



**MİKROBİYAL KAYNAKLI SELÜLAZ ENZİMİNİN
E.coli'de REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ**

Hülya KUDUĞ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Prof. Dr. İsa GÖKÇE
2013
Her hakkı saklıdır**

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYAL KAYNAKLI SELÜLAZ ENZİMİNİN *E.coli*'de
REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ

Hülya KUDUĞ

TOKAT
2013

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. İsa GÖKÇE danışmanlığında, Hülya KUDUĞ tarafından hazırlanan bu çalışma 04/01/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Şaban TEKİN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

İmza:

Üye: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Namı ÇAGMAN

Enstitü Müdürü

01.02.2013

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 içerdiği 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.

Hülya KUDUĞ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MİKROBİYAL KAYNAKLI SELÜLAZ ENZİMİNİN *E.coli*'de REKOMBİNANT OLARAK ÜRETİLMESİ

Hülya KUDUĞ

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Bitki biyokütlesinin ana bileşeni olan selüloz dünyada en yüksek oranda bulunan organik polimerdir. Selüloz polimeri D-glukoz birimlerinin β -1,4-glikozidik bağlar ile linear bir şekilde bağlanması ile oluşur. Selüloz, endoglukanaz, ekzoglukanaz ve β -glukosidaz enzimleri ile monomeri olan glikoza hidroliz olabilmektedir. Selüloz enzimleri büyük ölçüde fungus ve bakterilerden elde edilmekte ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu enzimlerden biri olan endoglukanaz enzimi gıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, biyoyakıt, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, atıkların giderimi gibi birçok alanda endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu çalışmada endüstriyel uygulamalarda kullanılabilecek rekombinant selüloz (β -1,4-endoglukanaz) enziminin üretimi hedeflenmiştir. Asidik ortamda selüloz aktivitesi gösteren *Bacillus subtilis* suşundan izole edilen yhfE endoglukanaz geni, pTolT vektör sistemine klonlanmış ve ekspresyon amacıyla *E.coli* BL21(DE3)pLysE ve BL21 AI hücrelerine transforme edilmiştir. Böylece TolAIII-yhfE füzyon proteinin üretimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Proteinimizin yapı olarak doğru bir şekilde katlandığı “circular dichroism” (CD) spektroskopisi çalışmaları ile ispatlanmıştır. Üretilen rekombinant proteininin karakterizasyon çalışmaları yapılarak elde edilen verilere göre uygun bir endüstriyel alanda ticari olarak kullanılabilir.

2013, 92 sayfa

Anahtar kelimeler: Selüloz, *E.coli*, Rekombinant protein, Endoglukanaz

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

EXPRESSION OF RECOMBINANT MICROBIAL CELLULASE IN *E.coli*

Hülya KUDUĞ

Gaziosmanpasa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. İsa GÖKÇE

Cellulose is an organic polymer that is the main component of plant biomass and has the highest rates in the world. Cellulose consist of linear D-glucose units that connecting with β -1, 4-glikosidic bonds. Cellulose can be hydrolyzed to glucose monomer with endoglucanase, exoglucanase and beta-glucosidase. Cellulase enzymes are usually obtained from fungi and bacteria, and has various biotechnological applications. One of these enzymes is endoglucanase used in industrial applications in many areas such as waste removal food, animal feed production, textiles, bio-fuel, pulp and paper industry. In this study, it is aimed that production of recombinant cellulase (beta-1,4-endoglucanase) for industrial applications. yhfE cellulase gene is isolated from *Bacillus subtilis* strain which has cellulase activity in an acidic medium, it is cloned to pTolT vector system and than transformed to *E.coli* BL21(DE3)pLysE and BL21 AI cells for expression of protein. Thus, TolAIII-yhfE fusion protein was produced successfully. Structurally, proper folding of yhfE cellulase protein is demonstrated by using circular dichroism (CD) spectroscopy. The recombinant protein can be used in a suitable industrial area according to the data obtained by characterization studies of protein.

2013, 92 pages

Keywords: Cellulose, *E.coli*, Recombinant protein, Endoglucanase

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmam süresince bilgi ve tecrübesiyle bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan, öneri ve fikirlerinden yararlandığım hocalarım; Prof. Dr. Şaban TEKİN ve Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını proje ile destekleyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Sema BİLGİN ŞENTÜRK'e ve Öğr. Gör. Yakup ULUSU'ya, teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim annem Fatma, babam Ahmet, abim Harun ve eşi Elise KUDUĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Hülya KUDUĞ

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. KURAMSAL TEMELLER	1
2.1 Endüstriyel Enzimler	3
2.2 Mikrobiyolojik Yöntemlerle Enzim Üretimi	4
2.3 Rekombinant DNA Teknolojisi ile Enzim Üretimi	7
2.3.1. Rekombinant DNA Teknolojisinin Temelleri	7
2.4. Lignoselülozik Biyokütlelerin Bileşimi	11
2.4.1 Selüloz	12
2.4.2. Hemiselüloz	17
2.4.3. Lignin	18
2.5 Selülozun Biyodegradasyonu	19
2.6. Selülaz ve Mikroorganizmalarda Selülotik Enzim Sistemleri	20
2.7. Selülitik Bakteriler	23
2.8. Selülozun Hidroliz Mekanizması	24
2.9 Selülazın Yapısı	25
2.10 Selülazların Endüstriyel Uygulamaları	27
2.10.1. Gıda Biyoteknolojisinde Selülaz Uygulamaları	28
2.10.2. Şarap ve Bira Endüstrisinde Selülazların Kullanımı	29
2.10.3. Hayvan Yemi Endüstrisinde Selülazların Kullanımı	30
2.10.4. Tekstil Endüstrisinde Selülazların Kullanımı	30
2.10.5. Kağıt Hamuru ve Kağıt Biyoteknolojinde Selülazların Kullanımı	32
2.11. Aktivite Tayini	33
2.12 <i>Bacillus</i> ve Özellikleri	35
2.13 Selülazların Substratları	37
2.13.1. Suda Çözünen Substratlar	37

2.13.2	Suda Çözünmeyen Substratlar.....	39
2.14.	Selülag Çalışmaları.....	40
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	44
3.1	Materyal.....	44
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar	44
3.1.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	45
3.1.3.	Kullanılan Çözeltiler	46
3.2	Yöntem (yhfE Endoglukanaz Proteininin Rekombinant Olarak Üretilmesi).....	50
3.2.1	<i>Bacillus</i> Suşlarında Selülag Aktivitesinin Kalitatif Olarak Araştırılması.....	50
3.2.2.	Selülag Genlerinin Araştırılması.....	51
3.2.3.	PCR İşlemleri İçin Selülag Genlerine Ait Primerlerin Tasarımı.....	51
3.2.4.	Selülag Aktivitesi Tespit Edilen <i>Bacillus</i> Suşlarında PCR ile Selülag Genlerinin Araştırılması.....	53
3.2.5	PCR ürünlerinin Saflaştırılması	54
3.2.6.	Restriksiyon Enzimleri ile Kesim	54
3.2.7.	DNA Ligasyonu.....	56
3.2.8.	DH5 α Hücrelerinin Transformasyonu.....	56
3.2.9	Plazmid DNA Saflaştırılması.....	58
3.2.10	Plazmid DNA'ların Restriksiyon Enzimleri ile Analizi.....	59
3.2.11	DNA Dizileme.....	60
3.2.12.	<i>E. Coli</i> BL21(DE) pLysE ve BL21 AI Hücrelerinin pTolT-yhfE Plazmidi ile Transformasyonu.....	60
3.2.13	TolAIII-Selülag (yhfE endoglukanaz) Füzyon Proteinin Üretilmesi (İndüksiyon).....	61
3.2.14	<i>E. Coli</i> BL21(DE) pLysE ve BL21 AI Hücrelerinin Parçalanması.....	62
3.2.15	Ultrasantrifüjle Proteinlerin Ayrım.....	62
3.2.16	Afinite Kromatografisi ile Füzyon Proteinin Saflaştırılması.....	63
3.2.17	SDS-PAGE ile TolAIII, Selülag (yhfE endoglukanaz) Füzyon Proteinin Kantitatif Analizi.....	63
3.2.18	Saflaştırılan Füzyon Proteinden Diyaliz Yöntemi ile İmidazol Uzaklaştırılması.....	63
3.2.19	Saflaştırılan Füzyon Proteinin Kantitatif Analizi.....	64
3.2.20	TolAIII, Selülag (yhfE endoglukanaz) Füzyon Proteinin Thrombin ile Kesilmesi.....	64
3.2.21.	Selülag (yhfE endoglukanaz) Proteinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması	64
3.2.22.	Selülag(endoglukanaz) Proteinin Aktivitesinin Araştırılması.....	65
3.2.23	Circular Dichorism(CD) Spektroskopisi ile Füzyon Proteinin Sekonder Yapı Analizi.....	65
3.2.24.	Selülag (yhfE endoglukanaz) Proteinin MALDI-TOF Spektroskopisi Analizi.....	66

4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	67
4.1.	<i>Bacillus</i> Suşlarında Selülag Aktivitesinin Kalitatif Olarak Araştırılması	67
4.2.	Selülag Genlerinin Araştırılması	68
4.3.	Selülag Genlerine Ait Primer Tasarımı	69
4.4.	Selülag Genlerinin PCR ile Araştırılması	70
4.5.	PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	71
4.6.	Plazmid DNA'ların Restiriksiyon Enzimleri ile Analizi	71
4.7.	TolAIII-Selülag (endoglukanaz) Füzyon Proteininin Ekspresyon Çalışmaları ...	73
4.8.	TolAIII-yhfE Füzyon Proteininin Saflaştırılması	73
4.9.	Dizileme Analizi	75
4.10.	TolAIII-yhfE Füzyon Proteinin Thrombin ile Kesimi	77
4.11.	yhfE endoglukanaz Proteininin MALDI-TOF Spektroskopisi	77
4.12.	yhfE endoglukanaz Proteininin CD Spektroskopisi	80
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
	KAYNAKLAR	83
	ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
bç	baz çifti
G	Glisin
μ l	mikro litre
μ M	mikro molar
M	Molar
mM	mili molar
nm	nano metre
P	Fosfat
rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatory per minute)
T	Timin

Kısaltmalar	Açıklama
amp	Ampisilin
APS	Amonyumpersülfat
ATP	Adenozintrifosfat
BSA	Sığır (Bovine) Serum Albümini
CD	Circular Dichrosizm
CMC	Karboksimetilselüloz
ddH ₂ O	Çift distile su (Double distilled water)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNS	Dinitro Salisilik Asit
dNTP	Deoksiribonükleosit trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>B.subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FSB	Frozen Storage Buffer

IPTG	İzopropil β -D-1 tiyogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
ME	Merkaptoetanol
OD	Optik dansite
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIPES	piperazin-N,N'-bis (2-etanesülfonik asit)
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
SEM	Scanning Electron Microscopy
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 2.1.	Endüstriyel enzimlerin kullanıldığı sektörlere göre dağılımları.....	3
Şekil 2.2.	Gen klonlamasının temel ilkeleri.....	8
Şekil 2.3.	Selüloz monomeri.....	13
Şekil 2.4.	Selülozun yapısı.....	13
Şekil 2.5.	Selüloz ve ksiloglukanın moleküler yapıları.....	16
Şekil 2.6.	Hemiselüloz yapısı.....	18
Şekil 2.7.	Selüloz molekülleri arasındaki hidrojen bağları.....	19
Şekil 2.8.	Selülozun glukoza hidrolizi.....	22
Şekil 2.9.	Selülaz alt birimleri.....	26
Şekil 2.10.	Pamuklu kumaş dokularının SEM görüntüleri.....	31
Şekil 3.1.	pTolT vektörünün dairesel haritası ve poli-linker bölgesinin restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi.....	52
Şekil 4.1.	Farklı <i>B. subtilis</i> suşlarında selülaz aktivitesinin araştırılması.....	67
Şekil 4.2.	Selülaz genlerinin PCR ile araştırılması sonucu elde edilen jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.3.	Elde edilen pTolT-yhfE plazmid DNA'nın dairesel haritası.....	72
Şekil 4.4.	Restriksiyon enzim kesiminin agaroz jel ile analizi.....	72
Şekil 4.5.	pTolT-yhfE plazmid DNA'sın BL21 AI vektörüne transformasyonu ile gerçekleştirilen ekspresyon çalışmasına ait %12'lik SDS PAGE jel görüntüsü.....	76
Şekil 4.6.	pTolT-yhfE plazmid DNA dizileme sonucunun kromotogram şeklindeki görüntüsü.....	76
Şekil 4.7.	TolAIII + yhfE füzyon proteininin trombin ile kesimine ait %15'lik SDS PAGE jel görüntüsü	77
Şekil 4.8.	CD için dominant karakterdeki yapılarıyla bilinen proteinlerin referans spektrumları.....	78
Şekil 4.9.	yhfE endoglukanaz proteininin Far UV CD spektrumu.....	78
Şekil 4.10.	Endoglukanaz proteininin kristal yapısı.....	79

Şekil 4.11. yhfE endoglukanaz proteininin 220 nm deki CD spektrumu	79
Şekil 4.12. yhfE endoglukanaz proteininin MALDI-TOF spektroskopisi.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Elde edildikleri kaynaklara göre mikrobiyal enzimler.....	6
Çizelge 2.2. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları.....	9
Çizelge 2.3. Selülaz çalışmaları.....	41
Çizelge 3.1. Birinci kesim için gereken madde miktarları.....	54
Çizelge 3.2. İkinci kesim için gereken madde miktarları.....	55
Çizelge 3.3. Ligasyon için gereken madde miktarları.....	56
Çizelge 3.4. Restriksiyon enzimleri ile analiz.....	59
Çizelge 4.1. Toprak örneklerinden izole edilen ve selülaz aktivitesi araştırılan mikroorganizmalara ait MALDI-TOF ve 16s rDNA dizi analizi sonuçları.....	68
Çizelge 4.2. Primer tasarımında kullanılan selülaz genleri ve özellikleri.....	69
Çizelge 4.3. Tasarlanan primerler.....	69

1. GİRİŞ

Enzimler, canlılar tarafından doğal olarak sentezlenen protein yapısında ya da bir kısmı protein olan biyo-moleküllerdir. Enzimlerin kullanımı binlerce yıl öncesinde varlığı ve görevi bilinmeden kullanılmıştır. Enzimlerin kullanımına dair ilk bulgular eski Mısır'a kadar dayanmaktadır. Yakın tarihte ise Doğu ülkelerinde birçok gıda fermentasyonu için ipliksi mantarlar enzim kaynağı olarak kullanılmaktadır (Uhlig, 1998).

Bu dönemlerde dericilikte, deri yumuşatılması işleminde proteaz enzimi bulunduran köpek ya da güvercin dışkısı kullanıldığı bilinmektedir. Bu yüzyıl başlarında Alman kimyacı "Otto Röhm" bu enzimin hayvansal organlardan elde edilerek köpek dışkısı yerine kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Böylece 1905'den itibaren domuz ve sığır pankreasları güvenilir bir enzim kaynağı olarak ön plana çıkmıştır (Smith, 1996). Bitkisel kaynaklı enzimlerden bira üretiminde kullanılan malt amilazı içecek endüstrisinde önemli bir yer tutmaktadır (John,1987).

Tarihsel gelişim içerisinde enzimler farklı kaynaklardan elde edilmiştir. Bunlar bitkisel, hayvansal ya da mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir. Bugüne kadar yaklaşık 2500 farklı enzim tanımlanmış ve bunların ancak %10'u ticari alanda kullanım için kendilerine yer bulmuşlardır. Bunlardan ise ancak 25 tanesi nişasta sanayi ile deterjan katkı maddesi olarak kullanılmış olup, ticari alanda yararlanılan bütün enzimlerin %80'ini oluşturmaktadırlar (Rao ve ark., 1998). Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, mikrobiyal enzimlere olan ilginin artmasına neden olmuştur. Geniş biyolojik çeşitliliği ve genetik manipülasyonlara uygunluğu nedeniyle mikroorganizmalar mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao ve ark., 1998). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir (Wolfgang, 2004).

Mikrobiyal enzimlerin dünya genelinde yıllık kullanım değerlerine bakıldığı zaman, alkalın proteaz %25, diğer proteazlar %21, Amilaz %18, Renin %10, analitik ve farmasötik enzimler %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selülaz ve ksilanaz

gibi) %10, tripsin %3, lipaz %3; şeklinde bir dağılımla karşılaşılmaktadır (Rao ve ark., 1998).

Endüstriyel amaçlı kullanılan enzimler düşük maliyetle üretilmeli, tekrar kullanılabilir özellikte olmalı ve sabit verimlilikle tekrar üretilmelidir. Birçok ticari enzim, üretim şartları ve üretimini sağlayacak mikroorganizmanın seçimi açısından uygun özellikte olan enzim karışımları şeklinde üretilmektedir. *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri lignoselülozların degradasyonunu sağlayan en iyi enzim üreticileridir. *Humicola*, *Talamyces*, *Acrophialophora*, *Thermoascus*, *Bacillus* ve *Penicillium* türlerinin suşları yaygın olarak bilinen diğer organizmalardır. (Rao ve ark., 1998).

Endüstriyel selüloz enzimleri hedeflenen ticari uygulamalara özel olarak üretilen ve bu alanda yaygın olarak kullanılan ticari ürünlerdir. Bununla birlikte, enzimatik biyokütle hidrolizi açısından öneminden dolayı selülozların birçok ticari yönü araştırılmakta ve çalışılmaktadır. Örneğin süperselülotik mutantlar ile selüloz üretimi, yüksek spesifik aktivite gösteren selüloz üreten organizmaların genetik mühendisliği ile yapılandırılması, kompleks polimerlerin çoklu enzim sistemleri ile teorik olarak mekanizmalarının hesaplanması gibi çalışmalara verilen önem artmıştır. İleri biyoteknoloji teknikleri ile birlikte mühendislikteki önemli gelişmeler, yeni uygulama alanlarına ve spesifik uygulamalara uygun yüksek aktiviteye sahip enzim uygulamalarına olanak sağlamıştır. Geliştirilmiş bu enzim çalışmaları ile yüksek katalitik aktivite, yüksek sıcaklık ya da belirli pH değerlerinde stabil olma, son ürün inhibisyonuna karşı tolerans gösterme gibi farklı karakteristiklere sahip enzimler üretilmektedir (Rao ve ark., 1998).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Endüstriyel Enzimler

Enzimler, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonları katalize eden protein yapısında moleküllerdir. Hücrelerde önemli metabolik görevleri olan enzimler günlük ve ekonomik hayatta farklı kullanım alanlarına sahiptirler (Wiseman, 1987).

Endüstriyel enzim kaynağı olarak mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, daha yüksek katalitik aktivite göstermeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleri sebebiyle bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha çok tercih edilmektedir (Wiseman, 1987). Enzim üretimi için seçilen mikroorganizmalar, yalnızca enzim üretim kapasitelerine göre değil, mikroorganizmaların toksik ve patojen olmamasına göre de seçilmektedir (Demain ve Solomon, 1981).

Ticari olarak kullanılan enzimlerin endüstriyel bir ürünün üretilmesinde bazı avantajlara sahip olması gerekmektedir. Buna göre, bir enzimin herhangi bir endüstri alanında kullanılabilmesi maliyet bakımından ucuz olması, çok farklı alanlarda kullanılabilme özelliğinde olması ve en önemlisi de enzimin alerjik ya da toksik etkiye sahip olmaması, yani güvenilir olmasına bağlıdır (Wiseman, 1987; Sarıkaya, 1995).



Şekil 2.1. Endüstriyel enzimlerin kullanıldıkları sektöre göre dağılımları (Anonim, 2007)

Hidrolitik enzimler endüstriyel enzimlerin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. Proteaz grubundaki enzimler kullanımda ilk sırayı alırken, karbonhidratları parçalayanlar ikinci

sırada yer almaktadırlar (Hamilton ve ark., 1999; Bhat, 2000). Karbonhidrat parçalayan enzimlerden amilazlar, enzim piyasasında yaklaşık %25'lik bir paya sahiptir (Sindhu ve ark.,1997; Rao ve ark.,1998). Son zamanlardaki en etkin uygulamaları kağıt hamuru beyazlatılması olan ksilanazların endüstride kullanımı gün geçtikçe artmaktadır (Wainq ve Ingworsen, 2003).

Dünya pazarı incelendiğinde endüstriyel enzimlerin 1.6 milyar dolarlık ticari pazar payına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Bu enzimler sektörlere göre %29 gıda endüstrisi, %15 hayvan yemi sektörü ve %56 genel amaçlı teknik alanlar şeklinde dağılım göstermektedirler (Uhlig, 1998).

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

2.2. Mikrobiyolojik Yöntemlerle Enzim Üretimi

Enzimler hücreler için hayati önem taşıdıkları gibi gıda ve diğer endüstriyel alanlarda teknolojik açıdan da önemlidirler. Örneğin; şarap, bira, meyve suyu, süt, tekstil, yün, deri, kağıt endüstrilerinde, çeşitli organik maddelerin ticari preperasyonlarında kullanılır. Her ne kadar ticari enzim endüstrisi, geniş bir gelişme halinde ise de, enzimlerin kimyasal bileşimleri hakkında fazla bilgi sahibi olunmadığı durumlarda da peynir, bira fermentasyonu gibi diğer alkollü içeceklerin üretiminde de bunların kullanımları söz konusu olmuştur (Topal, 1985).

Mikrobiyal yolla üretilen fungal enzimler ilk defa 20. Yüzyılın başlarında ticari olarak kullanılırken, bakteriyel enzimlerin kullanımının ise I. Dünya Savaşı sırasında başladığı bilinmektedir. İlk kez yaşayan hücreden aktif enzimin ayrılabilceğinin demonstrasyonu 1897'de Buchner tarafından yapılmıştır. Bu işlemi, mayanın alkol fermentasyonunun

başlangıcında katılması yerine, yaşayan hücre olmadan maya ekstraktından yararlanılmak suretiyle göstermiştir (Topal, 1985).

Her ne kadar hayvansal ve bitkisel hücrelerden yararlanılarak enzim elde etme olanakları varsa da, teknik ve ekonomik yönden mikrobiyal kaynaklı enzimler daha avantajlıdır. Çünkü hayvansal kaynaklı enzimler ancak et endüstrisinin yan ürünü olduğu zaman ekonomik olurlar ve önem kazanırlar. Hayvansal ve bitkisel kaynaklı dokuların miktarları kısıtlıdır. Çünkü bunlar kullanılabilir toprak alanına, iş gücüne, mevsim ve iklim şartlarına bağlı olarak değişir ve elde edilen ürünün kalite ve kantitesi de bu faktörlere bağlı olarak standart olmaktan uzaklaşır (Topal, 1985).

Endüstriyel yolla enzim üretiminde mikroorganizmalardan kaynak olarak yararlanılması, yeterli olmayan enzim potansiyelinin tamamlanması bakımından ilk ve en büyük avantajdır. İkinci büyük avantaj mikroorganizmalardan pek çok sayıda enzimi ekonomik olarak üretmek mümkündür. İyi seçilmiş organizma suşları ile herhangi bir enzim üretimi genellikle mümkündür. Ancak tek bir organizma ile çalışmak bazen dezavantaj olabilir.

Genellikle bir endüstriyel proses yalnızca spesifik bir enzimatik değişimi talep eder, ancak bir enzim kontaminasyonu söz konusu ise, istenmeyen ve farklı sonuçlar veren reaksiyonlar gerçekleşebilir. Bu nedenle istenmeyen enzim kontaminasyonunu uzaklaştırmak gerekirse bu işlem zor ve pahalı olabilir. Differansiyel inaktivasyon, fraksiyonel presipitasyon ve kolon kromatografisi gibi enzim saflaştırma metotlarının geniş ölçüde uygulanabilirlik kazanması ile, enzim üreticileri için uygun ticari ürünler elde edilmiştir (Topal, 1985).

Ticari enzimler bakteri, küf ve mayalar olmak üzere üç gruptan elde edilebilirler. Ticari öneme sahip bazı enzimler elde edildikleri kaynaklara göre aşağıdaki çizelgede sınıflandırılmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Elde edildikleri kaynaklara göre mikrobiyal enzimler (Topal, 1985)

	Organizma	Enzim
Küf	<i>Aspergillus oryzae</i>	Amilaz, Proteaz
	<i>Aspergillus niger</i>	Amiloglukosidaz, Katalaz, Amilaz, Selülaz, Pektinaz
	<i>Rhizopus spp.</i>	Amilaz, Amiloglukosidaz, Lipaz
	<i>Penicillium spp.</i>	Pektinaz, Lipaz
	<i>Mucor spp.</i>	Proteaz, Lipaz
	<i>Trichoderma viride</i>	Selülaz
Bakteri	<i>Bacillus subtilis</i>	Proteaz, Selülaz, Amilaz
	<i>Bacillus mesentericus</i>	Proteaz
	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Katalaz
	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	Streptokinaz, Streptodomaz
Maya	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	İnvertaz
	<i>Saccharomyces fragilis</i>	Laktaz

Mikrobiyal yolla enzim üretiminde en önemli basamak enzimi üretecek olan suşun seçimidir. Bu suşların seçiminde patojen olmamaları, toksik olmayan ürünler üretmeleri ve biyolojik olarak yüksek stabiliteye sahip olmaları dikkat edilmesi gereken özelliklerdir (Topal, 1985).

Ayrıca kültürler saf suşlar halinde olup, çok iyi şartlarda saklanmış olması gerekir. Bunlar liyofilize veya yatık agar kültürleri şeklinde saklanmış olabileceği gibi optimum şartlarına çok dikkat etmek ve her pasajında kontaminasyon kontrolü yapmak gerekir. Bunun yanında kültürün mutasyona uğramamış olması da gerekmektedir (Topal, 1985).

Maksimum ürün eldesi için çevresel faktör olarak besin maddesi seçimi en önemli faktörlerden biridir. Besi ortamının karbonhidrat, nitrogen, mineral madde bakımından yeterli olması gerekir. Ayrıca seçilecek fermentasyon tipine bağlı olarak sıvı veya katı ortam oluşuna göre, çeşitli köpük kırıcı ya da viskozite faktörleri de önem taşımaktadır. Ayrıca ortam seçimi saflaştırma basamağı dolayısıyla ürün maliyeti açısından önemlidir (Topal, 1985).

2.3. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Enzim Üretimi

Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine gen klonlaması adı verilmektedir. Gen klonlama rekombinant DNA teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasıdır (Arda,2000; Kuk ve Erensoy, 2008).

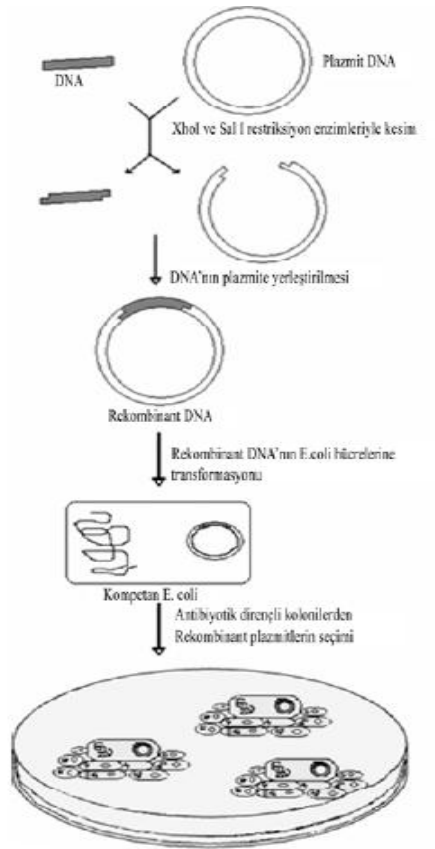
Günümüzde gen klonlaması çalışmaları; gen izolasyonu, gen bankalarının oluşturulması, genlerin güvenlik altına alınarak onların yapı ve fonksiyonları üzerinde araştırmalar yapılması, klonlanan genlerin üzerinde mutasyonlar yapılarak fonksiyonel bölgelerin belirlenmesi, DNA dizi analizlerinin kolaylaştırılması, DNA aşılarının oluşturulması ve rekombinant proteinlerin açıklatılması gibi amaçlarla yapılmaktadır (Alberts,1994; Brown, 1990).

Klonlamada vektör olarak; virus ve bakteriler, bakteriyofajlar, plazmitler, nadir olarak da kozmid ve mayalar kullanılmaktadır. Viral vektörler, genlerin hücrelere aktarılması ve gen ekspresyon çalışmaları için virüslerin modifikasyonu ile oluşturulmuşlardır. Bu amaçla *herpes*, *adeno*, *retro*, *vaccinia*, *polyoma*, *baculovirus* gibi birçok DNA ve RNA virusu vektör olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte *S. typhimurium*, *E. coli*, *Bacille Calmette Guerin* (BCG) suşu gibi bakteriler de klonlamada denenmektedir. Bakteriofajlar; virus olarak bilinen, bakterileri infekte eden, çoğunlukla DNA nadiren de RNA içeren ve proteinden yapıli kapsit ile çevrilmiş basit yapılardır. Kozmitler; *cos* dizisi ile *mid* dizisinin laboratuvar ortamında birleştirilmesiyle oluşturulurken ve 45 kb.'lik DNA'ların klonlanmasına olanak veren vektörlerdir (Grim, 2007).

2.3.1. Rekombinant DNA Teknolojisinin Temelleri

Gen klonlamanın temel ilkeleri Şekil 2.2'de özetlenmiştir. Hedeflenen DNA için taşıyıcı rolündeki küçük ve sirküler yapıli moleküllere vektör adı verilmektedir. Organizma genomundan elde edilen DNA parçasının vektöre yerleştirilmesi klonlamanın temelini oluşturur. Vektör DNA'sına, organizmaya ait bir DNA'nın

yerleştirilmesiyle oluşturulan moleküle rekombinant DNA adı verilmektedir ve bu molekülün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda bakterilerin bölünmesiyle rekombinant DNA’da replike olan klon olarak isimlendirilen kopyalar meydana getirilmektedir. Klonlanan DNA transforme edilen hücrelerden saflaştırılarak doğrulanmaktadır (Sambrook,1989).



Şekil 2.2. Gen klonlamasının temel ilkeleri
(Kuk ve Erensoy, 2008)

Hedef Genin Seçilmesi

Hedef geninin seçimi klonlama çalışmalarının en önemli basamaklarından biridir. Yapısı incelenecek, DNA ve protein aşısı çalışmalarında kullanılabilecek bir gen klonlama çalışmalarında hedef olarak seçilebilmektedir. Hedef DNA’nın elde edilmesi

için tasarlanan primerlere, genin vektöre yerleştirileceği bölgeye uygun enzim kesim bölgelerinin eklenmesi önemli noktalardan birini oluşturmaktadır (Doria-Rose, 2003).

Restriksiyon Enzimleri ve DNA'nın Kesilmesi

Restriksiyon enzimleri, fajlara karşı bir savunma mekanizması olarak bakteriler tarafından üretilmektedirler. DNA'yı kesen bu enzimler izole edildikleri bakterilere göre isimlendirilmektedirler. DNA'yı spesifik dizilerden kesen enzimler DNA manipülasyonları için anahtar rol oynamaktadırlar. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir (Kuk ve Erensoy, 2008). Bazı restriksiyon enzimleri anahtar kilit ilişkisi gibi yapışkan uçlar meydana getirirken bazıları da küt uçlar oluşturmaktadırlar (Sambrook, 1989).

Çizelge 2.2. Bazı restriksiyon enzimlerinin izole edildikleri mikroorganizmalar ve DNA tanıma noktaları (Kuk ve Erensoy, 2008)

Enzimin adı	İzole edildiği mikroorganizma	Oluşturduğu uç	Tanım dizisi
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] GATCC-3' 3'-C CTAG [^] G-5'
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] AATTC-3' 3'-C TTAA [^] G-5'
<i>KpnI</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yapışkan uç	5'-GGTAC [^] C-3' 3'-C [^] CATGG-5'
<i>Sal I</i>	<i>Streptomyces albus</i>	Yapışkan uç	5'-G [^] TCGAC-3' 3'-C AGCT [^] G-5'
<i>XhoI</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i>	Yapışkan uç	5'-C [^] TCGAG-3' 3'-G AGCT [^] C-5'

DNA'nın Plazmite Yerleştirilmesi

Gen klonlama işlemlerinde hedef DNA'nın plazmite yerleştirilmesi öncesinde, restriksiyon enzimleriyle kesilen genin ve plazmitin saflaştırılması gerekmektedir. Saflaştırılan gen ve plazmit, T4 DNA ligaz enzimiyle uygun ısı ve reaksiyon koşullarında birleştirilmektedirler. DNA ligazın etki mekanizması bir nükleotidin 3' hidroksil ucu ile diğer nükleotidin 5' fosfat gurubu arasında kovalent fosfodiester bağı oluşturulma temeline dayanmaktadır. T4 DNA ligaz aktivasyonunda kofaktör olarak ATP'ye gereksinim vardır. Bu nedenle ATP içeren T4 DNA Ligaz tamponlarının çok sık dondurulup çözülmemeleri gerekmektedir (Sambrook,1989; Promega, 2007) .

Rekombinant DNA'nın Coğaltılması

Genin plazmite yerleştirilmesi ile elde edilen rekombinant DNA'nın çoğaltılması sonraki çalışmalar için büyük avantajlar sağlamaktadır. Bunun için rekombinant DNA'nın bakteri hücrelerine aktarılması (transformasyon) gerekmektedir. Transformasyon işlemi için, basit ve ucuz olan kimyasal yöntemlerin yanı sıra daha etkin bir metot olan elektroporasyon yöntemi de kullanılmaktadır. Transformasyonda kullanılacak kompetan hücreler ticari olarak satın alınabileceği gibi araştırmacıların kendi laboratuvarlarında da elde edilebilmeleri mümkündür. Bunun için kalsiyum klorid ve rubidyum klorid gibi metotlar yoğun olarak kullanılmaktadır (Inoue, 1990).

Klonlanan Vektörün Hücrelerden Seçimi

Klonlamada karşılaşılan sorunlardan biri de kolonilerden rekombinant plazmitlerin seçimidir. Çoğu zaman transformasyon sonrasında onlarca hatta yüzlerce koloni karşımıza çıkmaktadır. Bunlardan hangilerinin rekombinant plazmitleri içerdiğinin tespiti gerekmektedir. Birçok plazmit, ampisilin, tetrasiklin gibi antibiyotiklere direnç genleri içermektedir. Bu direnç genleri sayesinde rekombinant plazmitlerin seçimi sağlanacaktır (Kaplan ve ark., 2002).

Klonlamanın Doğrulanması

Klonlamanın doğrulanması için transforme katı besiyerindeki kolonilerden, PCR analizi ile kolonilerin rekombinant DNA'yı içerip içermediği hızlı bir şekilde tespit edilebilmektedir. Kolonilerden elde edilen PCR ürününün direkt olarak agaroz jelde yürütülmesi de rekombinant plazmitin doğrulanmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca bu kolonilerden miniprep ile elde edilecek rekombinant DNA'ların varlığı enzim kesim deneyleriyle doğrulanabilmektedir. Fakat sonraki çalışmalarda güvenilirliği arttırmak ve klonlamanın doğrulamasını kesinleştirmek için DNA dizi analizinin yapılması gerekmektedir (Sambrook,1989; Özdemir ve ark., 2003).

2.4. Lignoselülozik Biyokütlelerin Bileşimi

Dünya nüfusundaki hızlı nüfusun artışı sonucu olarak fosil yakıt kaynaklarının hızla azalarak tükeneceği endişesi ve yüksek kalitede enerji ihtiyacından kaynaklanan zehirli ve kalitesiz atıkların büyük çevre problemlerine yol açması bilim adamlarını yeni enerji kaynakları konusunda araştırmalara yöneltmiştir (Lodhi, 1987). Bu sebeple yenilenebilir enerji kaynaklarından biyokütlenin yeri ve önemi tartışılmazdır. Yüksek karbonlu polimerik yapıya sahip olan biyokütle materyalleri genel anlamda depolimerizasyonla parçalanarak veya CO ve H₂ gibi indirgenlerle reaksiyona sokularak yeni kimyasal ürünlere dönüştürülmeye elverişli hammadde kaynaklarıdır (Demirbaş, 1996).

Biyokütle enerjisi yenilenebilir, çevre dostu, yerli ve yerel bir kaynak olarak önem kazanmaktadır (Sayigh, 1999). Biyokütle doğrudan yakılarak veya çeşitli süreçlerle yakıt kalitesi artırılıp, mevcut yakıtlara eşdeğer özelliklerde alternatif biyoyakıtlar (kolay taşınabilir, depolanabilir ve kullanılabilir yakıtlar) elde edilerek enerji teknolojisinde değerlendirilebilir (Çetinkaya ve ark., 2003). Biyokütle kaynaklarından enerji kaynağı olarak yararlanma konusuna ilgi son zamanlarda giderek artmaktadır (Islam ve ark., 2005; Çulcuoğlu ve ark., 2005).

Dünya yıllık bitki ve tarımsal artık miktarı yaklaşık olarak 2 273 080 000 tondur. Türkiye'de ise her yıl 36 milyon 940 bin ton tarımsal artık elde edilmektedir. Bu

miktarın yaklaşık 18 milyon tonunu buğday sapı, 8 milyon tonunu arpa sapı, 3 milyon tonunu pamuk sapı, 2,5 milyon tonunu mısır sapı, 2,5 milyon tonunu ayçiçeği sapı, 2 milyon tonunu kendir kenevir, 200 bin tonunu pirinç sapı, 240 bin tonunu çavdar sapı, 300 bin tonunu tütün sapı, 200 bin tonunu göl kamışı oluşturmaktadır (T.C.Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları, Tarımsal Yapı ve Üretimi, Ankara, 1995).

Yüksek bitkilerin hücre duvarları lignoselüloz içerir. Ligninin ayrılması durumunda geriye polisakkarit türevi kalır. Bitki hücresindeki polisakkaritlere haloselüloz da denir. Haloselülozlar selülozlar ve hemiselülozlardan oluşur (Beyatlı, 1996). Lignoselülozik doğal kaynakların temel bileşenleri selüloz, hemiselülozlar, ligninler, özütlenebilir maddeler ve inorganiklerdir. Doğada selüloz; çeşitli nişasta, pektin ve hemiselüloz gibi polisakkaritlere bağlı olarak bulunur. Hemiselülozlar ise galaktoz, mannoz, ksiloz, arabinoz ve diğer şekerlerle; üronik asitlerin polimerleri ve heteropolimerlerini içerirler. Bunlara ek olarak, doğadaki hemen hemen her selüloz, selüloz-lignin karışımı halinde bulunur (Parisi, 1989).

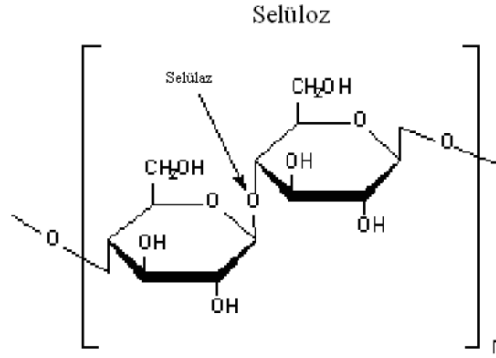
2.4.1. Selüloz

Bitki dünyasında en fazla bulunan ve en basit yapıya sahip olan, aynı zamanda hücre duvarı yapısında yer alan yapısal polisakkaritlerin en önemlilerinden birisi selülozdur (Eriksson ve ark., 1990).

Selüloz bitki biyokütlesinin ana bileşenidir dünyada en yüksek oranda bulunan organik polimerdir. Dünyadaki selülozun toplam miktarı 7. 10¹¹ tondur (Coughlan, 1985).

Fotosentez sırasında karbondioksit ve su D-glukoza dönüşür. D-glukoz 2 anomerik formda bulunur, α -D-glukoz ve β -D-glukoz. α -D-glukoz ve β -D-glukoz (D-glukopiranozil) açık zincirli aldehit formu ile denge halinde bulunur. D-glukoz selülozun ana bileşenidir. Anomerik karbon C1 üzerindeki aldehid grubu gümüş ya da bakır gibi metal iyonlarını indirgeme özelliğine sahiptir. Bu aldehid grubu metal iyonlarını indirgerken karboksilik asite yükseltgenir. Serbest C1 karbonuna sahip olan glukoz ve diğer karbohidratlar indirgen şeker olarak isimlendirilir. D-glukoz selülozun

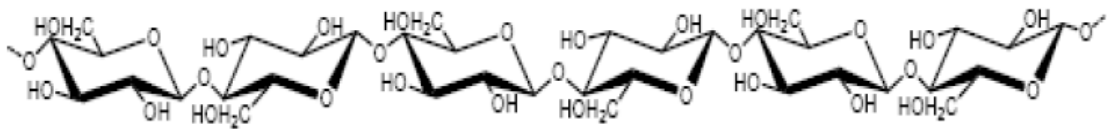
ana bileşenidir selülozun büyük kısmı yüksek bitkilerde hücre duvarı bileşeni olarak sentezlenir. En önemli fonksiyonu yüksek bitkilerde yapısal bileşen olmasıdır. Selüloz β -D-glukoz birimlerinden oluşmaktadır.



Şekil 2.3. Selüloz monomeri

Hücre duvarında hemiselüloz ve lignin bir arada kompleks bir yapı oluşturur. Bu yapıda lignin, hemiselüloz ve selüloz arasında kovalent bağ oluşumu gözlenir (Scalbert,1985; Higuchi, 1990).

Selüloz molekülünün büyüklüğü (polimerizasyon derecesi) bitki hücresinin duvarında bulunan ikincil duvarda her molekülde 500'den daha az glukoz biriminin bulunmasına bağlı olarak değişir (Ljungdal ve Eriksson, 1985). Selülozun yapısı Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Selülozun yapısı (Valenzuela, 2006)

Selüloz β -1,4 glikozidik bağ ile bağlı glukoz birimlerinden oluşan lineer homopolisakkarittir. Glukoz halkası sandalye konformasyonundadır. Selülozun tekrarlayan en küçük alt birimi bir disakkarid olan selobiozdur. Glukozun selobioz şeklindeki bu

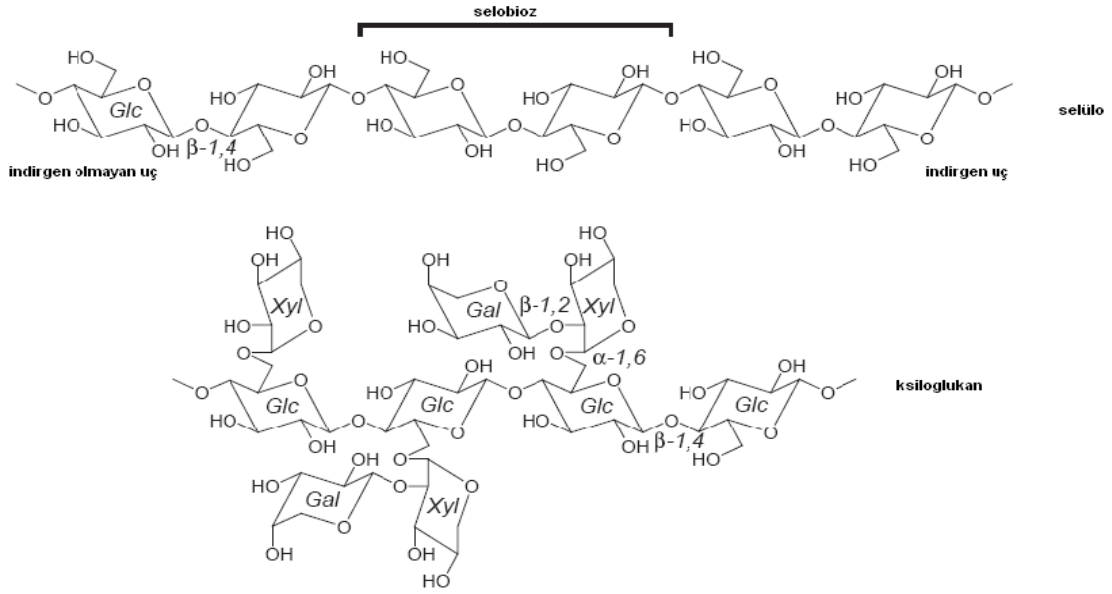
düzenlenmesi selüloz zincirinin karşılıklı oksijen grupları üzerinden uzamasına olanak sağlar. Glukoz birimlerinin sayısı yani selülozun polimerleşme derecesi (DP) elde edildiği kaynağa bağlı olarak 100-1400 arasında değişir. Hücre duvarında selüloz, selüloz zincirlerinin inter ve intra H- bağları ile bir araya gelmesiyle oluşan kristalize selüloz fibrilleri şeklinde bulunur. Selüloz-I adı verilen doğal selülozda glukoz zincirleri paralel düzendedir. Tüm indirgen uçlar ve indirgen olmayan uçlar fibrilin aynı tarafında bulunur. Son dönemde gerçekleştirilen yapı çalışmaları doğal selülozun 2 farklı kristal yapıda bulunduğunu göstermiştir. Bu yapılar iki zincirli monoklinik faz I β ve tek zincirli triklirik faz I α .dır (Atalla, 1993; Heiner et al., 1995). Selülozun elde edildiği kaynağa göre I β ve I α yapılarının oranları değişiklik gösterir. *Acetobacter xylinum* ve *Valonia ventricosa*.’dan elde edilen Algal ve bakteriyal selüloz I α .bakımından zengindir. Buna karşın yüksek bitkilerde baskın olan form I β yapısıdır. Ayrıca fibrillerin kalınlığı da elde edildiği kaynağa bağlı olarak değişiklik gösterir (Atalla, 1993; Sugiyama et al., 1991; 1993). Algal *Valonia* selülozunun kalınlığı 20 nm iken yüksek yapılı bitkilerde hücre duvarında yer alan selüloz fibrillerinin kalınlığı 2 nm olabilir (Chanzy, 1990). Selüloz fibrilleri yalnızca kristal yapıda değildir, daha düzensiz amorf bölgeler de içerirler. Kristalizasyon düzeyi de selülozun elde edildiği kaynağa göre değişiklikler gösterir. Selülozun kristalizasyon indeksi göreceli bir özelliktir, X-ray ve katı faz NMR yöntemi ile ölçülebilir. *Valonia*’ dan izole edilen selüloz %100 kristalize olarak kabul edilir (Kulshreshta ve Dwelz, 1973).

Daha önce de belirtildiği üzere, glukoz zincirinin sonunda yer alan başka bir glukoz artığına bağlı olmayan anomerik karbon polimerin indirgen ucu olarak ifade edilir. Polimerin diğer ucu ise indirgen olmayan uçtur. Sentezden hemen sonra selüloz zinciri, selüloz mikrofibrillerinin H-bağı, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri etkisi ile katlanması sonucu yüksek kristalize selüloza dönüşür. Bu yüksek yapılı organizasyon selüloz zincirinin hidrolize olan dayanıklılığını arttırır, mikrofibrillerin kalınlığı selülozun kaynağına bağlıdır (Nieduszynski ve Preston, 1970).

Selüloz; bütün bitki, ot ve ağaçların temel yapı taşıdır. Selülozun en önemli görevi bitkilere sağlamlık, diklik ve destek sağlamaktır. Doğada saf halde bulunmaz. Odunun ağırlıkça %40’ını, ketenin %60-85’ini pamuk liflerinin %85-90’ını selüloz oluşturur

(Johansson, 1999). Genellikle selülozun bitki hücre duvarındaki oranı hücre tipine ve evresine göre değişmektedir. Örneğin; birincil duvarın kuru ağırlığının %20-40'ı selülozdan oluşurken ikincil duvarın %40-60'ı selülozdan meydana gelmektedir (Nugzar, 1997). Pamuk tohumunun ikincil duvarının %100'ü selülozdur. İkincil hücre duvarı mikrofibrilleri birincil hücre duvarı mikrofibrillerine göre daha yoğundur ve daha çok selüloz kristalleri içerir. Selüloz doğada hemen hemen hiçbir zaman tek başına bulunmaz. Genellikle diğer bitkisel maddelerle beraber bulunur. Bu selülozun doğal ortamda parçalanmasını etkilemektedir. Selüloz fibrilleri öncelikle hemiselüloz, pektin ve proteinlerin dahil olduğu diğer polimerlerin matriksine gömülmüş haldedir. Selüloz, hücre duvarına turgor basıncına dayanabilecek gerilebilir bir kuvvet verir. Eğer hücre duvarındaki su lignin ile değiştirilirse yüksek bir kuvvet elde edilir.

Selüloz mikrofibrilleri bitki hücresinin yapısını kuvvetlendirir. Yapı oluşurken selüloz mikrofibrilleri diğer polisakkaritler olan hemiselülozlarca sarılır. Bitki hücreleri lignin ve pektin içeren bir tabaka ile bir arada tutulurlar. Hücre duvarının diğer bir bileşeni olan hemiselüloz ise alkali ile ekstrakte edilebilen fraksiyon olarak tanımlanır. Hemi-selüloz farklı polisakkaritlerin heterojen bir karışımıdır. Ksiloglikan en sık karşılaşılan hemi-selülozdur. Selülozda olduğu gibi β -1,4 glukan iskeletine sahiptir ancak her 4 glukoz biriminin 3.ünde sübstitüye halde β -ksiloz vardır. Selüloz ve ksiloglukanın moleküler yapıları Şekil 2.5'te gösterilmiştir. Selüloz doğada ilk sentezlendiği andan itibaren asla tek zincirli olarak bulunmaz birçok zincirin bir araya gelmesi ile oluşan mikrofibril yapılarını oluşturur (Delmer, 1995).



Şekil 2.5. Selüloz ve ksiloglukanın moleküler yapıları

Selüloz β -1,4 bağlı D-glukoz artıkları içeren basit kimyasal kompozisyonuna karşın kompleks ve heterojen bir yapıya sahiptir. 10000'den fazla glukoz artığı içeren lineer polimerik zincir suda çözünabilir özellikte değildir. Her bir zincir birbirinden izole halde bulunmaz, paralel halde dizilerek mikrofibril yapılarını oluştururlar. Elde edildikleri kaynağa bağlı olarak mikrofibrillerin boyu ve kristalizasyon özellikleri farklıdır (Chanzy, 1990). Selülozun saflaştırılması ve kurutulmasındaki fiziksel koşullar kristalizasyon ve polimerizasyon derecesini etkileyebilir. Kristalizasyon mikrofibril boyunca tek bir formda değildir. Mikrofibriller hem yüksek kristalize hem de amorf bölgeleri bir arada içerirler. Ancak selülozun özel bir kaynağı olan alg ve bakterilerden elde edilen selüloz yüksek kristalize formdadır. Bu yüksek kalite selüloz farklı tipte farklı tipte selülozların karakterizasyonunda model substrat olarak kullanılırlar (Boisset, 2000). Selüloz I olarak isimlendirilen doğal selüloz, polimer bilimlerinde en çok çalışılan konulardan biridir. Çok sayıdaki rapor ve yayına rağmen selülozun yapısı hala tam olarak çözülememiştir. Selülozun biyosentezi selüloz mikrofibrillerinin oluşumu ile takip edilen enzimatik polimerizasyonun sonucudur. Bu olayın sonucunda selüloz zincirleri paralel şekilde bir araya gelerek kristalize mikrofibril yapılarını oluştururlar (Hieta, 1984; Chanzy, 1985).

Doğada birkaç çeşit selüloz bulunmaktadır. Bunların hepsi de endüstri açısından önemlidir fakat değişik amaçlar için kullanılırlar. Selüloz türleri birbirinden a,b,d harfleriyle ayırt edilir. Pamuktaki selüloz türü a-selülozdur. Bütün türler arasında en önemli olanıdır. “Hemi-selüloz” adını alan b-selüloz ve d-selüloz ise asitler ve bazlara karşı daha az dayanıklı moleküller dallanmış halde ve daha kolay kopabilme özelliğine sahiptir (Anonim, 1984).

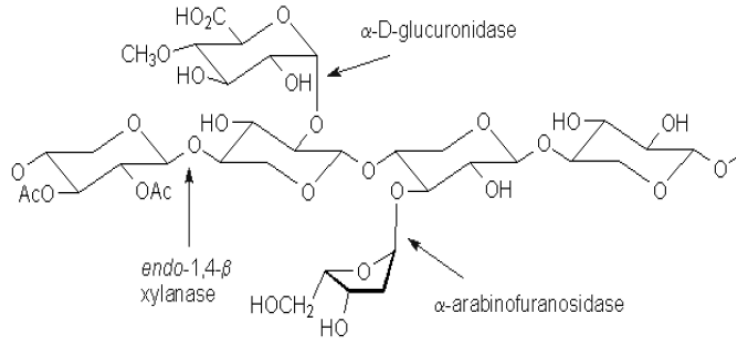
2.4.2. Hemiselüloz

Lignoselülozik maddelerin selülozdan sonraki en önemli bileşenleri hemiselülozlardır. Selüloz gibi kristalin bir yapıya sahip değildir. Hemiselülozlar, odundaki selüloz olmayan başlıca polisakkaritlerdir. Hücre çeperindeki polisakkaritlerin %20-35 ‘ini oluşturmaktadırlar. Odunun üç ana bileşeni arasında ısıya en duyarlı olanı hemiselülozlardır ve 200-260 °C arasında bozunurlar (Gunnar, 2000). Hemiselüloz ve selüloz odundaki holoselülozu oluşturur. Hemiselülozlar, selülozdan bazı özellikleri ile ayrılır (Yoon ve ark., 2005). Odunun diğer elemanlarından ayrıldıktan sonra seyreltik alkali çözeltisinde ve kaynayan suda çözünebilirler. Hemiselülozların kimyasal yapısı hakkında bugün çok az şey bilinmektedir. Ama şu açıkça bilinmektedir ki hemiselülozlar selülozdan daha heterojendir (Robert ve ark., 2001).

Hemiselüloz polimerleri (DP- Degree of Polimerization: 150-250) oldukça amorf ve düzensiz dallanmalara sahiptir; düz zincirler şeklinde düzenlenmiş selüloza göre reaksiyonlara daha duyarlıdır. Hemiselülozlar kendilerini oluşturan şeker birimlerine göre; ksilanlar, mannanlar, arabinoksanlar, glikomannanlar ve glikoksilanlar şeklinde isimlendirilirler (Mutlu, 1990). Şekil 2.6’da hemiselülozun yapısı gösterilmiştir (Anonim, 2011).

Ksilanlar, hemiselülozik yapı içinde nicelik açısından önemli yer tutarlar. Kara bitkilerinin ligninli dokularındaki hemiselülozların temel bileşenini oluştururlar. Olgunlaşmış odunların % 20-25’i, otların % 15-20’si ve yumuşak odunların önemli bir kısmı ksilanlar ve glikomannanlardan oluşur. Tahıl sapları ile tohum kabuklarının da,

kuru ağırlık olarak % 20-30'u ksilanlardır (Aspinal, 1970). Ksilanlar, selülozla birleşik halde bulundukları gibi, ligninle de etkileşim içindedirler. Polisakkaritlerin hemiselüloz grubunun temel bileşenini oluşturan ksilanlar, bitkilerden alkali çözeltilerle özütlenebilirler (Whistler, 1953).



Şekil 2.6. Hemiselüloz yapısı

2.4.3. Lignin

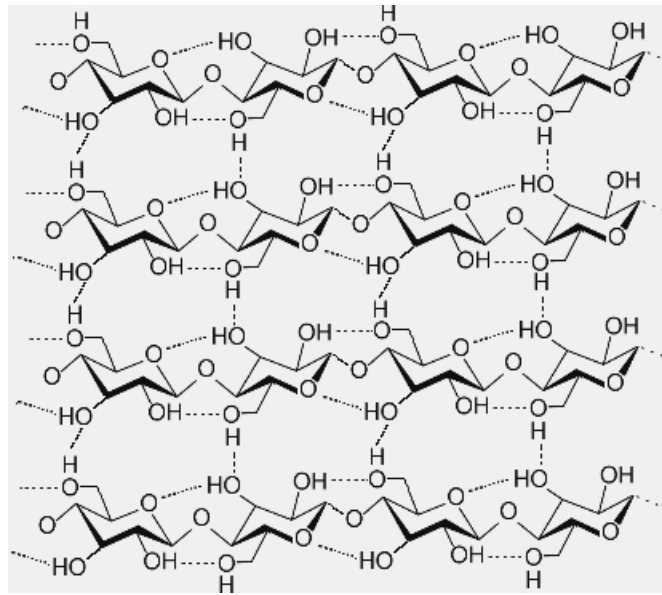
Lignin, bitkide kök ve gövdenin odunsu yapısını oluşturan madde olarak da bilinir. “Odunun özü” de denen su geçirmez bir yapıya sahiptir. Yaşlanmış ölü hücrelerin selüloz çeperleri üzerinde birikerek bitkiyi uygun olmayan çevre şartlarından korur (Martinez ve ark., 2001). Lignin bir glikozit olup kolayca glukoz ve aromatik bir alkole ayrıştırılabilmektedir. Bu glikozit koniferin olarak adlandırılır. Bu bileşikten türeyen alkole de buna uygun olarak koniferil alkol denilmiştir (Strayer ve ark., 2002). Potasyum permanganat ile ligninin oksidasyonu sonucu hemipin asitleri ve türevleri meydana gelmektedir (Sfountoulakis, 2002). İğne yapraklı ağaç odunları lignininden esas itibari ile “guayasil” kalıntısı taşıyan parçalanma ürünleri elde edilmesine karşılık, yapraklı ağaç odunu lignininden yukarıdaki ürünlerin yanı sıra aynı seri içinde “şiringil” kalıntısı taşıyan ürünlerde elde edilmektedir (Elke ve ark., 1997).

Lignin bir karbonhidrat olmamakla beraber fonksiyonları bakımından karbonhidratlara yakın bir maddedir. Hücrede sekonder çeper yapısına büyük oranda iştirak eder. Hücre çeperini oluşturan selüloz misellerin arasını amorf lignin doldurur ve böylece dokuda

odunlaşma meydana gelir (Hirofimi ve ark., 1999). Çam ağaçlarının iğnelerinde yoğun miktarda bulunan ligninin, çürüyüp toprağa karışması uzun bir zaman aldığından çam ağaçlarının altında birikir. Bu biriken maddeler yavaş yavaş çözündükçe toprakta asit birikmesi olur. Ayrıca alt tabakadaki bitkiler oluşan bu iğne yumağının altında kaldığı için ışık alamayarak çürürler (Breen, 1999).

2.5. Selülozun Biyodegradasyonu

Selüloz, glikoz birimlerinin β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanarak oluşturduğu, doğada en bol bulunan yenilenebilir bir biyopolimerdir. Genellikle yaygın olarak bitki hücre duvarlarında bulunur. Düz bir zincir şeklinde nişastadan ayrılır ve herhangi bir sarmal yapı göstermez. Selüloz molekülleri β -1,4 glikozidik bağlarla bağlanırken, Şekil 2.7’de görüldüğü gibi selüloz zincirleri hidrojen bağları ile bağlanırlar (Anonim, 2009a). Bazı durumlarda selüloz hemen hemen saf olarak bulunur. Birçok yapı ile hemiselüloz ve lignin gibi diğer yapısal biyopolimerler arasına selüloz lifleri katılabilmektedir. Selülozun diğer polisakkaritlerden farklı bir kristal yapı oluşturabilmeleri en önemli özelliklerindendir (Bhat, 2000).



Şekil 2.7. Selüloz molekülleri arasındaki hidrojen bağları

Bitki biyokütlesinin enzimatik parçalanması selüloz ve hemi-selülozlardan oluşan bir kompleks tarafından gerçekleştirilir. Bu enzimler polimeri α - ve β -Glikozidazlarca metabolize olabilen daha küçük fragmetlere parçalarlar. Ligno-selülozik biyokütlenin karmaşık yapısı bunları parçalayan organizmaların da karmaşık yapılı enzim sistemleri sentezlemelerini zorunlu kılmıştır. Selülozun parçalanması bitki artıkları ve toprakta yaşayan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir. Doğal selüloz suda çözünmediği için hücre içine giremez, bu nedenle selülozun biyolojik olarak parçalanması hücre dışında gerçekleştirilir. Selüloz hücre yüzeyini saran bir tabaka oluşturarak ya da ekstraselüler olarak selüloz ile etkileşime girer. Çok az mikroorganizma hidroliz için gerekli tüm enzimleri sentezleyebilme kapasitesine sahiptir.

Mikrobiyal selüloz degradasyonu doğada, iki farklı çevrede gerçekleşir. Anaerobik ortamda selülitik işleyiş mikroorganizmanın hücre duvarı yüzeyinde bulunan kompleks bir sistem tarafından gerçekleştirilir. Anaerobik çevre toprak ve çamur olduğu gibi sürüngen ve gevişgetiren hayvanların bağırsaklarının arkaduarını da kapsar (Troyer, 1991). Aerobik çevrede ise pek çok mikroorganizma tek başına selüloz sentezleyerek doğrudan hücre dışına salarlar. Her iki durumda da hidroliz ürünleri hücre içine alınarak metabolize edilirler.

Selüloz doğada en çok bulunan polimerdir ve birçok hayvan türü için de önemli bir besin kaynağıdır. Ancak selülozu enerji kaynağı olarak kullanan birçok otobur ve karışık beslenen hayvan kendi selülozunu sentezleyemez. Örneğin geviş getiren hayvanlar selülozu anaerobik koşullarda sindirebilmek için bakteri, fungi, protozoalardan oluşan bir karışıma gereksinim duyarlar (Dehority, 1991).

2.6. Selüloz ve Mikroorganizmalarda Selülitik Enzim Sistemleri

Selüloz enzim sistemleri, oligo ve/veya polisakkaritleri hidroliz eden glukozid hidrolaz enzim ailesinin üyeleridirler. Birçok selüloz kimyasal olarak basit yapıdaki bir substratta tek bir bağı parçalarlar. Yani β -1,4 glukozidik bağların hidrolizinden sorumludurlar. Selülozun yapısını oluşturan glukoz molekülleri arasındaki kapsamlı bağlanma deseni özellikle mikrobiyal parçalanmaya dirençli kristal bir yapı oluşturmaktadır. Selüloz

enzim bileşenlerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada selüloz miyofibrilindeki kristal bölge üzerinde sadece sellobiyohidrolaz enziminin yavaş bir etkisinin olduğu, kristal bölgeye göre daha yumuşak bir bölge olan amorf bölgede ise sellobiyohidrolaz ve endoglukanaz enzimlerinin aktif olduğu belirtilmektedir (Wood ve Garcia-Campayo, 1990).

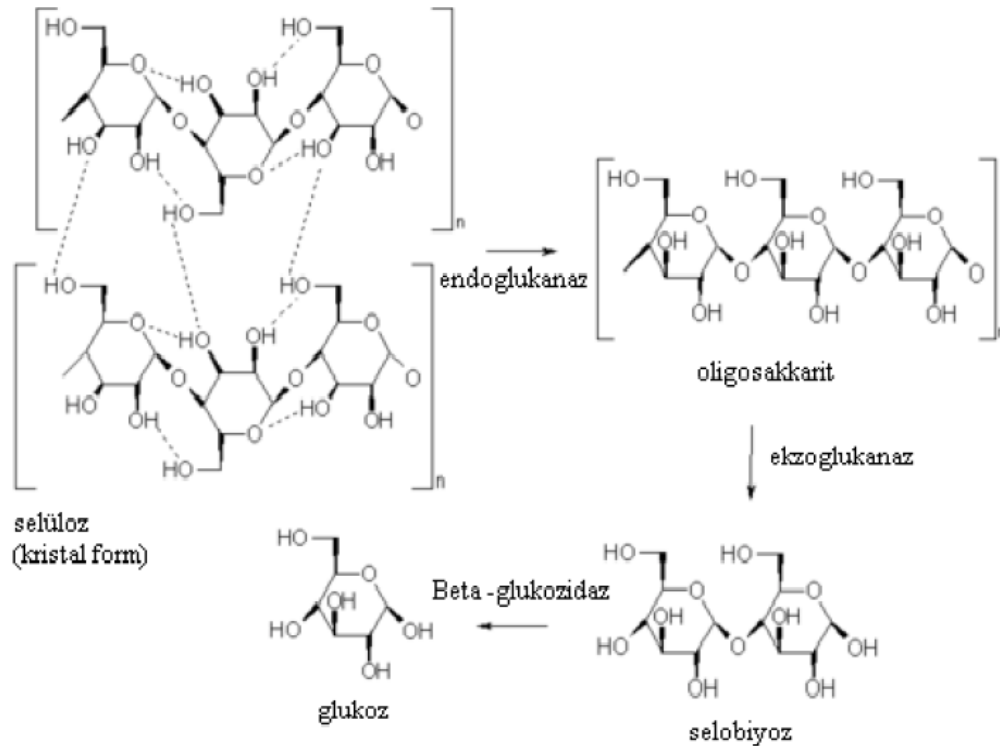
Geleneksel olarak selülazlar etki mekanizmalarına göre 3 gruba ayrılırlar (Şekil 2.8), (Lynd ve ark., 1991).

- a) Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolazlar, CBH) (E.C. 3.2.1.91)
- b) Endoglukanazlar (endo- β -1,4 glukanaaz, CMCAz) (E.C. 3.2.1.4) ve
- c) β -glukozidazlar (E.C. 3.2.1.21)

Endoglukanazlar (EG); selüloz polimerinin orta kısmından (genelde amorf bölgeden) parçalarlar. Son ürünleri ise oligosakkaritlerdir. Bu grup enzimlerin oyukları vasıtasıyla polimeri kavradıkları ve parçaladıkları bildirilmektedir. Bazı endoglukanazlar ise selüloz bağlayıcı modüller (CBM, Cellulose Binding Modül) vasıtasıyla selüloz polimerine bağlandıktan sonra polimeri parçalama işlemini gerçekleştirirler. Bu grubun aktivitesi daha yüksektir (Lynd ve ark., 2002).

Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolazlar (CelloBioHydrolase, CBH)); selüloz polimerini bütün şekliyle veya endoglukanazlar tarafından parçalanmış kısımlardaki ara ürünlerin uçlarından parçalamaya başlarlar. Son ürünleri sellobiyozdur. Bu grup enzimlerin iç kısımlarında tüneli andıran bir boşluk bulunmaktadır ve selüloz polimerinin ucunu bu boşluk içine alarak aktivite gösterirler (Lynd ve ark., 2002).

β -glukozidazlar; ara ürün olan sellobiyozları glukozla parçalarlar. *Aspergillus* türlerinin β -glukozidazları, ortamda oluşan glukozla inhibe olmazken *Trichoderma reesei* β -glukozidazları ortamda oluşan glukoz ile inhibe olurlar (Lynd ve ark., 2002).



Şekil 2.8. Selülozun glukozu hidrolizi (Lynd ve ark., 2002)

Selülozun glukozu kadar olan hidrolizi ekzoglukanazlar, (selobiyohidrolaz) endoglukanaz ve β -glukozidazlar tarafından tamamlanır (Şekil 2.8). Selobiyohidrolaz (1,4- β -D-glukan E.C 3.2.1.91) genellikle kristalize selüloz üzerinde etkilidir. Endoglukanaz 1,4- β -D-glukan -4-glukano hidrolaz EC. 3.2.1.4) daha çok selülozun amorf bölgeleri üzerinde etkilidir ayrıca karboksimetilselüloz (CMC) ve hidroksietilselüloz (HEC) gibi süstitüye formdaki selüloza karşı da aktivite gösterir. Selobiyohidrolaz selobiyozu indirgen olan ya da olmayan uçlardan kırabilir. Ancak endoglukanazlar zinciri yalnızca internal olarak kırarlar. β -glukozidazlar (EC 3.2.1.21) selobiyoz ve diğer suda çözünür oligosakkaritleri glukozu parçalar (Beguin, 1990). Glukozu parçalanmayı sağlayan bu son adım çok önemlidir çünkü selobiyoz selülazlar için son ürün inhibitörü olarak etki gösterir.

Selülozun bakteriler tarafından parçalanmasında hem aerobik olan hem de anaerobik olan mikroorganizmalar görev yapmaktadır. İlk fonksiyon selülozun basit şekerlere dönüşmesidir. Bu metabolik yolda selüloz glikoza kadar parçalanır. Selülitik aerobik olan bakteriler *Bacillus*, *Cytophaga*, *Herpetosiphon*, *Pseudomonas*, *Cerratia*,

Streptomyces, *Sporocytophaga*, *Thermoactinomyces* ve *Thermomonospora*'dır. β -glukanaz enzimlerini üretme yeteneği *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus macerans*'ta oldukça yaygındır ve bu enzimlerin sentezinden sorumlu genler diğer mikroorganizmalarda klonlanmışlardır (Liming ve Xueliang, 2004).

Günümüze kadar birçok *Bacillus* türlerinin selülitik enzimlerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu türlerin karboksimetilselüloz (CMC)'u sellobioza hidroliz ettikleri bildirilmiştir. Hidrolizden sonra ise ortamdan distile su ile selülitik madde uzaklaştırılmıştır. *Bacillus polmyxa*'nın selülaz üretimi için besiyerindeki karbon kaynağının varlığı önemlidir. Böylece enzim, tuzlu peptonlu besiyerine nişasta, glikoz, selüloz, sellobioz, karboksimetilselüloz, ksilan, maltoz ve sükroz ilave edildiği zaman üretilmektedir (Fogarty ve Kelly, 1979).

2.7. Selülitik Bakteriler

Bakterilerde selülozun parçalanması hem aerobik hem de anaerobik bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir. Herbivor hayvanlarda ve böceklerde selülozun parçalanması anaerobik bir olaydır. Selülitik bakterilerin seçiminde aerobik ve anaerobik bakteriler çalışılmıştır. İlk fonksiyon selülozun basit şekerlere dönüşmesidir (Hungate, 1950; Bryant ve Robinson, 1961; Miller ve Wolin., 1974).

Aerobik selülitik bakterilerin tanımlanması uzun zaman önce yapılmıştır. Selülitik aerobik bakteriler *Bacillus*, *Cytophaga*, *Herpetosiphon*, *Pseudomonas*, *Cerratia*, *Streptomyces*, *Sporocytophaga*, *Thermoactinomyces* ve *Thermomonospora*'dır. Birçok aerobik selülitik bakteri suşları izole edilmiş olmasına rağmen bunların çoğu tam karakterize edilmemiş ve yalnızca son zamanlarda bu bakterilerin kirliliğe eğilimli olduğu görülmüştür. Selülitik enzim sistemlerine sahip olan bu bakterilerde eğilim, endüstriyel olarak kullanılabilir olmasıyla ilişkilidir (Humprey ve ark., 1977).

Bacillus türlerindeki selülitik enzimler çok iyi karakterize edilmişlerdir. Türlerin karboksimetilselülozu sellobioza hidroliz ettikleri söylenmiştir. Daha sonra selülitik

madde ortamdan distile su ile uzaklaştırılmıştır. *Bacillus polmyxa*'nın selüloz üretimi besiyerindeki karbon kaynağının varlığına bağlıdır. Böylece enzim, tuzlu peptonlu besiyerine nişasta, glikoz, selüloz, sellobioz, karboksimetilselüloz, ksilan, maltoz ve sükroz eklenildiği zaman üretilmektedir (Fogarty ve Griffin, 1973).

2.8. Selülozun Hidroliz Mekanizması

Selüloz D-anhidroglukopiranoz birimlerinin β -1,4-glikozidik bağ ile bir araya gelmesi sonucu oluşan, 100 - 20 000 polimerizasyon dercesine sahip lineer bir polimerdir (Krassig, 1993). Anhidroselobioz selülozun tekrarlayan birimidir. Komşu selüloz zincirleri arasındaki H bağları ve van der Waals kuvvetleri paralel düzenlenme ve kristal yapının oluşmasını sağlar.

Kristal yapı ve fibrillerin düzenlenmesi moleküle esneklik ve sağlamlık katar (Demain, 2005; O'Sullivan, 1997; Nishiyama, 2003).

Selüloz molekülü çok kararlıdır. B-glukozidik bağın 25°C.de yarılanma ömrü 5-8 milyon yıldır (Wolfenden, 2001). Ancak selülozun enzimatik olarak parçalanması çok daha hızlı olarak gerçekleşir. Bu parçalanma karbonun tekrar atmosfere dönebilmesi açısından hayati önem taşır (Berner, 2003; Falkowski, 2000).

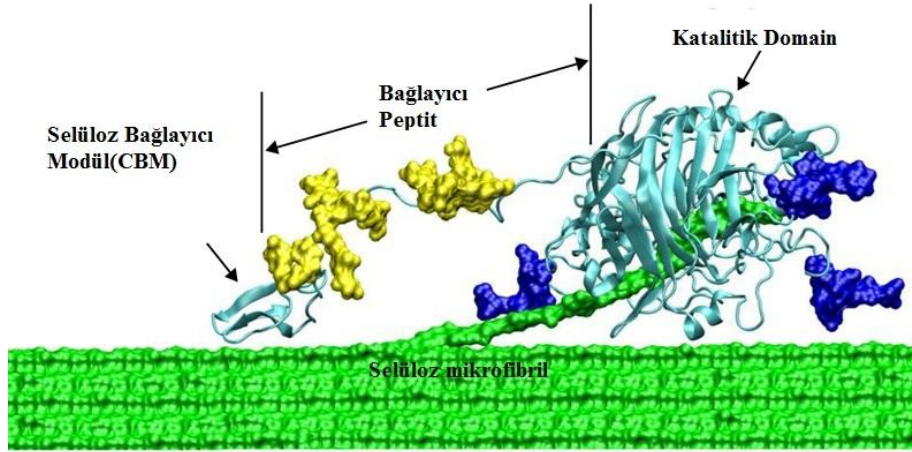
Endoglukanazlar, ulaşılabilir olan intramoleküler β -1,4-glukozidik bağları rastgele hidrolizleyerek, yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlarlar. Selülozun enzimatik olarak hidrolizinde en çok kabul edilen mekanizma endo-glukanaz (EC 3.2.1.4), ekzo-glukanaz ya da diğer adıyla selobiyohidrolaz (EC 3.2.1.91) ve β -glukozidazın sinerjik etkisi ile selülozu parçaladıklarıdır (Henrissat, 1994). Endoglukanaz selüloz zincirinin ulaşılabilir olan β -1,4-glukozidik bağlarını kırarak yeni zincir uçları oluşmasını sağlar, ekzo-glukanazlar selüloza bu serbest uçlardan etki ederek suda çözünebilir selobiyoz ve glukozun açığa çıkmasına neden olur. Son olarak da β -glukozidazlar selobiyoz inhibisyonunu önlemek amacıyla selobiyozu glukozu parçalar. Katı substrat yüzeyinde gerçekleşen ilk hidroliz polimerizasyon derecesi en fazla 6 olan suda çözünebilir, endo-

ve ekzo-glukanazlarca hidrolizlenebilen şeker oligomerlerinin açığa çıkmasına olanak sağlar. Endo- ve ekzo-glukanazlarca gerçekleştirilen depolimerizasyon adımı tüm selüloz hidroliz sürecinin hızını belirleyen adımdır. Sıvı fazda gerçekleşen ikincil hidroliz adımı selobiyozun ve daha uzun zincirli olan sellodekstrinin β -glukozidazlarca glukozu hidrolizini içerir (Zhang ve Lynd, 2004).

Selüloz hidrolizi sürecinde substratın karakteristiği sürekli değişir. Örneğin, endoglukanazlarca oluşturulan ve ekzoglukanazlarca tüketilen selüloz zincirinin uçlarının sayısı sürekli olarak değişim gösterir (Kongruang, 2004). Bunun yanında selüloz fragmentasyonu ve substratın tüketimi sonucunda katı fazdaki selüloza enzimlerin ulaşabilirliği artar (Lee, 1996- 2000). Endo- ve ekzo-glukanazların birlikte etkisi sonucu selüloz yüzeyinde meydana gelen değişimler hidroliz hızını büyük oranda farklandırır. Selüloz hidrolizi yapısındaki anomerik karbon atomunun yapılandırılmasındaki değişim ile birlikte gerçekleşir. Bu değişim enzimin aktif bölgesindeki iki karboksil grubu tarafından sağlanır.

2.9. Selülazın Yapısı

Selülazlar Şekil 2.9'da görüldüğü üzere domain adı verilen bağımsız katlanmalara, yapıya ve fonksiyona sahip alt birimlerin bir araya gelmesi ile oluşurlar (Anonim, 2012a). Bu karmaşık enzim sistemi genellikle bir katalitik birim, bir veya daha fazla substrat bağlayıcı ya da kompleksi oluşturmada görevli yardımcı birimlerden oluşur. Bunlara ek olarak henüz fonksiyonu bilinmeyen bazı birimlerde bu kompleksin yapısında bulunmaktadır.



Şekil 2.9. Selüloz alt birimleri

Her bir domain birbirine bağlayıcı peptid ile bağlanmış durumdadır (Gilkens ve Henrissat, 1991). Bu bağlayıcılar genellikle glisin, prolin, serin ve treonine zengin O-glikozillenmiş peptidlerdir (Williamson, 1992).

Katalitik birimler glikozil hidrolazlardır. 500 farklı dizinin incelenmesi sonucunda, amino asit dizilerindeki benzerlikler ve hidrofobik grup analizi yöntemi (HCA) kullanılarak yapılan ikincil yapı aydınlatmaları temel alınarak 82 aileye ayrılmışlardır (Henrissat ve Bairoch 1993).

Bu sınıflandırma hem yapısal katlanmayı hem de katalitik mekanizmayı temel almaktadır. Bazı aileler amino asit dizilimlerindeki farklılığa rağmen küresel yapıyı oluşturan benzer katlanmalara ve katalitik merkez yapısına sahip olduklarından ..klan formundadır. En büyük klan olan GH-A, 6 farklı aileler içerir ve farklı amino asit dizilimlerine sahip olmalarına karşı bu ailelerin tümü benzer katlanmalara ve katalitik aktiviteye sahiptir. Tersine şekilde amino asit dizilimleri çok benzer olan aile 8 ve 9 katalitik aktiviteleri ve yapısal katlanmaları açısından farklıdır. Farklı selülozlar bu ailelerden 11. i (aile 5-10, 12, 26, 44, 45, 48) arasında dağılır. Katalitik birimlerin üç boyutlu yapılarının belirlenmiş olmasına bağlı olarak aynı aileye üye olan enzimlerde amino asit dizisinde olan farklılıklara karşın katlanma şeklinin korunduğu görülmüştür. Aile yapılandırması, enzim sınıflandırma sisteminden (EC sınıflandırması) oldukça farklıdır. EC sınıflandırması substrat spesifikliğini temel alarak yapılan bir

sınıflandırmadır. Buna bağlı olarak bir aile içinde hem ekzoglukanazlar, hem de endoglukanazlar bulunabilir. Bununla beraber aile- 5 çoğunlukla selülozlerden oluşmaktadır ancak β -mannaz, ekzo- 1,3- β -glukanaz ve selodekstrinaz da bu ailenin üyesidir (Henrissat, 1994).

Aktif bölgenin yapısının anlaşılması selülozun nasıl aktif bölgeye girdiğinin ve selülazın nasıl çalıştığının gösterilmesi için yeterli değildir. Katalitik bölge ve sahip olduğu katalitik aktivite enzimin tüm özelliklerini değiştiren ya da yeni özellikler ekleyen aksesuar modüllerle modifiye edilir. Günümüze kadar çalışılmış pek çok selülaz ikinci bir bağlayıcı alt birime sahiptir. Selüloz bağlayıcı modül ya da domain (cellulase binding module/ domain 'CBM', 'CBD') olarak isimlendirilen bu altbirim substratı bağlamasına karşın onu hidrolizleyemez. Farklı ailelerin bir çoğunda bulunan CBM için amino asit dizi homolojisinin varlığı gösterilmiştir (Temme, 1995).

CBM'ün en önemli fonksiyonu kristalize selülozu katalitik bölgeye ulaştırmaktır. Enzim substrat yüzeyinde difüzyona maruz kaldığı halde bağlanma oldukça stabildir (Jervis ve Haynes, 1997). Bazı CBM'ler kristalize substrat zincirleri arasındaki kovalent olmayan etkileşimleri bozma işleminde katalizör görevi üstlenmektedirler (Din, 1991). CBM'ün hücre duvarının sentezi sırasında da bazı fonksiyonlara sahip olduğu belirlenmiştir. CBM'nin *A.xylinum*'da selüloz sentez hızını 5 kat arttırdığını göstermiştir. CBM varlığında selüloz biyosentezini elektron mikroskobu ile incelenmesi sonucunda ince kontrol fibrillerine oranla daha kalın yeni fibrillerin oluştuğu gösterilmiştir (Shpigel 1998).

2.10. Selülazların Endüstriyel Uygulamaları

Dünyada en bol ve yenilenebilir kaynak olan lignoselülozun glukoz ve çözünür şekerlere dönüşümünü sağlayan selülaz ve selülaz ile ilişkili enzimlere ait çalışmalar 1950'li yılların başlarında başlamıştır. 1970 ve 1980'li yıllarda gerçekleştirilen temel ve uygulamalı araştırmalar enzim ile tetkilenen lignoselülozun biyodönüşümünün zor ve ekonomik olmadığı bilinmektedir. Devam eden çalışmalar ile selülaz, hemiselülaz ve

pektinaz gibi enzimlerin gıda, bira ve şarap, yem, tekstil, kağıt hamuru ve kağıt, tarım gibi sektörlerde biyoteknolojik önemini açığa çıkarmıştır. Günümüzde endüstrinin birçok alanında kullanılan enzimlerin daha kararlı, daha yüksek aktivite ve spesifiteye sahip olması yönündeki talep gün geçtikçe artmaktadır. Günümüzde üretimi sağlanan endüstriyel enzimlerin %60'ının üretimi Avrupa'da, %40 lık kalan kısmın ise Amerika ve Japonya'da gerçekleştirildiği bilinmektedir.

Selülazın aktif bölgeye ulaşmasını sağlayan selüloz bağlayıcı modül (CBM) uygulamalarda kullanılabilir. CBM afinite özelliğine bağlı olarak saflaştırma, biyoprosesler, biyosensör, çeşitli protein ve hücrelerin immobilizasyonu amacıyla bağlayıcı molekül olarak kullanılmaktadır (Ross, Mayer 1991).

2.10.1. Gıda Biyoteknolojisinde Selülaz Uygulamaları

Selülaz meyve suyu endüstrisinde pektinaz, ksilanaz, mannaz gibi diğer endüstriyel enzimlerle birlikte sebze ve meyve sularının ekstraksiyonu ve saflaştırılmasında kullanılır. Meyveler mekanik prostesten geçirilerek (presleme, santrifüj ve filtrasyon) pulpa (küspe) haline getirilir. Bu enzimler ek sermaye gerektirmeden ürün eldesini ve proses verimini arttırırlar ve genel olarak iki basamakta kullanılmaktadırlar. 1) Parçalama işleminden sonra kullanımda, meyve ya da sebze küspesi ıslatılarak yumuşatılır. Böylece hem ürün artışı sağlanırken hem de prosesin süresi kısaltılır. Ayrıca değerli meyve bileşenlerinin kazanımı sağlanır. 2) Ektraksiyon sonrasında saflaştırma amacıyla kullanılır. Böylece meyve suyunun viskozitesi azaltılarak filtrasyon süresi kısaltılır ve son ürün stabilitesi arttırılır. Selülazlar pektinazlar ile birlikte meyve ve sebze küspelerinden antioksidanların salınımını arttırırlar.

- Zeytinyağı zeytinin kalitesini korunması için soğuk ortamda muhafaza edilmesi gerekir fakat proses boyunca zeytinin yüksek sıcaklığa maruz kalması aromasının azalmasına ve bozulma hızının artmasına neden olur. Zeytinyağı eldesinde selülazın diğer enzimlerle birlikte kullanımıyla birlikte ürün eldesinin artması (100 kg zeytinden 2 kilo daha fazla ürün eldesi), zeytinyağındaki antioksidan ve vitamin E oranında artış,

bozulmanın gecikmesi, daha verimli ekstraksiyon ve atık sulardaki zeytinyağı miktarında azalış gibi avantajlar gözlenmektedir.

- Selüloz gıda endüstrisinde tohumların yağlarının çıkartılması işleminde yardımcı olmaktadır (Che Man, 1996).
- Ekmek yapımında selülozlar, hamurun yapısındaki macunumsu kıvamın azaltılması amacıyla kullanılır. Selülozlar bu amaç için kullanıldığında, yüksek aktivitenin hamurun yapısına zarar vermesinin önlenmesi ve ekmeğin kalitesinin düşmemesi için, aktiviteleri yumuşatılmalıdır. *Trichoderma* selülozlarının aktiviteleri oldukça agresiftir bu nedenle ekmek yapımında daha çok *Aspergillus* selülozları kullanılır (Godfrey, 1996).

2.10.2. Şarap ve Bira Endüstrisinde Selülozların Kullanımı

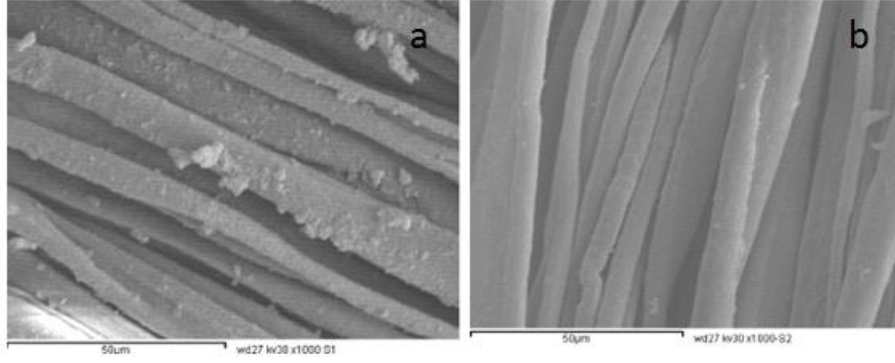
- Endoglukanazlar bira endüstrisinde malt üretimi ve fermentasyon basamaklarında kullanılmaktadır. Malt üretiminde arpanın çimlenmesi ile birlikte endoglukanaz, pektinaz ve amilaz gibi enzimlerin biyosentezi başlatılarak tohumun hidrolizi gerçekleştirilir. Fakat mevsim şartları, tohum kalitesinin yeterli olmaması gibi sebeplerden dolayı bu enzimlerin aktivitesi düşebilmektedir. Bu durum elde edilen maltın filtrasyonunda ve kalitesinde problemler ortaya çıkarır. *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma reesei* gibi mikroorganizmalardan elde edilen endüstriyel enzimler mayşeleme ve birincil fermentasyon süreçlerinde kullanılarak tohumların hücre duvarı hidrolizi arttırılır, viskositenin düşmesi ile filtrasyon ve ürün kalitesindeki problemler çözülür (Galante ve ark, 1998).
- Şarap üretiminde selülozın kullanımı bitki dokusunun maserasyonu, saflaştırma, filtrasyon, renk kalitesi, ürün kalitesi ve stabilite açısından önemlidir. Üzüm tanelerinde funguslar tarafından üretilen glukon şarabın filtrasyonunda sorunlara sebep olmaktadır. *Trichoderma harzianum*'dan elde edilen β - glukon enzimi hücre duvarındaki polisakkaritleri hidrolize ederek viskositeyi düşürür.

2.10.3. Hayvan Yemi Endüstrisinde Selülozların Kullanımı

- Yem üretiminde kullanılan β -glukanaz ve ksilanaz enzimleri tahıllardaki glukanın hidrolizini sağlayarak intestinal viskoziteyi azaltır, besin bileşenlerinin sindirimini ve bağırsaktaki emilimini kolaylaştırarak piliç ve yumurtlama dönemindeki tavukların kilo kazanımını sağlar.
- Buğday/arpa ile beslenen domuzların yemlerine endüstriyel enzimlerin takviyesi besin kalitesini arttırarak daha etkin ve az maliyetli beslenmeyi sağlar.
- Geviş getiren hayvanların diyetleri kümes hayvanları ve domuz yemlerine göre daha komplekstir. Selüloz ve ksilanaz içeren ticari enzimlerin sığırların vücut ağırlıklarında %35'e varan ağırlık artışı Beauchemin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Benzer çalışmalarda bu enzimlerin ineklerde süt verimini %5-25 oranında artışı sağladığı bilinmektedir.

2.10.4. Tekstil Endüstrisinde Selülozların Kullanımı

- Tekstil endüstrisinde özellikle Jean (kot) endüstrisinde kumaş dokularına ponza taşı ile yıkama uygulanarak yıpranmış ve eski görüntüsü verilmektedir. Bu işleme biyotaşlama (bio-stoning) denmektedir. Taşlama işleminde ponza taşı yerine selülozların kullanılması; kumaş dokusunda yıkamadan kaynaklanan aşınmanın azaltılması, üretimdeki makinaların verimi yüksek yüklemekten dolayı artışı, giysilerin kalitesinde artış, daha az emek ile güvenli üretim, ponza tozunun oluşamamasından dolayı temiz çevre gibi birçok avantajı beraberinde getirmiştir.



Şekil 2.10. Pamuklu kumaş dokularının SEM görüntüleri a) İşlenmemiş kumaş dokusu b) Selüloz ile biyo-parlatılma işlemi gerçekleştirilmiş kumaş dokusu (N.A. Ibrahim ve ark.,2011)

- Kumaş dokularının üretim prosesinde haşılama, temizleme, ağartma, boyama gibi mekanik etkiler kumaş dokusunda küçük fibril çıkıntılarının oluşmasına neden olur. Bu sorunu çözmek amacıyla kullanılır selülozlar, kısa fibrilleri uzaklaştırarak pürüzsüz parlak renklere sahip kumaş dokularının üretilmesini sağlar (Şekil 2.10), (Galante ve ark., 1998). Bu süreçte kumaşlar selülozla birlikte ve mekanik olarak çalkalanır, bu şekilde kumaş üzerindeki lifler uzaklaştırılır. İşlem sonucunda kumaş orijinal parlak görünümüne döner. Selüloz ile yapılan muamele sonunda kumaşın yumuşaklığı azalabilir bu durumda katyonik yumuşatıcılar kullanılır. Protein mühendisliği selülozın ortamda anyonik surfaktans, proteaz, beyazlatıcı madde bulunan yıkama aşamasında kullanılabilmesini ve kumaşın dayanıklılığında en az azalma olmasını amaçlamaktadır (Hakamada, 2001).

- Pamuk ve pamuk türevi kumaşlar tekrarlanan yıkama işlemlerinden dolayı dokusunda selülozik firil çıkıntıları oluşturma eğilimindedirler. Deterjan endüstrisinde deterjan tozuna eklenen ticari selüloz enzimi bu problemi ortadan kaldırarak kumaş yüzeyindeki kirliliklerin yumuşatılıp temizlenmesine katkı sağlamaktadır. Selüloz enzimi ilavesi deterjan maliyetini %0,4 oranında arttırmaktadır (Uhlig, 1998).

2.10.5. Kağıt Hamuru ve Kağıt Biyoteknolojisinde Selülozların Kullanımı

Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde nişastanın modifikasyonu amacıyla enzimler geniş kullanım alanı bulurlar. Bununla beraber ekonomik ve teknik nedenlerle az sayıda enzimin kullanımı mümkün olmaktadır. Enzimlerin kâğıt sanayindeki en önemli uygulama alanı ksilanazların kâğıt hamurunun beyazlatılmasında kullanımıdır (Viikari, 1994).

Endoglukanazların kâğıt endüstrisinde iki önemli kullanım alanı vardır; suyun ve mürekkebin uzaklaştırılması.

- Suyun uzaklaştırılması kâğıt üretimindeki en önemli adımlardan biridir. Su basınç, sıcaklık ve vakum yardımı ile yeni üretilmiş olan kâğıt yaprağından uzaklaştırılır. Selüloz güçlü su tutucu özelliğe sahip küçük parçacıkların çözünmesini sağlayarak bu adıma yardımcı olur (Bhardwaj,1996).

- Mürekkebin uzaklaştırılması kâğıdın geri-dönüştürülmesinde kullanılan bir diğer önemli adımdır. Mürekkebin uzaklaştırılması kâğıdın ıslatılıp hamurlaşmasını takiben kimyasal beyazlatma işlemleri adımlarını içerir. Mürekkebin enzimatik yolla uzaklaştırılması ikinci kez kullanılan kâğıdın kaliteli bir ürüne dönüşmesi için yeni bir yaklaşım getirmektedir. Selülozın tekrar hamurlaştırma işleminde kullanımı ekonomik olarak ve etkinlik bakımından birçok fayda sağlamaktadır. Mürekkebin enzimatik olarak uzaklaştırılması kimyasal uzaklaştırmaya göre yüksek parlaklık, düşük mürekkep kalıntısı gibi üstün fiziksel özellikler sağlamaktadır. Ayrıca mürekkebin enzimatik olarak uzaklaştırılması kimyasal beyazlatma işleminde daha az kimyasal ve surfaktan kullanımına sebep olur (İlan, 2002).

- Son zamanlarda yapılan çalışmalar CBM'ün tek başına kâğıdın özelliklerinin değiştirilmesi amacıyla kâğıt endüstrisinde kullanılabileceğini göstermiştir. *C. Cellulovorans*'dan elde edilen aile III CBM'ün iki tanesinin birleştirilmesi ve kâğıt üzerinde kullanılması gerilme gücünde artış ve parlaklık gibi mekanik özelliklerde artışa sebep olmuştur. CBM'ün tek başına kullanımı da bazı mekanik özelliklerin

artışına sebep olmuştur ancak bu özellikler iki CBM'nin füzyonunda olduğundan daha düşük düzeyde olmuştur. Ayrıca CBM'nin kâğıtla olan muamelesi kâğıda daha hidrofobik ve suyu uzaklaştırıcı özellik kazandırmıştır (Levy, 2002).

Gıda, tekstil, kâğıt, içecek endüstrisi gibi temel alanların dışında selüloz daha birçok uygulamada kullanılmaktadır.

Selüloz etanole dönüştürülebilen en önemli glukoz kaynağıdır. Bilim insanlarının amacı bu işlemi mümkün olan en ekonomik yolla gerçekleştirebilmektir. Selülozun etanole dönüştürülmesi, selülozdan glukoz üretimi ve mayalar yardımı ile glukozun etanole fermentasyonu adımlarını içerir. İlk aşama odun ve saman fibrillerinden oluşan bir hamur hazırlamaktır. Bunun sonucunda selüloz ulaşılabilir hale gelir. Bu hamura çeşitli selülozlardan oluşan bir karışım eklenir glukozun ortaya çıkması için 4-7 gün beklenir. Bu işleyiş enzimin yüksek maliyeti nedeniyle ekonomik değildir ve enzimatik performans sınırlıdır (Mansfield, 1999).

Selülozun yüksek spesifikliği, toksisitesinin olmaması, biyobozunur olması ve optimum pH, sıcaklık, basınç gibi özelliklerinin ılımlı aralıklarda olması selülozun inorganik katalizörlere göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır (Taylor, 1991).

2.11. Aktivite Tayini

Selüloz aktivite tayin yöntemleri hidroliz sonrası ürünlerin ölçümü, substrat miktarındaki azalmanın ölçümü, substratın fiziksel özelliklerindeki değişimin ölçülmesi olmak üzere 3 gruba ayrılır.

Hidroliz ürünlerinin ölçümünde indirgen şeker miktarı, toplam şeker miktarı ve kromofor madde miktarının ölçülmesi yer almaktadır. İndirgen şeker ölçümünde en yaygın kullanılan metotlar dinitroselisilik asit (DNS) metodu, Somogyi-Nelson metodu, 2,2-bicinchroninat (BCA), 4-hidroksibenzoilhidrazin (PAHBAH) metodu ve

ferrisiyanid metodudur (Miller, 1959; Waffenschmidt, 1987; Lever, 1972; Kidby, 1973).

Toplam şeker miktarı zincir uzunluğuna bakılmaksızın fenol-H₂SO₄ metodu ile doğrudan ölçülebilir (Dubois, 1956).

Glukoz heksokinaz ve glukoz -6-fosfat dehidrojenaz enzim çiftinden oluşan enzimatik glukoz kiti yardımıyla ya da hidroliz sonrası HPLC ile ölçülebilir (Zhang, Lynd 2004a). Pek çok şeker tayini yönteminin dedeksiyon aralıkları şu iki stratejinin kullanılması yoluyla geliştirilmiştir. Birincisi, renk reaksiyonundan sonra daha fazla seyreltme yapılmasına dayanmaktadır. İkincisi ise reaksiyon öncesinde örnek başına düşen şeker hacmini değiştirmek şeklindedir. Örneğin, DNS metodunun ilk hali her bir örnek için 20- 600µg aralığında indirgen şeker tayini yapmak için tasarlanmıştır. Ancak bu metodun dedeksiyon aralığı dilüsyon yapılarak 100- 2500 µg aralığına genişletilmiştir (Ghose, 1987).

Aynı durum Somogyi-Nelson metodu için de geçerlidir. Sigma enzimatik glukoz tayin kiti reaksiyon karışımı 10µL örnek + 1000 µL enzim çözeltisi olacak şekilde şeker miktarını 200-5000 µg/L aralığında ölçebilmektedir. Bununla beraber dedeksiyon limiti, reaksiyon karışımı 500µL örnek ve 500µL enzim çözeltisi olarak alındığında 4-100µg/L düzeyine düşürülebilmektedir (Zhang, Lynd 2004b). İndirgen şeker yöntemi Cu²⁺ ya da ferrisiyanat gibi inorganik yükseltgenlerin indirgenmesi temeline dayanır. Bu yükseltgenler selüloz zincirinin indirgen ucundaki aldehit grubundan elektron alarak indirgenirler. İndirgen şeker yönteminin dedeksiyon aralıkları 1- 2500µg/örnek aralığındadır. Somogyi metodu, görece yüksek şeker tayin aralığı ve selülazın girişim etkisinin düşük olması nedeniyle selülaz aktivitesinde en sık kullanılan 2 yöntemden biridir.

Bununla beraber bu metodun dezavantajı sellodekstrin ve glukoz standardı arasındaki zayıf stokiyometrik ilişkidir (Coward-Kelly, 2003). Örneğin, glukozun standart olarak kullanıldığı ve β-glukozidazın fazla olmadığı durumlarda selülaz aktivitesi olduğundan daha düşük olarak ölçülebilir.

Ferrisiyanat, PAHBAH ve BCA metotları yüksek duyarlılığa sahip olmalarına karşın dezavantajları protein ile spesifik olmayan girişim etkisi oluşturmalarıdır. Fenol-H₂SO₄ ve antron-H₂SO₄ metotlarını kapsayan toplam karbohidrat tayini indirgen şeker tayin yöntemleri ile kıyaslandığında iki önemli avantaja sahiptirler. Bu yöntemde sellodekstrin ve glukoz standardı arasında sıkı bir ilişki vardır. Ayrıca proteinin girişim etkisi çok azdır ya da hiç yoktur. Buna rağmen diğer karbohidrat ve türevlerinin güçlü girişim etkisi yöntemin saf selüloza uygulanmasında sınırlayıcı olmaktadır. Enzimatik analiz kiti ya da HPLC kullanımı diğer şekerlerden kaynaklanan girişim etkisinin yok edilmesini sağlar ancak bu da sellodekstrinin glukozla dönüşümünü sağlayan ekstra bir adımın ortaya çıkmasına sebep olur. Substrattaki azalmayı ölçmek için kullanılan gravimetrik ve kimyasal pek çok yöntem vardır. Ancak bu metotlar kurutma işlemi ile son bulan santrifuj ve filtrasyon gibi sürekli tekrarlayan işlemleri gerektirmeleri nedeniyle oluşan üründeki artışı ölçen metotlar kadar ilgi görmezler. Gravimetri yöntemi standart sapmasının örnek ağırlığına bağlı olması nedeniyle çok dikkat gerektirmektedir. Örneğin ağırlıkları 1 mg ve 100 mg olan iki örnekte 0,1mg.lık bir sapma birinci örnek için %10 ikinci örnek için %0,1 hata anlamına gelmektedir.

Selülozun ölçülebilir fiziksel özellikleri, şişme faktörü, yapı şekillenmesi, turbidite ve viskozitedir. Viskozimetrik olarak aktivite tayini çözünebilir selüloz türevleri kullanılarak tek başına endoglukanaz aktivitesinin ölçülmesi amacıyla kullanılmaktadır (Manning, 1981). Bu metot işlem süresince molekülün viskozite değeri ortalamasının molekül sayısı ortalamasına olan oranının sabit olduğu durumlar için uygundur (Hulme, 1988). Bunun yanında bu metodun uygulanması ve otomasyonu zordur.

2.12. *Bacillus* ve Özellikleri

Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Hücreler çomak şekilli, düz veya hemen hemen düze yakın, çoğu olumsuz ortam koşulları için çok dirençli, tek endospora sahip, açık havada spor oluşturması engellenmeyen, gram-pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bir bakteridir. Birçok türünde hücre duvarı çapraz bağlı mezo-diamino pimelik asitten oluşur (Özçelik, 1995).

Bacillus zincirleri tek veya çok sayıda uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücreler parabazal kısım ve protein kristalleri içerebilir. Ana hücrede bulunan sporun şekli ve sporogonium yeri, *Bacillus sp.* türlerinde karakteristik bir özellik gösterir. Endosporlar genellikle silindirik, elipsoidal, oval ya da yuvarlaktır. Sporlar, sporogonium'un içinde merkezde, merkeze yakın, uca yakın, uçta veya lateralde bulunur. Yapılan çalışmalarda, sporogonium'un şişmesi ve sporun şekli 3 grup altında toplanmıştır. Birinci grup; elipsoidal sporlara sahip olup sporogonium' da şişmeye neden olmazlar. İkinci grup ise elipsoidal sporlara sahip olup sporogoniumlar' da şişmeye neden olurlar. Üçüncü grup sferik sporlar ise sporogonium'un şişmesine neden olurlar (Lennete ve ark., 1985).

Bacillus suşları yoğun halde bulunan mürein tipi direkt birbirine bağlı mezo-diamino pimelik asit şeklindedir. Bazı *Bacillus* türlerinde ise hücre duvarı taykonik asit yapısına sahiptir (Özçelik, 1995).

Sporların şekilleri, sporogoniumdaki durumları sporogoniuma bağlı olan büyüklüğü, taksonomide kullanılmaktadır. *Bacillus* sporları çok kompleks bir yapı göstermekte olup, vejetatif hücrede kolayca görülür (Çetin, 1968).

Bacillus suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüsü genellikle çevresel faktörlerle değişir. Bu faktörler arasında en önemlileri kültürün bağlı bulunduğu besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel faktörlerin değişmesi ile kültürün kendisinde de birtakım değişiklikler olur. Yalnızca küçük koloni formlarını içeren suşların dışında koloni çapı, besiyeri ve içerisindeki agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Lennete ve ark., 1985).

Bazı *Bacillus* türleri katı besiyerinde, inokülasyondan önce ortamdaki nem uzaklaştırılmadığı takdirde kümeler halinde bulunma eğilimi gösterir. Çoğu *Bacillus* türü pigment üretmez. *Bacillus megaterium* suşları özellikle kazein agarda sarı renkte pigment oluştururlar (Lennete ve ark., 1985). *Bacillus* türleri toprakta, suda, fekal materyalde ve çeşitli gıdalarda bulunabilir (Banwart,1983).

Endüstri alanında kullanılan, 10'dan fazla mikrobiyal enzimin, *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. Enzim üretimi çalışmalarında kullanılan bu bakterilerde birçok önemli özellik saptanmıştır. Örneğin, büyük bir bölümü kemoorganotrof olduğu için besin istekleri azdır, kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik yoktur (Priest, 1977).

2.13. Selülozların Substratları

Selüloz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan substratlar suda çözünürlüklerine göre iki gruba ayrılırlar.

2.13.1. Suda Çözünen Substratlar

Çözünebilir substratlar 2-6 arasında düşük polimerleşme derecesine (DP) sahip sellodekstrinlerini ve DP değeri yaklaşık birkaç yüz olan selülozları içerirler. Bu substratlar genellikle selüloz bileşenlerinin tek tek aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılırlar.

Sellodekstrinler DP değerinin 6'dan küçük olduğu durumlarda kolayca çözülebilirler. DP değeri 6- 12 arasında ise çözünürlüğü biraz daha zorlaşır (Zhang ve Lynd; 2003, 2005). DP değerindeki artışla beraber sistemin entropik etkisine ve intermoleküler hidrojen bağlarına bağlı olarak molekülün çözünürlüğü dramatik olarak azalır. Sellodekstrinler genellikle selülozun HCl, (Miller; 1960, 1963) sulfirik asit ya da bu asitlerin karışımı (HCl ve H₂SO₄) (Zhang, Lynd 2003) ile hidrolizi sonucu elde edilir. Bunun yanında sellodekstrinler *C. thermocellum*'dan elde edilen sellobiaz ve sellodekstrin fosforilaz ya da *T. Reesei*'den elde edilen β -glukozidaz kullanılarak biyolojik olarak sentezlenebilir (Strobel, 1995). Sellodekstrin karışımında bulunan farklı DP'ye sahip yani farklı zincir uzunluğunda bulunan polimerler ince tabaka, katyon değişim ya da moleküler eleme gibi kromatografik yöntemler kullanılarak ayrılabilir (Shintate, 2003; Schmid, 1988; Voloch, 1984).

Bu substratlar, kromoforların substütiye glukozidden salınmaları sonucu şekerden bağımsız olarak kolayca ölçülebilmeleri nedeniyle artan selobiyoz ve glukoz varlığında inhibisyon katsayısının belirlenmesi amacıyla da kullanılmaktadırlar.

Uzun zincirli selüloz türevleri de kimyasal yapıları nedeniyle suda çözünebilirler. İyonik yapılı karboksi metil selüloz (CMC) endoglukanaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir. Endoglukanazın moleküller arasındaki β -glukozitik bağları rastgele kırması sonucunda DP değerinde dramatik bir azalma görülür. Söz konusu reaksiyon CMC'deki β -glukozitik bağların kırılması olduğunda endoglukanaz CMCaz adını alır. CMC 2 önemli fiziksel parametreye sahiptir DS süstitüsyon derecesi ve DP polimerizasyon derecesi. CMC'nin çözünebilirliği maksimum stökiyometrik değeri 3 olan DS değeriyle yakından ilişkilidir. CMC, DS değeri 0,3-0,7.den büyük olduğunda suda çözünebilirdir (Karlsson, 2001).

Ticari olarak satılan CMC'leri DS değerleri genellikle 1,5.den küçüktür. CMC indirgen şeker ve viskozite ölçümünde substrat olarak kullanılacak ise bu değer şiddetle tavsiye edilmektedir. Çünkü DS değeri 0,7.ye eşit ise hidroliz %2 ile sınırlanmaktadır (Wood, 1988). Bu değer selülazın yalnızca non-substütiye glukozu etki edebilmesi ve hidroliz reaksiyonunun en az 2 veya 3 komşu non-substütiye glukoz artığına ihtiyacı olması nedeniyle önemlidir. CMC'nin DP değeri indirgen şeker ölçümünde önemli değildir. Ancak vizkozite azalmasının ölçülmesinde büyük önem taşır. CMC su içerisinde çözülürken DP değerini düşmesinden kaçınmak amacıyla yavaşça döndürerek karıştırılmalıdır (Sharrock, 1988). Bununla beraber iyonik CMC'nin vizkozitesi pH, iyonik şiddet ve polivalent katyon konsantrasyonundan da etkilenir.

Bu nedenle endo-glukanaz aktivitesinin belirlenmesinde hidroksietil selüloz (HEC) gibi iyonik olmayan selülozlar önerilmektedir (Wood, 1988a). Boyanmış çözünür CMC'.ler remazol brillant Blue R ya da Ruthenium Red gibi boyalarla CMC'.nin karıştırılması ile elde edilirler (Fülöp, 1994; Rescigno, 1994).

2.13.2. Suda Çözünmeyen Substratlar

Selüloz aktivitesinde kullanılan ve suda çözünmeyen substratlar oldukça saf selüloz (Whatman No1 filtre kâğıdı, bakteriyel selüloz, mikrokristalize selüloz ve amorf selüloz) ve saf olmayan selüloz (boyanmış selüloz, α -selüloz, ligno-selüloz) olarak sınıflandırılabilir. Doğal selüloz selüloz I olarak isimlendirilir. İki farklı kristal formu vardır. Ia bakteri ve alglerde bulunur, Ib yüksek bitkilerde bulunur (Atalla, 1984). Doğal selüloz çeşitli işlemler ile diğer kristal formlara (II-IV) dönüştürülebilir (Klein, 1993). Selülozun kristalizasyon derecesi (CrI) X-ışını difraksiyon modeli ile kantitatif olarak ölçülebilir (Krassig 1993). Kristalizasyon derecesi hidroliz düzeyi ile yakından ilişkilidir (Converse, 1993). Buna rağmen, kristalizasyon derecesi selülozun çeşitli muameleler öncesi ve sonrasında karakteristiğindeki değişimleri göstermek amacıyla kullanılan uygun bir belirteçtir. Yüksek kristalize selüloza örnek olarak pamuk, bakteriyel selüloz *Valonia ventricosa* algal selülozu verilebilir (Fierobe, 2002). Mikrokristalize selüloz, α -selüloz, ve işlem görmemiş selülozik substratlar ortalama CrI değerine sahiptirler ve kristalize fraksiyon ile amorf fraksiyonun birleşimi olarak kabul edilebilirler. Ancak yine de iki fraksiyon arasında kesin bir sınır çizgisi yoktur.

Pamuk ipliği doğal pamuktan mum, pektin, renkli maddeler gibi safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra elde edilir (Wood, 1988b). Whatman No1 filtre kâğıdı uzun pamuk ipliği hamurundan düşük kristalizasyon derecesi (yaklaşık %45) ile üretilir. Hidroselüloz ya da ticari adıyla ‘avicel’ çeşitli firmalar tarafından aşağıdaki adımlar izlenerek üretilmektedir. Birinci adım, ağaç hamurunun seyreltilmiş hidroklorik asit ile hidrolizi ile amorf selüloz fraksiyonunun uzaklaştırılmasıdır. Bu adımı hamurun yıkanması ve kurutulması takip eder (Fleming 2001). Ancak, bu işlemler sonucunda mikrokristalize selüloz hala amorf bölgeler içermektedir. Avicel düşük DP değeri nedeniyle ekzoglukanaz aktivitesi için iyi bir substrattır.

Bakteriyel selüloz (BC) *Acetobacter xylinum* tarafından üretilen pelikülden hazırlanır (Hestrin, 1963). Bakteriyel mikrokristalize selüloz (BMCC) amorf fraksiyonları uzaklaştırmak için uygulanan asit hidrolizi ile DP.nin düşmesi sağlanarak bakteriyel selülozdan üretilir (Valjamae, 1999).

Amorf selüloz kristalize fraksiyonların mekanik ya da kimyasal yöntemlerle amorf forma dönüştürülmesi ile elde edilir. Bu selülozlar mekanik olarak amorf hale getirilmiş selülozlar, alkali ile şişirilmiş selülozlar, fosforik asit ile şişirilmiş selülozlar olabilir. Mekanik olarak amorf selüloz hazırlamak için kürelerle öğütme ya da parçalama yöntemleri kullanılır (Fan, 1980).

2.14 . Selülaz Çalışmaları

Çizelge 2.3'te literatürde var olan selülaz çalışmaları özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Selülaaz Çalışmaları

Kaynak organizma	Gen	Vektör	Host	İndüksiyon	Plasmid Seleksiyonu	Optimum Aktivite Şartları		Rekombinant Selülaaz Aktivitesi	Referans
						pH	°C		
<i>Bacillus licheniformis</i>	endo-1,4-β-glukanaz geni	pET-22b (+)	<i>E. coli</i> BL21 (DE 3)	IPTG	ampisilin	6.0	60°	1.5 U/ml	Aftab ve ark., 2011
<i>Orpinomyces</i> PC-2	<i>celE</i> endo-β-1,4-glukanaz	pPIC9K	<i>P. pastoris</i> GS115	metanol		6.0	45°	*	Jin ve ark.,2011
<i>Bacillus</i> sp.	GHF 8	pET-28a(+)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys sS RosettaTM(DE3)	IPTG	Kanamisin ve kloramfenikol	*	*	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS6. 124 U/ml ; <i>E. coli</i> RosettaTM(DE3) 8.443 U/ml	Thaenkudrua ve ark., 2011
<i>Aspergillus niger</i>	<i>EglA</i>	pPICZαC	<i>P. pastoris</i> X-33	metanol	Zeosin	4.0	50 °C	63.83 U/mg (β-glukan); 9.47 U/mg (CMC)	Quay ve ark., 2011
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	endoglukanaz geni, <i>eglIII</i>	pET-20b	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	IPTG	ampisilin	6.0	50 °C	*	Nurachman ve ark., 2010
<i>Bacillus subtilis</i>	cell15	pET25b	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	IPTG	ampisilin	6.0	50 °C	6.78 U/ml	Yang ve ark., 2009
<i>Coptotermes formosanus</i>	CfEG3a	pET28a	<i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3) pLysS	IPTG	Kanamisin ve kloramfenikol	*	*	16 U/mg	Zhang ve ark.,2009
<i>Bacillus subtilis</i>	β-1,3-1,4-glukanaz	pET28a	<i>E.coli</i> BL21	IPTG	kanamisin	6.4	40 °C	12.52 U/ ml	Qiao ve ark.,2009
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	CSCMCas	pPIC3	<i>P. pastoris</i> GS115	metanol	*	*	*	4.93 ± 0.217 (U/mg protein)	Thongekkaew ve ark.,2008

Çizelge 2.3. (Devam) Selüloz Çalışmaları

<i>Bacillus subtilis</i>	Endoselülaz, CelDR	pET-28a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	IPTG	kanamisin ve ampisilin	*	50°C	0.82 U/ml	Li ve ark., 2008
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	Endoglukanaz	pPICZαA	<i>P. pastoris</i> GS115	metanol	zeosin	5.0-6.0	70 °C	57 U/mg(CMC)	Wonganu et al.(2007)
<i>V. volvacea</i>	Egl1	pPICZαB	<i>P. pastoris</i>	*	*	7.5	55 °C	344 U/mg(CMC)	Ding et al. (2002)
<i>A.niger</i>	<i>EglC</i>	*	<i>A. niger</i>	*	*	4.5	55 °C	19 ± 1 U/mg (xyloglucan)	Hasper et al. (2002)
<i>A.niger</i>	<i>EglB</i>	*	<i>K.lactis</i>	*	*	*	*	22 ± 4 U/mg (CMC)	Hasper et al. (2002)
<i>A.niger</i>	<i>EglA</i>	*	<i>K.lactis</i>	*	*	*	*	59 ± 5 U/mg (β-glucan); 3 ± 0.4 U/mg (CMC)	Hasper et al. (2002)
<i>A. niger</i>	Eng1	*	<i>S. cerevisiae</i>	*	*	6.0	70 °C	204 U/mg (CMC)	Hong et al. (2001)
<i>Streptomyces sp.</i>	Cel12A	<i>Bacillus</i> ekspresyon vektörü	<i>Bacillus subtilis</i>	*	*	8.0	50 °C	*	Solingen ve ark., 2001
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	endo-1,4-glukanaz, eg1		<i>S. cerevisiae</i>	*	*	6.0	70 °C	*	Hong ve ark., 2003
<i>Bacillus subtilis</i>	CellulasecelB 1	pUC118 pET-11d ve pET12a	<i>E. coli</i> BL21 (DE3),	*	*	7.0	50 °C	*	Sanchez-Torres ve ark.,1996
<i>Rhodothermus marinus</i>	β -glukanaz, <i>bglA</i>	pET23a	<i>E. coli</i> BL21 DE3,pLysS	IPTG	ampicillin	7.0	85°C	1445 U/mg	Spilliaert ve ark., 1994.
<i>Clostridium thermocellum</i>	celA(endo-β-1,4-glukanaz	lambda CEL16 and pBR322	<i>E. coli</i> DH1	*	ampicillin	pH 5.5-6.5	75 °C	580 (U/Mg)	Schwarz ve ark.,1986

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

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

“ARÇELİK” MD₅₀₀ Mikrodalga fırın,
“BIORAD” DNA Engine, PCR makinesi,
“BIORAD” Güç kaynağı (SDS ve agaroz için),
“BIOSAN” Combi Spin FVL 2400N, Spin Cihazı,
“BIOSAN” ES 20, Çalkalayıcı İnkübatör,
“Constant Systems”Hücre Parçalama Cihazı,
“GEL LOGIC 200” Agaroz jel fotoğraf makinesi,
“HETTICH” Mikro 22R Santrifüj,
“HETTICH” -80 Dondurucu,
“HMC-HIRAYAMA veya HICLAVE HV-50L” Otoklav,
“JASCO J810” CD Spektrofotometresi,
“MEMMERT” Etüv,
“Nanodrop-ND1000- Spectrophotometer”
“OPTIC-PRO” 4830P Tarayıcı,
“SONICS (VCX130)” Sonikatör
“SYNGENE” SYTC/1422, UV Gösterici,
“UĞUR” Dikey Soğutucu +4°C,
“VELP SCIENTIFICA” FOC 225i, Soğutuculu İnkübatör,
“VELP SCIENTIFICA” ARE, Isıtıcı-Magnetik Karıştırıcı,
“VESTEL” GTP 455A, Buzdolabı,
“VISION” VS 30 000i, Yüksek Hızlı Santrifüj,
“VISION” Kar makinesi,
“VWR” Himac CT 15E, Santrifüj,

“VWR” Vorteks Cihazı,
 “ZHİCHENG” ZHWY-111C, Çalkalayıcı İnkübatör,
 “GENERAL ELECTRIC” Biocore SPR cihazı,
 “ABI voyager DESTRA (circa. 2002)” MALDI-TOF cihazı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Ni-NTA Kolon Dolgu Maddesi “Qiagen”
 LB Broth Base “Invitrogen- lennox L Broth Base”
 CMC “Merck”
 Agar “BD Bacto™ Agar”
 KCl “Sigma”
 CaCl₂.2H₂O “Carlo Erba”
 Gliserol “Euromedex”
 KCH₃COO “Merck”
 DMSO “Merck”
 Ampisilin “Sigma Aldrich”
 Kloramfenikol “Sigma”
 Trypton “BD- Bacto™”
 Maya ekstrakt “Difco”
 NaCl “Tekkim”
 D-glukoz monohidrat “Alfa Aesar”
 L-Arabinose “Sigma”
 IPTG “Amresco”
 Agaroz “Bioron”
 Etidyum bromür “ICN”
 Akrilamid “Amresco”
 SDS “Serva”
 APS “Biorad”
 TEMED “Biorad”
 PİPES “Alfa Aesar”

Tris “Sigma Aldrich”
 HCl “Merck”
 PMSF “Sigma Aldrich”
 Benzamidin “Merck”
 İmidazol “Merck”
 MgCl₂ “Riedel de Haën”
 MgSO₄.7H₂O “Riedel de Haën”
 Etanol “Merck”
 Metanol “Merck”
 Plazmid DNA saflaştırma kiti “Promega”
 PCR ürünleri temizleme kiti “Qiagen QIAquick PCR Purification Kit”
 Q solution “Qiagen”
 MgCl₂ “Qiagen”
 Pfu DNA polimeraz “Qiagen”
 BamHI “Promega”
 MluI “Promega”
 Tampon D “Promega”
 Tampon E “Promega”
 BSA “Promega”
 T₄ DNA ligaz “Promega”
 T₄ DNA ligaz tamponu “Promega”
 Kongo Red Boyası “Amresco”
 Komasi mavisi “Sigma Aldrich”
 Trombin “Sigma”
 Şırınga filtresi “Sartorius / Minisart”
 Polikarbonat filtre “Millipore”

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler

- **PCA(Plate Count Agar) katı besiyeri:** *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve katı agarda stoklanması için kullanılmıştır. Peptone from casein (5 g/L), maya ekstraktı (2,5

g/L), D(+) glucose (1 g/L), Agar-Agar (20 g/L) bileşiminde hazırlanan 1 l'lik çözelti 400'er ml olacak şekilde 2 tane stok şişesinde otoklavlandı. İstenilen özellikteki bakterilerin izolasyonu için pH:5,5 olarak ayarlanmıştır.

- **%1 CMC (+) Agar PCA:** *Bacillus* suşlarda selülaaz aktivitesinin kalitatif olarak araştırılması için kullanılmıştır. Peptone from casein (5 g/L), maya ekstraktı (2,5 g/L), Agar-Agar (20 g/L) ve CMC (10 g/L) bileşiminde hazırlanan 1 l'lik çözelti 400'er ml olacak şekilde 2 tane stok şişesinde otoklavlandı. İstenilen özellikteki bakterilerin izolasyonu için pH: 5,5 olarak ayarlanmıştır.

- **Sıvı PCA:** CMC'li katı besi yerinde selülaaz aktivitesi gösteren mikroorganizmaların sıvı besiyerinde büyümeleri için kullanılmıştır. Bileşimi peptone from casein (5 g/L), Maya Ekstraktı (2,5 g/L), D(+) glucose (1 g/L) şeklindedir.

- **Kongo Kırmızısı (%0.1):** Katı besiyerinde selülaaz aktivitesinin gösterilmesi için 0.1 g kongo kırmızısı 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

- **NaCl Çözeltisi (1M):** Kongo kırmızısı ile boyanan petri kutusunda selülaaz aktivitesi sonucu oluşan sarı aktivite zonunu görünür hale getirmek amacıyla kullanılmıştır.

- **pH: 7,6 50 mM Sodyum Fosfat Tamponu (300 mM NaCl) :** Enzim çözeltisinden imidazolu uzaklaştırmak için kullanılmıştır. 12,35 g Na_2HPO_4 ve 2,03 g NaH_2PO_4 2 litre distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

- **Dinitro Salisilik Asit (DNS):** Enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacı ile kullanılır. 1g DNS 50 mL distile su içerisinde çözülür. Üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL 2 N NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL ye tamamlanır.

- **LB çözeltisi:** 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1 l suda çözüldü. Hazırlanan 1 l'lik çözelti 400'er ml olacak şekilde 2 tane stok şişesine alındı ve üzerine 6 g agar ilave

edilip karıştırıldı, otoklavlandı. Kalan LB çözeltisi yaklaşık 4 ml olacak şekilde deney tüplerine konuldu ve ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatıldı, otoklavlandı. 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base, 10 g maya ekstraktı, 10 g tripton, 5 g NaCl içeriğine sahiptir.

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

- **Ampisilin:** 1g ampisilin alınarak 10 ml steril suda çözöldü. Enjektöre alınarak; nitro-selöloz membrandan süzölerek 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine alındı ve dondurucuda saklandı.

- **IPTG:** 1 g IPTG, 10 ml steril suda çözöldü ve nitro selölöz membrandan süzölüdü. 1'er ml olacak şekilde ependorflara bölündü ve dondurucuya (-20 °C) kaldırıldı.

- **L-Arabinoz:** 10 g L-arabinoz 50 ml distile suda çözölerek %20'lik çözelti hazırlandı.

- **Agaroz Elektroforez Jeli:** 1 g agaroz üzerine 100 ml 1x TAE tamponu eklendi ve mikrodalga fırında eritildikten sonra üzerine 5 µl etidyum bromür eklendi ve kasete döküldü.

- **SDS Elektroforez Jeli:**

Alt Tampon: 182 g Tris (1,5 M), 4 g SDS(%0,4) 1L distile suda çözölerek pH 8,8 olarak ayarlandı.

Üst Tampon: 60,5 g Tris (1,5 M), 4 g SDS(%0,4) 1L distile suda çözölerek pH 6,6-6,8 olarak ayarlandı.

Yürütme jeli: 2,7 ml %40 akrilamid, 2,25 ml alt tampon, 4 ml su, 50 µl %10 APS ve 20 µl TEMED.

Yükleme jeli: 0,35 ml %40 akrilamid, 1 ml üst tampon, 2,55 ml su, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED. Tüm maddeler katıldı ve en sona TEMED eklenip kasete döküldü.

Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli döküldü ve polimerleşmesi beklendi.

Elektroforez Tamponu(1X): 3 g Tris, 14,4 g Glisin, 1 g SDS bileşikleri bir miktar distile suda çözülür ve son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenerek hazırlanır.

SDS Örnek Yükleme Tamponu (5X): 0,6 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8), 5 mL Gliserol (%50), 2 mL %10'luk SDS, 0,5 mL β -ME, 1 mL %1'lik Bromfenol mavisi ve 0,9 mL distile su karışımından meydana gelir.

SDS Jel boyama (Staining) Solüsyonu: 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtre kağıdından süzildükten sonra, karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 ml distile su eklenerek hazırlanır.

SDS Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu: 100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL distile su karışımından oluşur.

- **Amonyum Persülfat (APS- %10):** 0,5 g APS 5 mL distile su içerisinde çözülerek hazırlanır.
- **PİPES'li Tampon Çözeltisi:** 0,5 M, 50 ml PİPES çözeltisi hazırlandı. KOH ile pH 6,7'e ayarlandı. Ardından 6,92 g $MnCl_2$, 1,66 g $CaCl_2$ ve 18,64 g KCl 980 ml suda çözüldü. Üzerine 20 ml PİPES çözeltisi eklendi ve hacim 1 l'ye tamamlandı. 0,45 μ m'lik Nalgene filtreden geçirildi ve steril şişelere bölünerek, -20°C'de saklandı.
- **100mM Tris/HCl Tamponu (100mM NaCl pH:7.5):** 12,114 g tris alınarak bir miktar suda çözüldü. pH derişik HCl ile 7,5'e getirildi. 5,844 g NaCl (100 mmol) eklendi ve hacim su ile 1 l'ye tamamlandı.
- **300mM imidazol Tris/HCl Tamponu:** 2,042 g imidazol 100 ml Tris/HCl tamponu içinde çözüldü. pH derişik HCl ile 7,5'e getirildi.
- **PMSF çözeltisi:** 200 μ g PMSF %99'luk 1 ml etanol ile çözüldü.

- **SOB:** (Super Optimal Broth) 20 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 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.
- **CMC Çözeltisi (%1):** 0.5 g CMC enzimin içinde bulunduğu 50 ml Tris/HCl tamponu içinde çözünür.

3.2. Yöntem (yhfe Endoglukanaz Proteininin Rekombinant Olarak Üretilmesi)

3.2.1 *Bacillus* Suşlarında Selülag Aktivitesinin Kalitatif Olarak Araştırılması

Orta Karadeniz Bölgesi Ordu-Akkuş ilçesinden farklı toprak örneklerinden daha önce izole edilmiş ve genomik DNA'ları elde edilmiş olan ksilanaz aktivitesi olduğu tespit edilmiş olan *Bacillus* suşlarında kalitatif olarak selülag aktivitesi araştırılmıştır. Farklı *Bacillus subtilis* suşlarına ait genomik DNA'lar laboratuvar grubu tarafından daha önceki çalışmalarda kullanılmak üzere izole edilmiş ve -20 °C'de saklanmıştır.

Tanımlanmaları yapılan ve -80 °C'de muhafaza edilen *Bacillus* sp. suşlarında selülag aktivitesini araştırmak için tek koloni oluşturacak şekilde pH sı 5,5'e ayarlanmış olan PCA katı besiyeri içeren petri kaplarına yayma yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Ekim yapılan besiyeri 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilerek koloni oluşumu sağlanmıştır. Her bir suşa ait tek koloni ependorf içinde PCA sıvı besiyerine ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Büyüme görülen sıvı besiyeri içerisindeki suşlar, CMC içeren PCA katı besi yerine spot şeklinde ekilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda besiyerine %0,1'lik Kongo kırmızısı çözeltisinden dökülerek ve 15 dakika boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyama süresinin sonunda fazla boyanın ortamdan uzaklaştırılması için besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edilmiş ve 15 dakika inkübasyon yapılmıştır. Etraflarında sarı hidroliz zonu bulunan suşlar selülag pozitif olarak değerlendirilmiştir (Voget ve ark, 2006).

3.2.2. Selülaz Genlerinin Araştırılması

Kalitatif olarak aktif olduğu tespit edilen *Bacillus subtilis* suşlarının en aktif olduğu tahmin edilen suşa ait genomik DNA’da, literatürde var olan selülaz genlerinin varlığını tespit etmek amacıyla ‘NCBI (National Center for Biotechnology Information)’ genom veri tabanından yararlanarak *Bacillus subtilis* selülaz genlerinin sekansları araştırıldı (Anonim, 2009b). *Bacillus subtilis*’e ait 9 farklı selülaz geninin dizisine ulaşılmıştır.

3.2.3. PCR İşlemleri İçin Selülaz Genlerine Ait Primerlerin Tasarımı

Öncelikle klonlama işlemlerinde araştırma grubumuza ait olan patentli vektörlerden biri olan ve rekombinant protein üretimi için başarılı bir şekilde kullanılan pTolT vektörü seçildi.

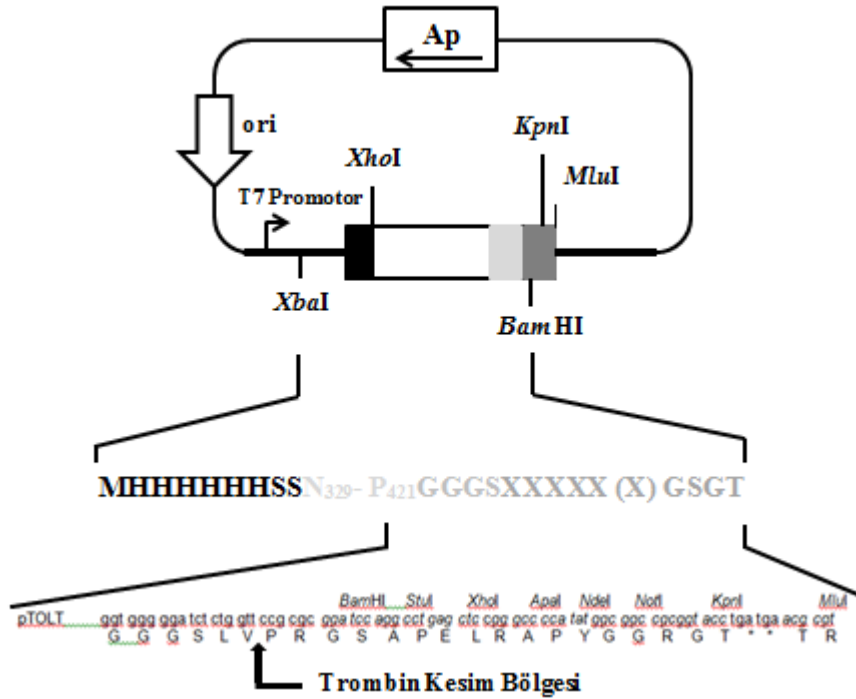
pTolT vektörüne klonlamak üzere selülaz genlerine ait DNA parçalarının çoğaltılması için PCR işleminde NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından elde edilen 4 farklı gene ait sekans dizilerinden yararlanarak *Bacillus subtilis* selülaz genlerine ait ileri ve geri 26-30 bp uzunluğundaki primerler şu şekilde dizayn edildi.

Seçilen restriksiyon enzim bölgeleri seçilen enzim tanıma bölgelerinin 5' ve 3' yönlerinde optimum kesim için en az kaçar tane daha baz bulunması gerektiği göz önüne alınıp (New England Biolab katalogunun “appendix” bölümünde var olan çizelgelerden faydalanılmıştır) aşağıda açıklandığı şekilde seçim ve restriksiyon enzimleri ile kesim yapılmıştır (Anonim, 1998).

- İlk olarak selülaz genlerine ait DNA sekansları ele alındı.
- pTolT vektörüne ait klonlama bölgesinde yer alan restriksiyon enzimleri tespit edildi. Klonlama yapılmak istenen her gen için enzim ikileri seçildi. Bu ikililerin bizim klonlamak istediğimiz selülaz genlerinin içerisinde olup olmadıkları <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> sitesinde bulunan “NEB cutter V2.0”

programı kullanarak araştırıldı ve benzersiz (unique) olan enzimlerden uygun olanları primer tasarımı için seçildi (Anonim, 2012b). Restriksiyon enzim ikilileri seçilirken seçilen enzimlerin vektör DNA'sını bir bölgeden kesiyor olmasına, klonlanacak geni ise genin herhangi bir bölgesinden kesmemesine dikkat edildi.

- İleri ve geri primerleri için minimum 20-25 baz çifti (bç) yhfE endoglukanaz proteininin DNA'sından bire bir olarak alındı ve bu diziye restiriksiyon enzimlerinin dizileri ilave edildikten sonra 5' uçlarına ekstradan 5 ya da 6 adet T eklenerek hem enzimin optimum kesmesi için gerekli olan DNA dizisi, enzimin tanıma bölgesi baz alınarak bir miktar uzatıldı hem de bu sayede oligonükleotidlerin erime sıcaklıkları düşürülerek optimize edildi.



Şekil 3.1. pTolT vektörünün dairesel haritası ve poli-linker bölgesinin restiriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi (Anderluh, 2003)

Bu sisteme (pTolT) klonlama yapılacak DNA parçalarını üretecek PCR işlemi için dizayn edilen primerler;

1. yhfE- BamHI sense primer :

5'-TTTTTGGATCCATGGCAAAATTAGAT-3' **26 bç**

2. yhfE- MluI reverse primer:

5'-TTTTTACGCGTTTATTGGTACGTAATTTC-3' **29 bç**

3.2.4. Selülaaz Aktivitesi Tespit Edilen *Bacillus* Suşlarında PCR ile Selülaaz Genlerinin Araştırılması

Tasarlanan primerler yardımı ile en iyi selülaaz aktivitesine sahip olduğu düşünülen *Bacillus subtilis* genomlarında PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile gen varlığı araştırılmıştır. PCR işlemleri için satın alınan yüksek saflıktaki oligonukleotidler DNaz içermeyen saf su ile PCR işlemlerinde kullanılacak olan konsantrasyona seyreltili ve aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı.

PCR

- 31,5 µl H₂O (DNaz & RNaz free)
- 5 µl 10x PCR tamponu
- 3 µl MgCl₂ (25mM)
- 3 µl dNTP karışımı (10 mM)
- 3 µl primer “sense” (5µM)
- 3 µl primer “reverse” (5µM)
- 1 µl kalıp DNA (*B. subtilis* genomik DNA)
- 0,5 µl Taq DNA polimeraz (5U/ µl)

Kalıp DNA olarak 6 ve 11A kodlu *Bacillus subtilis* suşlarına ait genomik DNA'lar kullanılmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olan PCR tüpleri PCR işlemi için

hazırlanmıştır. PCR işleminde; sıcaklık değerleri her bir döngü için aşağıda gibi ayarlanmış ve toplamda 33 döngüyle PCR işlemi tamamlanmıştır.

1. Denatürasyon: 95 °C
2. Primer Annealing: 55 °C
3. Ekstensiyon: 72 °C

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra 10’ar µl PCR ürününün 3 µl Orange G DNA yükleme boyası ile karışımı %1’lik agaroz jelinde analiz edildi ve jel görüntüleme cihazı ile jel görüntüsü elde edildi.

3.2.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, PCR ürünleri PCR karışımından “QIAGEN QIAquick PCR Purification ” kiti kullanılarak saflaştırıldı.

3.2.6. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim

yhfE endoglukanaz geni ve pTolT vektörünün BamHI ve MluI enzimleri ile kesimi farklı tampon sistemleri ile iki basamakta gerçekleştirildi.

Birinci kesim:

Çizelge 3.1 Birinci kesim için gereken madde miktarları

yhfE-BamHI	pTolT- BamHI
2 µl BamHI	2 µl BamHI
4 µl Tampon E	3,1 µl Tampon E
4 µl 10xBSA	3,1 µl 10xBSA
20 µl saf yhfE PCR ürünü	15 µl pTolT vektörü
10 µl saf su	6,8 µl su

- Enzim kesiminde toplam hacim PCR ürünü için 40 µl, vektör DNA'sı için 30 µl olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Ardından mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37 °C'de sıcak su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
- Enzim kesimi 4 saat süresince sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Her saat başında reaksiyon tüpleri hızlıca döndürülerek reaksiyona devam edilmiştir. 3. Saat sonunda sadece vektör DNA'sının bulunduğu reaksiyon tüplerine 1'er µl BamHI eklenmiştir, enzim eklenen tüpler hızlıca döndürülerek 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Belirtilen şekilde ilk kesim 4 saatte gerçekleştirildi ve kesim sonrasında ürünler "QIAGEN QIAquick PCR Purification " kiti kullanılarak saflaştırılmış ve ikinci kesim işlemi ile devam edilmiştir.

İkinci kesim:

Çizelge 3.2. İkinci kesim için gereken madde miktarları

yhfE-MluI	pTolT- MluI
2 µl MluI	2 µl MluI
4 µl Tampon D	3 µl Tampon D
4 µl 10xBSA	3 µl 10xBSA
22 µl MluI ile kesilmiş ve saflaştırılmış yhfE kesim ürünü	22 µl MluI ile kesilmiş ve saflaştırılmış pTolT kesim ürünü
8 µl saf su	

- Enzim kesiminde toplam hacim PCR ürünü için 40 µl, vektör DNA'sı için 30 µl olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Ardından mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37 °C'de sıcak su banyosunda inkübasyona bırakıldı.
- Enzim kesimi 4 saat süresince sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Her saat başında reaksiyon tüpleri hızlıca döndürülerek reaksiyona devam edilmiştir. 3. Saat sonunda sadece vektör DNA'sının bulunduğu reaksiyon tüplerine 1'er µl MluI eklenmiştir, tüpler hızlıca döndürülerek 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

İlk kesimde olduğu gibi ikinci kesim de 4 saatte gerçekleştirilmiştir ve kesim sonrasında ürünler “QIAGEN QIAquick PCR Purification ” kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.

3.2.7. DNA Ligasyonu

Kesilen vektör plazmid DNA’ları ve PCR ürünleri Promega T4 DNA Ligaz kullanılarak birleştirildi. Ligasyon karışımı için işlemler aşağıdaki şekilde yapıldı;

Çizelge 3.3. Ligasyon için gereken madde miktarları

pTolT- yhfE endoglukanaz ligasyonu için;
14.5 µl saf yhfE- BamHI/MluI
2.5 µl saf pTolT- BamHI/MluI
2 µl Promega 10X T ₄ DNA ligaz tamponu
1 µl PromegaT ₄ DNA ligaz

Çizelge 3.3’te belirtildiği şekilde yapılan pipetlemenin ardından, hazırlanan ligasyon karışımı +16 °C’de 16-18 saat süresince inkübasyona bırakıldı, transformasyon işlemlerinde kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı.

3.2.8. DH5α Hücrelerinin Transformasyonu

PİPES’li Kompetent Hücre Hazırlanması

- -80 °C’de stoklanmış olan DH5α hücreleri LB petrilere ekildi ve 37 °C’de 16 saat inkübe edildi.
- 16 saatlik inkübasyonun ardından alınan petriden 1 koloni alınarak; içinde 25 ml SOB bulunan 250 ml’lik erlene inoküle edilerek, 250 rpm ve 37 °C’de 6 saat inkübe edildi.

- 6 saatin ardından kültür için içinde 250 ml SOB bulunan 3 tane erlen hazırlandı ve 25 ml'lik DH5 α kültüründen erlenlere sırasıyla 10 ml, 4 ml ve 2 ml inoküle edildi. Hazırlanan erlenler 18-22°C arası 14 saat boyunca 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Kùltürlerin 45 dakikada bir 600 nm'deki OD değeri ölçölerek bu değeri 0,55'e ulaştığında kùltür çalkalayıcıdan alındı.
- 10 dakika buzlu-su banyosunda bekletildi.
- Ardından hücreler +4 °C'de 2 500 g (3 900 rpm)'de 10 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve santrifüj şişesindeki besiyerinin tamamen uzaklaştırılmasına dikkat edildi.
- Hücrelere 0 °C 'deki 80 ml PİPES'li tampon ilave edilerek, hassas olarak yeniden süspansiyon haline getirildi.
- Hücreler, +4 °C 2 500 g (3 900 rpm)'de 10 dakika santrifüjlendi. Tüpün içindeki tampon çözelti tamamen uzaklaştırıldı.
- 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 banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- Hızlı bir şekilde hücreler steril ependorf tüplere bölündü ve hızlıca donması için sıvı azota atıldı. Ardından hücreler -80 °C'de saklandı (Inoue ve ark., 1990).

Transformasyon

- Transformasyon için hazır hale getirilmiş buz banyosu içindeki DH5 α kompetent hücrelerinden 200'er µl alınarak gerekli sayıda ependorfa pipetleme yapıldı. Üzerine ligasyonu gerçekleştirilen kùltürden 3 µl plasmid DNA eklendi ve hassas bir şekilde karıştırılarak 1 saat buz banyosunda bekletildi.
- 1 saatin ardından 2 dakika 42 °C'de ısı şokuna maruz bırakıldı.
- Tekrar buza gömölerek 5 dakika inkübe edildi.
- Üzerine 250 µl LB sıvı besiyeri eklendi ve yarım saat 37 °C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.

- Yarım saatin ardından hücreler ampisilinli petriye yayma yöntemi ile ekildi ve 37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Hanahan, 1985).

3.2.9. Plazmid DNA Saflaştırılması

37 °C’de 1 gece inkübasyona bırakılmış olan petrilerdeki koloniler 100 µM/ml konsantrasyondaki ampisilinden 3 ‘er µl içeren 3 ml’lik steril LB sıvı besiyeri tüplere inoküle edildi. Herbir tüpe bir koloni inoküle edilmesine dikkat edildi. LB sıvı besiyeri ve plazmid DNA taşıyan hücreleri içeren kültürler 37 °C’de gece boyu inkübe edildi. Mikrosantrifüj ile hücreler ependorf tüplerine toplanarak “Promega Wizard® *Plus* SV minipreps” kiti kullanarak plazmid DNA’lar şu şekilde saflaştırıldı:

- Ependorfların içerisindeki hücre peletleri 250 µl “hücre süspansiyon çözeltisi” eklendi ve çok iyi vortekslenerek hücreler süspanse hale getirildi. Çözünmemiş pelet kalmamasına dikkat edildi.
- Üzerine 250 µl “hücre parçalama çözeltisi” eklendi. Ependorflar vorteks kullanılmadan 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 çözelti tamponu” eklendi ve birkaç sefer alt-üst edilerek karıştırıldı.
- Ependorf tüpleri mikrosantrifüj kullanılarak maksimum hızda (15 000 rpm) 10 dakika santrifüjlendi. Ardından süpernatant kısım pipetle alındı. Süpernetantın pelet içermemesine dikkat edildi.
- Alınan süpernatant, mini DNA bağlama kolonuna verildi. 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- 750 µl yıkama çözeltisi kolona verildi ve 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- 250 µl yıkama çözeltisi kolona verildi ve 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.

- Kolonda çözelti kalmış olabileceğinden kolon boş olarak 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- Kolona 100 µl “nükleaz içermeyen su” verildi ve 1 dakika inkübe edildi.
- Ardından 15 000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenerek, plazmid DNA’lar saflaştırıldı ve etiketlenerek restiriksiyon analizi için kullanılmak üzere -20 °C’de dondurucuda saklandı.

3.2.10. Plazmid DNA’ların Restiriksiyon Enzimleri ile Analizi

Saflaştırılan pTolT-yhfE plazmid DNA’lar; BamHI, MluI ve BamHI&MluI enzimleri ile kesilerek; plazmid DNA’ları PCR yapıldıktan sonra bu plazmidlerin istenilen insertleri ihtiva edip etmedikleri %1’lik agaroz jel üzerinde analiz edildi.

Çizelge3.4. Restiriksiyon Enzimleri ile Analiz

BamHI ile kesim	MluI ile kesim	BamHI&MluI ile kesim
4 µl Tampon E	4 µl Tampon D	1 µl Tampon D
4 µl 10x BSA	4 µl 10x BSA	1 µl 10x BSA
20 µl plazmid DNA	20 µl plazmid DNA	6 µl plazmid DNA
2 µl BamHI	2 µl BamHI	1 µl BamHI
10 µl H ₂ O	10 µl H ₂ O	1 µl H ₂ O

- Çizelge 3.4’te görüldüğü gibi 3 ayrı kesim için ependorf tüpleri hazırlandı, vortekslendi. Mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürüldü ve 37 °C’ye ayarlanmış bir ısıtıcı blok üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- 1 saat sonra tüpler alınarak hızlıca döndürüldü ve tekrar inkübasyona bırakıldı.
- 1 saat sonra tüplere 1 µl enzim ilave edilerek, hızlıca döndürüldü ve tekrar inkübasyona bırakıldı.
- 1 saat sonra tüpler alınarak hızlıca döndürüldü. Alınan az miktardaki örneklerin üzerine Xylene DNA boyası eklenerek agaroz jele yaklaşık olarak 25–30 µl yükleme yapıldı. Yürütme tamamlandıktan sonra jelin fotoğrafı alındı.

3.2.11. DNA Dizileme

Transforme olmuş plazmid DNA'larından 10 µl alındı ve T7 terminatör primeri kullanılarak "BECKMAN COULTER GENOMICS- UK" firması tarafından DNA dizileme gerçekleştirildi.

3.2.12. *E. Coli* BL21(DE)pLysE ve BL21 AI Hücrelerinin pTolT-yhfE Plazmidi ile Transformasyonu

FSB'li Kompetent Hücre Hazırlanması

- 1 gece önce 4 ml'lik LB tüplerine inoküle edilen BL21(DE3) pLysE ve BL21 AI kültüründen 1 ml alınarak 2 tane steril erlene eklendi. 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 5 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine +4 °C'de saklanan soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisinden 50 ml eklendi ve pellet tamamen çözünene kadar vortekslendi. Ardından 1 saat buz banyosunda inkübe edildi.
- 1 saatin ardından; +4 °C, 4 000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 8 ml soğuk FSB çözeltisi eklendi ve vortekslemeden pellet çözüldü.
- Pelletin tamamı çözününce üzerine 560 µl DMSO eklendi ve 3 saat buza gömüldü.
- 3 saatin ardından kompetent hücre transformasyon için hazır hale geldi (Hanahan, 1983).

Transformasyon

- Transformasyon için hazır hale getirilmiş buz banyosu içindeki BL21(DE3) pLysE ve BL21 AI BL21 AI kompetent hücrelerinden 200'er µl alınarak gerekli sayıda ependorfa pipetleme yapıldı. Üzerine saflaştırılmış 0,5 µl plasmid DNA eklendi ve hassas bir şekilde karıştırılarak 1 saat buz banyosunda bekletildi.
- 1 saatin ardından 2 dakika 42 °C'de ısı şokuna maruz bırakıldı.
- Tekrar buza gömülerek 5 dakika inkübe edildi.
- Yarım saatin ardından hücreler ampisilin ve kloramfenikol içeren petriye yayma yöntemi ile ekildi ve 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Hanahan, 1985).

3.2.13. TolAIII-Selülaz (yhfE endoglukanaz) Füzyon Proteinin Üretilmesi (İndüksiyon)

Ekpresyon için BL21(DE)pLysE ve BL21 AI ekspresyon vektörleri kullanıldı.

- pTolT-yhfE plazmid DNA'sı ile transforme olmuş ve koloni oluşumu görülen BL21(DE3) pLysE petrilerinden birer koloni alınarak; 4 µl'lik ampisilin (100 µM/ml) ve 4 µl kloramfenikol ihtiva eden (34 µM/ml) 4 ml lik steril LB tüplerine inoküle edildi ve 250 rpm 37 °C bir gece de inkübe edildi.
- pTolT-yhfE plazmid DNA'sı ile transforme olmuş ve koloni oluşumu görülen BL21 AI petrilerinden birer koloni alınarak; 4 µl'lik ampisilin (100 µM/ml) ihtiva eden 4 ml lik steril LB tüplerine inoküle edildi ve 250 rpm 37 °C bir gece de inkübe edildi.
- Ertesi sabah 600 ml'lik erlenlerde üretime geçildi. BL21(DE)pLysE hücreleri ekilecek erlenlere kloramfenikol ve ampisilin, BL21 AI hücreleri ekilecek erlenlere ampisilin eklendi. Bir gün önce ekilen ve büyüme görülen tüplerdeki hücre kültürlerinden 1'er ml 600 ml'lik LB besiyeri içeren 2 L'lik erlenlere inoküle edildi. 37 °C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Her saat 600 nm'deki absorbansları 37 °C'de okunarak yetiştirildi. Erlenlerdeki kültürlerde OD ~ 0,7 ye ulaştığında, BL21(DE)pLysE erlenlerindeki kültürler 1 M 600

µl IPTG ile BL21 AI hücrelerini içeren erlenler ise %20'lik 600 µl L-arabinoz ile indüklendi.

- IPTG ve arabinoz ile 4 saatlik indüksiyonun ardından erlenler alınarak; 250 ml'lik santrifüj kaplarında, +4 °C'de 8000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Toplanan *E. coli* BL21(DE3)pLysE ve BL21 AI hücreleri -20 °C'de saklandı (Guda ve ark., 1995).

3.2.14. *E. Coli* BL21(DE) pLysE ve BL21 AI Hücrelerinin Parçalanması

- -20 °C'de saklanan indüklenmiş haldeki *E. Coli* BL21(DE) pLysE ve BL21 AI hücreleri buza gömüldü. Üzerine 100 mM Tris tamponundan (pH = 7,5) 10 ml eklenerek süspansiyon haline getirildi.
- Süspansiyona 100 mM benamidinden 100 µl eklendi ve vortekslendi. Üzerine 100 mM PMSF'den 100 µl eklendi ve buz üzerine alındı.
- *E. Coli* BL21(DE) pLysE hücreleri buz banyosu içine gömülü halde 3 mm ucu olan sonikatörle 7–8 tur yapılarak 1 saat parçalama işlemi gerçekleştirildi. BL21 AI hücreleri ise 'Cell Distruption Equipment' cihazı ile yüksek basınçta parçalanarak krema kıvamına getirildi.
- Parçalanmayan hücreleri ayırmak amacıyla +4 °C ve 6000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant ayrı bir tüpe alındı. Pelet üzerine yine 10 ml Tris tamponu eklenerek önceki işlemler tekrar edildi.
- Bu şekilde tekrarlanan işlemlerin ardından parçalanmış hücreleri içeren süpernatantlar birleştirildi.

3.2.15. Ultrasantrifüjle Proteinlerin Ayrımı

Süpernatant 30 000 rpm ve +4 °C'de 1 saat santrifüjlenerek, karışımdaki hidrofobik proteinler ve diğer hidrofobik hücre materyalleri çöktürüldü.

3.2.16. Afinite Kromatografisi ile Füzyon Proteinin Saflaştırılması

- Saflaştırma yapılacak olan polikarbonat kolon içerisine “Promega HisLink Protein Purification Resin ” reçineden (nikel bağlı dolgu maddesi) 4 ml kadar konulduktan sonra, kolon 50 ml 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla yıkandı.
- Santrifüj sonrasında alınan protein karışımı kolona tatbik edildi ve kolondan gelen bütün fraksiyonlar toplandı.
- Protein yüklenmiş kolon 50 ml 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla yıkanarak kolonda tutunmuş diğer proteinlerin ayrılması sağlandı.
- 300 mM imidazol içeren, 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla kolona tutunmuş olan protein 2'er ml'lik fraksiyonlar halinde 20 ml ile elüe edildi ve bütün fraksiyonlar toplanarak +4 °C'de saklandı.

3.2.17. SDS-PAGE ile TolAIII, Selülaz (yhfE endoglukanaz) Füzyon Proteininin Kantitatif Analizi

- Toplanan her fraksiyondan ve yıkama sonrası elde edilen çözeltilerden alınan 200 µl'lik numuneler 100 µl jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100 °C'de 2 dakika denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS PAGE (sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) jelinin kuyucuklarına 10'ar µl yüklendi.
- SDS-PAGE tamamlandıktan sonra distile su ile yıkanan jel sonrasında Coomassie mavisi ile boyandı. Boyanan jelden boya "destain" solüsyonu ile uzaklaştırıldıktan sonra bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alındı (Laemmli, 1970).

3.2.18. Saflaştırılan Füzyon Proteinden Diyaliz Yöntemi ile İmidazolun Uzaklaştırılması

20 ml elüsyon tamponu ile 2'şer ml lik fraksiyonlar halinde elüe edilen füzyon protein çözeltilerinin ilk 8 fraksiyonu ‘Spectra/Por’ diyaliz membranı ile 2L'lik 50 mM fosfat

tamponu (pH 7,6, 300 mM NaCl) içinde 1 gece diyaliz edilerek protein çözeltisindeki imidazolun uzaklaştırılması sağlandı.

3.2.19 Saflaştırılan Füzyon Proteinin Kantitatif Analizi

Saflaştırılan füzyon protein çözeltisinden 1 µl alınarak 'Nano-DropN ND 1000' cihazı kantitatif analizi gerçekleştirildi. Analiz yapılırken molekül ağırlığı (48.254 kDa) ve ekstinksiyon katsayısı ($39.970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verileri olarak TolAIII-yhfE füzyon proteinine ait değerler girilmiştir.

3.2.20. TolAIII, Selülaz (yhfE endoglukanaz) Füzyon Proteininin Thrombin ile Kesilmesi

- 1,23 mg/ml konsantrasyonundaki protein çözeltisinden 500 µl alınarak 10X trombin tamponu ve 1,75 ml deionize su eklenerek 0,5 µl Trombin enzimi ile 4 °C'de gece boyu proteolitik kesim yapıldı.
- Kesim sonrası numuneler SDS-PAGE'de koşulumak üzere alındı ve kesim kantitatif olarak analiz edildi.

3.2.21. Selülaz(yhfE endoglukanaz) Proteinin Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması

- Daha önceden füzyon proteinin saflaştırılması için kullanılan kolon imidazol içeren Tris/HCl yıkama tamponu ile yıkanarak saflaştırma için hazır hale getirildi.
- Trombin ile kesimi gerçekleştirilen protein çözeltisi kolona yüklendi. Protein yüklenmiş kolon 50 ml 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponuyla yıkanarak TolAIII' nin kolondan uzaklaştırılması sağlandı.
- 20 ml 300 mM imidazol- 100 mM Tris/HCl (pH = 7,5) tamponu ile kolona tutunmuş olan protein (yhfE endoglukanaz) elüe edildi.

3.2.22. Selülag (endoglukanaz) Proteinin Aktivitesinin Araştırılması

DNS Yöntemi

Selülag aktivitesini belirlemek için kullanılan en yaygın yöntem enzim substrat etkileşimi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarının belirlenmesi esasına dayanan 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) metotudur (Miller,1951). pH'sı 7,6 olan Tris-HCl tamponunda çözünen CMC 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.

Plate Assay (Petride Aktivite Analizi)

- pTolT-yhfE plasmid DNA'sını içeren BL21(DE3) pLysE hücrelerinin petri kültürlerinden bir koloni alınarak ampisilin ve kloramfenikol içeren LB tüplerine ekim yapılarak 250 rpm'de 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- %1 CMC içeren LB agar besiyerine 1M IPTG eklenerek petrilere ekime hazırlandı.
- Gecelik kültürden 50 µl ve 100 µl petrilere ortasına spot şeklinde inoküle edildi. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda petrilere %0,1'lik Kongo kırmızısı çözeltisinden dökülerek ve 15 dakika boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama süresinin sonunda fazla boyanın ortamdan uzaklaştırılması için besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edildi ve 15 dakika inkübasyon yapıldı.

3.2.23. Circular Dichorism (CD) Spektroskopisi ile Füzyon Proteinin Sekonder Yapı Analizi

- Far (uzak bölge) UV analizi için; 0,02 cm'lik ve near (yakın bölge) UV analiz için; 0,5 cm'lik ışık yoluna sahip kuvartz küvet kullanıldı.

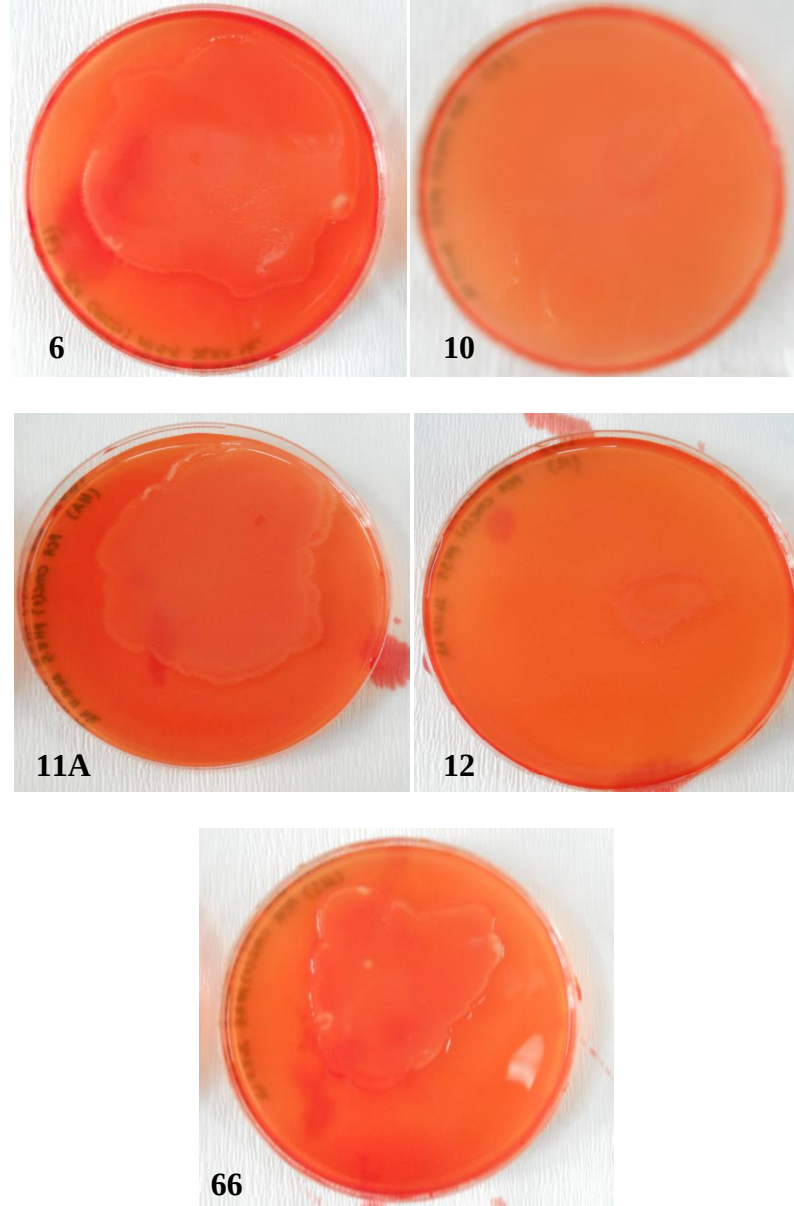
- Her bir spektrum için 10'ar defa ölçüm yapıldı. Jasco J810 model CD spektrofotometresinden veriler toplanarak gerekli konsantrasyon hesaplamaları yapıldı ve en son veriler cihazın yazılımına girilerek yhfE endoglukanaz proteininin far ve near UV spektrumları çizildi.

3.2.24. Selülaz (endoglukanaz) Proteininin MALDI-TOF Spektroskopisi Analizi

Trombin ile kesim sonrasında elde edilen SDS-PAGE jelinden kesilerek saflaştırılan yhfE endoglukanaz proteininin, MALDI-TOF analizleri Newcastle Üniversitesi “Institute for Cell and Molecular Biosciences, Pinnacle” proteomik ve biyolojik kütle spektrometri laboratuvarında yaptırıldı. Analizlerde ABI voyager DESTR (circa. 2002) marka ve model bir cihaz kullanıldı. SDS-PAGE jelinden elde edilen protein analiz edilmek üzere proteomik ve biyolojik kütle spektrometri birimindeki cihaz sorumlusu tarafından analiz edildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *Bacillus* Suşlarında Selüloz Aktivitesinin Kalitatif Olarak Araştırılması



Şekil 4.1. Farklı *B. subtilis* suşlarında selüloz aktivitesinin araştırılması

CMC(%1w/v) - PCA katı besiyerlerine petrinin ortasına farklı *Bacillus subtilis* suşlarına ait sıvı kültürlerinden 100'er µl petrinin ortasına spot şeklinde mikroorganizmalar

ekildi. 37 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda petriler %0,1’lik kongo kırmızısı ile 15 dakika boyandıktan sonra 1M’lık NaCl ile 15 dakika boyanın geri alınması işlemi uygulanmıştır. Zemin kırmızı renge boyanırken selüla z üreten kolonilerin çevresinde boyanmayan şeffaf zonlar meydana gelmiştir.

Şekil 4.1’de görüldüğü üzere 6 ve 11A olarak kodlanmış *Bacillus subtilis* suşlarının en yüksek selüla z aktivitesine sahip suşlar olduğuna karar verilmiştir. Literatürde var olan selüla z genlerinin varlığının araştırılması için bu organizmalar ile çalışmaya devam edilmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.1. Toprak örneklerinden izole edilen ve selüla z aktivitesi araştırılan mikroorganizmalara ait MALDI-TOF ve 16s rDNA dizi analizi sonuçları

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>
12. PCA	<i>Bacillus koreensis</i> (Güvenilir okuma DEĞİL)	<i>Bacillus ginsengihumi</i>
66. PCA	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus sp.</i>

4.2. Selüla z Genlerinin Araştırılması

NCBI(National Center for Biotechnology Information) genom veri tabanından 9 farklı *Bacillus subtilis* selüla z geninin sekansına ulaşıldı (Anonim, 2012a). Bu genlerden 4 tanesinin sekansı primer tasarımı için kullanıldı.

Çizelge 4.2. Primeri tasarımında kullanılan selüloz genleri ve özellikleri

Gene Kodu	Gen Adı	Strain	Uzunluk (bç)
10180729	BSn5_00410 endo-1,4-beta-glucanase	<i>Bacillus subtilis</i> BSn5	1053 bç
9722851	eglS endo-1,4-beta-glucanase	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii str. W23</i>	1500 bç
936750	ysdC endo-1,4-beta-glucanase	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>	1086 bç
936306	yhfE endoglucanase	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168</i>	1041 bç

4.3. Selüloz Genlerine Ait Primer Tasarımı

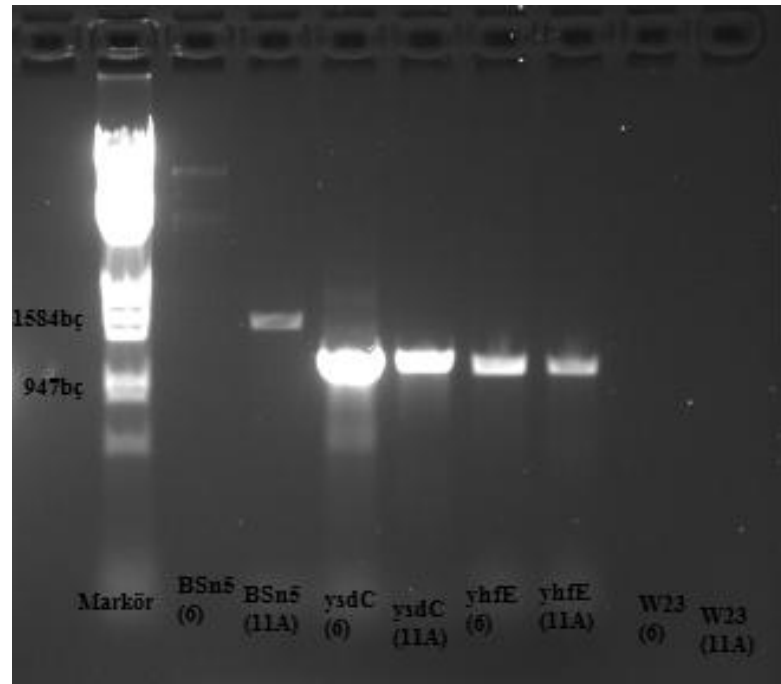
Çizelge 4.3. Tasarlanan primerler

Primerin Adı (Vektör-gen-Restriksiyon Enzimi- ileri/geri primer)	Primer sekansı	Primer uzunluğu (bç)
pTOLTBsn5BamHIFwd	TTTTTGGATCCATGAAACGGTCA ATCTCT	29 bp
pTOLTBsn5KpnIRev	TTTTGGTACCTCAATTTGGTTCTG TTCCCC	30 bp
pTOLTW23BamHIFwd	TTTTTGGATCCATGAAACGTTCA GTC	26 bp
pTOLTW23MluIRev	TTTTACGCGTTCATTTGGGTTCTG TTCCCC	30 bp
pTOLTydCBamHIFwd	TTTTTGGATCCATGGCAAAATTA GAT	26 bp
pTOLTydCMluIRev	TTTTACGCGTTTATTGGTACGTA ATTTC	28 bp
pTOLTyhfEBamHIFwd	TTTTTGGATCCATGACGTCCGTA CGT	26 bp
pTOLTyhfEMluIRev	TTTTACGCGTTTATACCATTTGGTG ACTG	29 bp

Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere 6 ve 11A kodlu *Bacillus subtilis* suşlarının genomlarında varlığı araştırılacak olan 4 farklı selüloz genine ait primerlerin 26-30 bp uzunluğunda tasarımı gerçekleştirildi. Primerler tasarlanırken genin varlığının tespit edilmesi durumunda, çalışmanın ilerisinde genin klonlanmasında kullanılacak olan ve vektör DNA'sına uygun olan enzim kesim bölgeleri genin 5' ve 3' uçlarına eklendi.

4.4. Selüloz Genlerinin PCR ile Araştırılması

Selüloz aktivesinin olduğu tespit edilen 6 ve 11A *Bacillus* suşlarına ait genomik DNA'lar kalıp olarak, tasarlanan selüloz genlerine ait primerler kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR ürünlerinden alınan 10 µl'lik numuneler 3 µl Orange G DNA yükleme boyası ile karıştırılarak %1'lik agaroz jel üzerinde analiz edildi ve agaroz jel görüntüsü elde edildi (Şekil 4.2.).



Markör: λ / Hind III-EcoR I markörü

Şekil 4.2. Selüloz genlerinin PCR ile araştırılması sonucu elde edilen jel görüntüsü

Agaroz jel görüntüsünden elde edilen sonuçlara göre 6 ve 11A kodlu suşlarda ysdC ve yhfE endoglukanaz genlerinin varlığı tespit edildi.

yhfE endoglukanaz genin pTolT vektörüne klonlanmasına ve protein üretimi için yhfE geni ile çalışmalara devam edilmesine karar verildi.

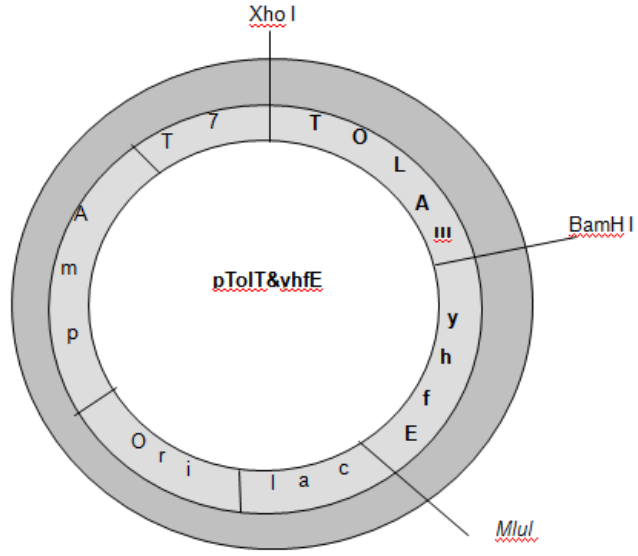
4.5. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, yhfE endoglukanaz genine ait PCR ürünü “QIAGEN QIAquick PCR Purification ” kiti kullanılarak saflaştırıldı. 50 µl saf PCR ürünü elde edildi.

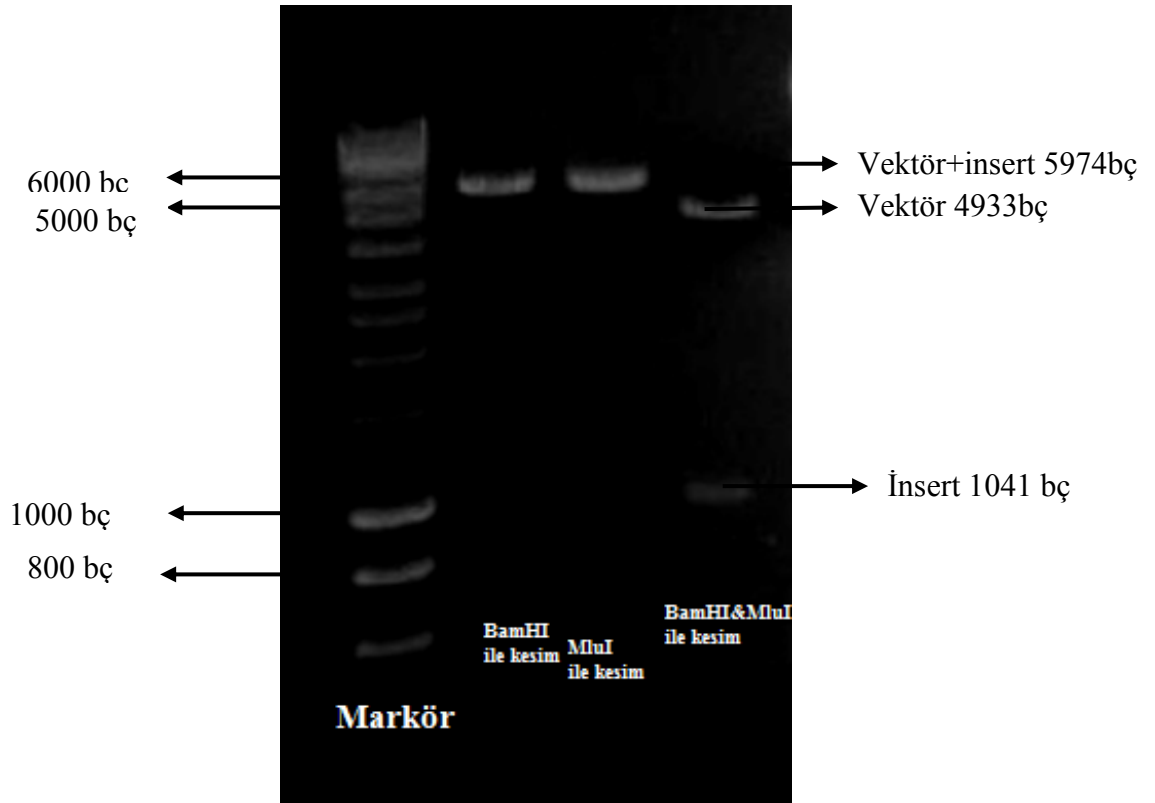
4.6. Plazmid DNA’ların Restiriksiyon Enzimleri ile Analizi

Elde edilen PCR ürünleri ve vektörler restiriksiyon enzimleriyle kesilip ligasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra *E. coli* DH5α suşu kullanılarak transformasyon işlemi yapıp ekilen ampisilin içeren petri tabaklarında (bir gece sonrası) beliren kolonilerden 4'er ml'lik kültürler inoküle edilmesinden sonra bunlardan plazmid DNA saflaştırması Promega Wizard® Plus SV minipreps kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

BamHI ile gerçekleştirilen ilk kesimde ve MluI ile gerçekleştirilen ikinci kesimde ürün olarak insert(yhfE) ve vektör(pTolT) toplamı olan 5974 bp büyüklüğünde birer DNA bantları görüldü (Şekil 4.4). Üçüncü kesimde plazmid DNA BamHI&MluI enzimleri ile birlikte kesildi ve ürün olarak yhfE(1041bp) ve pTolT(4933bp) olmak üzere iki DNA bandı görüldü (pTolT vektörü 4984 bp dir, fakat enzim kesiminde insert DNA'nın yerleştirileceği gen parçası vektörün 51 bp dir. Bundan dolayı jel görüntüsünde kesilmiş olan vektör DNA'sı 4933 bp olması beklenmektedir).



Şekil 4.3. Elde edilen pToIT-yhfE plazmid DNA'nın dairesel haritası



Şekil 4.4. Restriksiyon enzim kesiminin agaroz jel ile analizi

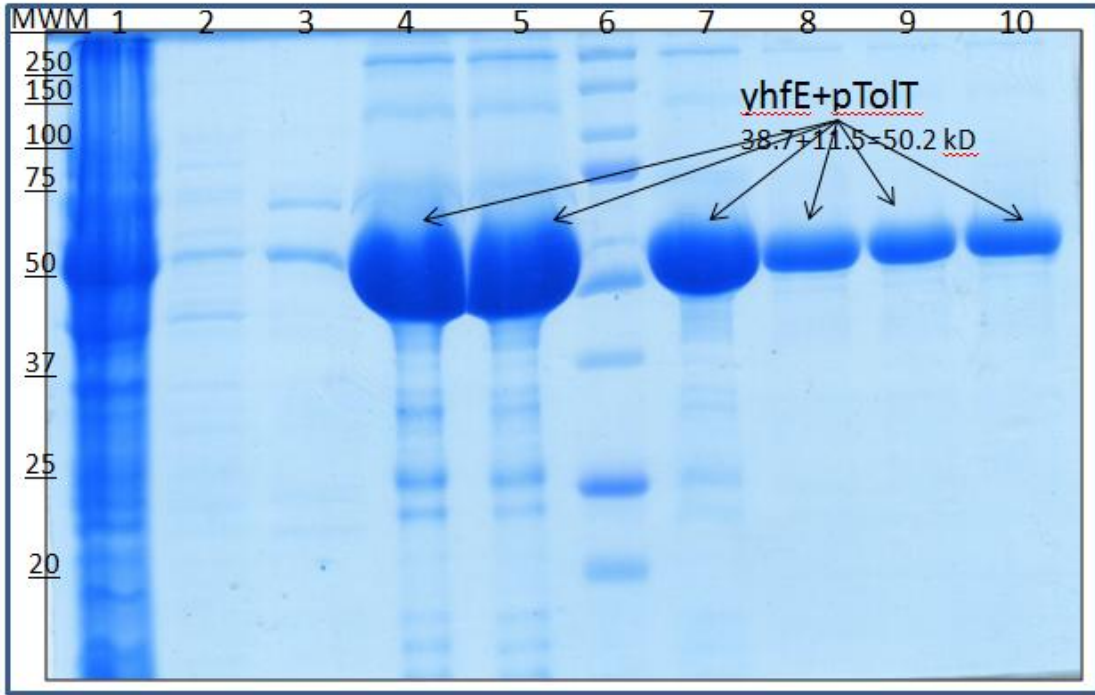
Bu işlemlerden sonra oluşturulmuş olan rekombinant pTOLT-yhfE plazmitini pozitif olarak taşıyan hücrelerden izole edilen plazmit DNA'lar Universal T7 promotor primeri ile beraber DNA dizileme (sequencing) işlemi yapılması için "BECKMAN COULTER GENOMICS- UK" firmasına gönderildi.

4.7. TolAIII-Selülaz (endoglukanaz) Füzyon Proteininin Ekspresyon Çalışmaları

pTolT-yhfE plazmid DNA'larının *E. coli* BL21(DE3) pLysE ve BL21 AI hücrelerine transformasyon gerçekleştirildi. Transformasyon yapıp ekilen petri tabaklardan birer koloni alınarak pLysE için kloramfenikol ve ampisilin içeren 4 ml'lik LB kültür tüplerinde, BL21 AI hücreleri için sadece ampisilin 4 ml'lik LB kültür tüplerinde 37 °C' de hücreler gece boyu yetiştirildi. Bu kültürlerin 1'er ml si uygun antibiyotikleri içeren 600 ml LB bulunan erlenlere aktarıldı ve 37 °C'de 250 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde yetiştirilmeye başlandı. UV spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde $OD_{600} \sim 0,7$ olduğunda pLysE hücreleri IPTG ile, BL21 AI hücreleri ise arabinoz ile indüklendi. 4 saat inkübe edilerek yetiştirilen hücrelerden alınan numuneler % 12'lik SDS PAGE'ye tabi tutuldu. Elektroforez işlemleri bittikten sonra SDS PAGE jelleri kasetlerden çıkartılarak Coomassie brillant mavi boyası ile boyandı. Boyama işlemlerinin akabinde iyice yıkanıp temizlenen jeller tarayıcı kullanılarak resim şeklinde dosya ortamına alındı.

4.8. TolAIII-yhfE Füzyon Proteininin Saflaştırılması

Şekil 4.5'te görülen SDS PAGE jel görüntüsünden anlaşıldığı gibi pTolT-yhfE plazmid DNA'ların her ikisi de pTolII-yhfE füzyon proteinini üretmektedir. yhfE DNA fragmanını ihtiva eden pTolT-yhfE vektörleri hem TolTIII hem de yhfE selülaz proteinin toplamı olan yaklaşık 50.2 kD bir protein füzyonu üretmektedir.



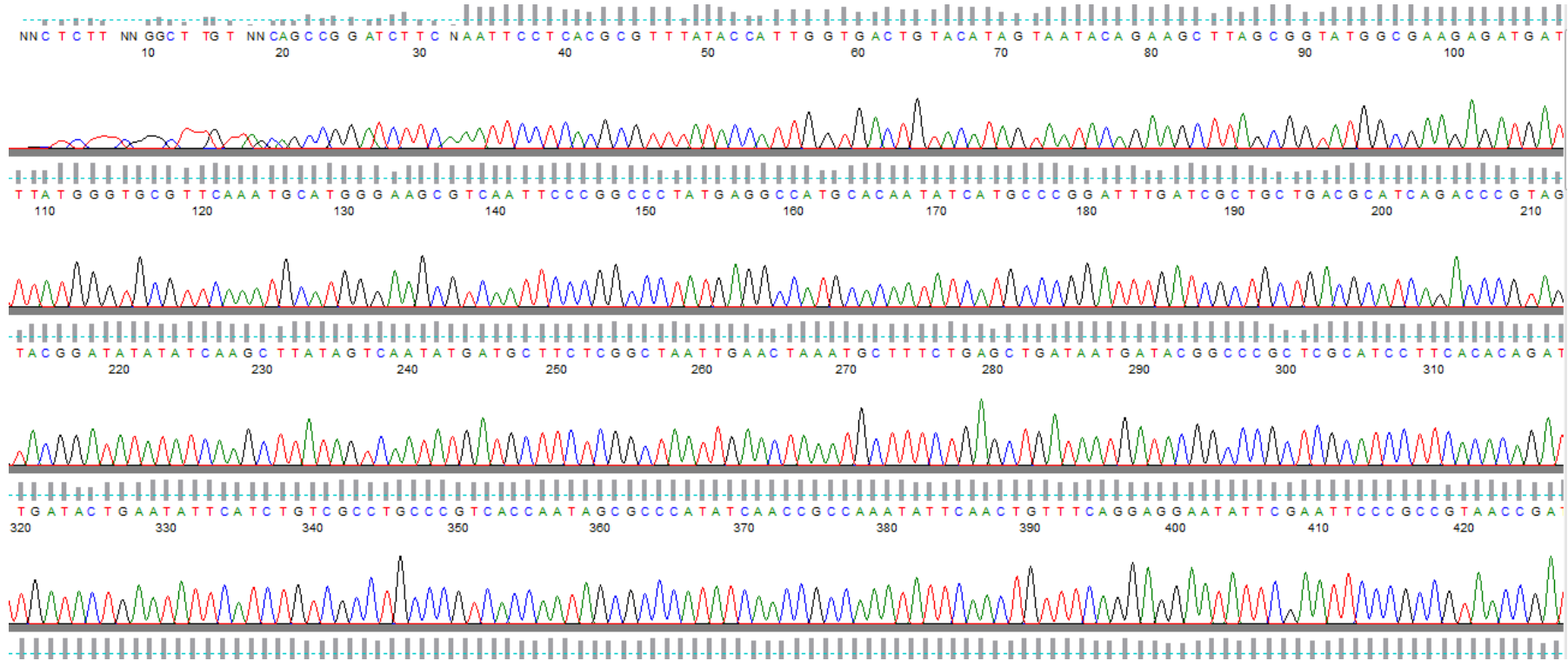
Şekil 4.5. pTolT-yhfE plasmid DNA'sın BL21 AI vektörüne transformasyonu ile gerçekleştirilen ekspresyon çalışmasına ait %12'lik SDS PAGE gel görüntüsü. Kuyucuklar sırasına göre şunları içermektedir, **1.** Süpernetant (Ultrasantrifüj sonrası protein çözeltisi) **2-3.** Ni-NTA agaroz afinite kolonunun 30 mM imidazol içeren tamponla yıkanması. **4.** Elüsyon çözeltisi (Fraksiyon1) **5.** Elüsyon çözeltisi(Fraksiyon2) **6.** BIORAD Precision moleküler markör, **7.** Elüsyon çözeltisi(Fraksiyon3) **8.** Elüsyon çözeltisi (Fraksiyon4) **9.** Elüsyon çözeltisi(Fraksiyon5) **10.** Elüsyon çözeltisi (Fraksiyon6)

Afinite kromatografisi ile saflaştırılma işleminin ardından, şekil 4.5.'te görüldüğü gibi TolAIII-yhfE füzyon proteini saf olarak elde edilmiştir. Füzyonun amino ucuna eklenen histidinlerin (6 adet) nikel olan afinitesi ile füzyon kolona bağlanmış, diğer tüm proteinler kolondan ayrılmış ve böylece saflaştırma gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen füzyon proteinin aktivitesini araştırmak üzere DNS (dinitrosalisilik asit) ve plate assay (petride aktivite analizi) metotları kullanılmıştır fakat aktivite gözlenmemiştir.

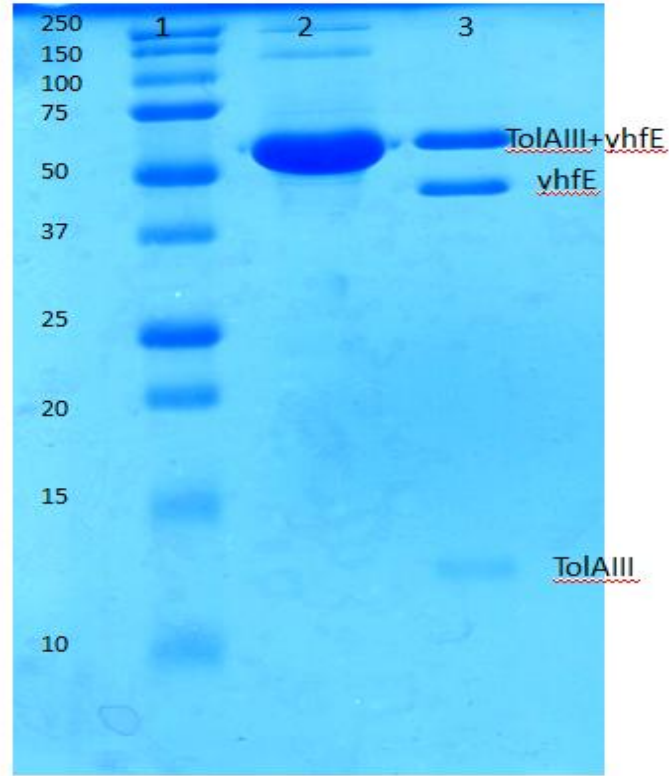
4.9. Dizileme Analizi

yhfE endoglukanaz genini kodlayan DNA fragmanının Tol-A-III proteinine füzyon şeklinde herhangi bir çerçeve kayması problemi olmaksızın başarılı bir şekilde klonlayabildiğimiz aşağıdaki DNA dizileme kromatogramından (Şekil 4.6) alınan DNA dizisi ile analiz edilerek ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.6. pTolT-yhfE plasmid DNA dizileme sonucunun kromotogram şeklindeki görüntüsü

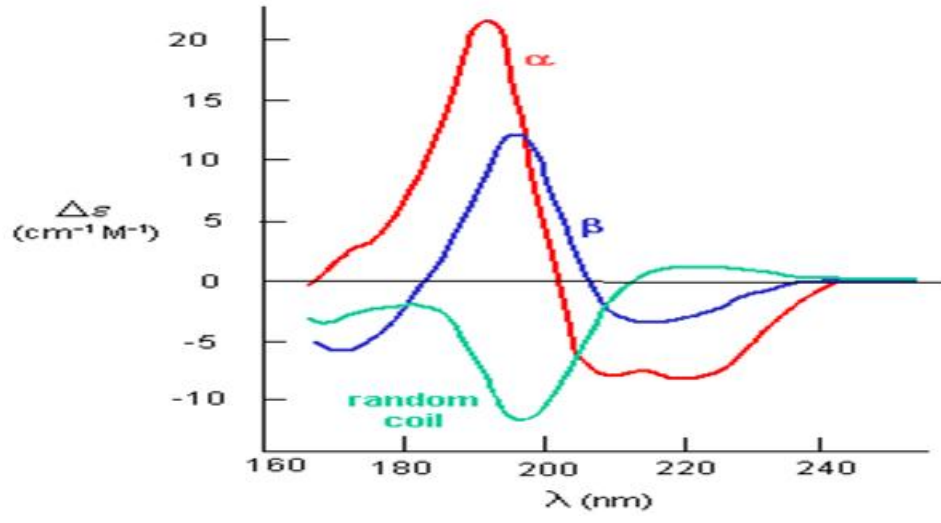
4.10. TolAIII-yhfE Füzyon Proteinin Thrombin ile Kesimi



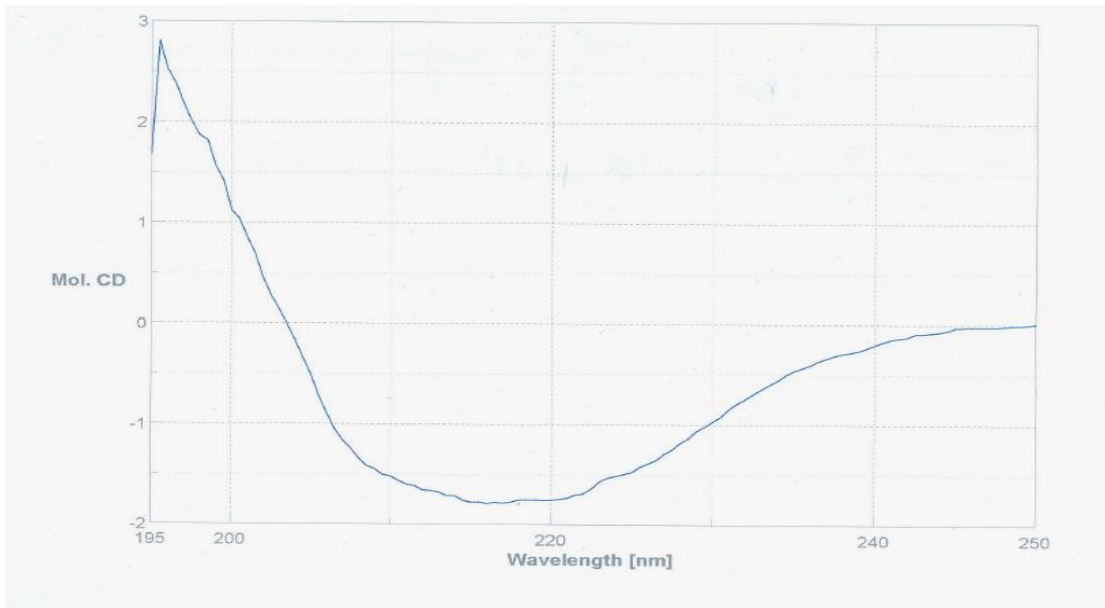
Şekil 4.7. TolAIII + yhfE füzyon proteininin Trombin ile kesimine ait %15'lik SDS PAGE jel görüntüsü
 1. BIORAD Precision moleküler markör
 2. Kesilmemiş TolAIII-yhfE füzyon proteini
 3. Thrombin ile 20 saat kesim sonrası

4.11. yhfE Endoglukanaz Proteininin CD Spektroskopisi

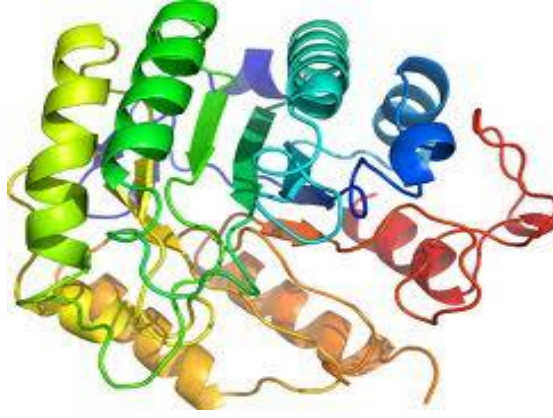
Saflaştırılan alınan yhfE endoglukanazın CD spektrofotometresinde 10'ar defa tekrarlanarak Far UV CD spektrumları (Şekil 4.9) alındı. Bizim proteinimizin de verdiği spektrum Şekil 4.8'de kırmızı renkle verilen α heliks yapıdaki proteinin verdiği spektrumla örtüşmekte ve aynı nanometrelerde aynı pikleri vermektedirler. Almış olduğumuz CD spektrum sonuçlarına bakarak proteinimizin doğru bir şekilde ve tam olarak katlanarak α heliks dominant bir yapı göstermekte ve bu sonuçlar *B. subtilis* β -1,4-endoglukanazın kristal yapı sonuçları ile de desteklenmektedir (Şekil 4.9).



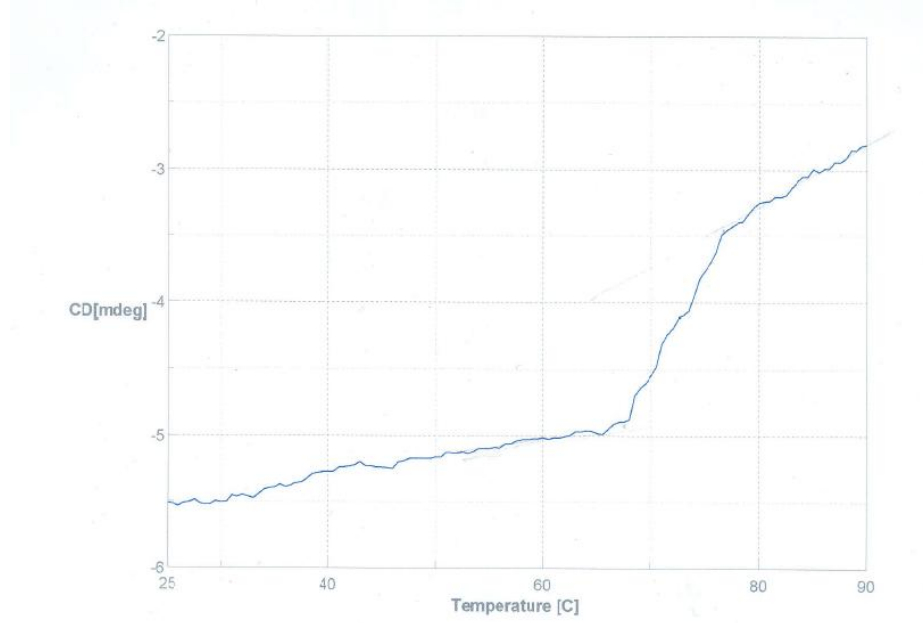
Şekil 4.8. CD için dominant karakterdeki yapılarıyla bilinen proteinlerin referans spektrumları



Şekil 4.9. yhfE endoglukanaz proteininin Far UV CD Spektrumu



Şekil 4.10. Endoglukanaz proteininin kristal yapısı (Yasutake ve ark., 2006)



Şekil 4.11. yhfE endoglukanaz proteininin 220 nm deki CD Spektrumu

Şekil 4.11’de görüldüğü gibi proteinimize ait erime sıcaklığı 75°C aralığındadır.

4.12. yhfE Endoglukanaz Proteininin MALDI-TOF Spektroskopisi

Accession	Mass	Score	Description
1. gi 351470036	38079	111	hypothetical protein BSSC8_33090 [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. SC-8]
2. gi 16078084	38883	110	endoglucanase [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]
3. gi 291483495	38853	110	hypothetical protein BSNT_01736 [Bacillus subtilis subsp. natto BEST195]
4. gi 321314744	38897	110	putative endoglucanase [Bacillus subtilis BSns]
5. gi 386757700	38883	110	putative endoglucanase [Bacillus sp. JS]
6. gi 384174712	38862	99	YhfE [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. RO-MN-1]
7. gi 350265299	38875	99	hypothetical protein GYO_1318 [Bacillus subtilis subsp. spizizenii TU-B-10]
8. gi 296332442	38807	90	putative endoglucanase [Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC 6633]

gi 16078084	Mass: 38883	Score: 110	Expect: 0.00013	Matches: 15			
endoglucanase [Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168]							
Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Start	End	Miss	Peptide
890.5620	889.5548	889.5022	59.2	87	- 94	0	K.IDLIGGFR.Y
1033.5376	1032.5303	1032.4658	62.5	136	- 143	0	R.NQENMEIR.L
1080.6661	1079.6589	1079.5863	67.2	171	- 180	0	R.VEITSSGGFIK.S
1131.7658	1130.7585	1130.6812	68.4	85	- 94	1	R.LKIDLIGGFR.Y
1306.7028	1305.6955	1305.6102	65.4	261	- 271	0	K.DAGGPVHYQLR.K
1323.8156	1322.8083	1322.7194	67.2	171	- 182	1	R.VEITSSGGFIKSR.H
1333.8539	1332.8466	1332.7626	63.0	45	- 57	1	R.NHKGGLIATLPGR.D
1413.8685	1412.8612	1412.7736	62.0	48	- 61	1	K.GGLIATLPGRDTSR.H
1434.8108	1433.8036	1433.7051	68.7	261	- 272	1	K.DAGGPVHYQLRK.H
1450.9366	1449.9293	1449.8303	68.2	183	- 195	1	R.HLDDKASVALLR.L
1953.0679	1952.0606	1951.9164	73.9	153	- 170	0	K.DTEELGIGVGDFVSFDPR.V
2081.1752	2080.1680	2080.0113	75.3	152	- 170	1	R.KDTEELGIGVGDFVSFDPR.V
2285.3234	2284.3161	2284.1349	79.3	303	- 324	0	K.SGHDIVHGLIGPGIDASHAFER.T
2651.5679	2650.5606	2650.3364	84.6	303	- 327	1	K.SGHDIVHGLIGPGIDASHAFERTHK.S
3014.7522	3013.7449	3013.4921	83.9	153	- 180	1	K.DTEELGIGVGDFVSFDPRVEITSSGGFIK.S

Şekil 4.12. yhfE endoglukanaz proteininin MALDI-TOF spektroskopisi

SDS-PAGE jeilinden saflaştırılarak analiz edilen yhfE enziminin MALDI-TOF sonuçlarına göre (Şekil 4.12) en yüksek skorların endoglukanaz enzimine ait olduğu görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enzim biyoteknolojisi ürün ve bu ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve aynı zamanda ekonomik değerinin yüksek olması nedeniyle ülkemiz gibi enzim ticaretinde dışa bağımlı ülkeler için gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Endüstriyel enzimlerin %90'ının mikroorganizmalardan elde edilmesinin sebebi biyoçeşitliliğin fazla olması ve genetik manipülasyonlara uygun olmasıdır.

Günümüzde selüloz (endoglukanaz) enziminin dünya enzim ticaretindeki yeri yaklaşık %20 düzeyindedir. Selülozların ana uygulama alanlarıgıda, hayvan yemi üretimi, tekstil, biyo-yakıt, kimya, kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, atıkların giderimi, tıbbi ve farmasötik endüstrisi, protoplast üretimi, genetik mühendisliği ve kirlilik giderimidir (Bhat ve Bhat, 1997). Özellikle selülozik materyallerin şekere dönüştürülerek biyoetanol üretiminde kullanım alanından dolayı selülozın dünya piyasasındaki payı gittikçe artmaktadır.

Çalışmamızda *Bacillus subtilis* yhfE endoglukanaz enzimi rekombinant olarak başarıyla üretilmiştir. Ekspresyon için patenti laboratuvarımıza ait olan pTolT ekspresyon vektörü kullanılmıştır. Enzimin bakteride ekspresyonu için iki farklı *E.coli* BL21(DE3) pLysE ve BL21AI strainleri (suşları) kullanılmıştır. Çalışmanın başlangıcında farklı *Bacillus* suşlarında selüloz aktivitesi pH 5,5 olan besiyerinde araştırılmıştır. Bu yüzden bu organizmalar arasında en yüksek aktiviteye sahip olduğunu düşündüğümüz ve genomik DNA'sını izole ederek ekspresyon çalışmalarında kullandığımız yhfE endoglukanaz enziminin, hayvan yemi sektöründe ticari olarak kullanımı uygun olabilir. Günümüzde bu sektörde kullanılan β -1,3-1,4-glukanazlar hayvan yemlerine enzimatik preparatlar şeklinde ilave edilerek genellikle tahıl kökenli beslenmenin sindirilebilirliğini arttırabilmektedir. Böylece bu şekilde beslenen hayvanlarda kilo artışından dolayı hayvandan elde edilen verimde artış beklenmektedir.

Ekspresyonunu gerçekleştirdiğimiz yhfE selüloz enzimi TolAIII proteini ile birlikte yüksek verimde füzyon halinde üretilmiştir ve afinite kromatografisi ile oldukça yüksek saflıkta (>% 99) saflaştırılabilmektedir. Bunun sebebi amino ucuna eklenen 6 adet histidinde var olan imidazol grubunun nikel ile olan afinitesidir ki bu özellik seçtiğimiz klonlama vektörünün en önemli avantajıdır. Saflaştırmanın ardından füzyon halindeki iki proteinin trombin ile proteolitik olarak kesimi ve tekrar afinite kromatografisi kullanılarak saf yhfE endoglukanaz enziminin eldesi de mümkündür. Çalışmamızda füzyon halinde ve saf halde ürettiğimiz selüloz enziminin kantitatif olarak aktivitesini araştırmak amacıyla DNS (dinitrosalisilik asit) ve plate assay (petride aktivite analizi) metotları kullanılmıştır fakat aktivite gözlenmemiştir, bu sebepten dolayı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilememiştir. Saflaştırma sonrasında tuzsuz ortamda yapılan diyaliz uygulamasında proteinimizin presipite olduğu gözlemlenmiş ve diyaliz ortamına katılan tuz prepitasyonu engelleyememiş ancak yeniden saflaştırılan protein tuzlu ortamda diyaliz yapıldığında presipitasyon problemi ortadan kalkmıştır. Enzimimizin aktif olmaması birçok nedene dayanabilir ve bunlardan birisi füzyon halindeki iki protein arasındaki etkileşim (disülfid bağı ve elektrostatik etkileşimler gibi) substratın enzimimizin aktif bölgesine bağlanmasını engellemesinden kaynaklanabilir. Saflaştırma sonrasında yapılan proteolitik kesim esnasında ortama katılacak olan ditiyotritol (DTT) veya 2-Merkaptoetanol gibi disülfid bağı kırıcı veya histidinleri modifiye etmek için kullanılabilecek dietilpirokarbonat (DEPC) kimyasallarla yapılabilecek optimizasyonlar ile bu iki protein arasındaki etkileşimin önüne geçilerek karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilebilir.

Sonuç olarak ticari enzimlerin endüstriyel alanda birçok uygulama alanına sahip olması nedeniyle doğal ortamdan üretilen enzimler bu sektördeki talebi karşılayamamaktadır. Bu yüzden biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğindeki gelişmelere bağlı olarak bu sektörde kullanılan mikroorganizmaların önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışma ile endüstriyel alandaki tüketici olarak içinde bulunduğumuz enzim pazarında, rekombinant enzim üretim sistemlerini kullanarak ya da bu sistemler üzerinde ihtiyacımıza yönelik değişiklikleri yaparak katkıda bulunmayı hedefliyoruz.

KAYNAKLAR

- Aehle, W., 2004. Enzymes in Industry: Production and Applications. Wiley, 508 p, Weinheim.
- Aftab, S., Aftab, M. N., Haq, I. U., Javed, M. M., Zafar, A., Iqbal, I., 2012. Cloning and expression of endo-1,4- β -glucanase gene from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 into *Escherichia coli* BL21 (DE 3). African Journal of Biotechnology, 11(12) 2846-2854.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., ve Watson, J.D., 1994. Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, 3rd ed., New York, 308-318.
- Anderluh, G., Gökçe, İ. ve Lakey, J.H., 2003. Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. Protein Expression and Purification, 28 (1), 173–181.
- Anonim, 1984. Difco Manuel, Dehydrate Culture Media and Reagents for Microbiology. Detroit, Michigan USA, 1155.
- Anonim, 1995. Tarımsal Yapı ve Üretimi. T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Yayınları, Ankara.
- Anonim, 1998. 1998-1999 Catalog. New England BioLabs. USA.
- Anonim, 2007. Target Markets of Industrial Enzymes. http://www.idiverse.com/html/target_industrial_enzymes.htm (20.12.2012)
- Anonim, 2009a. Cellulose. <http://en.wikipedia.org/wiki/Cellulose>.(01.12.2012)
- Anonim, 2009b. Bacillus subtilis cellulase genes. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (20.11.2011)
- Anonim, 2011. A Representation of Hemicellulose. <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Wood14.html> (20.12.2012)
- Anonim, 2012a. Cellulose Binding Domain. http://www.nrel.gov/continuum/deliberate_science/biofuels.cfm (20.12.2012)
- Anonim, 2012b. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> (15.10.2011)
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayınevi, 358 s., Ankara.
- Aspinal, G.O., 1970. Polysaccharides. Pergamon Press Headington Hill Hall, 431-438, Oxford.
- Atalla, R.H., 1993. In *Trichoderma reesei* Cellulases and Other Hydrolases. Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research. Proceedings of the Tricel 93 Symposium, Helsinki, 25-39.
- Atalla, R.H., ve VanderHart, D.L., 1984. Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms. Science, 223, 283-285.
- Banwart, G.J., 1983. Basic Food Microbiology. Publishing Company Inc., 72-74p, Wesport-Connecticut.
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M., ve Sewalt, V.J.H., 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. Canadian Journal of Animal Science, 75 (4), 641–644.
- Beguin, P., 1990. Molecular biology of cellulose degradation. Ann Review of Microbiology, 44, 219- 248.

- Berner, R.A., 2003. The long-term carbon cycle, fossil fuels and atmospheric composition. *Nature*, 426, 323-326.
- Beyatlı, Y., 1996. Biyoteknoloji ve Biyoprotein Üretimi. *Kükem Derneği*, 19, s. 23.
- Bhardwaj, N.K., Baipai, P., Baipai, P.K., 1996. Use of enzymes in modification of fibres for improved beatability. *Journal Of Biotechnology*, 51 (1), 21-26.
- Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355-383.
- Bhat, M.K., ve Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15 (3-4), 583-620.
- Boisset, C., Frascini, C., Schulein, M., Henrissat, B., ve Chanzy, H., 2000. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (4), 1444-1452.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D. ve Edelstein, S.J., 1996. *Protein Methods*, 2nd ed., Wiley-Liss Press, 414 p, USA.
- Breen, A., ve Sigleton, F.L., 1999. Fungi in lignocellulose and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology*, 10 (3), 252-258.
- Brown, T.A., 1990. *Gene Cloning*. Chapman & Hall, 2nd ed., London, 3-11.
- Bryant, M.P., ve Robinson, I.M., 1961. An Improved Nonselective Culture Medium For Ruminant Bacteria and Its Use In Determining Diurnal Variation In Numbers Of Bacteria In The Rumen. *Journal Dairy Science*, 41, 1446-1456.
- Chanzy, H., Kennedy, J.F., Phillips, G.D., ve Williamson, P.A., 1990. *Cellulose Sources and Exploitation*. Ellis Horward, 3 -12p, New York.
- Chanzy, H., ve Henrissat, B., 1985. Unidirectional degradation of *Valonia* cellulose microcrystals subjected to cellulase action. *FEBS Letters*, 184 (2), 285 -288.
- Che Man, Y.B., Suhardiyono, Asbi, A.B., Azudin, M.N., ve Wei, L.S., 1996. Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (6), 683-686.
- Cowan, W.D., 1996. *Animal feed. Industrial Enzymology*, Editors: Godfrey, T., and West, S., 2nd ed., Macmillan Press, 360-371 p, London.
- Coward-Kelly, G., Aiello-Mazzari, C., Kim, S., Granda, C., ve Holtzapple, M., 2003. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 82 (6), 745-749.
- Çetin, E.T., 1968. *Pratik Mikrobiyoloji*. İstanbul Üniversitesi Menteş Matb., 2. Baskı, 645s, İstanbul.
- Çetinkaya, M., ve Karaosmanoğlu, F., 2003. Türkiye Enerji Profili. II. Hidrojen Kongresi, 9 Temmuz 2003, Editörler: Filiz Karaosmanoğlu, M., Çetinkaya, E.O. Ankara, 25-40.
- Dehority, B.A., 1991. Cellulose digestion in ruminants. *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. Editors: Haigler, C.H., and Weimer, P.J. Marcel Dekker, Inc., 327-354, New York.
- Delmer, D.P., ve Amor, Y., 1995. Cellulose Biosynthesis. *Plant Cell*, 7 (7), 987-1000.
- Demain, A.L., Newcomb, M., ve Wu, J.H.D., 2005. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (1), 124-154.
- Demain, A.L., ve Solomon, N.A., 1981. In *Industrial Microbiology and the Advent of Genetic Engineering*. Scientific American, Freeman Comp., San Francisco, 3-14.

- Demirbaşı, A., 1996. Lignoselülozik Ürünlerin Katalitik Yöntemle Parçalanması. *Doğa Dergisi*, 10 (1), 25-33.
- Din, N., Gilkes, N.R., Tekant, B., Miller, R.C.J., Warren, R.A.J., ve Kilburn, D.G., 1991. Non-hydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulase. *Nature Biotechnology*, 9, 1096- 1099.
- Doria-Rose, N.A., ve Haigwood, N.L., 2003. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens. *Methods*, 31(3), 207-216.
- Dubois, B., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., ve Smith, F., 1956. Colormetric method for determination of sugars and relative substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., ve Ander, P., 1990. Biodegradation of lignin. In *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag KG, Berlin, 225-233.
- Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., ve Elser, J., et al. 2000. The global carbon cycle: a test of our knowledge of earth as a system. *Science*, 290 (5490), 291-296.
- Fan, L.T., Lee, Y.H., ve Beardmore, D.H., 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol Bioeng*, 22, 177-199.
- Fleming, K., Gray, D.G., ve Matthews, S., 2001. Cellulose crystallites. *Chemistry*, 7, 1831-1835.
- Fogarty, W.M., ve Griffin, P.J., 1973. Some Preliminary Observation On The Production and Properties Of Cellulolytic Enzyme Elaborated by *Bacillus polymyxa*. *Biochemistry Society Transactions*, 1, 1297-1298.
- Fogarty, W.M., ve Kelly, C.T., 1979. Developments in microbial extracellular enzymes. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Editor: Wiseman, A. Ellis Horwood Ltd. Publishers, Volume 3, 45-108p, England.
- Fülöp, L., ve Ponyi, T., 1997. Rapid screening for endo-b-1,4-glucanase and endob 1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. *J Microbiol Methods*, 29 (1), 15-21.
- Galante, Y.M., De Conti, A., Monteverdi, R., 1996. Application of *Trichoderma* enzymes in textile industry. *Trichoderma & Gliocladium—Enzymes, biological control and commercial applications*. Editors: Harman, G.F., Kubicek, C.P. Taylor & Francis Press, Volume 2, 311–326 p, London.
- Galante, Y.M., De Conti, A., Monteverdi, R., 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Editors: Harman, G.F., Kubicek, C.P. Taylor & Francis Press Vol.2, 327–342 p, London.
- Ghose, T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, 59, 257-268.
- Godfrey, T., ve West, S., 1996. *Industrial enzymology*. Macmillan Press Ltd., 609 p, London.
- Grimm, D., 2002. Production methods for gene transfer vectors based on adeno-associated virus serotypes. *Methods*, 28(2), 146- 157.
- Guda, C., Zhang, X., McPherson, D.T., Xu, J., Cherry, J.H., Urry, D.W. ve Daniell, H., 1995. Hyper expression of an environmentally friendly synthetic polymer gene. *Biotechnology Letters*, 17 (7), 745–750.

- Hakamada, Y., Hatada, Y., Ozawa, T., Ozaki, K., ve Kobayashi, T., Ito, S., 2001. Identification of thermostabilizing residues. *FEMS Microbiology Letters*, 195 (1), 67-72.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T., ve Fogarty, W.M., 1999. Purification and properties of the raw starch degrading α -amylase of *Bacillus* sp. IMD434. *Biotechnology Letters*, 21, 111-115.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166 (4), 557-580.
- Heiner, A.P., Sugiyama, J., ve Teleman, O., 1995. Crystalline cellulose Ia and Ib studied by molecular dynamics simulation. *Carbohydrate Research*, 273 (2), 207-223.
- Henrissat, B., 1994. Cellulase and their interaction with cellulose. *Cellulose*, 1 (3), 169-196.
- Hestrin, S., 1963. Bacterial cellulose. *Methods Carbohydr. Chem.* Academic Press, .p 4-9.
- Hieta, K., Kuga, S., ve Usuda, M., 1984. Electron staining of reducing ends evidences a parallel chain structure in *Valonia* cellulose. *Biopolymers*, 23, 1807 -1810.
- Hirofimi, H., Takonori, I., ve Ryuichiro, K., 1999. Intracellular ferrireductase involved in Mn(IV) reducing enzyme system to supply Mn(II) for lignin biodegradation by white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (4), 467-473.
- Hulme, M.A., 1988. Viscosimetric determination of carboxymethylcellulase activity. *Methods of Enzymology*, 160, 130-135.
- Humphrey, A.E., Moreire, A., Armiger, W., ve Zabriske, D., 1977. Production of Single Cell Protein From Cellulose Wastes, *Biotechnology Bioengineering Symp*, Symposium on single cell protein substrates presented at the First Chemical Congress of the North American Continent, Mexico, 19 (7), 45-64.
- Hungate, R.E., 1950. The Anaerobic Mesophilic Cellulolytic Bacteria. *Bacteriology Rev.*, 14, 1-50.
- Inoue, H., Nojima, H., ve Okayama, H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96 (1), 23-28.
- Ibrahim, N.A., EL-Bardy K., Eid B.M., Hassan T.M., 2011. A new approach for biofinishing of cellulose-containing fabrics using acid cellulases. *Carbohydrate Polymers*. 83 (1), 116-121.
- Islam, M.N., Alamberg, M.R., ve Islam, M.R., 2005. Pyrolytic oil f pyrolysis of municipal solid waste and its characterization. *Renewable Energy*, 30, 413-420.
- Jervis, E., Haynes, C., ve Kilburn, D., 1997. Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 24016- 24023.
- Jin, X., Meng, N., Xia, L., 2011 Expression of an Endo- β -1,4-glucanase Gene from *Orpinomyces* PC-2 in *Pichia pastoris*. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 3366-3380.
- Johansson, E., Krantz-Rülcker, C., Zhang, B.X., ve Öberg, G., 1999. Chlorination and biodegradation of lignin . *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1029-1032.
- Kaplan, M., Kuk, S., Özdarendeli, A., Bulut, Y., ve Kalkan, A., 2002. *Fasciola hepatica* cathepsin L1 geninin klonlanması ve rekombinant plazmitlerin polimeraz zincir reaksiyon taraması ile belirlenmesi. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 26, 388-392.
- Karlsson, J., Momcilovic, D., Wittgren, B., Schulein, M., Tjerneld, F., ve Brinkmalm, G., 2001. Enzymatic degradation of carboxymethyl cellulose hydrolyzed by the

- endoglucanases Cel5A, Cel7B, and Cel45A from *Humicola insolens* and Cel7B, Cel12A and Cel45A core from *Trichoderma reesei*. *Biopolymers*, 63, 32-40.
- Kennedy, J.F., 1987. *Enzyme Technology*. Biotechnology Vol 7A, Ed: Rehm, H.J. ve Reed, G. New York, 37-62.
- Kidby, D.K., ve Davidson, D.J., 1973. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. *Analytical Biochemistry*, 55, 321-325.
- Klein, G.L., ve Snodgrass, W.R., 1993. Cellulose. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, Editors: Macrae, R., Robinson, R.K., Soddler, M.J. Academic Press, p758-767, London.
- Kongruang, S., Han, M.J., Breton, C.I.G., ve Penner, M.H., 2004. Quantitative analysis of cellulose reducing ends. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113- 116, 213-231.
- Kuk, S., ve Erensoy, A., 2008. Gene Cloning, Selection of Plasmids and Application of *Fasciola hepatica* Cathepsin L1 Gene. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (1), 16-22.
- Kulshreshta, A.K., ve Dweltz, N.E., 1973. Paracrystalline lattice disorder in cellulose I. Reappraisal of application of 2-phase hypothesis to analysis of powder X-ray diffractograms of native and hydrolyzed cellulosic materials. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics*, 11 (3), 487-497.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lang, E., Kleeberg, I., ve Zadrazil, F., 1997. Competition of *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* with soil microorganisms during lignocellulose decomposition. *Bioresource Technology*, 60 (2), 95-99.
- Lee, I., Evans, B.R., Lane, L.M., ve Woodward, J., 1996. Substrate-enzyme interactions in cellulase systems. *Bioresource Technology*, 58 (2), 163-169.
- Lennete, E.H., Balows, A., Hausler, J.W., ve JR, Shadomy, J.H., 1985. *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology Press, 4th ed., 1149 p, Michigan.
- Lever, M., 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 47 (1), 273-279.
- Levy, I., Nussinovitch, A., Shpigel, E., and Shoseyov, O., 2002. Recombinant cellulose crosslinking protein: a novel paper modification biomaterial. *Cellulose*, 9, 91-98.
- Lewis, G.E., Hunt, C.W., Sanchez, W.K., Treacher, R., Pritchard, G.T., ve Feng, P., 1996. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. *J Animal Sci.*, 74, 3020–3028.
- Li, W., Zhang, W., Yang, M., Chen, Y., 2008. Cloning of the Thermostable Cellulase Gene from Newly Isolated *Bacillus subtilis* and its Expression in *Escherichia coli*, *Mol. Biotechnol.*, 40, 195–20.
- Liming, X., ve Xueliang, S., 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technology*, 91, 259-262.
- Ljungdahl, L.G., Eriksson, K.E., 1985. Ecology of microbial Cellulose Degradation . *Adv. Microbiology Ecology*, 8, 237-299.
- Lodhi, M.A.K., 1987. Hydrogen Production from Renewable Sources of Energy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 12 (7), 461-468.
- Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J., ve Wyman, C.E., 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science*, 251, 1318- 1323.

- Mamo, G., ve Gessesse, A., 1999. Purification and characterization of two raw –starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25 (3-5), 433-438.
- Manning, K., 1981. Improved viscometric assay for cellulase. *J Biochemical and Biophysical Methods*, 5 (4), 189-202.
- Mansfield, S. D., Mooney, C., ve Saddler, J. N., 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, 15 (5), 804-816.
- Martinez, A.T., Camerero, S., ve Gutierrez, A., 2001. Studies on wheat lignin degradation by *Pleurotus* species using analytical pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 58-59, 401-411.
- Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E., ve Burton, A.L., 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1 (2), 127-32.
- Miller, T.L., ve Wolin, M.J., 1974. A Serum Bottle Modification of the Hungate Technique for Cultivating Obligate Anaerobes. *Application Microbiology*, 27, 985- 987.
- Mutlu, S.F., 1990. Ayçiçeği Bitkisinin Sap ve Tohum Kabuklarının Enzimatik Yöntemlerle Şekere Dönüşümü. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi. Kimya Bölümü, Ankara, 1-30.
- Nieduszynski, I.A., Preston, R.D., 1970. Crystallite size in natural cellulose. *Nature*, 225, 273-274.
- Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., ve Langan, P., 2003. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose Ia from a synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of American Chemical Society*, 125 (47), 14300-14306
- Nurachman, Z., Kurniasih, S.D., Puspitawati, F., Hadi, S., Radjasa, O.K., Natalia D., Cloning of the Endoglucanase Gene from a *Bacillus amyloliquefaciens* PSM 3.1 in *Escherichia coli* Revealed Catalytic Triad Residues Thr-His-Glu. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 6(4), 268-274.
- Nutschidze, N.N., Sarkanen, S., Schmidt, E.L., ve Shashikanth, S., 1997. Consecutive polymerization and depolymerization of kraft lignin by *Trametes cingulata*. *Phytochemistry*, 49 (5), 1203-1212.
- O'Sullivan, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4, 173-207.
- Özçelik, S., 1995. Genel Mikrobiyoloji, Süleyman Demirel Üniversitesi, 1-33s, Isparta.
- Özdarendeli, A., Toraman, Z.A., Kuk, S., Tonbak, S., Bulut, Y., ve Kalkan, A., 2003. Polimeraz zincir reaksiyonu ile transforme bakteriyel kolonilerin belirlenmesi (PZR-Tarama). *Fırat Tıp Dergisi*, 8, 79-82.
- Parisi, F., 1989. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. *Advances Biochemical Engineering*, 38, 53-87.
- Priest, F.G., 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriology Rev.*, 41(3), 711-753.
- Qiao, J., Dong, B., Li, Y., Zhang, B., Cao, Y., 2009. Cloning of a β -1,3-1,4-Glucanase Gene from *Bacillus subtilis* MA139 and its Functional Expression in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152, 334-342.
- Quay, D. H. X., Bakar, F. D. A., Rabu, A., Said, M., Illias, R. M., Mahadi, N. M., Hassan, O., Murad, A. M. A., 2011. Overexpression, purification and characterization of the *Aspergillus niger* endoglucanase, *EglA*, in *Pichia pastoris*. *African Journal of Biotechnology*, 10 (11), 2101-2111.

- Rao, B.M., Tanksale, M.A., Ghathe, S.M. ve Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3), 597-635.
- Robert, J., ve Auston, F., 1982. In *Proceedings 1981 International Conference on Residential Solid Fuels*. Editors: Copper, J.A., and Malek, Portland, 1089.
- Ross, P., Mayer, R., ve Benziman, M., 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35-58.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., ve Maniatis, T., 1989. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pres, 2nd ed., New York, 1-186.
- Sanchez-Torres, J., Perez, P., Santamaria, R. I., 1996. A cellulase gene from a new alkalophilic *Bacillus* sp. (strain N186-1). Its cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 149-155.
- Sarıkaya, E., 1995. α -amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sayigh, A., 1999. Renewable energy-the way forward. *Applied Energy*, 64 (1-4), 15-30.
- Schmid, G., Bisell, M., ve Wandrey, C., 1988. Preparation of celloextrins and isolation of oligomeric side components and their characterization. *Analytical Biochemistry*, 175, 573-583.
- Schwarz, W.H., Schimming, S., Staudenbauer, W.L., 1987. High-level expression of *Clostridium thermocellum* cellulase genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 50-56.
- Sfountoulakis, M., ve Dokianakis, S.N., 2002. Removal of Phenolics in olive mill waste waters using the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Water Research*, 36 (19), 4735-4744.
- Sharrock, K.R., 1988. Cellulase assay methods: a review. *J Biochem Biophys Methods*, 17, 81-105.
- Shpigel, E., Roiz, L., Goren, R., ve Shoseyov, O., 1998. Bacterial cellulose-binding domain modulates in vitro elongation of different plant cells. *Plant Physiology*, 117, 1185- 1194.
- Sindhu, G.S., Shama, P., Chakrabarti, T., ve Gupta, J.K., 1997. Strain improvement for the production of a thermostable α -amylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 21 (7), 525-530.
- Smith, J.E., 1996. *Biotechnology*. Chambridge University Press, 233p, Chambridge.
- Spilliaert, R., Hreggvidsson, G. O., Kristjansson, J. K., Eggertsson, G., Palsdottir, A., 1994. Cloning and sequencing of a *Rhodothermus marinus* gene, *bglA*, coding for a thermostable β -glucanase and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 224, 923-930.
- Stokes, M.R., ve Zheng, S., 1995. The use of carbohydrase enzymes as feed additives for early lactation cows. In: 23rd Biennial Conf. Rumen Function, p 35, Chicago
- Strayer, R.F., Finger, B.W., Alazrki, M.P., Cook, K., ve Garland, J.L., 2002. Recovery of resources for advanced life support space applications: effect of retention time on biodegradation of two crop residues in a fed-batch, continuous stirred tank reactor. *Bioresource Technology*, 84 (2), 119-127.
- Strobel, H.J., Caldwell, F.C., ve Dawson, K.A., 1995. Carbohydrate transport by the anaerobic thermophilic *Clostridium thermocellum* LQRI. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 4012-4015.

- Sugiyama, J., Persson, J., ve Chanzy, H., 1991. Combined infrared and electron diffraction study of the polymorphism of native cellulose. *Macromolecules*, 24, 2461-2466.
- Taylor R.E., 1991. *Protein Immobilization. Fundamentals and Applications*. Marcel Dekker Inc., 377 p, New York.
- Topal Ş., Enzimler, 1985. Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri. *Gıda*, 1, 25-37.
- Temme, P., Warren, R.A.J., Miller, R.C., Kilburn, D.G., ve Gilkes, N.R., 1995. Cellulosebinding domains - classification and properties. In *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides*. Editors: Saddler, J.M., and Penner, M.H. Washington, DC: American Chemical Society, 142-161.
- Thaenkudruea, P., Jindaprasert, A., Jirajaroenrat, K., 2011. Cloning of a Cellulase Gene from *Bacillus* sp. and Expression in *Escherichia coli*, FerVAAP International Conference.
- Thongekkaew, J., Ikeda, H., Masaki, K., Iefuji, H., 2008. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 60, 140–146.
- Topal, Ş., 1985. Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi ve Bu Teknolojide Rennin'in Yeri. *Gıda*, 10 (1), 25-37.
- Troyer, K., 1991. Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose. Editors: Haigler, C.H., and Wimer, P.J. Marcel Dekker, Inc, 311-325, New York.
- Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. Wiley, 435 p, New York.
- Valenzuela, M.B., Jones, C.W., ve Agrawal, P.K., 2006. Batch aqueous-phase reforming of woody biomass. *Energy Fuels*, 20, 1744–1752.
- Valjamae, P., Sild, V., Pettersson, G., ve Johansson, G., 1999. Acid hydrolysis of bacterial cellulose reveals different modes of synergistic action between cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *European Journal of Biochemistry*, 266 (2), 327-334.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., ve Linko, M., 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, 13 (2-3), 335-350.
- Voloch, M., Ladisch, M.R., Cantarilla, M., ve Tsao, G.T., 1984. Preparation of celloextrins using sulfuric acid. *Biotechnology Bioengineering*, 26, 557-559.
- Yang, D., Weng, H., Wang, M., Xu, W., Li, Y., Yang, H., 2010. Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15, *Mol Biol Rep.*, 37, 1923–1929.
- Waffenschmidt, S., ve Janeicke, L., 1987. Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2- bincinoninate. *Analytical Biochemistry*, 165, 337-40.
- Wainó, M., ve Ingvorsen, K., 2003. Production of β - xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7 (2), 87-93.
- Whistler, R.L., ve Smart, C.L., 1953. *Polysaccharide Chemistry*. Academic Pres Inc. Publishers, 114 p, New York.
- Williamson, G., Belshaw, N.J., ve Williamson, M.P., 1992. O-glycosylation in *Aspergillus glucoamylase*. Conformation and role in binding. *Biochemical Journal*, 287(Pt.2), 423-428.

- Wiseman, A., 1987. Chapter 3: The Application of Enzymes in Industry. Handbook of Enzymes Biotechnology, 2nd ed., Horwood, Chichester, 274-373.
- Wolfenden, R., ve Snider, M.J., 2001. The depth of chemical time and the powder of enzyme as catalysts. Accounts of Chemical Research, 34 (12), 938-945.
- Wonganu, B., Pootanakit, K., Boonyapakron, K., Champreda, V., Tanaponpipat, S., Eurwilaichitr, L., 2007. Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif., 58, 78-86.
- Wood, T.M., ve Bhat, K.M., 1988. Methods for measuring cellulase activities. Methods of Enzymology, 160, 87-117.
- Wood, T.M., 1988b. Preparation of crystalline, amorphous and dyed cellulase substrate. Methods of Enzymology, 166, 19-45.
- Wood, T.M., ve Garica-Campayo, V., 1990. Enzymology of cellulose degradation. Biodegradation, 1, 147-161.
- Yasutake, Y., Kawano, S., Tajima, K., Yao, M., Satoh, Y., Munekata, M. ve Isao, 2006. Structural Characterization of the *Acetobacter xylinum* Endo- β -1,4-Glucanase CMCax Required for Cellulose Biosynthesis in GTPase activation. Proteins, 64, 1069-1077.
- Yoon, J.J., ve Kim, Y.K., 2005. Degradation of crystalline cellulose by Brown-Rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*. The Journal of Microbiology, 43 (6), 487-492.
- Zhang, Y.H.P., ve Lynd, L.R., 2003. Cellodextrin preparation by mixed-acid hydrolysis and chromatographic separation. Analytical Biochemistry, 322 (2), 225-232.
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004a. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, 88 (7), 797-824.
- Zhang, Y.H.P., Lynd, L.R., 2004b. Kinetics and relative importance of phosphorolytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*. Appl Environ Microbiol., 70, 1563-1569.
- Zhang, Y.H.P., ve Lynd, L.R., 2005. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. Biomacromolecules, 6, 151-155.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Hülya KUDUĞ
Doğum Tarihi ve Yeri : 25.02.1987 / AYDIN
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
Telefon : 0 356 252 16 16 (2910)
e-mail : hlykudug@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ege Üni. Biyomühendislik Bölümü	2009
Lise	Aydın Süleyman Demirel Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010- ...	Tokat Gaziosmanpaşa Üni. Biyomühendislik Bölümü	Araştırma Görevlisi