shi, P., Chen, Q., Yang, P., Wang, G., Wang Y., Luo, H., Yao, B., 2009.Gene Cloning, Overexpression, and Characterization of a Xylanase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669. Appl Biochem Biotechnol, 162, 1–12.
- Lopez, C., Blanco, A., Pastor, F. I. J., 1998. Xylanase production by a new alkalitolerant isolate of *Bacillus*. Biotechnology Letters, 20 (3), 243–246.

- Luo, H., Li, J., Yang, J., Wang, H., Yang, Y., Huang, H., Shi, P., Yuan, T., Fan, Y., Yao, B., 2009. A thermophilic and acid stable family-10 xylanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Extremophiles*, 13, 849–857.
- Luo, H., Yang, J., Li, J., Shi P., Huang, H., Bai, Y., Fan, Y., Yao, B., 2009. Molecular cloning and characterization of the novel acidic xylanase XYLD from *Bispora* sp. MEY-1 that is homologous to family 30 glycosyl hydrolases. *Appl Microbiol Biotechnol*,
- Maat J, Roza M, Verbakel J, Stam H, daSilva MJS, Egmond MR, Hagemans MLD, vanGarcom RFM, Hessing JGM, vanDerhondel CAMJJ, vanRotterdam C (1992) Xylanases and their application in bakery. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) *Xylans and xylanases*. Elsevier, Amsterdam, pp 349–360
- Miller, GL., Blum, R., Glennon, WE., Burton, AL.: Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal Biochem* 1960, 2:127-132.
- Min, L. J., Shin J., Nam, J., Choi, J., Jeong, C., Han, I., Nam, S., Choi, Y., Chung, D. K., 2009. Molecular Cloning and Expression of the *Trichoderma harzianum* C4 Endo- β -1,4-Xylanase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* , 19(8), 823–828.
- MJ Bailey, Biely P, Poutanen K: Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol* 1992, 23:257-270.
- Morales P, Madrarro A, Flors A, Sendra JM, Gonzalez JAP, 1995. Purification and characterization of a xylanase and arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. *Enzyme Microb Technol*, 17, 424–429.
- Nelson, D., Cox, M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Palme Yayıncılık, 1119-1120, Türkiye.
- Negulescu,^{a,b} A., Patrutea,^{a,b} V., Mincea,^{#,a,b} M. M., Ionascu,^{a,b} C., Vlad-Oros^{#,a,b} B. A. and Ostafe^{*,a,b} , V., 2012. Adapting the Reducing Sugars Method with Dinitrosalicylic Acid to Microtiter Plates and Microwave Heating. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23 (12), 2176-2182.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a Source of Novel Enzymes for Industrial Application. *Application Microbiology Biotechnology*, 51: 711-729.
- Okazaki W, Akiba T, Horikoshi K, Akahoshi R, 1985. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp. *Agric Biol Chem*, 49, 2033–2039.
- Olsson, L., Hahn-Hagerdal, B., 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microb Technol*, 18, 312–331.
- Outtrup, H and Jorgensen, S.T., 2002. The Importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. (R. Berkley editör) *Applications and systems of Bacillus and relatives*. Blackwell Science Inc., Malden, Mass., 206-218.
- Özer, E., *Enzimler Yatırımcılarını Arıyor*, Boğaziçi Üniversitesi Teknoloji Geliştirme Merkezi. *Biyotek Biyoteknoloji Sektör Dergisi* (ISSN 1302-969X), No: 09, Volume: 2, Yıl: 2002.
- Paloheimo, M., Mantyla, A., Kallio, J., Puranen, T., Suominen, P.: Increased production of xylanase by expression of a truncated version of the *xyn11A* gene from *Nonomuraea flexuosa* in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 1997, 73:3215-3224.

- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24: 452-481.
- Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expression and Purification*, 57, 101-107.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Amorim, D. S., 2004. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 577-591.
- Puchart V, Katapodis P, Biely P, Kremnický L, Christakopoulos P, Vrsanska M, Kekos D, Marcis BJ, Bhat M.K., 1999. Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme Microb Technol*, 24, 355-361.
- Ramchuran, S. O., Mateus, B., Holst, O., Karlsson, E. N., 2004. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* as a host for the expression and production of thermostable xylanase from the bacterium *Rhodothermus marinus*. *FEMS Yeast Research* 5, 839-850.
- Rani, S., Nand, K., 1996. Development of cellulase-free xylanase-producing anaerobic consortia for the use of lignocellulosic wastes. *Enzyme Microb Technol*, 18, 23-28.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M. Gathe, M.S., Deshpande, W., 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597-635.
- Ratankhanokchai K, Kyu KL, Tantichareon M, 1999. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Appl Environ Microbiol*, 65, 694-697.
- Rattiya, W., Pason, P., Kyu, K. L., Sakka, K., Kosugi, A., Mori, Y., Ratanakhanokchai, K., 2009. Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Encoding a Multidomain Endo- β -1,4 Xylanase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, and Characterization of the Recombinant Enzyme. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 19(3), 277-285.
- Romanos, MA., Scorer, CA., Clare, JJ.: Foreign Gene Expression in Yeast: A Review. *Yeast* 1992, 8:423-488.
- Royer, JC., Nakas, JP.: Simple, sensitive zymogram technique for detection of xylanase activity in polyacrylamide gels. *Appl Environ Microbiol* 1990, 56:1516-1517.
- Saarelainen, R., Paloheimo, M., Fagerström, R., Suominen, PL., Nevalainen, KMH.: Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylanase II (pI9) gene. *Mol Gen Genetics* 1993, 241:497-503.
- Salles, B.C., Cunha, R.B., Fontes, W., Sousa, M.V., Filho, E.X.F., 2000. Purification and Characterization of a New Xylanase From *Acrophialophora nainiana*. *Journal of Biotechnology* .81 : 199-204.
- Sharma, HSS., 1987. Enzymatic degradation of residual non-cellulosic polysaccharides present on dew-retted flax fibers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 26, 358-362.
- Sidhu, G.S., Sharma, P., Chakrabarti, T., Gupta, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme. Microb. Technol.*, 21:525-530.
- Singh, S., Madlala, A.M. and Prior, B.A., 2003, *Thermomyces lanuginosus* : Properties of strains and their hemicellulases, *FEMS Microbiology Reviews*, 27:3-16.

- Suchita, N., Ramesh, CK.: Bleaching of wheat straw-rich soda pulp with xylanase from a thermoalkalophilic *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technol* 2006, 97:2291-2295.
- Tanaka, H., Okuno, T., Moriyama, S., Muguruma, M., Ohta, K., 2004. Acidophilic Xylanase from *Aureobasidium pullulans*: Efficient Expression and Secretion in *Pichia pastoris* and Mutational Analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98 (5), 338–343.
- Telefoncu, A., 1997. Enzimoloji. Yüksek Lisans Yazokulu. 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye. 446 s.
- Telefoncu, A., Pazarlıoğlu, N., 2010. Biyoteknoloji Temel Prensipler ve Uygulamalar. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 418-420, İzmir.
- Tenkanen, M., Buchert, J., Uikari, L.: Binding of hemicellulases on isolated polysaccharide substrates. *Enzyme Microbe Technol* 1995, 17:499-505.
- Tenkanen, M., Puls, J., Potanen, K.: Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb Technol* 1992, 14:566-574.
- Tomme, P., Warren, R.A., Gilkes, N.R., 1995. Cellulose Hydrolysis this Bacteria and Fungi. *Adv. Microbiolgy Physiol*, 37: 1-81.
- Törrönen, A., Mach, R.L., Messner, R., Gonzalez, R., Kalkkinen, N., Harkki, A., Kubicek, C.P., 1992. The two major xylanases from *Trichoderma reesei* : characterization of both enzymes and genes. *Biotechnology*, 10, 1461-1465.
- Viikari L, Ranva M, Kantelinen A, Sandquist J, Linko M., 1986. Bleaching with enzymes. Third international conference in biotechnology in pulp and paper industry. 16–19 June, Stockholm, pp 67–69
- Williamson G, Faulds CB, Kroon PA., 1998, Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterases. *Biochem Soc Trans*, 26(2), 205–209.
- Winterhalter, C., Liebl, W., 1995. Two Extremely Thermostable Xylanases of the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (5), 1810-1815.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.
- Wiseman, A., 1987. Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes in Industry p. 274-373.
- Wong KKY, Saddler JN, 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and purification. *Crit Rev Biotechnol*, 12, 413–435.
- Wong KKY, Tan LUL, Saddler JN, 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev*, 52, 305–317.
- Wong, K.K.Y., Richardson, J.D., and Mansfield, S.D., 2000. Enzymatic Treatment of Mechanical Pulp Fibers For Improving Papermaking Properties. *Biotechnol. Prog.* 16, 1025-1029.
- Wu, S., Halley, J. E., Luttig, C., Fernekes, L. M., Gutierrez-Sanchez, G., Darvill, A. G., Albersheim, P., 2005. Identification of an *endo*- β -1,4-D-Xylanase from *Magnaporthe grisea* by Gene Knockout Analysis, Purification, and Heterologous Expression, *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (2), 986–993.
- Xyn11A Gene from *Lentinula edodes*. *The Protein Journal*, Vol. 24 (1), 21-26.
- Yang Robert, CA., Roger MACKenzie, C., Bilous Doris, Seligy Verner, L., Narang Saran, A: Molecular cloning and expression of a xylanase gene from *Bacillus polymyxa* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1988, 54:1023-1029.

- Yang, VW., Zhuang, Z., Elegir, G., and Jeffries, TW.,1995. Alkaline-Active Xylanase Produced by an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated From Kraft Pulp. *Journal of Industrial Microbiology*. 15, 434-441.
- Zanoelo FF, Polizeli MLTM, Terenzi HF, Jorge JA, 2004. Purification and biochemical properties of a thermostablexylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*. *J Ind Microbiol Biotech*, 31, 170–176.
- Zeikus, J.G., 1979. *Enzyme Microb. Technol.* 1,243.
- Zhang, G. M., Huang, J., Huang, G. R., Ma, L. X., Zhang, X. E., 2006. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 339–346.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Sema BİLGİN ŞENTÜRK
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.05.1981 NİKSAR
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 0356 252 16 16
e-mail : sema.bilginsenturk@gop.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi	2008
Lisans	Atatürk Üniversitesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2006-devam	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	Araştırma Görevlisi

Yayınlar

- Ulus, Y., Bilgin Şentürk, S., Gedikli, F., Lakey, H. J., Gökçe, İ., Bacterial toxin Colicin N-T domain gains ordered structure upon binding C terminal domain of TolA 18. International Biomedical Science & Technology Symposium September 10-13, 2012 Tokat.
- Ulus, Y., Buldağ, A., Bilgin Şentürk, S., Gökçe, İ., Pichia pastoris pIB4α Sekresyon Pilazmid Vektörünün Moleküler Olarak Modifikasyonu. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.
- Ulus, Y., Bilgin Şentürk, S., Gökçe, İ., Rekombinant kimozen enziminin Escherichia coli mikroorganizmasında pTOLT ekspresyon sistemi kullanılarak üretilmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.

- Bilgin Şentürk, S., Çadırcı, B. H., Uluşu, Y., Gökçe, İ., Ksılanaz Üreticisi Mikroorganizmaların Toprakdan İzolasyonu MALDI-TOF Yöntemiyle ve 16S rDNA Dizi Analiziyle Tür Teşhisi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.
- Bilgin Şentürk, S., Uluşu, Y., Gökçe, İ., *Bacillus subtilis*'den Ksılanaz Enzimini Kodlayan Genin Eldesi ve pIB4α Vektörüne Klonlanması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. 3-7 Eylül 2012 İzmir.
- Kuduğ, H., Bilgin Şentürk, S., Uluşu, Y., Gökçe, İ., His-Tag'lı Selülaz enziminin rekombinant olarak üretilmesi ve afinite kromatografisi ile saflaştırılması. Kromatografi 2012 Kongresi, 6-9 Haziran 2012 Tokat.
- Uluşu, Y., Bilgin Şentürk, S., Kuduğ, H., Gökçe, İ., *Escherichia coli* mikroorganizmasında rekombinant olarak üretilen His-Tag'lı kimozen enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması. Kromatografi 2012 Kongresi, 6-9 Haziran 2012 Tokat.
- Uluşu, Y., Bilgin Şentürk, S., Kuduğ, H., Gökçe, İ., Rekombinant olarak üretilen His-Tag'lı yeşil floresan proteininin (GFP) afinite kromatografisiyle saflaştırılması. Kromatografi 2012 Kongresi, 6-9 Haziran 2012 Tokat.
- Bilgin Şentürk, S., Kahraman, D., Alkan, C., Gökçe, İ., 2011., Biodegradable PEG/cellulose, PEG/agarose and PEG/chitosan blends as shape stabilized phase change materials for latent heat energy storage, *Carbohydrate Polymers* 84 (2011) 141–144.
- Gökçe, İ., Gedikli, F., Uluşu, Y., Bilgin, S., Antiapoptotik Bcl-2 Ailesi Proteinlerinin Yapay Membranlara İnseriyonu, XXV. Ulusal Kimya Kongresi 27 Haziran-2 Temmuz 2011 Erzurum.
- Gökçe, İ., Gedikli, F., Bilgin, S., Uluşu, Y., Rekombinant Tam Boy Antiapoptotik Bcl-XL Proteininin Yapı ve Fonksiyon Çalışmaları, XXV. Ulusal Kimya Kongresi 27 Haziran-2 Temmuz 2011 Erzurum.
- Gökçe, İ., Elmastaş, M., Bilgin, S., Uluşu, Y., Biyokimya Laboratuvarı, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Yayınları No:21 Ders Kitapları Serisi NO: 07, TOKAT-2009
- Gedikli F., Bilgin S., Uluşu Y., Gökçe I., “Anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin immünolojik, fonksiyonel ve yapı çalışmaları için üretilmesi” XXIII. Ulusal Kimya Kongresi 16-20 Haziran 2009
- Mutlu, E., Bilgin, S., Solmaz, M., Gökçe, İ., *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* Mikroorganizmalarının Çeşitli Biyolojik Materyallerden PCR ile Tanısı., XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Cumhuriyet Üniversitesi 16-20.06.2009, Sivas
- Solmaz, M., Bilgin, S., Gökçe, İ., Gram Negatif Patojen Mikroorganizmaların Moleküler Olarak PCR ile Teşhisi., XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Cumhuriyet Üniversitesi 16-20.06.2009, Sivas.
- Doğan, Z., Elmastaş, M., Bilgin, S., Şahin, A., Karahindiba (*Taraxacum officinale*) Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi., XXIII. Ulusal Kimya Kongresi, Cumhuriyet Üniversitesi 16-20.06.2009, Sivas
- Bilgin, S., Mutlu, E., Gökçe, İ., PCR Enhancer Olarak Yeni Kimyasalların Kullanılabilirliği., XXII. Ulusal Kimya Kongresi, Doğu Akdeniz Üniversitesi, 06-10. 10.2008, Mağusa, K.K.T.C

- Gedikli, F., Bilgin, S., Avşar, İ., Gökçe, İ., SDS-PAGE’de Coomassie “brillant blue” ya Alternatif Boyar Maddeler., XXII. Ulusal Kimya Kongresi, Doğu Akdeniz Üniversitesi, 06-10. 10.2008, Mağusa, K.K.T.C.
- Çimen, M., Elmastaş, M., Bilgin, S., Karaalp, M., Karayaka ve Gıcık Koyunlarında Süt Verimleri ve Kompozisyonları ile Kuzu Canlı Ağırlıklarının Karşılaştırılması., V. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, 05-08. 08.2007, Van.
- Yüksek, H., Elmastaş, M., Calapoğlu, M., Bilgin, S., Synthesis and Antioxidant Activities of Some New 4-Heteroarylidenamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one Derivatives, International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, ASMC 07, St. Petersburg, Russia - August 27 - 31, 2007.
- Yüksek, H., Elmastaş, M., Calapoğlu, M., Bilgin, S., Tağıyev, B., Antioxidant Activities of Some New 4-Heteroarylidenamino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one Derivatives, International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, ASMC 07, St. Petersburg, Russia - August 27 - 31, 2007.