



T.C

BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN *THERMOTOGA*
NAPHTHOPHILA'DAN β -KSİLANAZIN MOLEKÜLER
KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU

ÖZGENUR DİNÇER

DANIŞMAN

PROF. DR. AHMET KARADAĞ

BARTIN-2021



T.C

**BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN *THERMOTOGA NAPHTHOPHILA*'DAN β -
KSİLANAZIN MOLEKÜLER KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ÖZGENUR DİNÇER

BARTIN-2021

KABUL VE ONAY



BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Prof. Dr. Ahmet KARADAĞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN *THERMOTOGA NAPHTHOPHILA*’DAN β -KSİLANAZIN MOLEKÜLER KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

31.05.2021

Özgenur DİNÇER

ÖNSÖZ

Üniversite hayatım boyunca lisans ve yüksek lisans dönemlerinde her türlü konuda beni yalnız bırakmayarak danışmanlığımı üstlenen, araştırma konusunun seçiminden sonuçlandırılmasına kadar katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, Pakistan’a gitme sürecimde beni motive ederek desteğini her zaman üzerimde hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Ahmet KARADAĞ’a ve Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi’nde ikinci danışman hocam olmayı kabul eden değerli hocam Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL’e saygıyla ve içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Pakistan’da geçirdiğim süreç boyunca bana ev sahipliği yapan, çalışmalarına büyük destek sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Muhammad Nauman Aftab’a ve her konuda bana yardımcı olan, çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan arkadaşım Attia Hamid’e teşekkürlerimi borç bilirim. Tez çalışmamın sonuçlandırılmasına kadar mesleki, hayati ve bilimsel alanda bilgi, görüş ve tecrübelerini benimle paylaşan, Pakistan’daki çalışma sürecimde benimle birlikte olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hasan Ufuk ÇELEBİOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan, her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan, tez çalışmam süresince bana moral ve destek veren babama, anneme ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezi, Pak-Türk Araştırmacı Hareketliliği Burs Programı (MEV.2017-361) tarafından desteklenmiştir.

Özgenur DİNÇER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOETANOL ÜRETİMİ İÇİN *THERMOTOGA NAPHTHOPHILA*'DAN β -KSİLANAZIN MOLEKÜLER KLONLANMASI, EKSPRESYONU VE KARAKTERİZASYONU

Özgenur DİNÇER

Bartın Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet KARADAĞ

Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Bartın-2021, sayfa: 85

Enzimler, üretim aşamasının kolay ve ucuz olmasından dolayı çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmektedir. Ksilanaz enzimleri özellikle endüstriyel alanlarda çok tercih edilmesinden dolayı bu enzim üzerinde yapılan araştırmalar oldukça fazladır.

Bu çalışmada β -ksilanaz geni, termofilik bir organizma olan *Thermotoga naphthophila*'dan klonlandı. Ekspresyon vektörü *pET-21a(+)* aracılığı ile *Escherichia coli* BL21(DE3)'te eksprese edildi. Yapılan araştırmalar sonucu enzimin pH (7.0), sıcaklık (37°C) ve IPTG konsantrasyonu (0,5 mM) en yüksek ekspresyon sonucunu verecek şekilde ayarlandı. β -ksilanazın saflaştırılması ısıtma işlemi kullanılarak gerçekleştirildi. Enzimin indirgen şeker miktarının saptanması için Dinitrosalisilik asit (DNS) kullanıldı. Yöntem indirgen şekerin 3,5-Dinitrosalisilik asit ile yükseltgenmesine dayanır. Saflaştırılmış β -ksilanaz enziminin moleküler kütlesi sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi kullanılarak 38 kDa olduğu bulundu.

β -ksilanaz enzimi fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı lignoselülozik biyokütleler ile ön muamele aşamasından geçirildi. Pek çok ön işlem yöntemi araştırıldı ve en iyi sonucu verebilecek yöntem olan asit alkali metodu kullanıldı. Biyokütlelerin enzimle muamelesi sonucu açığa çıkardığı şeker miktarı hesaplandı. En yüksek aktivite fındık koçanı biyokütlesinde olduğu gözlemlendi.

Çeşitli kullanım alanları bulunan termofilik β -ksilanaz enziminin biyokütleler ile muamele edilmesinin ardından fermentasyon aşamasının ve diğer metodların uygulanması durumunda fosil yakıtların yerini alabileceği ve yenilenebilir enerji kaynağı olarak biyoetanol üretilebileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ksilanaz; klonlama; ekspresyon; sakkarifikasyon; biyoetanol

Bilim Alanı Kodu: 401.02.02

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOLECULAR CLONING, EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF β -XYLANASE FROM *THERMOTOGA NAPHTHOPHILA* FOR THE PRODUCTION OF BIOETHANOL

Özgenur DİNÇER

**Bartın University
Graduate School
Department of Biology**

Thesis Advisor: Prof. Ahmet KARADAĞ

Co-Advisor: Prof. Kemal BÜYÜKGÜZEL

Bartın-2021, pp: 85

Enzymes can be used in various biotechnological applications due to the easy and cheap production stage. Since xylanase enzymes are preferred especially in industrial areas, researches on this enzyme are quite high.

In this study, the β -xylanase gene was cloned from *Thermotoga naphthophila*, a thermophilic organism. The expression vector was expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) via *pET-21a* (+). Within the literature information, pH (7.0), temperature (37°C) and IPTG concentration (0,5 mM) of the enzyme were adjusted to result in the highest expression. Dinitrosalicylic acid (DNS) was used to determine the amount of reducing sugar of the enzyme. The molecular mass of the purified β -xylanase enzyme was found to be 38 kDa using sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis.

The β -xylanase enzyme hazelnut cob, rhododendron branch and rhododendron leaf were pretreated with lignocellulosic biomass. Many pretreatment methods have been researched

and the acid alkali method which can give the best results, has been used. The amount of sugar released by enzyme treatment of biomass was calculated. The highest activity was observed in hazelnut cob biomass.

It is envisaged that after the thermophilic β -xylanase enzyme, which has various uses, is treated with biomass, fermentation stage and other methods can replace fossil fuels and produce bioethanol as a renewable energy source.

Keywords: Xylanase; cloning; expression; saccharification; bioethanol

Scientific Field Code: 401.02.02



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
BEYANNAME	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Enzimler ve Enzimlerin Genel Özellikleri.....	2
1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	5
1.3. Selüloz	6
1.4. Selülazlar	7
1.5. Selülaz Enzimlerinin Kullanım Alanları	8
1.6. Hemiselüloz	8
1.7. Lignin.....	9
1.8. Ksilan	10
1.9. Ksilanların Sınıflandırılması	12
1.10. Ksilanların Uygulama Alanları	13
1.11. Ksilanazlar	13
1.12. Ksilanazların Kullanım Alanları.....	15
1.13. <i>Thermotoga naphthophila</i>	19
1.14. Biyokütle ve Biyoyakıt	20
1.15. Biyoetanol	22
1.16. <i>Rhododendron</i> (Ormangülü).....	24
1.17. Fındık Kabuğu	25
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	26
2.1. Ksilanaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar	26
2.2 Biyoetanol Üretimi Çalışmaları.....	33
3. MATERYAL VE METOT	34

3.1 Materyal	34
3.1.1 Bakteriyel Türlerin ve Plazmidlerin Toplanması.....	34
3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar	34
3.1.3 Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri.....	35
3.2 Yöntem.....	36
3.2.1 Genomik DNA'nın PCR Analizi	36
3.2.2 <i>pET-21a(+)</i> Vektöründe β -ksilanaz Geninin Klonlanması	38
3.2.2.1 PCR Ürünü Saflaştırılması.....	38
3.2.2.2 Plazmid DNA Saflaştırılması.....	39
3.2.2.3 Plazmid DNA'nın Kısıtlandırılması.....	42
3.2.2.4 Agaroz Jelden Plazmid DNA Pürifikasyonu.....	42
3.2.2.5 Plazmid DNA'nın ve Genomik DNA'nın Kısıtlandırılması.....	44
3.2.2.6 Ligasyon.....	45
3.2.2.7 Kompetent Hücre Oluşumu	45
3.2.2.8 Transformasyon.....	46
3.2.2.9 Pozitif Klonların Belirlenmesi İçin Koloni PCR.....	47
3.2.2.10 Pozitif Klonlardan Rekombinant Plazmid İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimleriyle Kısıtlama.....	48
3.2.3 Rekombinant β -ksilanaz Geninin İfadesi	49
3.2.3.1 Kültürün Hazırlanması ve IPTG ile Muamele Edilmesi	49
3.2.3.2 Enzim Üretimi.....	50
3.2.3.3 Protein Tayini	51
3.2.3.4 Enzimin Kısmi Saflaştırılması.....	52
3.2.4 β -Ksilanaz Enziminin Moleküler Kütle Tayini.....	52
3.2.5 Asit-Alkalın Metodu İle Çeşitli Biyokütlelerin Ön İşlemden Geçirilmesi...	53
3.2.6 Ön İşlem Görmüş Biyokütlelerin Sakkarifikasyonu	55
3.2.6.1 DNS (Dinitrosalisilik Asit)	56
4. BULGULAR	58
4.1 β -ksilanaz Geninin PCR Analizi	58
4.2 Genomik DNA ve <i>pET-21a(+)</i> Vektörünün Saflaştırılması	59
4.3 Kompetent <i>E.coli</i> BL21 Hücre Hazırlığı Analizi ve Transformasyon Analizi ..	60
4.4 Koloni PCR Analizi	61
4.5 Pozitif Klonlardan Rekombinant Plazmid İzolasyonu Analizi ve Restriksiyon Enzimiyle Kısıtlama Analizi	62

4.6 Rekombinant Enzimin İfadesi.....	64
4.7 Rekombinant Enzimin Kısmi Saflaştırılması	65
4.8 β -ksilanaz Enziminin Moleküler Kütle Tayini.....	65
4.9 Ön İşlem Görmüş Biyokütlelerin Sakkarifikasyonu.....	66
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR.....	75
ÖZGEÇMİŞ	84



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
1.1: Bitki hücre duvarı.....	10
1.2: Ksilan yapısı.....	12
1.3: Ksilanın hidrolizi için gerekli olan enzimler.....	14
1.4: Lignoselülozik malzemelerden bakteri ve mayalar tarafından ksilanaz kullanılarak etanol üretimi.....	18
1.5: <i>Thermotoga naphthophila</i> bakterisinin elektron mikroskobu görüntüsü.....	20
1.6: Biyoyakıtların fiziksel özelliklerine göre gruplandırılması.....	21
3.1: PCR analizi adımları.....	37
3.2: Agaroz jel hazırlanması.....	38
3.3: GeneJET jel ekstraksiyon kiti.....	39
3.4: LB besiyeri.....	40
3.5: LB besiyerinde kültürlenmiş <i>E.coli</i> bakterisi.....	40
3.6: GeneJET plazmid miniprep kit.....	41
3.7: Pürifiye edilen <i>pET-21a(+)</i> vektörü.....	42
3.8: Plazmid DNA'sı içeren jel ile bağlama tamponu bileşimi.....	43
3.9: Plazmid DNA'sının agaroz jelden bistrüri ile kesimi.....	44
3.10: Agar ve ampicilinli petri kaplarında kompotent hücre içeriği.....	46
3.11: Transformasyon aşaması.....	47
3.12: Koloni PCR aşamaları.....	48
3.13: IPTG içeren kültür içeriği.....	50
3.14: a) Sonikatör cihazı içerisindeki enzim içeriği. b) Sonikasyon sonrası enzim içeriği.....	51
3.15: Isıtıcı üzerindeki DNS eklenmiş enzim içeriği.....	52
3.16: Biyokütlelerin saf su ile yıkandıktan sonra süzülme aşaması.....	54
3.17: Ön işlem aşamaları gören biyokütlelerin kurutulmaya alınması.....	54
3.18: Biyokütlelerin çalkalamalı inkübatörde 72 saat bekletilmesi.....	55
3.19: Biyokütlelerin çalkalamalı inkübatörde 72 saat inkübe aşaması sonrası.....	56
3.20: Biyokütle ve DNS'nin test tüpüne alınması.....	57
3.21: Biyokütle ve DNS içeriğinin sıcak suya maruz bırakılmasından sonraki görüntüsü.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor).

Şekil	Sayfa
No	No
4.1: Kullanılan DNA markörün baz çifti ve konsantrasyonu.	58
4.2: β -ksilanaz geninin PCR amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforeziyle analizi.	59
4.3: a) Saflaştırılan PCR ürünü b) Dimerleşme gösteren saflaştırılmış plazmid DNA.	60
4.4: Agaroz jelden saflaştırılan plazmid DNA'sı.	60
4.5: Transformasyon sonucu oluşan koloniler.	61
4.6: Koloni PCR analizi.	62
4.7: Rekombinant plazmid DNA izolasyonu.	63
4.8: Çift kısıtlama analizi sonucu.	63
4. 9: a) 80°C ısıya maruz bırakılan DNS içeren kontrol tüpü ve enzim tüpü içeriği b ve c) 80°C'de 10 dakika bekletilen DNS içeren kontrol tüpü ve enzim tüpü içeriği.	64
4.10: β -ksilanaz enzimi için SDS-PAGE. 1) protein marker 2) 5 μ l β -ksilanaz 3) 10 μ l β -ksilanaz 4) 15 μ l β -ksilanaz 5) 20 μ l β -ksilanaz.	65
4.11: Farklı konsantrasyondaki glukoz ile hazırlanan kalibrasyon grafiği.	66

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
No	No
1.1: Termofilik yapıdaki enzimlerin uygulama alanları.....	3
1.2: Biyoetanolün fiziksel özellikleri.	22
1.3: Biyoetanolün kimyasal ve termal özellikleri.....	22
1.4: Dünya biyoetanol üretim miktarları (milyar litre).....	23
1.5: Türkiye biyoetanol üretim, tüketim, ihracat miktarları (milyon litre).....	24
3.1: Pakistanda yapılan çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar.....	34
3.2: Türkiyede yapılan çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar.....	35
3.3: Çalışmada kullanılan laboratuvar malzemeleri.....	36
3.4: SDS-PAGE yöntemi için kullanılan β -ksilanaz miktarları	53
4.1: Fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı biyokütlelerin şeker miktarları.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
°F	: Fahrenheit derece
nm	: Nanometre
ng	: Nanogram
µl	: Mikrolitre
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
Da	: Dalton
kg	: Kilogram
m ³	: Metreküp
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
mm ²	: Milimetre kare
ml	: Mililitre
M	: Molar
mM	: Milimolar
kJ	: Kilojoule
Hg	: Hektogram
sn	: Saniye
kcal	: Kilokalori
g	: Gram
dk	: Dakika
rpm	: Revolutions per minute
pJ	: Petajoule
bç	: Baz çifti

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
DNA	: Deoksribo Nükleik Asit

pH	: Power of Hidrojen
Araf	: Arabinofuranoz
MeGlcUA	: Metil-D-glikopiranosil Üronik Asit
ArbF	: Arabinofuranosil
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
TARKİM	: Tarımsal Kimya Teknolojileri
TEZKİM	: Tezkim Tarımsal Kimya
GH	: Glikozid Hidrolaz
ICS	: İyon Kromatografi Sistemi
RNAaz	: Ribonükleaz
DNS	: Dinitrosalisilik Asit
FPLC	: Hızlı Protein Sıvı Kromatografi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
DSMZ	: Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu
LB	: Luria Bertoni
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
UV	: Ultraviyole
IPTG	: İzopropiltrigalaktosidaz
TEMED	: Tetrametiletildiamin
APS	: Amonyum Per Sülfat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NO	: Azot Oksit
OH ⁻	: Hidroksil
Ca	: Kalsiyum
CaCl ₂	: Kalsiyum Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
HCl	: Hidroklorik Asit
Cl	: Klor
Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Pb	: Kurşun

Hg	: Cıva
Mn	: Manganez
Fe	: Demir
Na	: Sodyum
H ₂ SO ₄	: Sulfürik Asit
C ₂ H ₅ OH	: Etil Alkol



1. GİRİŞ

Enerji, insanların tüm yaşamsal ve biyokimyasal faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi için gerekli bir kaynaktır. Enerji insan hayatını kolaylaştıran her türlü işlem için kullanılmaktadır. Dünya nüfusunun giderek artması nedeniyle enerji talebinde de büyük artışlar olmaktadır. Enerji kaynakları yenilenebilirliğine göre yenilenebilir ve yenilenemez olarak iki gruba ayrılır. Yenilenemez enerji kaynakları başlıca kömür, petrol, doğalgaz gibi enerji kaynaklarıdır. Dünyada ve ülkemizde enerji kaynağı olarak çoğunlukla fosil yakıtlar kullanılmaktadır. Fakat gün geçtikçe enerji kıtlığı ve çevre kirliliği ile ilgili artan endişeler; güneş, rüzgar, biyoenerji gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının gelişimine odaklanmaya yol açmıştır.

Dünya nüfusunun giderek artması ve fosil yakıtların yaşama ömrünün kısılmasına sebep olduğu olumsuzluklardan dolayı alternatif, güvenli, sürdürülebilir, düşük maliyetli yeni bir enerji kaynağı arayışına girilmiştir (Moshi vd., 2015). Biyokütle bazlı atık malzemelerden veya yenilenebilir kaynaklardan elde edilen etanol, biyoetanol olarak adlandırılır. Günümüzde biyoetanol, fosil yakıtların yerini almak için çok tercih edilmekle birlikte birçok araştırmaya da konu olmuştur. Biyoetanolün yenilenebilir ve sürdürülebilir yapısı, depolama kolaylığı, yüksek oksijen içeriği ve yüksek oktan sayısı gibi pek çok özelliği fosil yakıtlarına kıyasla çeşitli avantajlar sergilemektedir (Sewsynker-Sukai ve Kana, 2018).

Ağaçlar ve tarımsal artıklar gibi lignoselülozik biyokütleler, biyoetanol üretimi için büyük miktarda şeker üretebilme potansiyeline sahip dikkat çekici hammaddedir. Fındık kabukları ve ormangülü gibi lignoselülozik biyokütleler fermente edilebilir şekerler üretmek açısından yenilenebilir, düşük maliyetli ve yüksek verimli ham maddelerdir.

Bu çalışmada *Thermotoga naphthophila* organizmasının genomik DNA'sı *pET-21a* vektörü ile ligasyon ve transformasyon yöntemleri kullanılarak β -ksilanaz geninin klonlanması, jel ekstraksiyon kitleri ile saflaştırılması gerçekleştirildi. IPTG kullanılarak üretilen β -ksilanaz enziminin sakkarifikasyon yöntemi ile fındık kabuğu, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı biyokütleleri üzerinden elde edilen şekerin şekerleşme potansiyeli DNS yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan biyokütlelerin yüksek şeker üretme

potansiyeline sahip olduğu bulunmuş ve sürdürülebilir biyoetanol üretimi için bu biyokütlelerin uygun olduğu kanısına varılmıştır.

1.1 Enzimler ve Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler canlıların yapısında önemli role sahip olan, çoğunlukla protein yapıda bulunan, canlıların yaşam faaliyetlerini gerçekleştirebilmesi için kimyasal tepkimeye giren biyolojik katalizörlerdir. Enzimler kimyasal bir tepkimenin aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyon hızını artırır. Enzim kelimesi ilk olarak 1876'da Kühne tarafından kullanılmış olup maya anlamına gelmektedir.

Eski zamanlardan beri kullanılan enzimler; sirke, peynir, bira, şarap, hamur mayası gibi gıda ürünlerinin üretilmesinin yanı sıra deri, çivit ve keten gibi ürünlerinde üretilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu işlemlerde kullanılan enzim kaynağı maya, buzağı rumeni veya papaya meyvesinden sağlanabilir (Kirk vd., 2002).

Enzimlerin spesifik oluşu, etkili oluşu ve geleneksel süreçlere kıyasla çoğu zaman hammadde, enerji ve su tasarrufu sağladığından dolayı son zamanlarda çok çeşitli endüstrilerde kullanılmıştır. Endüstriyel kullanım için enzimler su altı ya da katı hal fermantasyonunda bakteri ve mantar yetiştiriciliği ile üretilmektedir. Su altında enzim üretimindeki işlemler önce fermantasyonu ardından hücre bozulmasını ve filtrasyonu içerir. Daha sonra liyofilizasyon yoluyla saflaştırılır (Jegannathan ve Nielsen, 2013).

Endüstriyel olarak üretilen enzimler; kağıt, deri, tekstil, temizlik, gıda, yem, ilaç, kozmetik ve biyoyakıt üretimi işlemlerinde kullanılmaktadır (Jegannathan ve Nielsen, 2013). 2000 yılında dünya çapında tahmin edilen endüstriyel enzim pazarı yaklaşık olarak 1,5 milyar dolar değerindedir. Endüstriyel pazarın %65'i deterjan, nişasta, tekstil, deri, kağıt ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılan enzimleri içerirken %25'i süt, bira, şarap, meyve suyu ve katı yağ üretiminde kullanılan gıda enzimleri içermektedir. Pazarın %10'unu ise hayvansal yem üretiminde kullanılan fitaz ve selülaz gibi enzimlerin üretimi oluşturur (Cherry ve Fidantsef, 2003).

Enzim ile ilgili bilgiler çok eski zamanlara dayanmaktadır. Günümüzde endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayan üretim daha çok fungal ya da mikrobiyal yolla

gerçekleşmektedir. Hayvansal ve bitkisel kaynaklar kullanılarak elde edilen enzimlere karşın mikrobiyal kaynaklı enzimlerin kullanılması ekonomik yönden daha avantajlıdır. Ayrıca, hayvansal ve bitkisel dokular kısıtlıdır. Çünkü toprak veriminin, mevsim ve iklim şartlarının standart olmamasından dolayı hayvansal ve bitkisel dokular kısıtlı kalmaktadır. Mikrobiyal kaynaklarda ise böyle bir sorun olmadığı için bunlardan elde edilen enzimler çok çeşitlilik göstermektedir (Topal, 1985).

Mikroorganizmalar genel olarak üreme sıcaklıkları bakımından psikrofil, mezofil ve termofil olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Kristjonsson ve Stetter, 1991). Termofilik organizmalar psikrofil ve mezofillere göre daha yüksek sıcaklıkta üremektedir. Termofilik organizmalar kendi aralarında ılımlı termofiller (45-65°C) ve hipertermofiller (85°C) olarak ikiye ayrılırlar (Tablo 1.1). Hiçbir mikroorganizma kendi üreme sıcaklığı dışındaki sıcaklıklarda faaliyet göstermemektedir.

Tablo 1.1: Termofilik yapıdaki enzimlerin uygulama alanları (Demirjian vd., 2001).

Mikroorganizma	Enzimler	Uygulama Alanları
Ilımlı (orta dereceli) termofiller	Amilazlar Ksilanazlar	Tatlandırıcılar için glikoz ve fruktoz Kâğıt ağartma
Termofiller	Proteazlar	Ekmekçilik, bira ve deterjan üretimi
Hipertermofiller	DNA polimerazları	Genetik mühendisliği uygulamaları

Bu zamana kadar tanımlanan yaklaşık 2500 enzimin sadece 250 kadarı ticari olarak kullanılmaktadır. Bunlarında gıda ve temizlik endüstrisinde kullanılan 25 kadar enzim ticari olarak kullanılan tüm enzimlerin biyokütle olarak %80'nini oluşturur (Woodley, 2000). Son 30 yıldan beri rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinden sonra enzim üretimi için mikrobiyal kaynakların kullanılmasında artış olmuştur.

Rekombinant DNA teknolojisi enzimlerin endüstriye yetecek kadar üretilmesini sağlamıştır. Bunun yanı sıra modern biyoteknolojide yer alan protein mühendisliğindeki son gelişmeler endüstriyel enzimlerin gelişmesinde büyük ölçüde katkıda bulunmuştur (Kirk vd., 2002). Bu gelişmeler endüstriyel kullanımları daha çok artırmak için yeni

aktiviteler ortaya koyan ve yeni işlem koşullarına adapte edilmiş özel yapım enzimlerini meydana getirmeyi mümkün kılmıştır.

Enzimlerin katalizör olarak etki ettiği maddelere substrat, oluşan maddelere de ürün denilmektedir. Enzim ile substratın uyumu anahtar-kilit uyumuna benzemektedir. Enzimler etki ettikleri substratları ile aktif bölge adı verilen yerde bağlanır ve böylece substrat-enzim bileşiği oluşur. Daha sonra substrat ürünlerine parçalanırken, enzimler girmiş olduğu tüm reaksiyonlardan hiçbir değişime uğramadan çıktığı için sürekli kullanılabilirler. Enzimlerin bazıları spesifikdir. Sadece tek bir substrata etki eder. Bazı enzimler ise spesifik olmayıp birden fazla substrata etki edebilmektedir.

Enzimlerin yapılarında apoenzim ve koenzim olarak adlandırılan iki grup bulunur. Apoenzim enzimin spesifikliğini sağlayan protein kısmıdır. Koenzim ise organik ve inorganik kısmı olan enzimin etkin biçimidir ve tek başına aktiflik göstermez. Koenzim aktivitesi için apoenzimin de bulunması gerekir.

Bazı enzimlerin aktif olabilmesi için protein yapısında bulunmayan iyonlar gerekmektedir. Bu gruplara kofaktör adı verilmektedir. Demir, çinko, bakır gibi metal iyonları kofaktör olarak adlandırılmaktadır. Bir apoenzim koenzime sıkı bir şekilde bağlanırsa koenzime 'prostetik grup' adı verilmektedir. Apoenzim ile koenzim kompleksine tam enzim anlamına gelen haloenzim adı verilmektedir.

Her enzimin kendine özgü aktivite gösterdiği sıcaklık değeri vardır. Bu değere optimal sıcaklık denir. Enzim optimal sıcaklığından daha düşük bir sıcaklıkta maksimum aktivite gösteremez. Optimal sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta ise enzim yapısının moleküler iç bağları kopar. Her enzimin kendine özgü en iyi çalıştığı pH aralığı vardır. Buna ise optimum pH denilmektedir. Bazı maddelerin kullanılması enzimin aktif bölgesine etki ederek enzimin deforme olmasına yol açar ve böylece enzimin aktivitesi düşürülür. Bu maddeler ise inhibitör olarak adlandırılır.

1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler katalize edilen reaksiyon tipine göre altı gruba ayrılır. Her enzimin dört rakamlı bir numarası vardır.

- 1) İlk sayı enzimin sınıfını
- 2) İkinci sayı enzimin alt sınıfını
- 3) Üçüncü sayı enzimin grubunu
- 4) Dördüncü sayı enzimin kendine özgü seri numarasını gösterir.

Enzimlerin altı grupta sıralanması ise;

1) Oksidoredüktazlar:

Bu sınıf redoks reaksiyonları katalize eden bütün enzimleri içerir. Diğer bir deyişle oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları içerir. Oksitleme reaksiyonlarında moleküle oksijen atomu eklenir ya da molekülden hidrojen atomu ayrılır. Redükleme ise bu olayın tam tersidir. Oksidoredüktazlar grubuna giren enzimler ise dehidrogenaz ve oksidazlardır. Dehidrogenaz substrattan hidrojen iyonunun uzaklaştırılmasını katalize ederken oksidazlar ise moleküler oksijeni kullanarak elektron kaybeden enzim grubudur.

2) Transferazlar

Transferazlar metil, asil, amino, glikosil ya da fosfat gibi grupların bir molekülden başka moleküle transferini sağlarlar.

3) Hidrolazlar

Hidrolazlar C—O, C—C, C—N ve diğer bazı bağların hidrolitik olarak yıkımlarını sağlarlar.

4) Liyazlar

Liyazlar C—O, C—C, C—N ve diğer bazı bağların hidroliz ve oksidasyondan farklı yollarla yıkımını sağlayan enzimlerdir.

5) İzomerazlar

İzomerazlar bir molekül içinde geometrik ya da yapısal düzenlemelerde değişiklik yaparak molekülün uzay dizilişini değiştiren gruptur.

6) Ligazlar

Ligazlar ATP ya da başka bir enerji kaynağı kullanarak iki molekülün birleşmesini katalize eder (Aehle, 2007).

1.3. Selüloz

Selüloz bitkilerin hücre duvarında bulunur ve aynı zamanda bitkilerin ana polimerik bileşenidir. Selüloz glikoz birimlerinin β -1,4 bağları ile bağlanması sonucu oluşan polimerdir. Ekosistemde bulunan çeşitli selülitik bakteri ve mantarlar, çözünmeyen selüloz substratları çözünebilir şekerlere dönüştürmek için ilgili mikroorganizmalar ile çalışır (Bayer vd., 1998).

Selülozun endüstriyel olarak üretilmesi ve işlenmesindeki iki ana kaynak ağaç ve pamuktur. Bununla birlikte selüloz; bakteriler, prokaryotik ve ökaryotik organizmalardan da üretilir. Selüloz ayrıca yosun, eğrelti otları, anjiyospermiler, tatlı sular ve kara bitkileri de dâhil olmak üzere çeşitli organizmalar tarafından sentezlenir (Brown, 2003).

Selülozun biyosentezi sırasında Van der Waals bağları, bitişik moleküllerin hidroksil grupları ve oksijen molekülleri arasındaki hidrojen bağları, büyük mikrofibriller halinde (5-50 nm çapında, birkaç mikron uzunluğunda) toplanan ve temel fibriller yapısını oluşturan çoklu selüloz zincirlerinin paralel yapıda toplanmasını teşvik eder.

Zincir içi ve zincirler arası hidrojen bağı, selülozu nispeten kararlı hale getirir ve selüloz fibrillerine yüksek oranda sertlik kazandırır. Bu selüloz fibrilleri; ağaçlar, bitkiler, bazı deniz canlıları, algler ve bakteriler için temel güçlendirme aşamasıdır. Bu selüloz fibrillerinin içinde selüloz zincirlerinin çok düzenli (kristal) bir yapıya yerleştirildiği bölgeler ve düzensiz (amorf) bölgeler bulunur (Moon vd., 2011).

Selüloz doğada yapısal olarak 4 farklı şekilde mevcuttur.

- 1) Paralel şekilde uzanan ve β -1,4 glukan zincirleriyle bağlanan yapı
- 2) Paralel şekilde uzanmayan β -1,4 glukan zincirleriyle bağlanan yapı
- 3) Selüloz 1'in kimyasal olarak işlenmesiyle elde edilen yapı
- 4) Selüloz 2'nin kimyasal olarak işlenmesiyle elde edilen yapı (Akoğlu vd., 2010).

Doğal selüloz esaslı malzemeler tahta, kenevir, pamuk, keten vb. binlerce yıldır mühendislik malzemesi olarak endüstriyel alanlarda kullanılmıştır. Ancak bu malzemeler sürdürülebilirlik açısından oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, biyoteknolojinin yardımıyla doğal kaynaklar olmadan selüloz üretebilmenin yolları yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar selüloz üretme yeteneğine sahip olan bakteriler üzerinde olmuştur.

1.4. Selülazlar

Selülazlar, selülozun sahip olduğu β -1,4 glikozit bağlarını parçalayarak glikoz moleküllerinin serbest bırakılmasını sağlayan enzimlerdir. Selülazlar oligosakkaritleri ve polisakkaritleri hidrolize eden glikozid hidrolaz enzim ailesinin üyesidir. Bütün selülazlar kimyasal olarak moleküler düzeyde tek tip bağlara etki edebilirler. Ancak, selülozun geniş intermoleküler bağlanma örtüsü birden fazla türde moleküler bağ içerdiğinden mükemmel bir kristal yapı oluşturur. Bu özellikle mikrobiyal bozunmaya karşı çok dirençlidir. Bu nedenle selülozu etkin bir şekilde hidrolize edebilmek için çoklu enzim sistemleri gerekmektedir (Bayer vd., 1998).

Selülaz enzimleri 3 kategoride incelenir.

- 1) Endoglukanazlar (β -1,4-D glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.4).
- 2) Ekzoglukanazlar (β -1,4-D glukan sellobiyohidrolazlar; EC 3.2.1.91).
- 3) Sellobiyazlar (β -1,4-D glukosidazlar veya β -D glikozid glikozil hidrolaz; EC 3.2.1.21) (Ryu ve Mandels, 1980).

Endoglukanazlar, zincirleri rastgele bir şekilde hidrolize eden ve zincir uzunluğunda hızlı bir şekilde düşüşe veya indirgeme gruplarında yavaş bir artış ile birlikte polimerizasyon

derecesini azaltan selülozlardır. β -glukoz konfigürasyonunu korur. Ekzoglukanazlar glukoz veya sellobiyoz ünitelerini zincirin indirgeyici olmayan ucundan uzaklaştırmaya neden olan, ayrıca akışkanlıkta çok az değişiklik olan indirgeme gruplarında hızlı bir artışa neden olan selülozlardır (Ryu ve Mandels, 1980).

1.5. Selüloz Enzimlerinin Kullanım Alanları

Günümüzde selüloz enzimleri gıda, bira, şarap ve hayvan yemi üretimi, tekstil, çamaşırhane, kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde, biyoyakıt, kimya, tıbbi ve genetik mühendisliği alanlarında, ayrıca kirlilik giderimi için kullanılmaktadır (Bhat, 2000).

1.6. Hemiselüloz

Hemiselülozlar bitki hücre duvarının ana bileşenidir ve selüloz haricindeki polimerik amorf hidrokarbonlara denilir. Hemiselülozlar, bitki hücre biyokütlesinin yaklaşık üçte birini oluşturur ve heteromananlar, ksiloglukan, heteroksilatlar ve karışık bağlantı glukanını sağlarlar. Bu polisakkaritlerin sahip olduğu ince yapısı bitki türlerine ve doku tipine bağlı olarak değişir (Pauly, 2013). Hemiselülozlar D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz, L-arabinoz gibi pentoz şekerlerini içermektedir (Abu Tayeh vd., 2014).

Hemiselülozların yapısı ve hücre içindeki miktarı, farklı türler ve hücre tipleri arasında önemli ölçüde değişir. Hemiselülozların en önemli biyolojik rolü, selüloz ve bazı hücre duvarlarında lignin ile birlikte etkileşime geçerek hücre duvarını güçlendirmeyi sağlar. Hemiselülozlar, golgi membranlarında bulunan glikosiltransferazlar tarafından sentezlenir (Scheller ve Ulvskov, 2010).

Sulu çözeltilerde çözünbilme yapısında olan hemiselülozlar asit etkisiyle çok iyi bir şekilde hidroliz olabilme yapısına sahiptir. Selüloz homopolisakkarit grubunda yer alırken hemiselülozlar ise heteropolisakkaritler grubunda yer alırlar. Hemiselüloz odunun %20-30'unu oluşturur ve dallanmış molekül zincirleri üzerinden meydana gelir. Selüloz %17,5'lik NaOH'da çözünemediği halde hemiselülozlar çözünür. Hemiselülozların polimerizasyon derecesi daha düşüktür. Hemiselülozlar gıda katkı maddeleri gibi pek çok sayıda endüstriyel uygulamada ve tıbbi uygulamalarda kullanılır.

Hemiselüloz otlarda ve ikincil hücre duvarlarında ksilan adı verilen β -1,4 bağlı ksiloz birimlerinden oluşan bir polimerdir. Selüloz plazma zarındaki büyük kompleksler tarafından sentezlenirken ksilan golgi membranındaki enzimler tarafından sentezlenir. Bu nedenle ksilan sentezi enzimlerin hareketini ve düzenlenmesini sağlamakla görevlidir (Rennie ve Scheller, 2014).

1.7. Lignin

Lignin karakteristik yan zincirlere sahip olan, 4-hidroksifenilpropanoid oksidatif birimlerinin birleşmesinden meydana gelen yapıdır. Çok sayıda aromatik polimer grubuna ve su geçirmez yapıya sahiptir. Lignin çapraz bağlar ile bağlanır ve katı halde amorf bir yapıdadır. Lignin %25-35 oranında iğne yapraklı ağaç odunlarında bulunurken %17-25 oranında ise yapraklı ağaç odunlarında bulunur.

Lignin kimyasal ve termal ayrışma yoluyla, poliestерler, polieterler ve polistiren gibi sentetik polimerler için başlangıç malzemeleri olarak kullanılabilirken ligninden çok çeşitli kimyasallar elde etmekte mümkündür. Aynı zamanda basit kimyasal modifikasyon ile ligninden çeşitli polimerler elde edilebilir (Hatakeyama ve Hatakeyama, 2009).

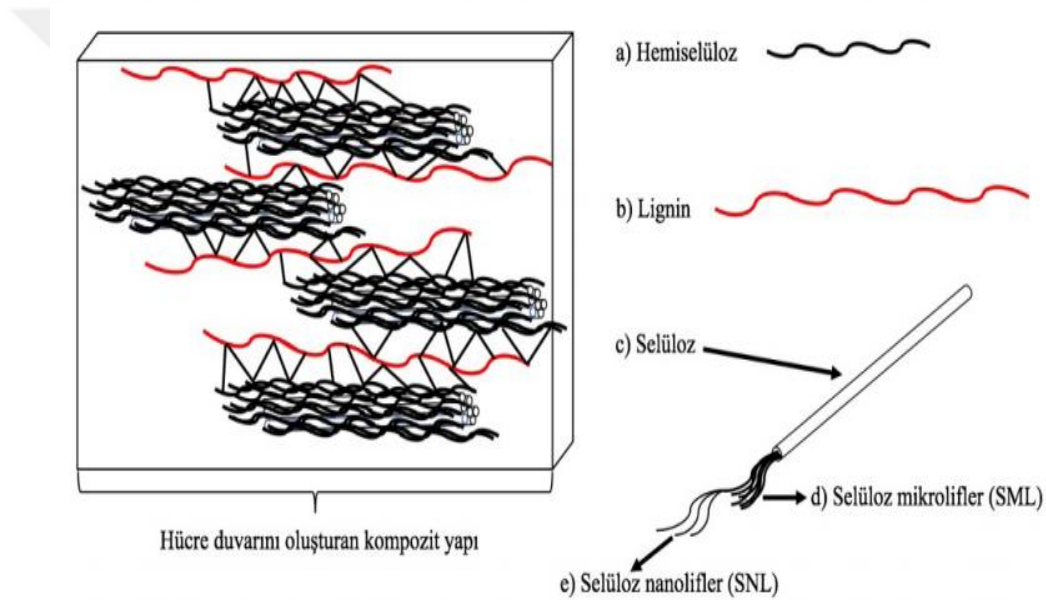
Ligninin tarihi çok uzun bir süreye dayanır. Bilim insanları kağıt hamuru işlemlerinde selüloz eldesi edebilmek için lignini odunsu yapıdan çıkartmak için etkili bir şekilde çaba sarf etmişlerdir. Lignin istenmeyen bir yan ürün olarak kabul edilmiştir ve gelişmekte olan yeni biyoteknoloji kullanılarak az miktarda lignin içeren odun türlerinin yetiştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Vanholme vd., 2010).

Ligninler metoksilasyon derecelerine göre üç alkol monomerinden türetilmiş aromatik heteropolimerlerdir. Bunlar, p-kumarilM1H, koniferilM1G ve sinapilM1S'dir (Boerjan vd., 2003). Bitki hücre duvarı selülozik mikrofibriller ile hemiselülozlarla çapraz bağ ile bağlanan lignin gibi aromatik polimerler içerir. Dolayısıyla bu polimerlerin varlıkları polisakkaritlerin monomerik şekere dönüşmesini engeller (Sahoo vd., 2017).

Bitki hücre duvarı esas olarak selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır (Şekil 1.1). Lignoselülotik biyokütlenin en yaygın bileşeni selülozdur. Spesifik olarak lignin, fiziksel bir bariyer oluşturarak enzimlerin selüloza erişebilirliğini sınırlandırmaktadır. Böylece

ligninin yapıdan çıkarılması fermente olabilen şekerler açığa çıkarmak için biyokütle içindeki polisakkaritlerin enzimatik erişebilirliğini arttırmaya yardımcı olur. Bu nedenle selülozik biyokütlenin yapısının düzene sokulması, enzimatik hidroliz işlemine daha kolaylıkla erişebilmeye yardımcı olabilmek ve selülozun basit şekerler halinde parçalanabilmesi için ön arıtma süreci gerekmektedir (Phitsuwan vd., 2016).

Sun ve Cheng (2002)'ye göre ön işlem metodu fermente edilebilir şeker oluşumunu arttırmalı, karbonhidrat degresyonuna neden olmamalı, hidroliz ve fermentasyon aşamalarının inhibisyonuna neden olacak yan ürün oluşumunu engellemeli ve fiyatı uygun olmalıdır.



Şekil 1.1: Bitki hücre duvarı (Yıldırım, 2018).

1.8. Ksilan

Dünyada selülozdan sonra en bol miktarda bulunan ikinci polisakkarit hemiselülozdur. Ksilan 100-200 tane 5 karbonlu ksiloz monosakkaritlerini birbirine β -1,4 glikozidik bağlarıyla birbirlerine bağlanmasından meydana gelmiş bir polisakkarittir (Kocabaş vd., 2017). L-arabinoz ve D-ksiloz yan zincirlerini içerir. Ksilan, toplam bitki biyokütlesinin yaklaşık olarak %20-40'ını oluşturan ana bileşendir.

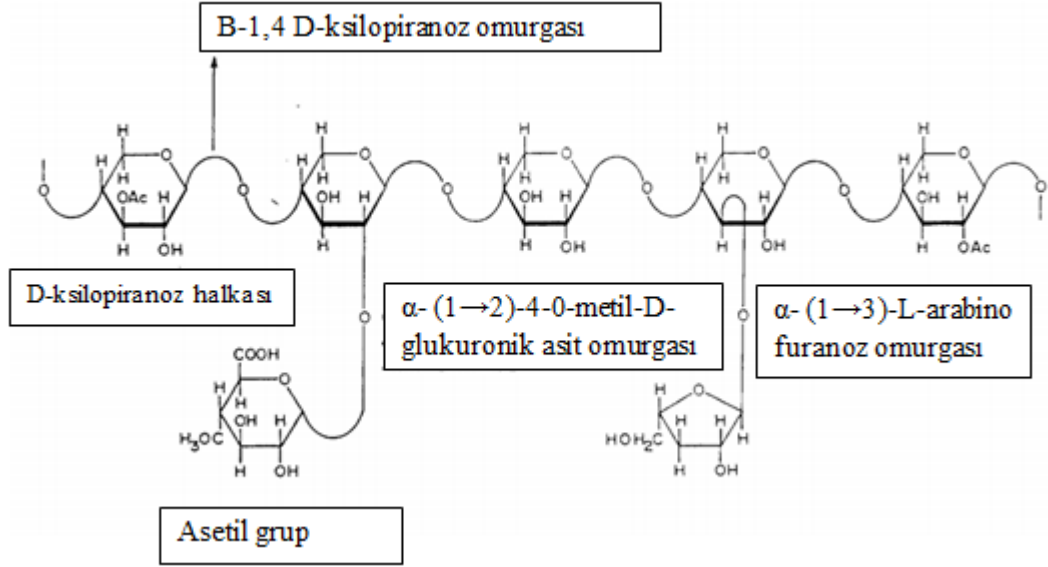
Ksilan pratik uygulamalarda büyük bir biyopolimer olarak kullanılır ve ksilanın parçalanmasıyla çeşitli miktarlarda birçok önemli ürünler elde edilir. Kökenlerine bağlı olarak ksilanlar; asetilasyon seviyesi, yan zincir sayısı, moleküler ağırlık ve kimyasal bileşim seviyelerinde farklılık gösterir (Zafar vd., 2016).

Ksilan yapısındaki farklılıklar farklı türler arasında ve hatta aynı türün farklı dokuları arasında da mevcuttur. Dikotlarda ksilan, sekonder hücre duvarlarında yaygın şekilde bulunurken primer hücre duvarlarında çok az bulunur. Çimlerdeki (Poaceae) ksilanlar çok daha fazla arabinofuranoz (Araf) nispeten daha az GlcA içerir. Araf ksilan omurgasına bağlanmış α -1,2 veya α -1,3 olabilir. Otlardaki süstitüsyonların sıklığı hakkında çok az bilgi olmasına karşın genel olarak süstitüsyonların sıklığı eski dokularda düşüktür (Rennie ve Scheller, 2014).

Yeryüzündeki biyokütlenin en bol bulunan deposu ksilan içeren lignoselülozik sekonder hücre duvarlarıdır. Bu biyokütle büyük ölçekli sıvı biyolojik yakıt üretimi için hammadde olarak çok önemli potansiyele sahip yenilenebilir bir enerji kaynağıdır (York ve Oneill, 2008).

Ksilan lignine kovalent bağı ile bağlıken selülozla kovalent bağı olmayan bir etkileşimi vardır. Ksilanın ana zinciri β -ksilopiranoz kalıntılarında oluşur. Ksilan kara bitkilerin hücre duvarlarında toplam kuru ağırlığının %30-35'ini oluşturan en yaygın hemiselülozik polisakkarittir (Beg vd., 2001).

Ksilan, anjiyospermilerden elde edilen sert ağaçtaki majör hemiselülozken gymnospermilerden elde edilen yumuşak ağaçlarda daha az bulunur ve toplam kuru ağırlığı yaklaşık olarak sırasıyla %15 ile %30 ve %7 ile %12'sini oluşturur (Whistler ve Richards 1970; Wong vd., 1988). Ksilanın ana zinciri β -1,4 bağlantılı β -ksilopiranoz'dan oluşur. Ksilan yapısı içindeki iki bitişik ksiloz kalıntısı arasındaki β -1,4 bağlantıların varlığı ve β -1,4 glikozit bağlarının varlığı (Şekil 1.2)'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2: Ksilan yapısı (Bastawde, 1992).

1.9. Ksilanların Sınıflandırılması

Ksilan, kökenlerine bağlı olarak çeşitli varyasyonlarda bulunabilmektedir, fakat bunların hepsinde ortak bir β -1,4 D-ksilopiranoz omurgası olmalıdır. Ksilanlar;

- Homoksilanlar, bazı deniz yosunlarında yaygın olarak mevcut olan doğrusal polisakkaritlerdir.
- Glukuronoksilanlar pek çoğu asetillenebilir ve α -(1→2)-4-O metil-D-glukopiranosil üronik asit (MeGlcUA) ile ikame edilmiş ünitelere sahip olabilir. Genel olarak sert ağaçta bulunurlar.
- Arabino glukuronoksilanlar, MeGlcUA'nın yanında α -(1→3)-L- arabinofuranosil (ArbF) ile birlikte ikameye sahiptir. Genel olarak yumuşak ağaçlarda bulunurlar.
- Arabinoksilanlar, 2. veya 3. pozisyonunda β -(1→4)-D-ksilopiranoz omurgasının kısmen fenolik asitlerle esterleştirilme yeteneğine sahiptir ve ArbF ile ikame edilmiştir. Bu tür, nişastalı endospermde ve tahılların dış kısmında sıkça bulunur.
- Glukurono arabinoksilanlar ArbF üniteleri ile ikame edebilen, asetilenmiş ve ferulik asit ile esterlenmiş olabilen yapıdır. Bu form otların ve tahılların odunsu dokularında mevcuttur.
- Heteroksilanlar, çeşitli monosakkarit veya oligosakkaritler ile ikame eder ve bu yapı tahıl kepeği, tohum ve zamklarda bulunur (Sedlmeyer, 2011).

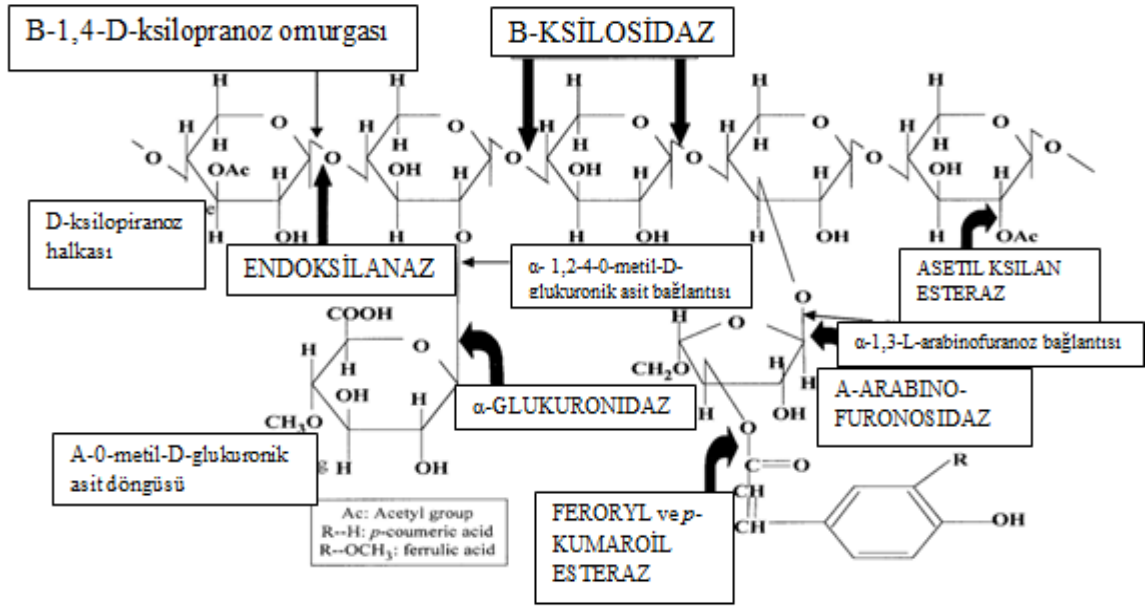
1.10. Ksılanların Uygulama Alanları

- Mısır koçanı veya buğday samanının gıda, eczacılık ve kozmetik ürünlerinde uygulanması için ksilooligasakkaritlere otohrolizinin kullanılması işlemlerinde,
- Karbonhidrat kaynağına ve modifikasyonlarına bağlı olarak nötr veya asidik oligosakkaritler elde edilebilmesinde,
- Ksılanın su emme özelliğinin farmasötik uygulamalarda yardımcı olarak kullanılması işlemlerinde,
- Etanol fraksiyonlarının kullanılmasıyla, arabinoksilooligasakkarit fraksiyonlarının heterojenliğinin azaltılması işlemlerinde ksılanlar kullanılmaktadır.

1.11. Ksılanazlar

Karmaşık bir kimyasal yapıya sahip olan ksılanın yıkımı çeşitli hidrolitik enzimlerinin kullanımını gerektirmektedir. Ksılanın ksiloz birimlerinden oluşan iskeletinin enzimatik hidrolizinde yer alan başlıca enzimler; β -1,4 bağları ile bağlanmış endo-1,4- β ksılanazlar (1,4- β -D-ksilan ksilanohidrolaz) (EC 3.2.1.8) ve β -ksilosidaz (1,4- β -D-ksilan ksilohidrolaz) (EC 3.2.1.37)'dir (Waino ve Ingvorsen, 2003). Bu temel iki enzim haricinde, α -L-arabinofuranosidaz (EC 3.2.1.55), α -glukoronidaz (EC 3.2.1.139), asetil ksilan esteraz (EC 3.2.1.72), ferulik asit esteraz (EC 3.1.1.73) ve *p*-Kumarik asit esteraz (EC 3.1.1.-) enzimleri ise yan zincirlerin hidrolizinde gerekli olan enzimlerdir (Şekil 1.3).

Ksılanazlar, hidrofobik küme analizi ve dizi homolojisine göre F ve G olmak üzere iki aile grubu olarak sınıflandırılabilirler. Bunlardan F ailesine ait olan ksılanazlar G ailesine göre biraz daha büyüktür ve yaklaşık olarak 35 kDa'lık moleküler bir kütleye sahipken G ailesine ait olan ksılanazlar sadece 20 kDa'lık moleküler bir kütleye sahiptir. F ve G aileleri glikozil hidrolazların sayısal sınıflandırmasında 10. ve 11. ailelere karşılık gelir (Krengel ve Dijkstra, 1996).



Şekil 1.3: Ksilanın hidrolizi için gerekli olan enzimler (Beg vd., 2001).

Wong vd. 1988'de ksilanazları fizikokimyasal özelliklerine göre iki gruba sınıflandırmışlardır. Bunlar, molekül ağırlıklı 30 kDa'dan düşük olup bazik olanlar ve molekül ağırlığı 30 kDa'dan yüksek olup asidik olanlardır. Ancak bu sınıflandırmada bazı istisnalar bulunmuştur. Bazı ksilanazların, özellikle fungal ksilanazların, yaklaşık %30'u bu sınıflandırmaya dahil edilemez.

Daha sonra ortaya konulan bir başka sınıflandırma sistemi sadece katalitik alanların primer yapılarının karşılaştırılmasına dayanır ve enzimleri ilgili dizilere sahip olduğu gruplarda gruplandırılır. İlk sınıflandırma selüla ve ksilanazları 6 ailede (A-F) gruplandırıldı. 1999 yılında ise bu 6 aile 77 aileye güncellendi (Collins vd., 2005).

Öte yandan EC.3.2.1.8 enzim sınıflandırma numarası kullanılarak yapılan çalışmalarda 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 ve 62 ailelerinde ksilanaz aktivitesi görülmektedir. Fakat 5, 7, 8, 10, 11 ve 43 ailelerine ait sınıflandırmada endo- β -1,4 ksilanaz aktivitesi gösterdikleri görülmektedir. 16, 52 ve 62 ailelerine ait olan enzimlerin iki farklı katalitik bölgeye sahip oldukları ve bunlardan birinin aile 10 ya da aile 11'e ait olup diğerinin ise glikosidaz katalitik bölgesi olduğu gösterilmektedir. 26. ailede sınıflandırılan enzimler ise endo- β -1,4 ksilanazda aktivite göstermeyip endo- β -1,3-ksilanaz aktivitesi göstermektedirler. Sonuç olarak ksilanazlar sadece 10 ve 11 aileleri olarak sınıflandırılması tamamen doğru değildir. 5, 7, 8 ve 43 ailelerinin de içerilmesi gerekmektedir (Yeğin ve Büyünnilleci, 2015).

Ksilanazların bakteriler, deniz yosunları, mantarlar, omurgasızlar ve bitkilerde var olduğu bildirilmiştir ve bu ksilanazların büyük miktarı mezofilik sıcaklıklarda nötr veya hafif asidik pH içerir (Wainö ve Ingvorsen, 2003). Ekstremofilik ksilanazlardan termofiller, alkalifiller ve asidofiller çok kapsamlı şekilde incelenirken, soğuk adapte edilmiş ksilanazlar daha az araştırma konusu olmuştur (Collins vd., 2005).

Pek çok ticari uygulamalar ve yapılan işlemlerin ekonomik olarak uygulanabilir olabilmesi için ucuz enzimlerin kullanımı daha yüksek seviyelerde enzim ekspresyonunu gerektirir. Bu nedenle biyoteknolojinin büyük gelişim göstermesiyle genetik mühendisliği ksilanazların büyük ölçekli ifade edilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır.

Ksilanaz, bitki hücre duvarındaki selüloz ve lignin yapısıyla birlikte bulunan ksilanın hidrolizini gerçekleştiren enzimlerdir. Bu sebepten dolayı bakteri kaynaklı enzim üretim metodlarında ağaç talaşı, mısır koçanı, fındık koçanı, buğday ve diğer bitkisel atık kaynakları substrat olarak kullanılmaktadır.

Tüm dünyaya büyük ölçüde zarar veren ve bununla birlikte sağlık tehlikesi kaynağı haline gelen tarımsal ve yiyecek atıklarının varlıkları büyük miktarlarda mevcuttur. Düşük maliyetli yüksek verimli enerji üretimi için bu atıkların yakıt üretiminde kullanılması tüm bileşenlerin hidrolizini gerektirmektedir. Ksilan bir bitkinin önemli yapısal polimeridir. Ksilanazlar ve bazı mikroorganizmalar ksilanı hidrolize ederek etanol üretimi amacıyla kullanılmaktadır (Rani ve Nand, 1996).

1.12. Ksilanazların Kullanım Alanları

Ksilanaz enzimi ksilanın β -1,4 bağlarının hidrolizini katalize ederek biyoyakıt üretimi, gıda ve kağıt hamuru gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Son zamanlarda ksilanazlar 2-7 ksiloz birimlerinden oluşan ksilooligosakkaritlerin endüstriyel olarak üretimindeki uygulama potansiyeli oldukça ilgi çekmektedir (Chang vd., 2017). Ksilanaz enzimi; kozmetik, eczacılık ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak önemli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır.

Ksilanaz enzimleri 1980 yıllarında endüstriyel alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde ksilanaz; selüloz ve pektinaz enzimleriyle birlikte dünya enzim pazarının yaklaşık olarak %20'sini oluşturmaktadır (Polizeli vd., 2005).

Termofilik organizmalardan meydana gelen ksilanazlar yüksek sıcaklık ve pH aralıklarında artan çözünürlükleri nedeni ile endüstriyel kullanım için oldukça dikkat çekicidir. Ksilanaz kodlayan mikroorganizmalardan ksilanaz genlerinin klonlanması ve ekspresyonu üretim maliyetinin düşürülmesi için enzim üretiminin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Hareketsizleştirilmiş enzimlerin yapılarının kararlılıkları, düşük duyarlılıkları, aktifliği ve çalışılan reaksiyon karşımından geri kazanılması nedeniyle endüstriyel uygulama alanlarında serbest enzimlere nispeten tercih edilmektedir. Bu sebepten dolayı enzimin tekrar kullanılması gibi bazı optimal özellikler mümkün kılınır (Çakmak ve Sağlam Ertunga, 2016).

Ksilanaz enzimlerinin kullanılmasıyla çeşitli ağartma yararları elde edilebilir. Bunlar:

- Klor gazı kullanımının azalması,
- Yüksek klor dioksit seviyelerindeki değirmenlerde klor gazının ortadan kaldırılması,
- Özellikle çok büyük miktarda peroksit ya da klor dioksit kullanan değirmenlerde ağartma işlemi gören kimyasalların maliyetlerinin azaltılmasıdır (Bajpai, 2014).

Ksilanazlar hamurlama sırasında hamur lifleri üzerinde biriken ksilanları hidrolize eder (Singh vd., 2002). Kanada, Firlendiya, ABD ülkeleri ağartma işlemlerinde sürekli olarak ksilanaz tercih etmektedir. Üreticiler maliyetleri düşürmek ve kağıt hamurunun parlaklığını arttırmak gibi birçok faydadan yararlanmak için ksilanaz kullanır. Ksilanazın geniş ölçüdeki bu çalışmaları için alkalifilik bakteriler ve aktinomisetler kullanılmıştır (Ratanakhanokchai vd., 1999). Enzim kâğıt hamurunu tahriş etmez aksine verimliliği artırır. Ksilanaz işlemi lignin alkaline ekstrete edilebilirliğini artırır, bu da hamurun ağartılması için gereken geleneksel ağartma kimyasal maddelerin kullanımını azaltır. (Tolan ve Popovici, 2002).

Gıda endüstrisinde ksilanaz enzimleri hamurdaki polisakkaritlerin parçalanmasına yardımcı olarak kurabiye, kek, kraker ve diğer gıda maddelerinin pişirilmesini hızlandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Pek çok ticari ksilanaz *Trichoderma*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium* ve *Talaromyces sp.* organizmaları tarafından üretilir (Godfrey ve West, 1996).

Ksilanazlar bazı enzimler ile birlikte ekmek yapımında kullanılabilmektedir. Ksilanazların temel fonksiyonu, buğdayda bulunan hemiselülozun su ile birlikte ekstrakte edilerek arabinoksilana ayrışmasını sağlamasıdır. Bu olay sonucunda hamur oluşumunda doğru yumuşaklık, uzayabilirlik, ekmek hacminde artış ve bununla birlikte suyun daha fazla emilmesi ile fermentasyona karşı daha fazla direnç oluşumu meydana gelir. Ayrıca ekmek içerisindeki çok miktarda bulunan arabinoksilo oligosakkaritler sağlık açısından yararlı olabilmektedir (Bajpai, 2014).

Selüloz, amilaz ve pektinaz enzimleriyle birlikte ksilanazlar, meyve ve sebzelerin sıvılaştırılması yolu ile meyve suyu üretiminde kullanılır. Ksilanaz aynı zamanda kahve çekirdeği zamlarında da kullanılır. Gıda endüstrisinde ksilanazların kullanımı için istenilen özellikler, asidik pH'da yüksek kararlılık ve optimum aktivitedir. Moleküler biyoloji tekniklerinde gelişen büyük ilerlemeler ile ksilanaz enzimlerinin diğer endüstriyel alanlarda kullanımlarına her geçen gün bir yenisi eklenmektedir (Bajpai, 2014).

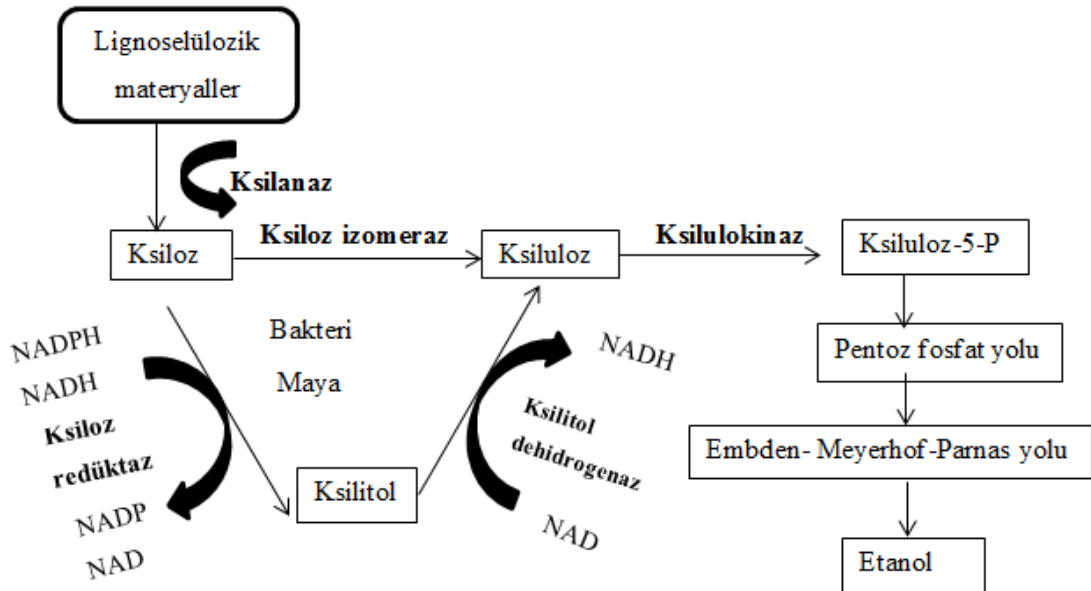
β -D-glukopiranosidaz, şarap ve meyve suyu üretimi için gıda endüstrisinde kullanılmıştır (Spagna vd., 1998). Ksilan, ksiloz ve oligosakkaritlerin hidroliz ürünleri gıda endüstrisinde pek çok uygulama alanlarına sahiptir. Bunlar koyulaştırıcılar, yağ, antifriz ve gıda katkı maddeleridir.

Hayvan yemi üretimi aşamasında enzimlerin üretimi yıllık olarak 600 milyon tonu geçmektedir ve bununla birlikte cirosu 50 milyar dolardır. Ksilanazlar hayvan yemi üretiminde glukonazlar, pektinazlar, selülozlar, proteazlar, amilazlar, fitaz, galaktosidaz ve lipazlarla birlikte kullanılır. Bu enzimler ham maddenin viskozitesini minimum seviyeye indirerek yem içeriğindeki arabinoksilanları parçalamaktadır (Polizeli vd., 2005). Ksilanazların ticari sektörlerdeki uygulamaları genişlediğinden ötürü enzimin etkin ve etkili şekilde kullanımı için doğasının ve özelliklerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

Tekstil endüstrisinde ksilanazların kullanımı çevre dostu tekstil ıslak işlemenin ve nihai ürün kalitesinin iyileştirilme stratejilerinin geliştirilmesini sağlayan endüstriyel biyoteknolojinin bir örneğidir. Enerji ve hammadde tüketimi ve kimyasalların toprağa, suya veya havaya salınmasına ilişkin kimyasalların kullanımı ile ilgili çevresel kaygıların artmasından dolayı tekstilin kimyasal işlemesi sırasında enzimlerin uygulanması çok gereklidir (El Aty vd., 2018). Ksilanaz kompleksi tekstil endüstrisinde kendir veya keten gibi bitki liflerini işlemek için kullanılabilir (Polizeli vd., 2005).

Ksilan yapısında bol miktarda hemiselüloz bulundurur. Bu nedenle etanol üretimi sağlayan bakteriler tarafından gerçekleştirilen fermentasyon işlemi için ksilanın ksiloz ve arabinoz gibi bileşen şekerlere ayrılmasının sağlanması (Şekil 1.4) biyoyakıt üretimi için bitki biyokütlesinin verimli bir şekilde kullanılması büyük öneme sahiptir (Dodd ve Cann, 2009).

Biyoteknolojideki büyük gelişmeler sayesinde ksilanazların bitki hücresi protoplastı, sebzelerin sertliğinin giderilmesi, kahve üretimi, yeraltı madenlerinden yağların geri kazanımı, pigmentlerin ve bitki yağlarının çıkarılması, biyoyakıt üretilmesi gibi çok geniş uygulamalarda kullanılmıştır (Juturu ve Wu, 2012).



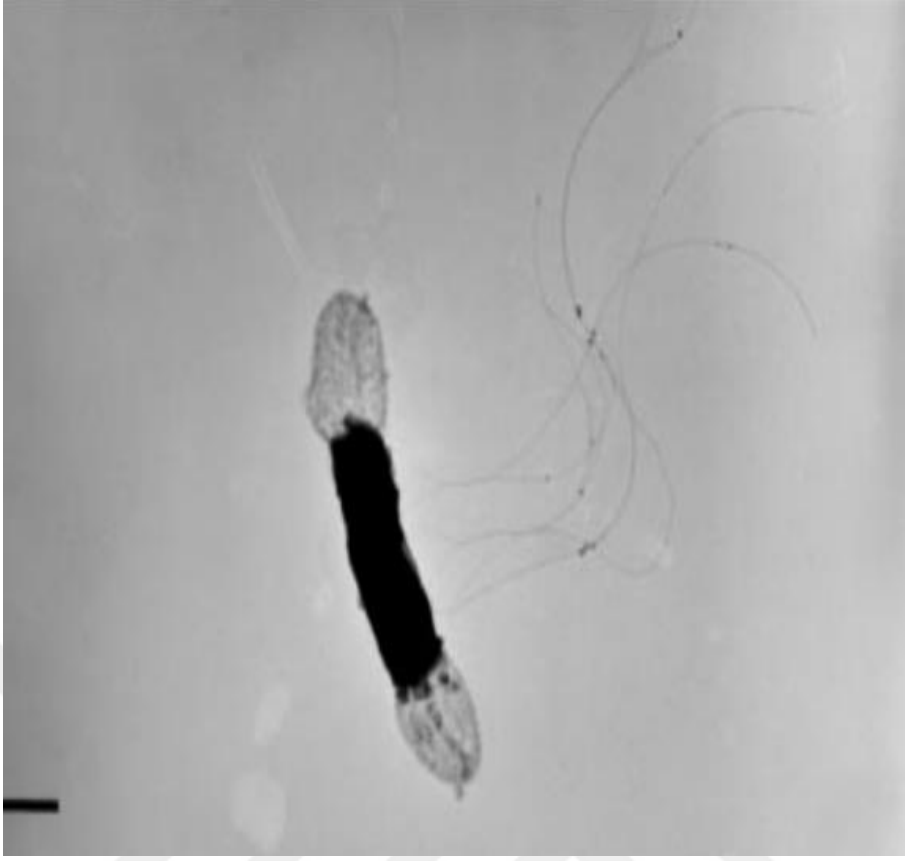
Şekil 1.4: Lignoselülozik malzemelerden bakteri ve mayalar tarafından ksilanaz kullanılarak etanol üretimi (Polizeli vd., 2005).

1.13. *Thermotoga naphthophila*

Thermotoga naphthophila bakterisi Japonya’da yeraltı rezervlerinden elde edilen anaerobik, hipertermofilik gram-negatif bir bakteri türüdür. Bakterinin büyümesi için uygun sıcaklık 48-86°C aralığındadır. Bakterinin büyümesi için optimum pH ise 5.4-9.0 aralığıdır. Ancak en iyi aktiviteyi pH 7.0’de göstermektedir.

Thermotoga naphthophila organizmasının beslenme gereksinimlerini karşılayabilmesi için maya özütü, pepton, glikoz, galaktoz, früktoz, mannitol, riboz, arabinoz, süktroz, laktoz, maltoz ve nişasta gerekmektedir. Takahata vd. (2001) yaptıkları çalışmada, *Thermotoga naphthophila*’nın *Thermotoga petrophila* organizması ile karşılaştırıldığında benzersiz olduğu sonucuna varılmıştır. *T. naphthophila* organizması aynı zamanda tiyosülfatı hidrojen sülfüre daha düşük bir oranda indirgeyebilmektedir. Bakterilerin büyüme hızları ve hücresel verimleri tiyosülfat varlığında hiçbir etki göstermemektedir (Takahata vd., 2001). *Thermotoga* türleri genel olarak ksilanaz, ksilosidaz, amilaz, fitaz, mannosidaz, selüloz ve galaktosidaz gibi birçok hidrolaz sergileyebilmektedir.

T. maritima ve *T. neapolitana* ksiloz üzerinde büyüme gösterirken *T. naphthophila* bakterisi ksiloz üzerinde bir büyüme gösterememektedir. *T. naphthophila* ksilozun parçalanması olayına katılan bütün genleri içermektedir. Fakat bu bakteri ksiloz için gerekli olan spesifik şeker taşıyıcılarını içermemektedir. Bu nedenle bu organizmadan ksiloz bozucu genlerin klonlanması cazip hale gelecektir (Fatima vd., 2016). *Thermotoga naphthophila* organizmasının mikroskopik görüntüsü (Şekil 1.5)’de verilmiştir.



Şekil 1.5: *Thermotoga naphthophila* bakterisinin elektron mikroskobu görüntüsü (Takahaka vd., 2001).

1.14. Biyokütle ve Biyoyakıt

Biyokütle bitkilerden ve hayvanlardan elde edilen organik maddeye verilen isimdir. Biyokütle dünyanın dördüncü birincil enerji kaynağıdır (Güney, 2013). Biyokütle enerji talebini karşılamak için mükemmel bir alternatif kaynağı olan en iyi adaylardan biridir. Biyokütlenin elektrik, ısı veya bir güç üretimi üretebilmek için yakıt olarak kullanılması bilimsel ve teknolojik araştırmaların odak noktası olmuştur. Güney (2013)'ün bulgularına göre biyokütle büyük bir oranla azot oksit (NO) yaymadan yakılabilir. Bununla birlikte biyokütle emisyonunun kükürt içeriği oranı çok azdır. Biyokütle kaynakları kendi içerisinde iki gruba ayrılır.

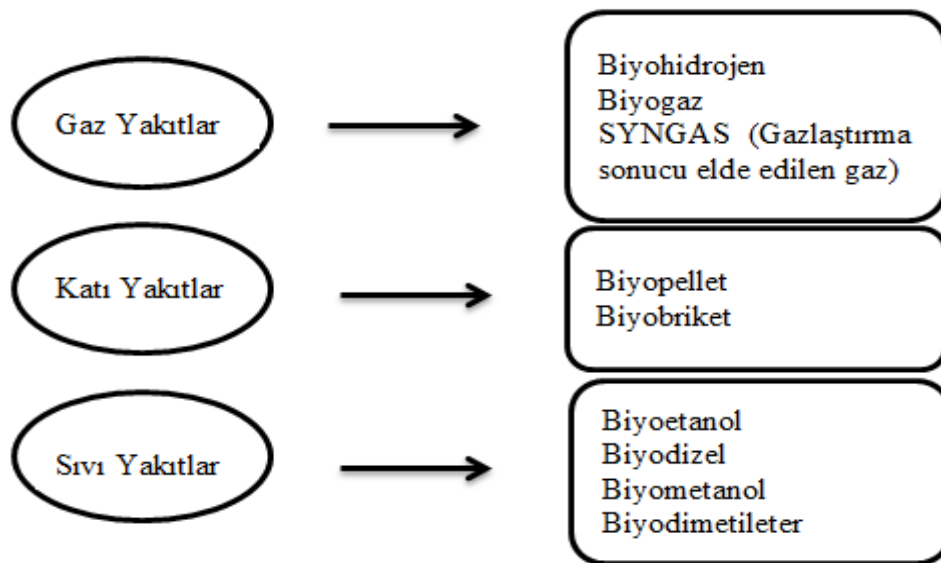
Klasik biyokütle kaynakları; genel olarak odun, hayvansal ve bitkisel atıklardır. Bu kaynaklar yakacak olarak kullanılmaktadır.

Modern biyokütle kaynakları; orman ve ağaç endüstrisi atıkları, tarım kesimindeki bitkisel ve hayvansal atıklar, kentsel atıklardır. Bu kaynaklar sonucunda meydana gelen enerjiye biyokütle enerjisi denir.

Enerji kullanımını yüksek boyutlara ulaştığı günümüzde petrol kaynaklarının zamanla azalacağı tahmin edilmektedir. Bununla birlikte fosil yakıtların kullanılması küresel ısınmaya, iklim değişikliğine, asit yağmurlarına ve hava kirliliğine neden olan sera gazı üretmektedir (Lam ve Lee, 2015). Bu etkileri en az seviyeye getirebilmek için sera gazı emisyonları 1990'daki küresel emisyon düzeylerinin yarısından daha azına indirilmelidir (Patel, 2017). Dünyadaki enerji tüketimi hızla artmaya devam ederken ham petrol üretimi azalmakta olup 2050 yılında 5 milyar varile yol açacağı tahmin edilmektedir (Khalil vd., 2015).

Her tür biyokütleden üretilen yakıtlar ise biyoyakıt olarak adlandırılır. En çok başarılı ve en çok kullanılan biyoyakıtlar biyoetanol, biyodizel ve biyogazdır (Saravanan vd., 2018). Swain vd. (2019)'un bulgularına göre biyoyakıtların biyokütle kaynaklarından üretilme amaçları gelecekte sürdürülebilir ve yenilenebilir bir kaynak olması, karbon salınımı ile sonuçlanmayan pozitif çevresel etkiye sahip olması ve fosil yakıt fiyatlarının ilerleyen zamanlarda artması sonucunda önemli bir ekonomik potansiyele sahip olmasıdır.

Biyoyakıtlar temel olarak 3 grupta sınıflandırılabilir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6: Biyoyakıtların fiziksel özelliklerine göre gruplandırılması (Mançuhan, 2006).

1.15. Biyoetanol

Etanol, alkol olarak adlandırılan organik bileşik sınıfının en önemli üyesidir. Moleküler formülü (C_2H_5OH)'dır. Doymuş bir hidrokarbon olan etanın (C_2H_6) altı hidrojeninden birinin yerine bir hidroksil grubu (OH) geçmiş şeklidir. Etanol $78,5^{\circ}C$ 'de kaynar ve $-115^{\circ}C$ 'de donar. Biyoetanolün fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri (Tablo 1.2) ve (Tablo 1.3)'de verilmiştir.

Tablo 1.2: Biyoetanolün fiziksel özellikleri (Aydoğan ve Acaroğlu, 2004).

Fiziksel Özellikler		
Özgül Ağırlık	Kg/m^3	0,79
Buhar Basıncı ($38^{\circ}C$)	mmHg	50
Buharlaşma Isısı	kJ/kg	842-930
Kaynama Sıcaklığı	$^{\circ}C$ ($^{\circ}F$)	78,3 (172-173)
Suda Çözünme		%100
Viskozite	Mm^2/sn	1,19

Tablo 1.3: Biyoetanolün kimyasal ve termal özellikleri (Aydoğan ve Acaroğlu, 2004).

Kimyasal Özellikler		
Formül		C_2H_5OH
Moleküler Ağırlık g/mol		46,1
Karbon Oranı %		52,1
Hidrojen Oranı %		13,1
Oksijen Oranı %		34,7
C/H Varlığı		4

Termal Özellikleri		
Alt Isıl Değeri	kJ/kg	27000
Özgül Isı	$kcal/kg$ $^{\circ}C$	0,6
Donma Noktası	$^{\circ}C$	-115
Yanabilirlik Limitleri	%hacim	3,3-19,0

Türkiyede biyoetanolün zorunlu olarak kullanımı ve buna bağlı olarak büyük bir üretimi yapılmamıştır. Mohanty ve Swain (2019)’a göre ABD ve Brezilya’da mısır, buğday, şeker gibi nişasta kaynaklı ürünlerden sırasıyla yıllık olarak yaklaşık 57,7 ve 27,6 milyon litre biyoetanol elde edilmektedir. Biyoetanol üretiminde birinci, ikinci ve üçüncü nesillerden çeşitli ürünler kullanılmıştır. Dünyada biyoetanol üretim miktarları her yıl artış göstermektedir (Tablo 1.4).

Tablo 1.4: Dünya biyoetanol üretim miktarları (milyar litre) (RFA, 2021).

	2016	2017	2018	2019
Amerika	58.03	59.80	60.90	59.73
Brezilya	27.63	26.72	30.32	32.44
AB	5.22	5.37	5.41	5.45
Çin	3.21	3.33	3.97	3.40
Kanada	1.66	1.70	1.81	1.89
Dünya Toplam	100.6	102.3	107.5	109.8

Dünyada yakıt olarak üretilen biyoetanol çoğunlukla nişasta (mısır, pirinç, buğday, patates, manyok, arpa vb.) ve sakkaroz (şeker kamışı, şeker pancarı ve tatlı sorgum) kaynaklıdır ve bunlar birinci nesil biyoetanol olarak bilinir. Birinci nesil biyoetanol potansiyel enerji üretme kapasitesine sahiptir. Nişastalı biyokütle bir besin kaynağı olduğu için nişastanın tarımsal üretimi yakıt üretimi seviyesine göre çok düşüktür bununla birlikte tropikal ormanların imhası nedeniyle çok tercih edilmemektedir (Hoşgün vd., 2017; Derman vd., 2018). Bu sıkıntıların üstesinden gelmek için lignoselülozik atıklar ikinci nesil biyoetanol üretimi amacıyla kullanılmaktadır.

Odun, bitki, tarım endüstrisi gibi lignoselülozik biyokütle dünyada bol miktarda bulunan yenilenebilir bir kaynaktır ve bu biyokütlelerin üretimi için daha az tarımsal çalışma gerekmektedir (Hoşgün vd., 2017). İkinci nesil biyokütle besin zincirinde hiçbir şekilde etkisi olmayan hammaddelerle yani odunsu biyokütleler ile yapılır. Bu nedenle ikinci nesil biyoetanol üretimi oldukça yüksek potansiyele sahiptir. Üçüncü nesil ise alglerden elde edilen biyoetanol üretimini kapsamaktadır.

Türkiye’de biyoetanol sektöründe araçlarda yakıt olarak kullanılabilecek susuz biyoetanol üretilen üç adet tesis bulunmaktadır. Bunlar, Tarımsal Kimya Teknolojileri (TARKİM) Sanayi ve Ticaret A.Ş., Tez kim Tarımsal Kimya (TEZKİM) İnşaat Sanayi ve Ticaret A.Ş. ve Konya Şeker Sanayi ve Ticaret A.Ş’dir. Bu firmaların hem üretim hem de dağıtım

yetkileri bulunmakla birlikte güncel yıllık üretim kapasiteleri yaklaşık 152 milyon litredir. Türkiye’de biyoetanol üretim ve tüketim miktarı her yıl artış gösterirken ihracat miktarında azalma olmuştur (Tablo 1.5).

Tablo 1.5: Türkiye biyoetanol üretim, tüketim, ihracat miktarları (milyon litre) (Akalin ve Seyrekbasan, 2015).

	2011	2012	2013	2014
Üretim	52,3	63,2	63	64,9
Tüketim	11,0	11,2	54,7	61,2
İhracat	29,6	33,4	6	2,6

1.16. *Rhododendron* (Ormangülü)

Ormangülü fundagiller (Ericaceae) familyasında *Rhododendron* cinsi içerisinde yer alan Karadeniz ormanlarının batısından doğusuna kadar çoğalan çok değişik çiçek ve yaprak yapılarına sahip olan bir türdür. Dünyada oldukça geniş bir yayılıma sahip olan ormangülü türlerinden bazıları Türkiye’de özellikle Karadeniz bölgesinin doğusunda yaygındır (Özbucak vd., 2009).

Ormangülleri türleri genellikle yüksek yağış, yüksek nem, ılıman iklim bölgesi ve asidik toprakta büyümeyi tercih eder. Ormangüllerinin birkaç santimetre uzunluğundan başlayarak 30 metrelik ağaçlara kadar uzanan çok çeşitli formları vardır. Genellikle bir tür içinde bile form ve çiçek renginde büyük değişiklikler olabilme ihtimali vardır (Gibbs vd., 2011).

Karadeniz bölgesi haricinde ormangüllerinin *R. poncicum* ve *R. luteum* türleri Marmara bölgesinde Sakarya ve Kocaeli’de çoğunlukla bulunmakla birlikte küçük popülasyonlar halinde Bursa, İstanbul, Kırklareli ve Yalova’da tespit edilmiştir. Ayrıca Çanakkale’de Kazdağlarının güney eteklerinin iki farklı noktasında *R.luteum* türü keşfedilmiştir (Altun vd., 2016). *Rhododendron* Türkiye orman topraklarının baskın bir türüdür. *Rhododendron* ağaç büyümesini azaltır, hedef ağaç türlerin yenilenmesini önleyerek Türkiye’nin Karadeniz bölgesinin zengin orman türlerini azaltır (Akgül ve Çamlıbel, 2008). Ormangülü %43,25 selüloz, %30,87 hemiselüloz ve %19,16 lignin içermektedir (Kara, 2012).

Dünya çapında geniş bir dağılıma sahip olan ve 1000'den fazla tür içeren ormangüllerinin 300'den fazla türü Çin-Himalaya Dağları'nda ve güneybatı Çin'deki Sikkim'de bulunur. Büyük, geniş yapraklı ve yaprak dökmeyen ormangülleri, Kuzey Amerika ve İskandinavya'da yaşayan 'süper dayanıklı' yani donmaya karşı toleranslı türleri oldukça önemlidir (Wang, 2009). *Rhododendron* türleri genel olarak çeşitli şekillerde görülür. Bunlar, yuvarlak, mızrak ve eliptik şekilleridir. Çiçekleri ise beyaz, kırmızı, pembe, sarı, mavi, mor ve turuncu tonlarındadır ya da bu renklerinin karışımlarında da olabilir.

1.17. Fındık Kabuğu

Ülkemizde yetiştiriciliği çok eski zamanlara dayanan fındık, en uygun yetiştirme ortamını Karadeniz bölgesinde bulmuştur. Fındık kabukları %43,1 lignin, %27,5 hemiselüloz, %24,7 selüloz, %3,4 alkol-benzen ekstraktları ve %1,4 oranında külden oluşmaktadır (Arslan ve Saraçoğlu, 2010). Fındık kabuğu endüstriyel olarak kullanılmayan yenilenebilir bir doğal kaynaktır. Ülkemizde yıllık 600.000 tonluk fındık üretiminin yapıldığı ve bunun yaklaşık olarak %50'sinin kabuk olduğunu düşünürsek yıllık olarak 300.000 ton fındık kabuğu açığa çıkmaktadır. Fındık kabuğu Türkiye'nin en önemli tarım ve ticaret malzemesi olduğundan ötürü biyoetanol üretimi için çok önemli bir biyokütledir. Orman endüstrisinde fındık kabuklarının kullanımı hakkında sınırlı çalışmalar bulunmaktadır.

Karadeniz bölgesindeki bahçe bitkisi atıklarının toplam ısı miktarı yaklaşık olarak 36,1 PJ'dür. Bu artıklardan en büyük payı ise %98,3 oranında fındık almaktadır. Dünyadaki fındık üretimi kapasitesinin yaklaşık %70'nin kaynağı Türkiye'dir. Türkiye'de yıllık üretilen fındık miktarı yaklaşık olarak 250.000 tonun üzerindedir (Midilli vd., 2000). Fındık kabuğunun asetik asit, metanol, amonyak, furfural ve hidrojen gibi kimyasallara dönüşümü araştırılmıştır (Arslan ve Saraçoğlu, 2010).

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Ksilanaz Enzimi İle İlgili Çalışmalar

Shi vd. (2013), *Thermotoga thermarum* organizmasından 3474 bp uzunluğuna sahip bir ksilanaz geni (Xyn10A) klonlamışlardır. Amino asit dizi homolojisi, hidrofobik küme ve üç boyutlu yapı analizi incelendiğinde ksilanazın 5 karbonhidrat bağlama bölgesi bulunduğu ve glikozid hidrolaz GH 10 ailelerine ait olduğunu kabul etmişlerdir. Ksilanaz optimum bir şekilde 95°C’de pH 7.0’da aktiflik göstermiştir. Buna ilaveten ksilanaz, 5 mM Ca^{2+} ilavesiyle pH 4.0-8.5 aralığında ve sıcaklık 55-90°C’nin üzerinde yüksek termal kararlılık göstermiştir. İyon Kromatografi Sistemi (ICS) analizi yapılarak ksilanın hidrolizi sonucunda oluşan son ürünlerin ksiloz, ksilobiyoz, ksilotrioz, ksilotetroz, ksilopentoz ve ksiloheksöz olduğu onaylanmıştır.

Lapidot vd. (1996), *Bacillus stearothermophilus* T-6’dan ksilanazı üretmişlerdir. Ksilanazın etkinliğini pH 9.0 ve sıcaklık 65°C’de bulmuşlardır. Proteinin X- ışını analizi ve protein mühendisliği ile karakterizasyon işlemlerini kolaylaştırmak için, *Escherichia coli*’de enzimin daha fazla ifade edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ksilanaz genini T-7 polimeraz ekspresyon vektörlerine klonlamıştır ve ekspresyonu yapılmıştır. Enzimin hücre proteinin %70’inden fazlasını oluşturduğunu bulmuşlardır. Bir kültürde 2 g’ın üzerinde aktif bir enzim elde etmişlerdir.

Sharma ve Chand (2012), *Pseudomonas* sp. XPB-6’dan elde edilen ksilanaz, amonyum sülfat çökeltme ve DEAE iyon değişim kromatografisiyle saflaştırarak %60,31 oranında verim elde etmişlerdir. Protein 41 kDa’lık üç alt birimden oluşarak toplamda 123 kDa moleküler ağırlığında bulmuşlardır. Enzim için optimum pH 7.5 ve sıcaklık 60-75°C bulmuşlardır. *Pseudomonas* sp. XPB-6 hem oda sıcaklığında hem de 4°C’de çalışılmıştır. Enzim oda sıcaklığında 90 gün, 4°C’de 28 gün boyunca aktif kalmıştır. Enzimin yarı ömrünün oda sıcaklığında yaklaşık olarak 40 gün olduğu bildirilmiştir.

Mondou vd. (1986), *Streptomyces lividans*’dan elde edilen ksilanaz geni, *Streptomyces lividans*’ın çoklu kopya plazmidi pIJ702 kullanılarak ksilanaz-negatif ve β -1,4 glukan glukanohidrolaz-negatif çift mutantının tamamlanmasıyla klonlamışlardır. Klonların 2 kb

DNA fragmanına sahip oldukları restriksiyon haritalanması ve Southern hibridizasyonu ile belirlenmiştir. Enzim seviyesi 380 IU/ml olarak elde etmişlerdir.

Blanco vd. (1997), ksilanaz ve selüloz aktivitelerini incelemişlerdir. İki farklı β -1,4 ksilanaz kodlayan genler *Thermomonospora alba* ULJB1'den klonlamışlardır. Bunlardan biri olan xylA, *Streptomyces lividans*'a dizilemesi, alt klonlaması ve ekspresyonu yapılmıştır. 48456 Da'lık moleküler kütleyle sahip olduğu ve bunun 482 amino asitlik bir proteini kodladığı bildirilmiştir. Ksilanazın ana bozulma ürünün ksilobiyoza olduğu bildirilmiştir. Ksilanaz'ın 95°C'de aktif olduğu ve pH 4.0-10.0 aralığında kararlı olduğu gösterilmiştir.

Guo vd. (2009), bir ksilanaz geni olan XynA'yı deniz bakterisi olan *Glaciecola mesophila* KMM 241'den klonlamışlardır. XynA geninin 1,272 bp içerdiği ve 423 amino asit bir proteini kodladığı bildirilmiştir. *Escherichia coli* B21'de eksprese edilen XynA ksilanazın 43 kDa'lık moleküler kütleyle sahip olduğu söylenmiştir. XynA ksilanazı için optimum sıcaklık 30°C ve pH 7.0'dir. XynA 4°C'de %23 aktivite gösterirken 30°C'de %20 aktivite göstermiştir. Bu sonuca göre XynA'nın soğuk aktif bir ksilanaz olduğu bildirilmiştir. XynA 0,5 M NaCl'de en yüksek aktiviteye sahipken 2,5 M NaCl'de %90 aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bunun sonucu olarak XynA'nın tuza toleranslı ilk ksilanaz olduğu söylenmiştir.

Crous vd. (1995), XynC ksilanaz genini *Aspergillus kawachii* IFO4308'den izole etmişlerdir. Bu gen maya fosfogliserat kinaz, gen promotörü ve sonlandırıcı sekanslarının arasına yerleştirilmiştir. Oluşan bu yapıya Xyn3 denilmiştir. Xyn3 geni çoklu kopya epizomal plazmidine klonlamışlardır. Bu gen *Saccharomyces cerevisiae*'de eksprese edilmiştir. Xyn3'ün 30-50°C de kararlı olduğunu optimum sıcaklığın 60°C'de ve pH'nın 3'ten düşük olduğunu göstermişlerdir.

Decelle vd. (2004), üç tane endo-1,4- β -ksilanaz genlerini *Phanerochaete chrysosporium*'dan klonlamışlardır ve *Aspergillus niger*'de eksprese edilmiştir. Bu genlerden ikisi XynA ve XynC aile 10'daki glikozid hidrolazları kodlarken üçüncü gen olan XynB aile 11 glikozid hidrolazını kodladığı söylenmiştir. Üç ksilanaz zayıf anyon veya Avicell kolon kromatografisiyle saflaştırıldıktan sonra karakterize edilmiştir. XynA, XynB, XynC enzimlerinin sırasıyla 52, 30 ve 50 kDa moleküler kütleyle sahip olduğu

bildirilmiştir. XynA ve XynC 70°C sıcaklıkta pH 4.5'te optimum aktivite gösterirken XynB ise 60°C'de pH 4.5'da optimum aktivite gösterdiği söylenmiştir. Substrat özgüllük çalışmaları ve ksilanın bozunması sırasında meydana gelen bozunma ürünlerinin iki aile arasındaki katalitik özelliklerinden dolayı farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Padilla-Hurtado vd. (2012), *Hypothenemus hampei* organizmasından elde edilen ksilanaz'ın DNA dizisi cDNA kütüphanesinde genom yürütme tekniği kullanılarak elde etmişlerdir. Rekombinant bir protein olan XIP-I geni buğdaydan çoğaltılmıştır. Bu gen ksilanazın inhibitörüdür. Rekombinant enzim oluşumu için *Pichia pastoris* ekspresyon sistemini kullanmışlardır. Ksilanazın aktivitesi ve XIP-I inhibe edici aktivitesi 3,5-dinitrosalisilik (DNS) ile ölçülmüştür. Ksilanaz pH 5.5 ve sıcaklık 37°C'de en yüksek aktivite göstermiştir. Ksilanazın 34.92 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olduğu ve 31.9 amino asitlik bir proteini kodladığı bildirilmiştir. XIP-I, in vitro ksilanaz aktivitesini inhibe etmiştir ve *Hypothenemus hampei*'nin mortalitesine neden olmuştur.

Ruanglek vd. (2007), *Aspergillus niger* BCC14405 organizmasından elde edilen ksilanaz geni (XyIB) *Pichia pastoris*'te 21 kDa olarak klonlamışlardır. Rekombinant ksilanazın aktivitesi 55°C sıcaklığında en iyi aktivite gösterdiği pH aralığı 3.6-6.5 arasında olduğu bildirilmiştir. Ticari bir enzim ile karşılaştırdıklarında rekombinant enzimin sindirilebilirlik hızları yüksek çıkmıştır. Bugüne kadar *Pichia pastoris*'te en yüksek ksilanaz aktivitesi olduğunu bildirmişleridir. Bununla birlikte rekombinat ksilanaz enziminin hayvanlar için yem katkı maddesi olarak etkili bir şekilde üretilip kullanılabilirliğini vurgulamışlardır.

Zhang vd. (2010), *Paecilomyces thermophila*'dan ksilanaz geni cDNA kütüphanesi yapılarak izole edilmiştir. Ksilanaz geni *Escherichia coli* BL21'e eksprese edilmiştir ve rekombinant ksilanaz Ni-NTA ve Sephadex G50 ile saflaştırılmıştır. XynA 681 bç'den oluşmuştur ve 226 amino asidi kodlayabilmektedir. XynA'nın maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 75°C ve en yüksek aktivite gösterdiği pH 7.0'dir. Bu çalışma ile *Paecilomyces thermophila*'dan klonlanan ilk fonksiyel gen ksilanaz olmuştur. Enzimin transglukosilasyon yoluyla ksilotrioz'u ksilobiyoza hidrolize edebildiği bildirilmiştir. XynA termal olarak kararlı bir enzim olduğu için çeşitli endüstrilerde büyük bir potansiyele sahip olduğu söylenmiştir.

Dholpuria vd. (2014), ksilanaz enzimlerini *Bacillus sp.* AP4 suşundan üretmişlerdir. Bakteri suşlarının karbon ve azot kaynaklarında daha iyi verim verebilmesi için Kongo kırmızısı boyaması ve ardından gram boyaması ile taranarak optimize edilmiştir. Enzim, amonyum sülfat çöktürme ve iyon değiştirme kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH aralığı 9-11 arasındayken en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 40°C olduğu bildirilmiştir. Ca ve Zn gibi metal iyonlarının varlığı enzimin aktivitesini arttırırken, Pb, Hg ve Mn gibi metal iyonlarının varlığı enzim aktivitesini çok güçlü bir şekilde düşürdüğü bildirilmiştir.

Lüthi vd. (1990), termofilik bir bakteri olan *Caldocellum saccharotiticum*'dan ksilanaz geni (XynA) üretilmiştir. Ksilanaz *Escherichia coli* pJLA602 ekspresyon vektörüne klonlanarak eksprese edilmiştir. Hücrelerin 42°C'de yetiştirilmesi 55 kata kadar induksiyon eldesi sağlamıştır ve böylece ksilanaz hücre protein içeriğinin %20 sini oluşturmuştur. Ksilanaz en iyi aktiviteyi 70°C sıcaklığında ve pH 5.5-6.0 arasında göstermiştir. Ksilanazın 60°C'de inkübasyonunda en az 72 saat kararlı olduğu ve yarı ömürlerinin 70°C'de 8-9 saat, 80°C'de 2-3 dakika olduğu bildirilmiştir. Ksilanaz enziminin ksilan ve orto-nitrofenil-β-D-ksilopiranosit üzerinde yüksek bir aktiviteye sahipken karboksimetil selüloz ve para-nitrofenil-β-D-sellobiyozit üzerinde yüksek olmayan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Latif vd. (2006), *Chaetomium thermophile* NIBGE tarafından ksilanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Ksilanaz, amonyum sülfat çöktürme, FPLC ile anyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyonu ile saflaştırılmıştır. Ksilanaz BIII'nin moleküler kütlelerinin 50 kDa olduğu ve en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 70°C iken en iyi aktivite gösterdiği pH 6.5 olduğu bildirilmiştir. Bazı metal iyonlarının ve EDTA'nın düşük konsantrasyonlardaki varlığının biraz inhibisyona neden olduğu vurgulanmıştır. 2 mM üzerindeki konsantrasyonlarda ise yüksek inhibisyon gözlemlenmiştir. Ticari kağıt hamuru numunelerinden indirgeyici şekerlerin serbest bırakılması uygulamasında bu ksilanazın kullanılabileceği bildirilmiştir.

Hachem vd. (2000), termal olarak kararlı bir organizma olan *Rhodothermus marinus*'tan elde edilen ksilanazın (Xyn10A) iki N-terminal karbonhidrat bağlayıcı molölü (CBM4-1 ve CBM4-2) *Escherichia coli*'de üretimi yapılmış ve afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Çözünmeyen substratlara olan bağlanma Na⁺ ve Ca²⁺ iyonlarının

mevcudiyeti sayesinde önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Çözünür polisakkaritlere bağlanma afiniteleri afinite elektroforezi ile belirlenmiştir. CBM4-2 hem çözünür hem çözünmez substratlar için CBN4-1'den daha yüksek bir bağlanma afinitesi sergilemiştir. Kısa oligosakkaritlere bağlanma NMR ile ölçülmüştür ve her iki modülün de benzer afinitelerle bağlandığı sonucuna varılmıştır. Bağlanma modülleri Xyn10A ile inkübe edildiğinde ksilan hidrolizi üzerinde bir etkisi olduğu gözlemlenmemiştir.

Li vd. (2008), turpan havzasında bulunan *Streptomyces* sp. S9 organizmasından ksilanaz genini (XynAS9) izole etmişlerdir. Genin uzunluğu 1,395 baz çiftinden oluşmaktadır ve 465 amino asidi kodlamaktadır. Amino asit sekansının *Streptomyces avermitilis* organizmasından elde edilen endo 1,4- β - ksilanaz ile yüksek özdeşliğe sahip olduğu vurgulanmıştır. Ksilanazı kodlayan gen *Escherichia coli* BL21'de eksprese edilmiştir. Protein homojen olarak saflaştırılıp karakterize edilmiştir. Ksilanaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C iken en iyi aktivite gösterdiği pH 6.5 olduğu belirtilmiştir. Ayrıca ksilanaz enzimi 50-80°C aralığında deneye tabi tutulmuştur ve sonuç olarak enzim aktivitesini çok büyük oranda koruyarak yüksek sıcaklık uygulanabilir özellikte olduğunu göstermiştir. Ksilanın hidroliz ürünlerinin ksiloz ve ksilobiyoz olduğu belirtilerek XynAS9'un çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir olduğu vurgulanmıştır.

Verma ve Satyanarayana (2012), ksilanaz geni (Xyl-gt) termofilik bir bakteri olan *Geobacillus thermoleovorans*'tan klonlanmıştır. Ksilanaz geni 408 amino asit kodlayabilmektedir. Ksilanaz geni *Escherichia coli* BL2'de eksprese edilmiştir. Ksilanazın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık ve pH aralığı sırasıyla 80°C ve 8.5'tir. Ksilanın hidrolizi sonucu ortaya çıkan ürünlerin ksilobiyoz, ksilotrioz, ksilotetroz ve ksilopentoz olduğu belirtilmiştir. *Geobacillus thermoleovorans* organizmasından elde edilen ksilanaz termoalkali kararlılığını ortaya çıkaran nadir ksilanazlardan biri olduğu bildirilmektedir ve bu nedenle kağıt hamurlarının ön arıtılması işlemlerinde kullanılması için çok iyi bir aday olduğu belirtilmektedir.

Chantasingh vd. (2006), *Aspergillus terreus* BCC129 organizmasından glikozil hidrolaz 10 ailesinde yer alan ksilanaz geni klonlanıp dizilemesi yapılmıştır. Ksilanaz 326 amino asidi kodlamaktadır. *Pichia pastoris* organizmasında ekspresyon yapılmıştır. Ksilanaz enziminin saflaştırılması ise jel filtrasyon kromatografisi ile yapılmıştır. Saflaştırılmış enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 40°C iken pH kararlılığı 4-10 arasında olduğu

bildirilmiştir. Enzimin 50°C’de 30 dakika inkübasyonundan sonra ise aktivitesini %90 oranda koruduğu söylenmiştir. Böylece ksilanaz enziminin hayvan yemi, kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinde çok iyi bir şekilde kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Wang vd. (2007), *Streptomyces olivaceoviridis* A1 organizmasından XynB ksilanaz geni elde edilmiştir. XynB geni hem *Escherichia coli* hem de *Pichia pastoris*’e eksprese etmişlerdir. XynB geni 576 bç’den oluşmaktadır ve 191 amino asit kodlayabilmektedir. Enzimin saflaştırılması amonyum sülfat çökeltme ve jel filtrasyon kromatografisi ile yapmışlardır. Saflaştırılmış enzim aktivitesini 2869.78 U/mg bulmuşlardır. XynB en yüksek aktiviteyi 60°C sıcaklığında ve pH 5.2 aralığında göstermiştir. Enzim aktivitesi üzerinde metal katyonların, EDTA’nın ve SDS’in hiçbir etkisi olmadığı sonucuna ulaşmışlardır. XynB enziminin balık yemi endüstrisinde kullanım için uygun olduğu belirtilmiştir.

Verma vd. (2013), termal olarak kararlı ksilanaz geni (Mxyl), kompost toprağından izole edilmiştir. BLAST analizi sonucunda genin 1077 bç uzunluğunda olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen ksilanaz geni 358 amino asidi kodlayabilme potansiyeline sahiptir. Mxyl enzimi glikozil hidrolaz (GH) 11 ailesine ait olduğu bildirilmiştir. Ksilanaz geni *pET-28a* vektörüne klonlanmıştır ve *E.coli* BL21’de eksprese edilmiştir. Rekombinant ksilanaz en iyi aktiviteyi 80°C sıcaklığında ve pH 9.0 aralığında göstermiştir. Bu ksilanaz geni alkali kararlılık ve termal kararlılık özelliklerine sahip olan ve metagenomik enziminin kullanılmasıyla ilgili ilk rapor olduğu bildirilmiştir. Mxyl enziminin kağıt hamuru endüstrisinde ve kağıt hamuru ağartma işlemlerinde kullanılması uygun bulunmuştur.

Luo vd. (2009), ksilanaz geni (Xyl11B) *Bispora* sp. MEY-1 organizmasından elde edilmiştir. 66 bç uzunluğuna sahip olan gen glikozid hidrolaz 11 ailesine ait olduğu bildirilmiştir. Rekombinant ksilanaz en iyi aktiviteyi 65°C sıcaklığında gösterirken en iyi aktivite pH 2.6 aralığında ortaya çıkmıştır. Termal kararlı enzimin hem pepsin hem de tripsine karşı oldukça dirençli olduğu bildirilmiştir. Bu durum hayvan beslenmesinin iyileştirilmesi amacıyla yem takviyesi olarak kullanılması önerilmektedir. Xyl11B aktivitesi pek çok metal iyonu tarafından arttırılırken Hg^{2+} , Pb^{2+} ve Cu^{2+} iyonları tarafından inhibe edilmiştir. Ksilanın ana hidroliz ürünlerinin ksiloz ve ksilobiyoza olduğu bildirilmiştir.

Li vd. (2008), ksilanaz geni (Sfxyn10), *Streptomyces fradiae* var.k11 organizmasından elde edilmiştir. Ksilanaz geni 1437 bç uzunluğundan oluşmaktadır ve 479 amino asidi kodlamaktadır. Rekombinant gen aseton çökeltme ve anyon değıştirme kromatografisi ile saflaştırılmıştır ve daha sonra karakterize edilmiştir. Rekombinant enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C iken maksimum aktivite gösterdiği pH 4.0-10.0 aralığındadır. Enzim aktivitesi Fe²⁺ ile arttırılırken Hg²⁺ ve SDS ile inhibe edilmiştir. Enzim ayrıca proteazlara karşı direnç göstermiştir. Bu özelliğinden dolayı enzim proteaza dayanıklı araştırma konularında kullanılabileceğı, gıda endüstrisinde ve hayvan beslenmesinin iyileştirilmesinde kullanılabileceğı bildirilmiştir.

Lee vd. (2000), *Paenibacillus* sp. KCTC8848P organizmasından XynA ve XynB ksilanaz genleri elde edilerek *Escherichia coli*'de klonlanıp eksprese edilmiştir ve nükleotid sekansları belirlenmiştir. XynA geni 636 bç uzunluğundadır ve 212 amino asitlik proteini kodlarken, XynB geni 951 bç uzunluğundadır ve 317 amino asitlik proteini kodlamaktadır. XynA geni glikozil hidrolaz 11 ailesi sınıfındadır ve *Aeromonas caviae*'nin ksilanazına %83 oranında benzerlik göstermiştir. XynB geni ise glikozil hidrolaz 10 ailesi sınıfındadır ve *Rhodothermus marinus* ksilanaza %51 oranında benzerlik göstermiştir.

2.2 Biyoetanol Üretimi Çalışmaları

Hoşgün vd. (2017), alternatif bir yakıt olarak lignoselülozik biyokütlelerden elde edilen etanolün kullanılmasının yakın gelecekte sürdürülebilir enerji kaynağı potansiyeline sahip olduğu görüşünü savunmuşlardır. Sakkarifikasyon ve etanol fermentasyonu işlemleri yapıldıktan sonra fermente edilebilen şekerden etanol üretimi değerlendirilmiştir. Etanol verimini %40,71 ve fermentasyon verimini %96,7 olarak bulmuşlardır.

Çöpür vd. (2013), endüstriyel uygulamalarda atık fındık kabuğunun kullanımı ile ilgili araştırmaların çok sınırlı olduğu hatta fındık kabuğundan biyoetanol üretimi için herhangi bir çaba gösterilmediğini söylemişlerdir. Yaptıkları çalışmada biyoetanol üretimi için kabuk artıklarının uygunluklarını incelemişlerdir ve ön arıtma tekniklerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak en yüksek ksilan çözünürlüğü NaOH ön muamelesi uygulandığında gözlemlenmiştir. %2 NaOH ile muamele edilen numuneler için en yüksek etanol verimi 52,6 g/kg olarak bulunmuştur.

Arslan ve Saraçoğlu (2010), yaptıkları çalışmada ilk defa biyoetanol üretimi için fındık kabuklarını kullandıklarını belirtmişlerdir. Fındık kabuğu yenilenebilir ve düşük maliyetli lignoselülozik bir malzemedir. Ön muamele işlemi ilk önce H_2SO_4 ile yapılmıştır ancak asitlerle yapılan hidroliz şeker içeriğini düşürmüştür. Fındık kabuğunun ön muamelesi için altı farklı metod denenmiştir. Etanol konsantrasyonuna ilişkin en etkili ön işlem oda sıcaklığında %3 NaOH kullanımında görmüşlerdir. Etanol verimini aynı koşullar altında sentetik D-ksilozdan elde edilen %91,25 etanol konsantrasyonuna eşit olarak bulmuşlardır.

Güney (2013), yaptığı çalışmada biyokütle artıklarının endüstriyel alanlarda, ısıtmalarda ve enerji santrallerinde kullanılabilmesi gerekliliğini vurgulamıştır. Fındık kabuğunun enerji kaynağı olarak kullanılmasının büyük bir ümit vaat ettiğini belirtmiştir. Yapmış olduğu çalışmada biyokütlenin lignoselülozik özelliklerinin yanı sıra fındık kabuğu yapısının biyokütle olarak özelliklerini ortaya koymuştur. Fındık kabuklarından sıvı veya gaz elde etmek için kolaylıkla uygulanabilir yöntemlere sahip olan dönüşüm teknolojilerinin araştırılması gerekliliğini vurgulamıştır. Böylece yeni, temiz, yenilenebilir bir biyokütlenin küresel enerji sorunlarına çözüm getireceğini belirtmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteriyel Türlerin ve Plazmidlerin Toplanması

Thermotoga naphthophila organizmasının genomik DNA'sı, Alman Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürleri Koleksiyonu (DSMZ)'den satın alınmıştır. *E.coli* BL21(+) suşu Pakistan'ın Lahore şehrinde bulunan Goverment College Üniversitesi Endüstriyel Biyoteknoloji bölümünün kültür toplama laboratuvarından elde edilmiştir. *E.coli* BL21(+) suşu Luria-Bertani (LB) besiyeri ortamında idame ettirilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

Araştırmada kullanılan sarf malzemeleri Goverment College Üniversitesi Endüstriyel Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarı'ndan (Tablo 3.1) ve Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan (Tablo 3.2) temin edildi.

Tablo 3.1: Pakistanda yapılan çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Materyal Adı	Markası
PCR	Applied Biosystems Veriti
Mikrodalga	Dawlance
Çalkalamalı inkübatör	Innova ^R Incubator Shaker Series
UV transilluminatör	Uvp
Santrifüj cihazı	Sigma Laboratory Centrifuges 3k30
İnkübatör cihazı	EcoCell
Laminar kabin	Technico Scientific Supply
Hassas terazi	AndII

Tablo 3.1 (devam ediyor).

Otoklav	Alp
Spektrofotometre	Cecil-CE7200.0 Aquarius
Isıtıcı	Eisco
Sonikatör cihazı	Bendelin Sonoplus
Su banyosu	Wisebash
Mikropipet	Dragonlab TopPette
Elektroforez aparatı	Wealtes Elite 300 Plus

Tablo 3.2: Türkiye’de yapılan çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar

Materyal Adı	Markası
Destile su cihazı	Thermo Scientific Smart2Pure 6 UV
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Hassas terazi	Shimadzu AUW220D
Otoklav	Nüve SteamArt
Etüv	Nüve En 400
Mikropipet	Nichoryo, Nichipet EX II
Çalkalamalı inkübatör	Stik® PSE-T150
Santrifüj	Mipro MPS-1000

3.1.3 Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

Çalışmada Goverment College Üniversitesi Endüstriyel Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarı’nda ve Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı’nda bulunan malzemeler kullanılmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan laboratuvar malzemeleri

Malzeme Adı	
Ependorf tüp	Mikrosantrifüj tüpü
Falkon tüpü	Drigalksi spatülü
Deney tüpü	Beher
Mezür	Deney tüpleri
Erlen	Şat Şişesi
Kolon tüpü	Hava
Petri kabı	Steril öze

3.2 Yöntem

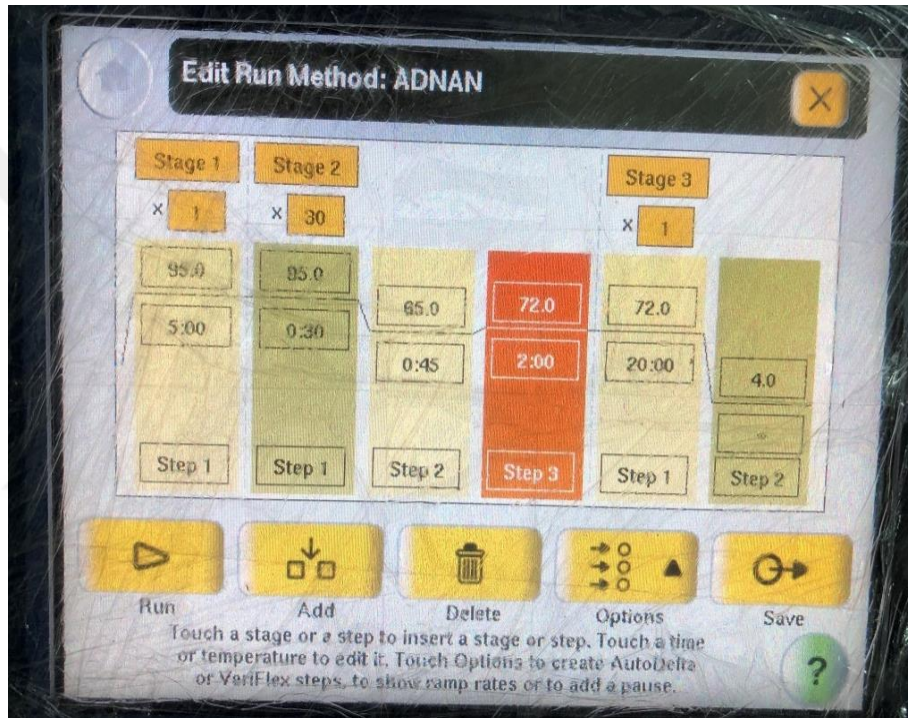
3.2.1 Genomik DNA'nın PCR Analizi

Goverment College Üniversitesi Endüstriyel Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda DSMZ koleksiyonundan satın alınmış olan genomik DNA konsantrasyonu agaroz jel ile önceden belirlenmiş ve yaklaşık 70 ng/μl olarak bulunmuştur. Aynı şekilde forward ve reverse primerler önceden Vektör NTI yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır. *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon bölgesi forward (5' GCG **CAT ATG** CCT TCT GTG CTG ATT 3') ve reverse (5' GCA **AGC TTC** TCC AGC ACC TCT TTT ATC 3') primerlerine eklendi. *T. naphthophila* organizmasından elde edilen β-ksilanaz genini çoğaltmak için forward ve reverse primerlerin konsantrasyonu 10 pmol/μL olarak hesaplandı. PCR reaksiyonu için 9,5 μl distile su, 2 X 12,5 μl PCR master mix, 1μl forward primer, 1μl reverse primer, 1 μl DNA ependorf tüpü içerisine eklendi. Ependorf tüpü PCR cihazına alındı ve PCR adımları şu şekilde ayarlandı;

1. Adım: 95°C 5 dakika 1 devir
 2. Adım: 95°C 30 saniye; 55°C 45 saniye; 72°C 1.30 dakika 30 devir
 3. Adım: 72°C 20 dakika 1 devir
- PCR toplamda 2 saat 6 dakika 11 saniye sürdü (Şekil 3.1).

PCR ile çoğaltılan genomik DNA agaroz jel ile görüntülendi. Bunun için 500 μl 50X Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE tampon) mezurun içine eklendi. Üzerine 25 ml distile su eklendi.

0,25 g agaroz hassas terazide tartıldı ve bu karışıma eklendi. İçerik yaklaşık üç dakika mikrodalgada yüksek sıcaklıkta ısıtıldı ve yaklaşık on dakika oda sıcaklığında bekletildi ve daha sonra 10 mg/ml 2 µl etidyum bromür ilave edildi. Hazırlanan içerik agaroz jel yatağına döküldü ve 15 dakika bekletildi (Şekil 3.2). Agaroz jeli yürütmek için yürütme tamponu hazırlandı. Bunun için 6 ml 50X TAE tamponu eklendi ve üzerine 300 ml olacak kadar distile su eklendi. 2,5 µl PCR örneği ve 6X 0,6 µl yükleme boyası karıştırılarak soğumuş olan jelin içerisine aktarıldı. 2 µl (0,5 µg) DNA markör eklendikten sonra agaroz jel 30 dk 100 voltajda yürütüldü.



Şekil 3.1: PCR analizi adımları.



Şekil 3.2: Agaroze jel hazırlanması.

3.2.2 *pET-21a(+)* Vektöründe β -ksilanaz Geninin Klonlanması

3.2.2.1 PCR Ürünü Saflaştırılması

PCR ürünü yani β -ksilanaz geni Thermo Scientific GeneJET jel ekstraksiyon kiti (Şekil 3.3) ile saflaştırıldı. Bunun için ependorf tüpüne 50 μ l PCR ürünü eklendi. Üzerine 50 μ l bağlama tamponu eklendi. Daha sonra örnekler mikropipet yardımı ile kolon tüpüne aktarıldı. Kolon tüpü 8000 rpm 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolon tüpünün altında kalan sıvı kısım atıldı. Kolon tüpüne 700 μ l yıkama tamponu eklendi. 1 dakika 8000 rpm santrifüj edildikten sonra kolon tüpünün altında kalan sıvı kısım atıldı. Tekrar 1 dakika 8000 rpm santrifüje tabi tutulan kolon tüpünün sıvı kısmı atıldı. Kolon tüpü temiz ependorf tüpüne alındı ve üzerine 30 μ l yürütme tamponu eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Saflaştırılmış genomik DNA kolon tüpünün altında kalan sıvı kısımıdır. Agaroze jel hazırlandı. Agaroze jele yüklenen saflaştırılmış genomik DNA 30 dakika 100 voltajda yürütüldü.



Şekil 3.3: GeneJET jel ekstraksiyon kiti.

3.2.2.2 Plazmid DNA Saflaştırılması

Bakteri üremesi için zengin bir ortam olan LB (Lysogeny broth) ortamı (Şekil 3.4) hazırlandı. Bunun için 1,25 g tripton, 1,25 g NaCl ve 0,625 g maya ekstratı hassas terazide tartıldı ve erlen içerisine alındı. Üzeri 125 ml olacak şekilde distile su eklendi. 15 dakika 121°C’de otoklavda bekletildi. İçerik 2 erlene bölündü. Erlenin bir tanesine *E.coli* bakterisi içeren petri kabından mikropipet yardımı ile *E.coli* alındı ve LB besiyerine ilave edilerek 1 gün 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.5)



Şekil 3.4: LB besiyeri.



Şekil 3.5: LB besiyerinde kültürlenmiş *E.coli* bakterisi.

Plazmid DNA saflaştırılması için GeneJET Plazmid Miniprep kiti (Şekil 3.6) kullanıldı. Bunun için 1 gün kültüre bırakılan plazmid *pET-21a* vektörü laminar kabin içerisinde falkon tüplerine aktarıldı. 7 dakika 6000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Süspansiyon solüsyonu içerisinde 700 µl RNAz eklendi. 280 µl süspansiyon çözeltisi ve RNAaz karışımından alınıp falkon tüpünde kalan pellet üzerine eklendi. Hücre

topakları kalmayacak şekilde pipetleme yapıldı. 280 µl liziz çözeltisi üzerlerine eklendi. Tüpler 2 dakika boyunca ters düz çalkalandı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon edildi. Tüplere 380 µl nötralizasyon çözeltisi eklendi. Tüpler 2-3 dakika ters düz çalkalanarak 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Falkon tüplerindeki süpernatant ependorf tüplerine alındı ve 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kolon tüplerine aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kalan pellet üzerine 500 µl yıkama çözeltisi eklendi. Tüpler 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine tekrar 500 µl yıkama çözeltisi eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 8000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet üzerine 35 µl yürütme tamponu eklenerek 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon tüpün altında kalan kısım saflaştırılmış plazmid DNA'sıdır (Şekil 3.7). Plazmid *pET-21a* vektörünü görüntülemek için agaroz jel hazırlandı ve 30 dakika 100 voltajda yürütüldü.



Şekil 3.6: GeneJET plazmid miniprep kit.



Şekil 3.7: Pürifiye edilen *pET-21a(+)* vektörü.

3.2.2.3 Plazmid DNA'nın Kısıtlandırılması

Plazmid DNA'nın kısıtlandırılması *HindIII* restriksiyon enzimi ile gerçekleştirildi. Bunun için ependorf tüpüne 3 µl plazmid DNA, 1 µl, *HindIII* 1 µl R tamponu ve 6 µl distile su eklendi. 37°C'de inkübatörde gece boyu inkübe edildi. Agaroz jel hazırlandı ve kısıtlanan plazmid DNA'sı jele yüklendi. Jel 30 dakika 100 voltajda yürütüldü. İstenilen sonuç elde edilemediği için plazmid DNA'sı tekrar saflaştırıldı.

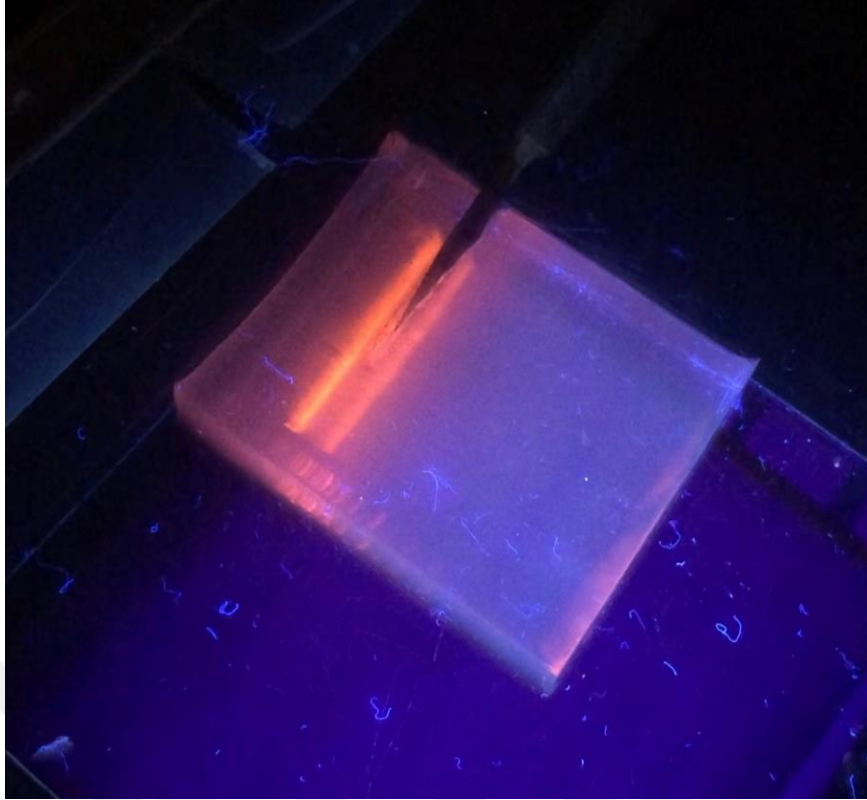
3.2.2.4 Agaroz Jelden Plazmid DNA Pürifikasyonu

Agaroz jel hazırlandı ve 90 µl plazmid DNA'sına 20 µl yükleme boyası eklenerek agaroz jele yükleme yapıldı. 2 µl DNA markör eklendi ve agaroz jel 30 dakika 100 voltajda yürütüldü. Jel UV transiluminatör cihazında görüntüldü ve istenilen alan bistüri yardımı ile kesildi (Şekil 3.9). Kesilen jel ependorf tüpü içerisine alınarak hassas terazide tartıldı ve 830 mg olarak ölçüldü. Plazmid DNA pürifikasyonu GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti kullanılarak yapıldı. Bunun için 830 µl bağlama tamponu jel içeren ependorf tüpüne eklendi (Şekil 3.8). 50-60°C'de 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra örnek kolon tüpüne

aktarıldı ve 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 700 µl yıkama çözeltisi eklendi ve 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tekrar 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kolon tüpünün altındaki tüp atıldı ve onun yerine yeni ependorf tüpü eklendi. Pellet üzerine 40 µl yürütme tamponu eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 1 dakika 8000 rpm’de santrifüj edildi. Kolon ve içerisindeki pellet atıldı. Ependorf tüpü içerisindeki süpernatant saflaştırılmış plazmid DNA’sıdır. Agaroz jel hazırlandı. 2 µl saflaştırılmış plazmid DNA’sı 0,5 µl yükleme boyası ile birlikte agaroz jele yüklendi. 2 µl DNA markör eklendi ve agaroz jel 100 voltajda 30 dakika yürütüldü.



Şekil 3.8: Plazmid DNA’sı içeren jel ile bağlama tamponu bileşimi.



Şekil 3.9: Plazmid DNA'sının agaroz jelden bistüri ile kesimi.

3.2.2.5 Plazmid DNA'nın ve Genomik DNA'nın Kısıtlandırılması

Plazmid DNA	5 µl	β-ksilanaz geni	6 µl
<i>Hind</i> III (10 U/µl)	1 µl	<i>Hind</i> III (10 U/µl)	1 µl
<i>Nde</i> I (10 U/µl)	2 µl	<i>Nde</i> I (10 U/µl)	2 µl
R tamponu (10X)	1 µl	R tamponu (10X)	1 µl
Distile su	2 µl	Distile su	1 µl

Yukardaki miktarlar 2 ayrı ependorf tüpüne eklendi. 1 gece 37°C'de inkübatörde inkübe edildi.

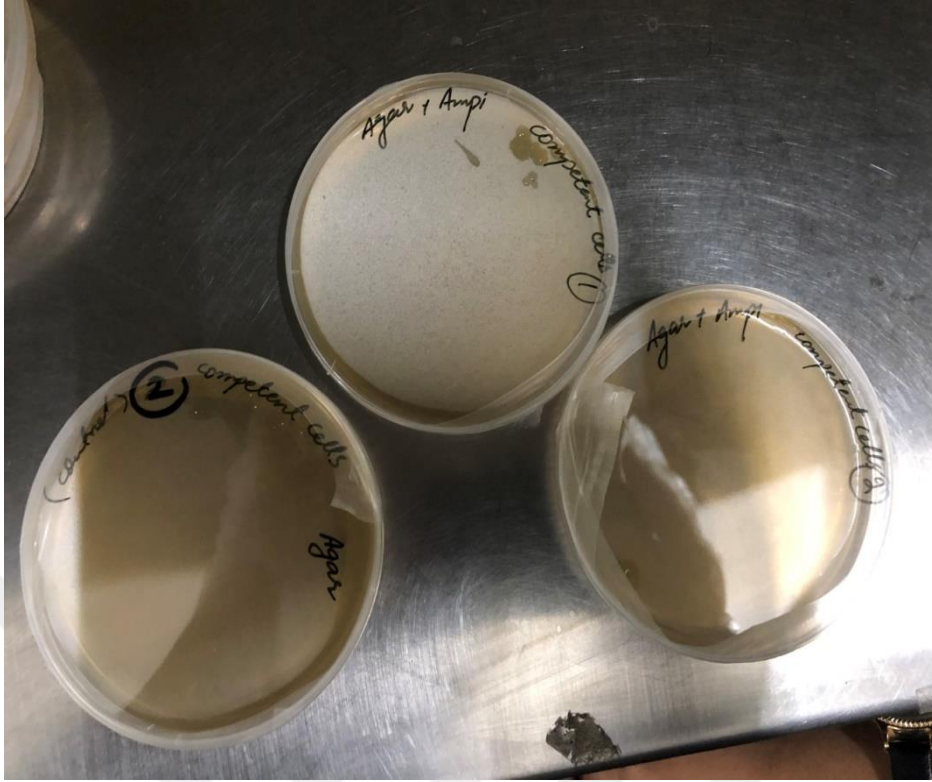
3.2.2.6 Ligasyon

B-ksilanaz geni ve *pET-21a(+)* plazmidi T4 DNA ligaz enzimi ile bağlandı. Bunun için ependorf tüpüne 2 µl sınırlandırılmış plazmid, 2,1 µl sınırlandırılmış PCR ürünü (β-ksilanaz geni), 1,25 µl DNA ligaz, 1,25 µl ligaz tamponu, 3 µl distile su eklendi ve pipetleme yapılarak gece boyu buzdolabında inkübe edildi. Ligasyon karışımı 5:1 oranında PCR ürününe plazmid içeriyordu.

3.2.2.7 Kompetent Hücre Oluşumu

LB besiyeri hazırlandı. Bunun için 1,25 g tripton, 1,25 g NaCl ve 0,625 g maya ekstratı erlen içerisine alındı. Üzeri 125 ml olacak şekilde distile su eklendi. İki şişeye bölündü ve bir süre çalkalandıktan sonra 15 dakika 121°C'de otoklava atıldı. Plazmid DNA purifikasyonu yapıldığı zaman hazırlanmış olan LB besiyerinin 2. şişesine *E.coli* BL21 içeren petri kabından mikropipet ile *E.coli* alındı ve eklendi. LB kültürü gece boyu 121 °C'de otoklavda bekletildikten sonra %2 oranında seyreltme yapıldı. Bunun için 2 ml LB kültürü ile 100 ml LB besiyeri erlene alındı. 37°C'de 2 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra spektrofotometrede 600 nm absorbans değerinde ölçüm yapıldı.

Kompetent hücre oluşumu için 100 ml distile su erlen içerisine alınarak üzerine 5 ml 50 mM CaCl₂ eklendi ve buzdolabına alındı. Laminar kabin içerisinde LB kültürü 24 adet ependorf tüpüne aktarıldı. 10 dakika 6000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırdı ve her tüpün içine 1,5 ml CaCl₂ eklendi. Pipetleme yapılarak CaCl₂ ile pelletin birbirine karışması sağlandı. Tüpler 30 dakika buz kutusu içinde inkübe edildi ve daha sonra tüpler 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak her tüpün içerisine 0,75 ml CaCl₂ eklendi ve pipetleme yapıldı. Tüpler 9 tüpe düşürüldü ve 30 dakika buz kutusu içerisinde inkübe edildi. Tüpler 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak her tüpün içerisine 0,375 ml CaCl₂ eklendi ve pipetleme yapıldı. Tüpler 5 tüpe düşürüldü ve 30 dakika buz kutusunun içerisinde inkübe edildi. Tüpler 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Toplamda tüm tüplere 2 ml CaCl₂ eklenerek pipetleme yapıldı ve 2 ependorf tüpüne düşürüldü (Cohen vd., 1972). 2 tüp agar ve ampicilin içeren 2 adet petri kaplarına eklendi ve yayma yapıldı. Kontrol için 1 adet petri kabı içeriğinde sadece agar vardır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: Agar ve ampisilinli petri kaplarında kompetent hücre içeriği.

3.2.2.8 Transformasyon

Laminar kabin içerisinde 2 ependorf tüpün içerisine 100 µl kompetent hücreden ilave edildi. 1.tüp kontrol tüpü 2.tüp β-ksilanaz olarak adlandırıldı. 1.tüpe 0,6 µl saflaştırılan *pET-21a(+)* plazmidi eklendi. 2.tüpe 5 µl ligasyon işlemi yapılmış β-ksilanaz eklendi. Tüplere pipetleme yapıldıktan sonra 40 dakika buz kutusunun içerisinde inkübe edildi. Tüplere ısı banyosunda 42°C’de 90 saniye ısı şoku yapıldı ve daha sonra buz kutusunda 5 dakika inkübe edildi. 800 µl LB besiyerinden her tüpe eklendikten sonra pipetleme yapıldı ve 2 saat 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Tüpler 3000 rpm’de 30 saniye santrifüjlendi ve tekrar 30 saniye 1000 rpm’de santrifüjlendi (Sambrook vd., 2006). Kompetent hücre için yapılmış olan petri kutularından 1.si kontrol, 2.si β-ksilanaz olarak adlandırıldı (Şekil 3.11). Örneklerden 400 µl alındı ve adlandırılan ampisilin içerikli petri kutularına ilave edilerek yayma işlemi yapıldı. Petri kapları 37°C de 2 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra petri kaplarında gözlemlenen koloniler işaretlendirildi ve numaralandırıldı.



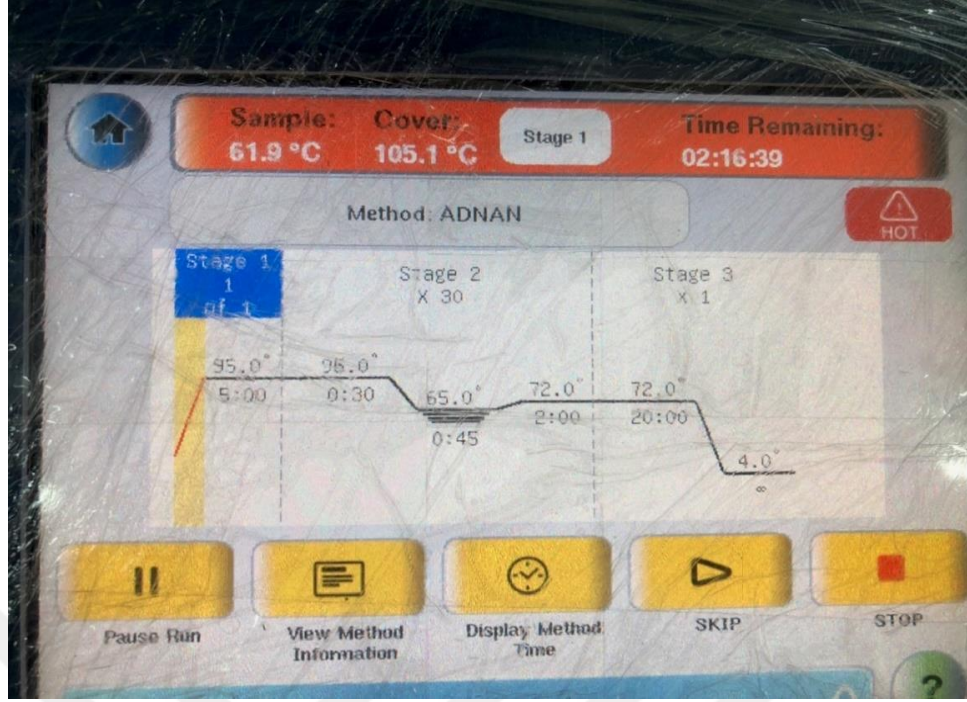
Şekil 3.11: Transformasyon aşaması.

3.2.2.9 Pozitif Klonların Belirlenmesi İçin Koloni PCR

Petri kaplarındaki koloniler işaretlendi ve numaralandırıldı. Her koloni ayrı ayrı ependorf tüplerine alınarak üzerlerine 5 µl distile su eklenerek sulandırıldı ve numaralandırıldı. Koloni PCR için 5 adet boş PCR tüplerinin içine sırasıyla 9,5 µl distile su, 2X 12 µl master mix, 1 µl forward primeri, 1 µl reverse primeri eklendi ve son olarak her tüpe sırasıyla numarasına göre 1 µl sulandırılmış koloni eklendi. Koloni PCR aşamaları;

- 1.Adım: 95°C 5 dakika 1 devir
- 2.Adım: 95°C 30 saniye; 65°C 45 saniye; 72°C 2 dakika 30 devir
- 3.Adım: 72°C 20 dakika; 4°C ∞

PCR toplamda 2 saat 16 dakika sürdü (Şekil 3.12). Agaroz jel hazırlandı ve 0,6 µl yükleme boyası ile örneklerden 2 µl alınarak sırayla jele yüklendi. Jel 100 voltajda 30 dakika yürütüldü.



Şekil 3.12: Koloni PCR aşamaları.

3.2.2.10 Pozitif Klonlardan Rekombinant Plazmid İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimleriyle Kısıtlama

Rekombinant plazmid izolasyonu için GeneJET Plazmid Miniprep kiti kullanıldı. Önceden hazırlanmış olan iki erlen LB besiyeri içerisine 25 µl ampisilin (100 µg/ml) eklendi. Transformasyon ürünü içeren petri kabından koloni alınıp bu iki erlene eklendi. 37°C'de çalkalamalı inkübatörde bir gün inkübe edildi. İnkübe edilen içerik falkon tüplerine boşaltılarak 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelletlerin üzerine totalde 600 µl süspansiyon solüsyonu eklendi ve pipetleme yapılarak içerik iki falkon tüpüne düşürüldü. Tüplere 600 µl liziz solüsyonu eklenerek viskoz yapı olana kadar çalkalandı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerlerine 800 µl nötralizasyon solüsyonu eklendi ve 2-3 dakika boyunca hızlı bir şekilde çalkalanarak 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 11000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant iki adet kolon tüpüne aktarıldı. Tüpler 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve her tüpün ağzına kadar (1000 µl) yıkama çözeltisi eklenerek 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kolonlara 700 µl yıkama çözeltisi eklendi ve 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kolon tüplerine 40 µl yürütme tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilerek 10000 rpm'de 1

dakika santrifüj edildi. Pellet içeren kolon atıldı. Süpernatant klonlanmış rekombinant plazmid DNA içeriğidir. Agaroz jel hazırlanarak plazmid DNA yüklendi. Jel 100 voltajda 30 dakika yürütüldü.

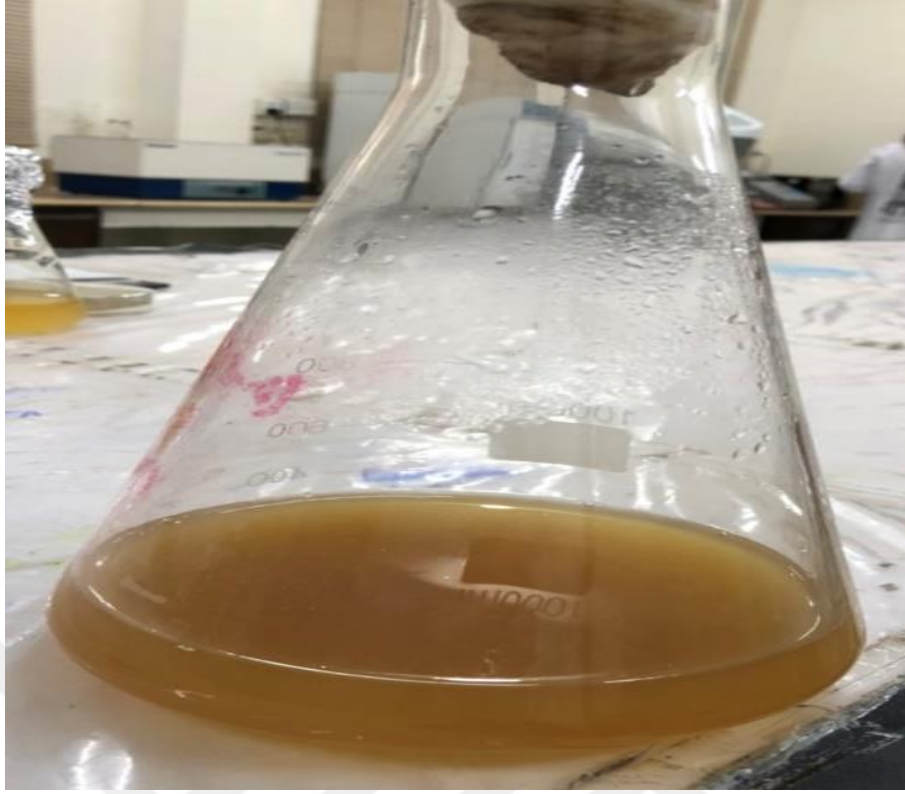
İzole edilen plazmidin kısıtlama analizi için izole edilen örnekten 6 µl, *Hind*III 1 µl, *Nde*I 2 µl, R tamponu 1 µl, distile su 1 µl miktarları iki adet ependorf tüpüne eklendi ve pipetleme yapıldı. 24 saat 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi ve daha sonra agaroz jele yüklemesi yapılması için 2 µl yükleme boyası ile 5 µl inkübe edilen örnek karıştırılarak jele yüklendi. Agaroz jel 30 dakika 100 voltajda yürütüldü.

3.2.3 Rekombinant β-ksilanaz Geninin İfadesi

3.2.3.1 Kültürün Hazırlanması ve IPTG ile Muamele Edilmesi

Transforme edilmiş koloninin kültürlenmesi için agar ortam hazırlandı. Bunun için; erlen içerisine NaCl 1,25 g, tripton 2,5 g, maya ekstratı 1,25 g ve agar 5 g eklenerek üzeri 250 ml oluncaya kadar distile su eklendi. Erlen iki şişeye bölündü ve 15 dakika 121°C’de otoklava bırakıldı. Laminar kabin içerisinde erlenlerin içerisine 125 µl ampisilin eklenerek boş petri kaplarına döküldü ve soğumaya bırakıldı. Soğuyan petri kaplarına transforme olmuş β-ksilanaz kolonisinden eklendi ve yayma işlemi yapıldı. Petri kapları 37°C’de 24 saat inkübe edildi.

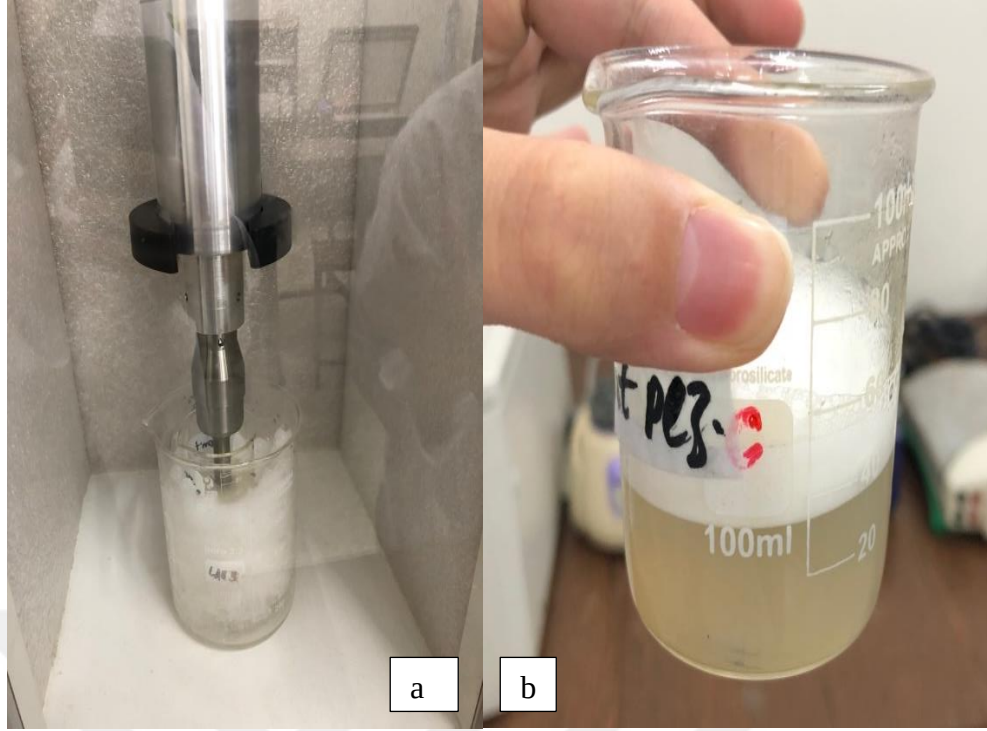
Laminar kabinde 100 ml LB besiyeri içerisine 100 µl ampisilin eklendi. Transforme β-ksilanaz kolonisi petri kabından mikropipet yardımıyla alınarak LB besiyeri içerisine eklendi. Kültür 37°C’de 24 saat çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Kültüre %2 oranında seyreltme yapmak için 300 ml LB besiyeri içerisine 1000 µl ampisilin eklendi ve üzerine kültürden 5000 µl eklenerek 2 saat 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra 75 µl 0,5 mM IPTG eklenerek 24 saat 37°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. *E.coli* BL21’de *T. naphthophila* organizmasından gen ekspresyonu izopropil D-tiyogalaktopiranosit (IPTG) kullanılarak bakteriyel hücrelerin uyarılması yöntemiyle incelendi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: IPTG içeren kültür içeriği.

3.2.3.2 Enzim Üretimi

0,5 mM IPTG eklenen kültür sekiz adet falkon tüpüne boşaltılarak 6000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelletlerin üzerine 200 µl 50 mM Tris- HCl (pH 8) eklendi. Pipetleme yapılarak bütün içerik behere boşaltıldı ve beherin üzeri 40 ml olana kadar Tris-HCl eklendi. Beher buz kutusunun içerisine koyularak sonikatör cihazına alındı (Şekil 3.14.a) Cihaz iki saat çalışacak şekilde ayarlandı ancak cihaz 30 saniye çalışıp 30 saniye durduğu için sonikasyon bir saat sürdü. Bu süreçte eriyen buzlar ara ara değiştirildi ve sonikasyondan sonra içerik 45 dakika buzdolabında inkübe edildi (Şekil 3.14.b) Liziz içeriği, hücre lizatını elde etmek amacıyla 6000 rpm’de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden çıkan ürünlerin süpernatantı falkon tüpüne aktarıldı. 10 ml Tris-HCl boş falkon tüpüne alındı ve içine 0,1 g %1 kayın ağacı ksilanı eklendi ve 70°C’de 2-3 dakika ısı banyosunda bekletildi. İki ayrı mezür içerisine 125 µl ısı banyosunda bekletilen içerikten eklendi. Bir tanesi kontrol tüpü diğeri enzim tüpü olarak adlandırıldı. Kontrol tüpüne 100 µl distile su eklendi. Enzim tüpüne ise falkon tüpünde bulunan enzim içeriğinden 100 µl eklendi. Mezürler 10 dakika 80°C ısı banyosunda bekletildi.



Şekil 3.14: a) Sonikatör cihazı içerisindeki enzim içeriği. b) Sonikasyon sonrası enzim içeriği.

3.2.3.3 Protein Tayini

Protein tayininde şeker oranının azaltılması için dinitrosalisilik asit (DNS) kullanılarak Miller metodu uygulandı. Boş beher içerisine 60 ml kaynamış su eklendi ve hat plate üzerine koyuldu. Mezür içerisindeki enzim içeriğine 1500 μ l DNS eklendi ve tüpler hat plate üzerindeki suyun içine koyularak 10 dakika bekletildi (Şekil 3.15). İndirgeyici şeker 540 nm optik yoğunluğunda spektrofotometrede ölçüldü. Enzim içeriği bir gün buzlukta bekletildi.



Şekil 3.15: Isıtıcı üzerindeki DNS eklenmiş enzim içeriği.

3.2.3.4 Enzimin Kısmi Saflaştırılması

B-ksilanaz enziminin saflaştırılması için ısıl işlem yöntemi uygulandı. Enzim içeriği 70°C’de ısı banyosunda yarım saat ısıtıldı ve daha sonra oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilerek buzluğa koyuldu.

3.2.4 β -Ksilanaz Enziminin Moleküler Kütle Tayini

β -ksilanaz enziminin saflaştırılması SDS-PAGE kullanılarak yapıldı. SDS-PAGE yönteminde ayırma jelinin hazırlanması işlemi için 3350 μ l saf su, 2500 μ l 1,5 M Tris-HCl (pH 8.8), 100 μ l %10 SDS ve 4000 μ l Akrilamid-Bis falkon tüpüne eklendi. Ependorf tüpüne 28 g %10 Amonyum persülfat, 280 μ l saf su eklendi ve pipetleme yapılarak bu karışımdan 75 μ l alınarak falkon tüpüne eklendi. Falkon tüpüne 15 μ l TEMED eklendi. Falkon tüpündeki tüm içerik SDS-PAGE tankına yüklendi.

Yükleme jelinin hazırlanması için 6100 µl saf su, 2500 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 100 µl SDS, 60 µl APS, 12 µl TEMED falkon tüpüne eklendi. Donmuş olan ayırma jelinin üzerine falkon tüpündeki yükleme jeli içeriği eklendi ve taraklar yerleştirilerek jelin donması beklendi. 36 µl sıvı ksilanaz enzimi boş ependorf tüpüne eklendi. Başka bir boş ependorf tüpüne de az miktarda katı ksilanaz enziminden eklendi. Tüplerin içine 2X yükleme tamponundan 36 µl eklenerek tüplerin 100°C de 5 dakika ısıtılması sağlandı.

Soğuyan jeller elektroforez tankına aktarıldı. 10X yürütme tamponundan 50 ml mezüre eklendi ve üzeri 500 ml olana kadar saf su eklendi. Tankın üzerine hazırlanan yürütme tamponu eklendi ve jelin üzerinden taraklar çıkartılarak örneklerin yüklemesi aşağıdaki tabloya göre (Tablo 3.4) yapıldı. Örnekler 100 voltta 10 dakika yürütüldü ve daha sonra 200 voltajda örneklerin istenilen yere gelmesine kadar yürütüldü. Yürütülen jelin üzerine brilliant mavisi eklenerek gece boyu bekletildi. Jel boya çıkarma çözeltisinde (%5 metanol %7 asetik asit) bekletilerek boyanın arındırılması sağlandı.

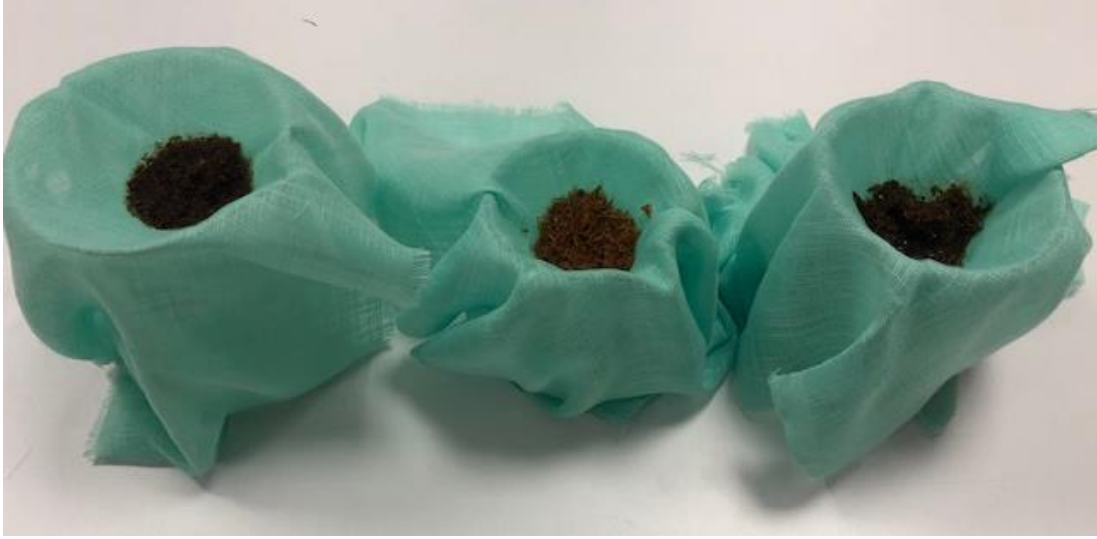
Tablo 3.4: SDS-PAGE yöntemi için kullanılan β-ksilanaz miktarları

Kuyucuk	B-ksilanaz miktarı
1.kuyucuk	6 µmarker
2.kuyucuk	5 µl katı β-ksilanaz
3.kuyucuk	10 µl katı β-ksilanaz
4.kuyucuk	15 µl katı β-ksilanaz
5.kuyucuk	20 µl katı β-ksilanaz
6.kuyucuk	5 µl sıvı β-ksilanaz
7.kuyucuk	10 µl sıvı β-ksilanaz
8.kuyucuk	15 µl sıvı β-ksilanaz
9.kuyucuk	20 µl sıvı β-ksilanaz

3.2.5 Asit-Alkalin Metodu İle Çeşitli Biyokütlelerin Ön İşlemden Geçirilmesi

Ön işlemden geçirilme metodu biyokütlelerin istenilmeyen yapılarını ortadan kaldırmak için uygulanmaktadır. Üç farklı biyokütleye (fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprakları) ön işlem aşaması uygulandı. Asit-Alkalin metodu için; 2 g NaOH üzerine 100 ml saf su eklendi ve çözüldü. Her biyokütleden 2 g tartılarak şat şişelerine alındı.

Biyokütlelerin üzerlerine hazırlanmış olan NaOH çözeltisinden 20 ml eklendi ve çalkalandı. Bitkilerin ekstratını çıkartmak için şişelerin ağzı yarım kapatılarak 121°C’de 15 dk otoklavlandı. Ayrı bir şişeye 6,27 ml %37’lik HCl üzerine 100 ml saf su ilave edildi. Otoklavdan çıkan bitki tülbent gibi bir bezden süzüldü (Şekil 3.16). Sıvı kısım atıldı ve katı kısım birkaç kez saf su ile yıkandı. Bitki-NaOH karışımını nötralize etmek için hazırlanmış olan HCl çözeltisinden 20 ml boş şat şişelerine alınarak üzerlerine suda yıkanan biyokütlelerden eklendi ve nötralize olana kadar çalkalanıp 30 dakika bekletildi. Bitki-HCl karışımları saf su ile üç kez yıkandı. Süzülen biyokütleler iki gün boyunca oda koşullarında kurumaya bırakıldı (Şekil 3.17). Kuruyan biyokütleler havanda öğütüldü ve 15 dakika 50°C etüve konuldu. Bu aşamadan sonra biyokütlelerin ön işlem hazırlığı tamamlanmış oldu.



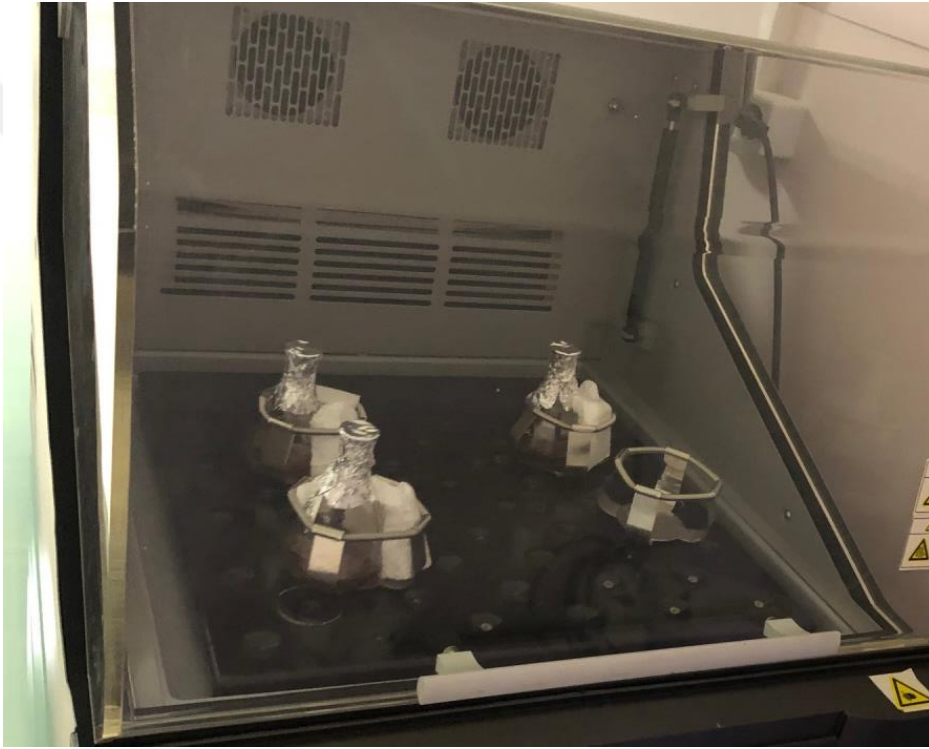
Şekil 3.16: Biyokütlelerin saf su ile yıkandıktan sonra süzülme aşaması.



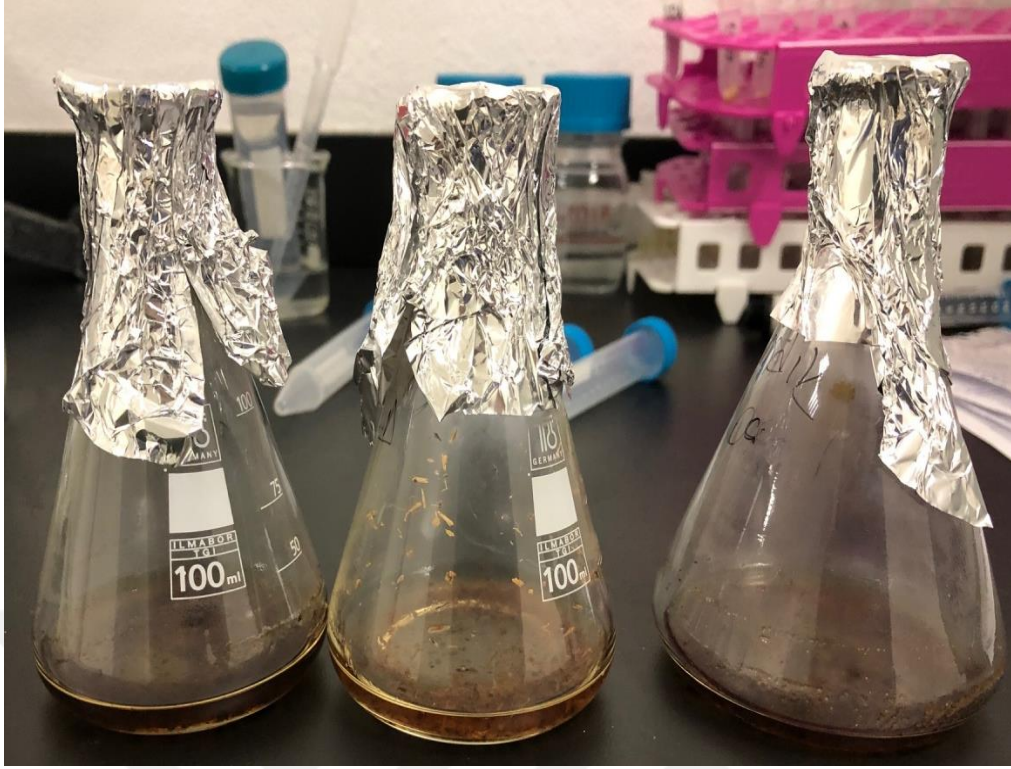
Şekil 3.17: Ön işlem aşamaları gören biyokütlelerin kurutulmaya alınması.

3.2.6 Ön İşlem Görmüş Biyokütlelerin Sakkarifikasyonu

Ön işlem görmüş biyokütlelerin β -ksilanaz enzimi ile hidrolizi sonucu açığa çıkan şeker miktarı teyit edildi. Sakkarifikasyon aşamasında her biyokütle için üç beher içerisine 0,1 g ön işlem görmüş biyokütle, 20 ml β -ksilanaz enzimi eklendi. Mikrobiyal büyümeyi engellemek için beherler içerisine 0,1 mg/ml 9 μ l kloramfenikol antibiyotiği eklendi. Beherler çalkalamalı inkübatörde 60° C’de 80 rpm’de 72 saat boyunca (Şekil 3.18) ve (Şekil 3.19)’da görüldüğü gibi bekletildi. Bu aşamadan sonra biyokütleler 3200 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar falkon tüplerine alındı.



Şekil 3.18: Biyokütlelerin çalkalamalı inkübatörde 72 saat bekletilmesi.



Şekil 3.19: Biyokütlelerin çalkalamalı inkübatörde 72 saat inkübe aşaması sonrası.

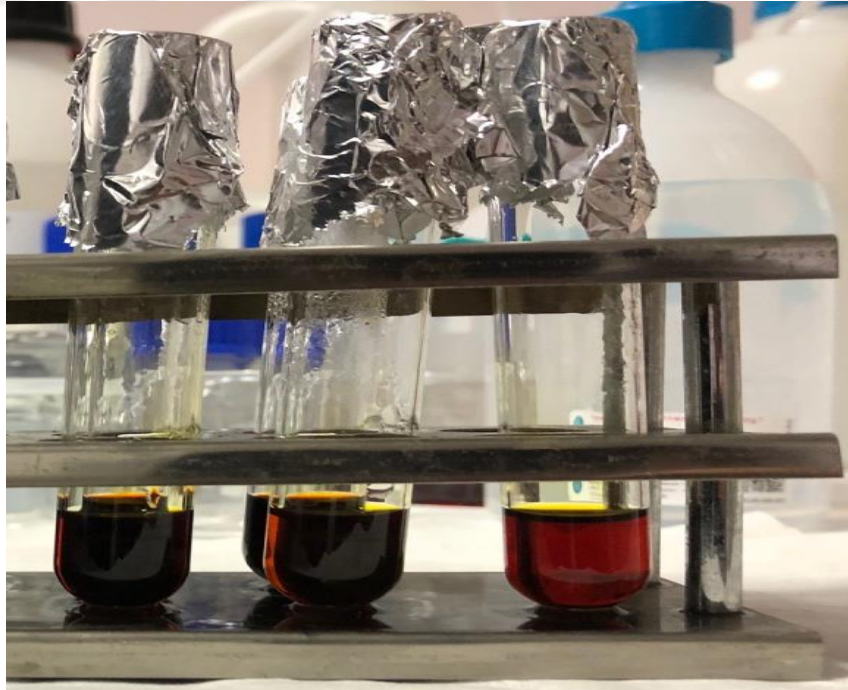
3.2.6.1 DNS (Dinitrosalisilik Asit)

Enzimin biyokütle üzerindeki aktivitesini durdurmak ve bununla birlikte şeker miktarının teyit edilmesi amacıyla DNS kullanılır (Miller, 1959). İlk şat şişesi içerisinde 1 g DNS 1,6 g 2 M NaOH içerisinde çözüldü. İkinci şat şişesi içerisinde 37,66 g sodyum potasyum tartrat (Rochella tuzu) 50 ml distile su içerisinde çözüldü. İlk şat şişesindeki içerik ikinci şat şişesine boşaltıldı. Homojen bir görüntü olana kadar ısıtılıp çalkalandı.

Süpernatantlardan 1 ml boş falkon tüplerine eklendi. Üzerlerine 1 ml hazırlanmış olan DNS'den eklendi (Şekil 3.20). İçerik 100°C'de 5 dakika ısı banyosunda bekletildi (Şekil 3.21). İçerik oda sıcaklığında soğumaya bırakıldıktan sonra tüplerin üzerine 8 ml distile su eklendi. Spektrofotometrede 540 nm'de ölçüm yapıldı. Örneklerin şeker miktarlarını saptayabilmek için glukozun farklı konsantrasyonları standart olarak kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi.



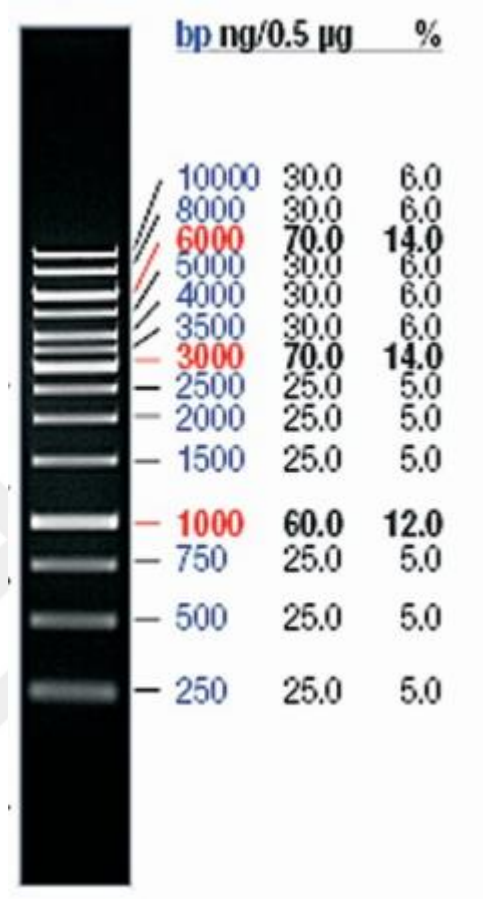
Şekil 3.20: Biyokütle ve DNS'nin test tüpüne alınması.



Şekil 3.21: Biyokütle ve DNS içeriğinin sıcak suya maruz bırakılmasından sonraki görüntüsü.

4. BULGULAR

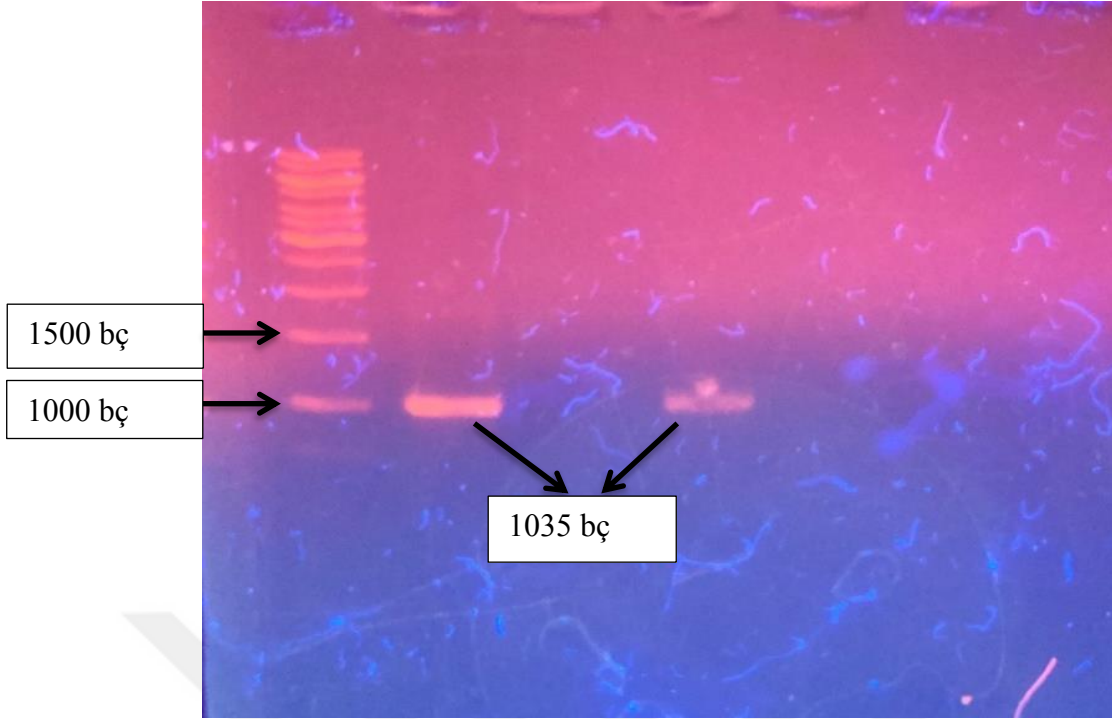
Yapılan çalışmanın bütün aşamalarında agaroz jel elektroforezi için Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA markörü kullanıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Kullanılan DNA markörün baz çifti ve konsantrasyonu (URL-1).

4.1 β -ksilanaz Geninin PCR Analizi

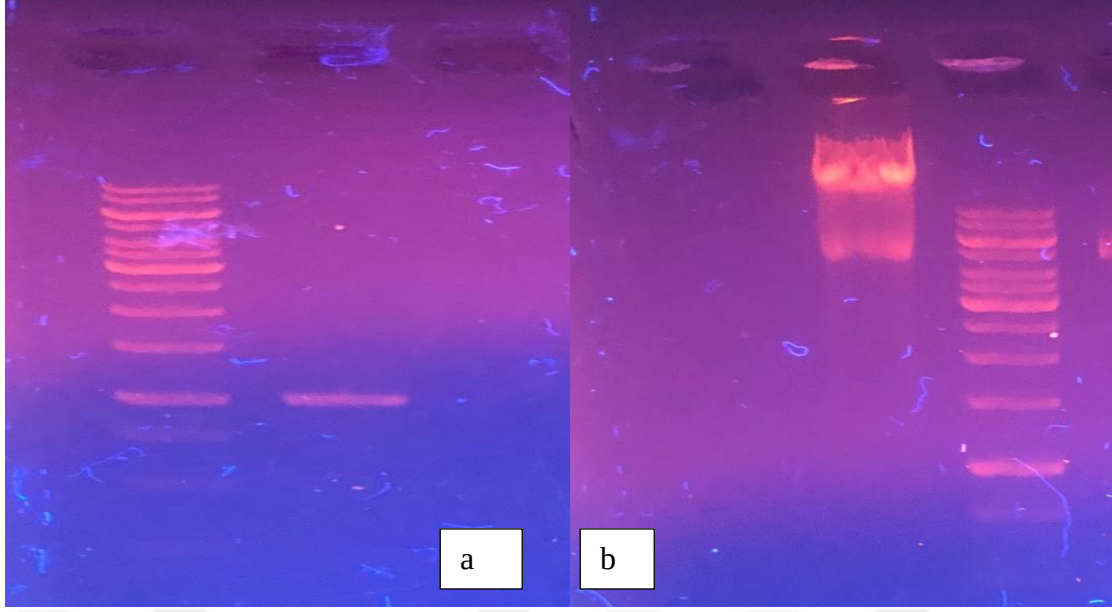
Thermotoga naphthophila organizmasından elde edilen β -ksilanaz geni forward ve reverse primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Genomik DNA konsantrasyonu yaklaşık olarak 70 ng/ μ l olarak hesaplandı. UV cihazında bakıldığında 1035 baz çiftine sahip β -ksilanaz geni görüldü (Şekil 4.2).



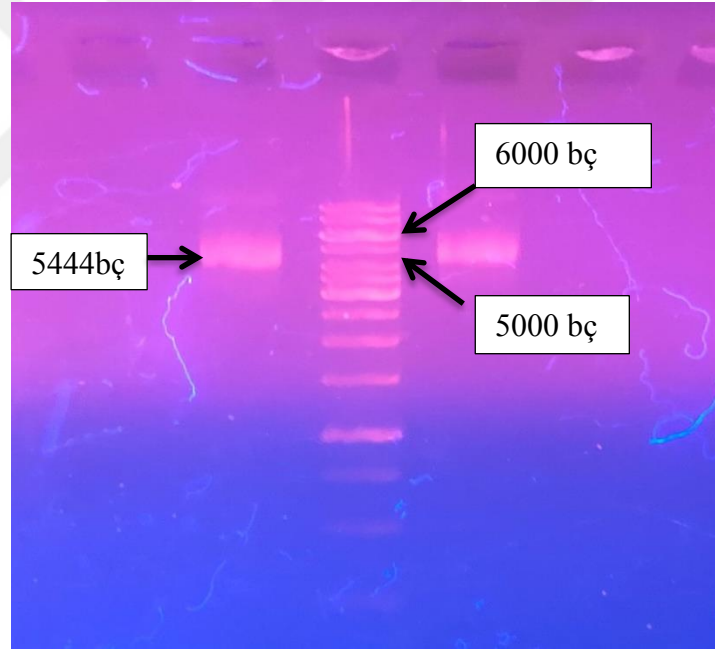
Şekil 4.2: β -ksilanaz geninin PCR amplifikasyonu ve agaroz jel elektroforeziyle analizi.

4.2 Genomik DNA ve *pET-21a(+)* Vektörünün Saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan β -ksilanaz geni Thermo Scientific GeneJET Jel Ekstraksiyon kiti ile saflaştırıldı (Şekil 4.3.A). Plazmid DNA saflaştırılması GeneJET Plazmid Miniprep kiti kullanılarak yapıldı ancak plazmid DNA'da dimerleşme meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.3.B) Bu yüzden agaroz jelden plazmid DNA saflaştırıldı ve bunun için GeneJET Jel Ekstraksiyon kiti kullanıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.3: a) Saflaştırılan PCR ürünü b) Dimerleşme gösteren saflaştırılmış plazmid DNA.



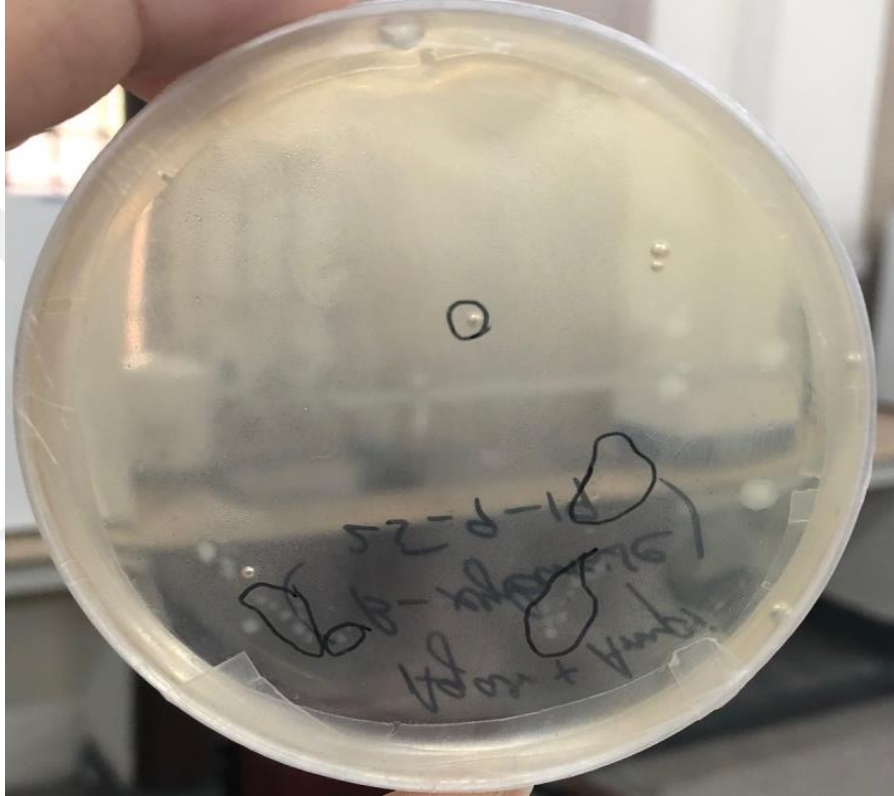
Şekil 4.4: Agaroj jelden saflaştırılan plazmid DNA'sı.

4.3 Kompetent *E.coli* BL21 Hücre Hazırlığı Analizi ve Transformasyon Analizi

Kompetent hücre oluşumu için hazırlanan *E.coli* BL21 LB kültürünün spektrofotometrede 600 nm absorbans değerinde optik yoğunluğunun 0,4-0,6 arasında olması bekleniliyordu. Üç saat inkübasyonun ardından optik yoğunluk 0,6 oldu. CaCl_2 kullanılarak hücre zarının plazmid DNA'sı için geçirgen olması sağlandı. Bunun için yapılan çalışmada 1 petri kabı

kontrol tüpüydü ve bu petri kabının içeriğinde sadece agar vardı. İkinci petri kabı agar ve ampisilin karışımıydı. Kontrol petri kabında koloni oluşumu meydana geldi. Agar ve ampisilin içeren petri kaplarında ise koloni oluşumu gözlemlenmedi.

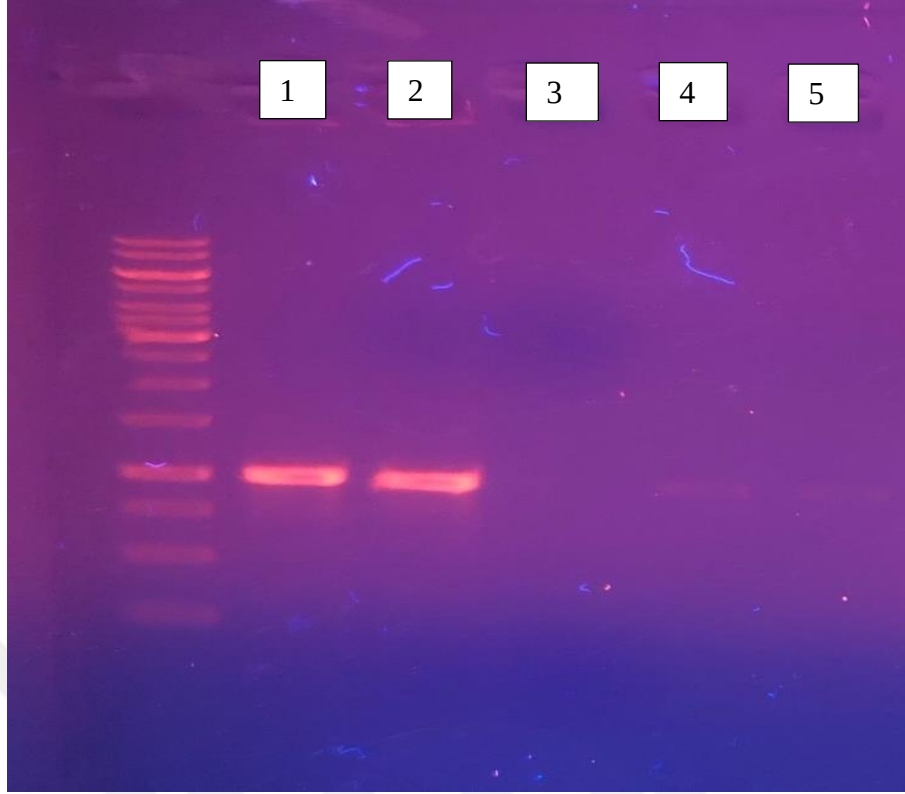
pET-21a(+) plazmidi ile birleştirilecek olan β -ksilanaz geninin *E.coli* BL21'de transformasyonu sonucunda petri kaplarında koloni oluşumu gözlemlendi. Oluşan koloniler işaretlendi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Transformasyon sonucu oluşan koloniler.

4.4 Koloni PCR Analizi

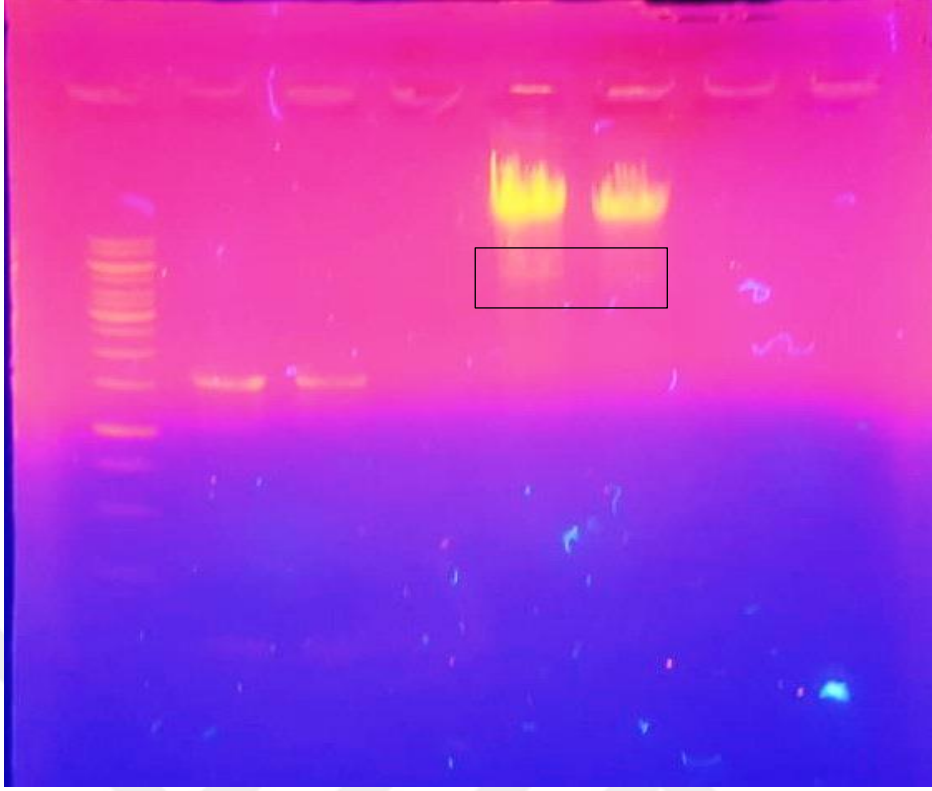
Transformasyon sonucu işaretlenen kolonilerin insert DNA içerip içermediklerini gözlemek amacı ile koloni PCR yapıldı. Sonuç olarak işaretlenen 5 koloniden 2 tanesi insert DNA içeriğine sahip olduğu görüldü (Şekil 4.6).



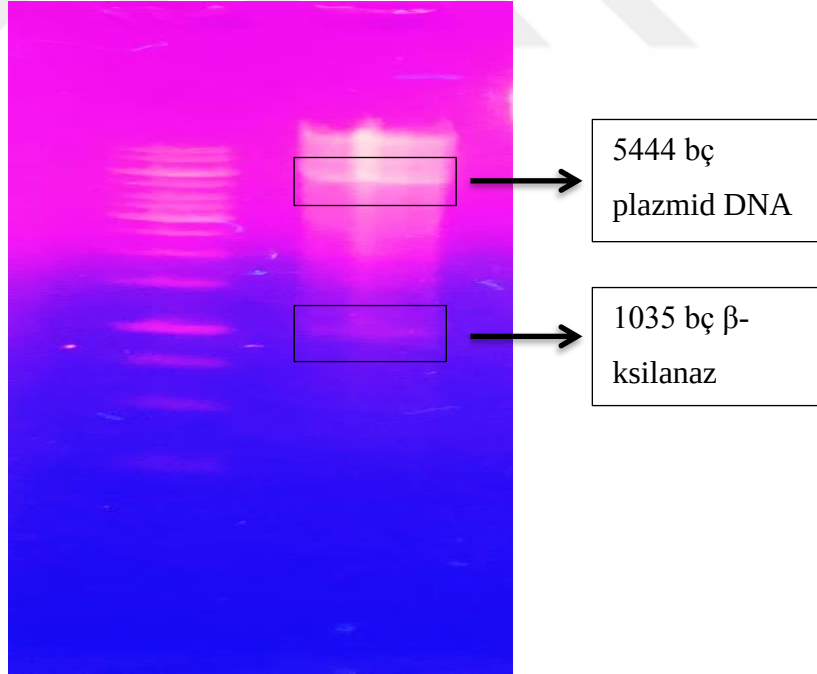
Şekil 4.6: Koloni PCR analizi.

4.5 Pozitif Klonlardan Rekombinant Plazmid İzolasyonu Analizi ve Restriksiyon Enzimiyle Kısıtlama Analizi

Rekombinant plazmid transforme edilmiş kolonilerden başarılı bir şekilde izole edildi. Ancak dimerleşmenin meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.7). İzole edilen plazmidin çift kısıtlama analizi (Şekil 4.8) *Hind*III ve *Nde*I restriksiyon enzimleriyle gerçekleştirildi.



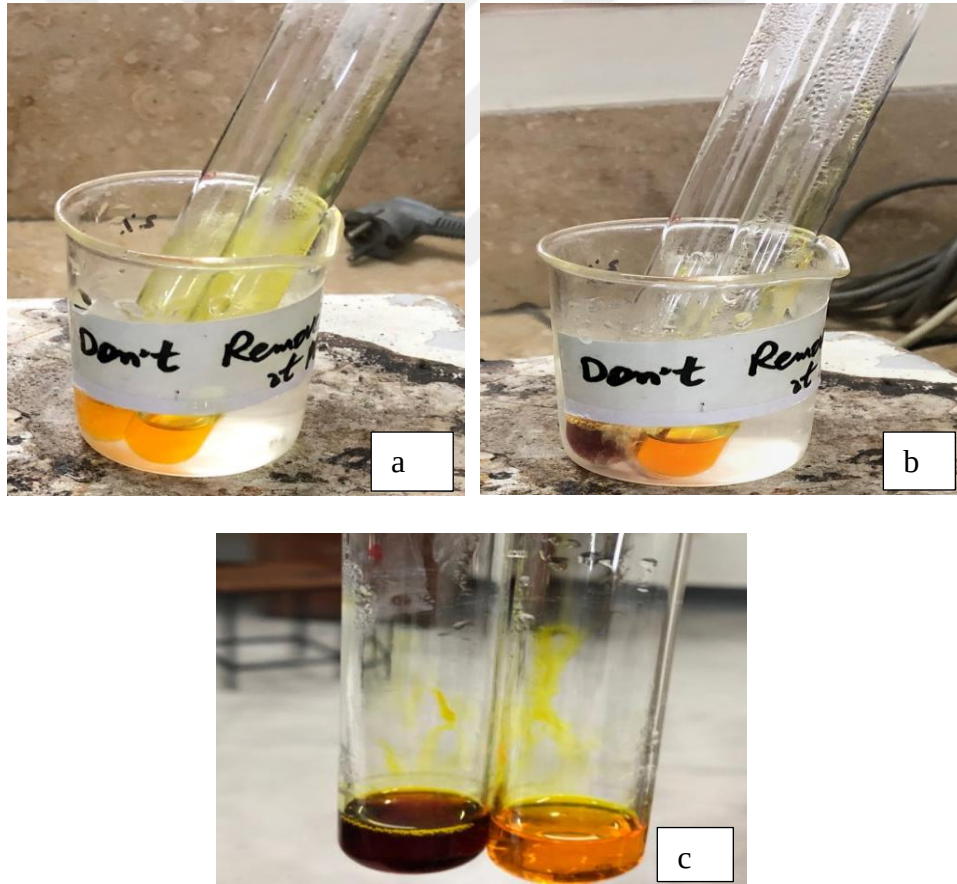
Şekil 4.7: Rekombinant plazmid DNA izolasyonu.



Şekil 4.8: Çift kısıtlama analizi sonucu.

4.6 Rekombinant Enzimin İfadesi

Rekombinant koloni ampisilin içerikli LB besiyerinde kültürlendikten sonra sonikasyon yapıldı ve santrifüjlendi. Klonlanan enzim çoğunlukla hücre içinde olduğundan dolayı intrasellüler enzimi açığa çıkartmak için sonikasyon yapıldı. Enzim etkisi sadece intrasellüler fraksiyonda gözlemlendi. IPTG'nin β -ksilanaz enzimi üretimde etkisi, IPTG'nin kültürel bakteriyle (*E.coli* BL21) birleşiminden sonra gözlemlendi. 0,5 mM IPTG kullanılarak enzim üretiminde istenilen sonuç elde edildi. pH 8.0 alınarak enzim üretiminde iyi bir sonuç elde edildi. Enzim aktivitesi, açığa çıkan şekerlerin DNS ile bağlanmasıyla ölçüldü (Şekil 4.9.a) Şeker içeriğinin DNS ile bağlanmasından sonra renk değiştiği gözlemlendi (Şekil 4.9.b) ve (Şekil 4.9.c). Enzim içeriğinin rengi turuncudan koyu kahverengiye dönüştüğü gözlemlendi.



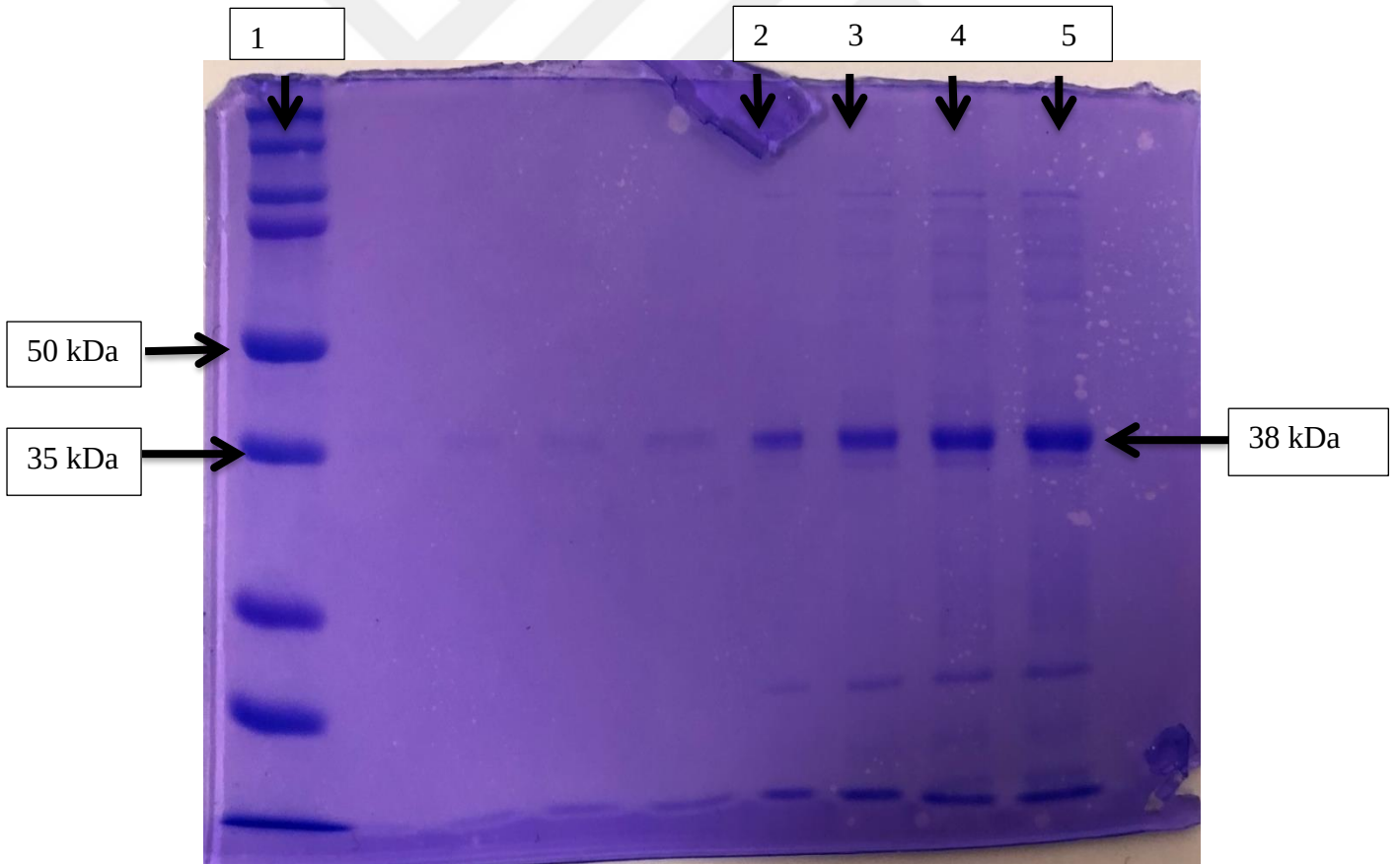
Şekil 4. 9: a) 80°C ısıya maruz bırakılan DNS içeren kontrol tüpü ve enzim tüpü içeriği b ve c) 80°C'de 10 dakika bekletilen DNS içereni kontrol tüpü ve enzim tüpü içeriği.

4.7 Rekombinant Enzimin Kısmi Saflaştırılması

β -ksilanaz enziminin kısmi saflaştırılması için ısıl yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem ile diğer konakçı *E.coli* bakterilerin uzaklaştırılması sağlandı. β -ksilanaz enzimi ısıya dayanıklı olduğu için zarar görmemiştir.

4.8 β -ksilanaz Enziminin Moleküler Kütle Tayini

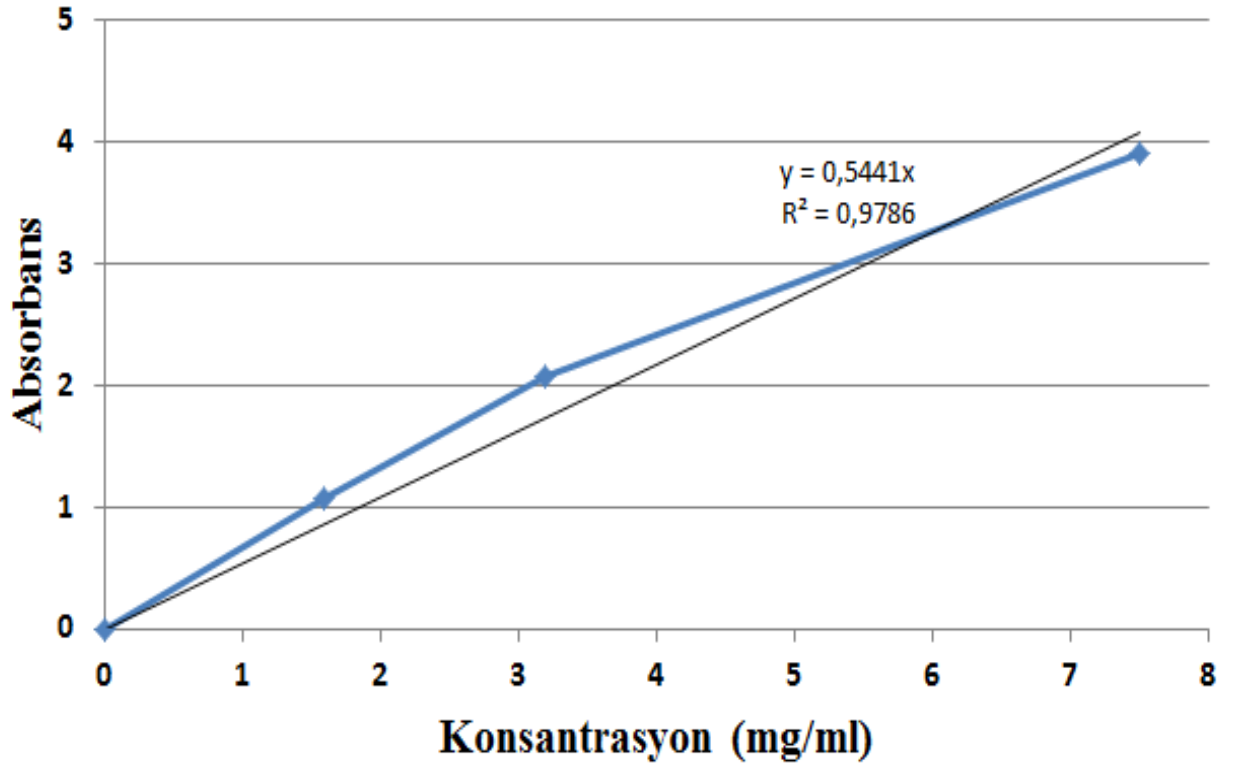
Saflaştırılmış β -ksilanaz enziminin moleküler kütle tayini SDS-PAGE kullanılarak gerçekleştirildi. Protein marker olarak Precision Plus Ladder (10-250 kDa) kullanıldı. Miktarları farklı 8 β -ksilanaz örneğinin moleküler kütlesi incelendi. Jel Brilliant Blue boya içeren boyama çözeltisi ile boyandıktan sonra protein örnekleri gözlemlendi. SDS-PAGE sonucunda 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l sıvı β -ksilanazların kütlesi 38 kDa olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10). Katı formdaki β -ksilanaz miktarlarında herhangi bir sonuç gözlemlenmedi.



Şekil 4.10: β -ksilanaz enzimi için SDS-PAGE. 1) protein marker 2) 5 μ l β -ksilanaz 3) 10 μ l β -ksilanaz 4) 15 μ l β -ksilanaz 5) 20 μ l β -ksilanaz.

4.9 Ön İşlem Görmüş Biyokütlelerin Sakkarifikasyonu

Farklı biyokütleler (Fındık koçanı, ormangülü dalı, ormangülü yaprakları) β -ksilanaz enzimiyle muamele edildikten sonra açığa çıkan şeker mikranının ölçülmesi amacıyla DNS kullanıldı. Spektrofotometrede 540 nm’de ölçülen fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı biyokütlelerin optik yoğunlukları sırasıyla 0,4604, 0,3796 ve 0,1962 olduğu görüldü. Glukozun farklı konsantrasyonlarıyla çizilen kalibrasyon grafiği sonucu biyokütlelerin şeker miktarı belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Farklı konsantrasyondaki glukoz ile hazırlanan kalibrasyon grafiği.

Kalibrasyon grafiğine göre biyokütlelerin şeker miktarı (Tablo 4.1)'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı biyokütlelerin şeker miktarları

	Absorbans (OD₅₄₀)	Konsantrasyon (mg/ml)
Fındık Koçanı	0,4604	0,8461
Ormangülü Dalı	0,3796	0,6976
Ormangülü Yaprığı	0,1962	0,3605

5. TARTIŞMA

Hemiselülozların enzimatik yollar ile gerçekleştirilen hidrolizi oldukça karmaşık bir süreçtir. Hidrolizi gerçekleştiren enzimler arasında β -ksilanaz enzimi önemli bir rol oynamaktadır. β -ksilanaz enzimi termofilik bir enzimdir. Termofilik enzimler yüksek sıcaklıklarda aktif olma yeteneklerinden dolayı pek çok biyoteknolojik uygulamalarda tercih edilmektedir (Frock vd., 2010).

Thermotoga naphthophila GH10 ailesinin bir üyesidir. Government College Üniversitesi'nde *Thermotoga naphthophila* termofilik organizmadan β -ksilanazın üretim aşaması gerçekleştirildi. Aynı üniversitede yapılan çalışmalarda *Thermotoga naphthophila* organizmasından elde edilen β -ksilanaz enziminin pH 7.0'de ve sıcaklığı 37°C'de maksimum aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Hamid ve Aftab, 2019).

Shi vd. (2013), *Thermotoga thermarum* organizmasından klonlanan β -ksilanaz enzimi *Escherichia coli* BL21 rekombinant suş tarafından ifade edilerek 95°C sıcaklığında ve pH 7.0'de en iyi şekilde aktif olduğunu ve buna ek olarak 5mM Ca^{2+} ilave edilmesiyle enzimin sıcaklık 55-90°C pH 4.0-8.5 aralığında olduğunu bildirmiştir.

Zverlov vd. (1996), *Thermotoga neapolitana* organizmasından ksilanaz A genini elde etmiştir. Ksialanaz genini *Escherichia coli*'de ifade etmişlerdir. Ksilanaz enziminin endo-1,4/3-ksilanaz görevi gördüğünü ve bu enzimin 102°C sıcaklığında pH 5.5 değerinde en yüksek aktiviteyi gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca ksilanazın 90°C'de stabil olduğunu ve 100°C'de 2 saat inkübe edildiğinde enzim aktivitesinde %50 azalma görülmüştür.

Simpson vd. (1991), endo-1,4-beta-ksilanaz enzimini *Thermotoga sp.*'den izole etmiştir. Saflaştırılan ksilanaz için en iyi aktivite pH 5.0-5.5 aralığında 80°C sıcaklığında olduğu bildirilmiştir. Sorbitol ve ksilan gibi maddelerin enzimin termal kararlılığını arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Genomik DNA'nın saflaştırılmasından sonra yapılan plazmid DNA saflaştırmasında beklenilmeyen bir sonuç elde edilmiştir. Agaroz jelde bakıldığında saflaşan plazmid DNA'sında dimer oluşumu görüldü. Bu dimer oluşumunun ortadan kaldırabilmek için

agaroz jelde görülen plazmid DNA'sı kesilerek tekrardan saflaştırıldı. Bu aşamadan sonra ise agaroz jel görüntüsünde istenilen sonuç elde edildi.

β -ksilanaz enzim geninin ifade edilmesi aşamasında 0,5 mM IPTG kullanıldı. IPTG β -ksilanaz gen ekspresyonunu arttırmak için kullanılan uyarıcıdır. Hamid ve Aftab (2019), IPTG uyarıcı maddesinin β -ksilanaz üzerindeki etkisini incelemişlerdir. IPTG konsantrasyonunu 0,1 mM ile 0,6 mM arasında *E.coli* BL21 kültür ortamında denemişlerdir. En iyi enzim aktivitesini 0,5 mM IPTG kullanarak bulmuşlardır. B-ksilanaz geninin optimal yükseklikte ifade edilmesi için IPTG veya başka bir uyarıcı madde eklenmesi beklenmektedir.

SDS-PAGE analiz aşaması Bartın Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. SDS-PAGE kullanılarak elde edilen β -ksilanazın moleküler kütlesinin 38 kDa olduğu hesaplandı. Enzimin kütle analizi sonucu diğer araştırılmalarda gözlemlenen sonuçlara benzer olduğu görülmektedir. Zhou vd. (2011), *Streptomyces sp.* organizmasından elde edilen GH 11 ailesi üyesi olan endo-1,4 β -ksilanaz enziminin moleküler kütle tayininin 34 kDa olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda bu enzimin gösterdiği en iyi aktivite 50°C sıcaklığında ve pH 7.0'de olduğunu bulmuşlardır. Benzer bir şekilde yapılan çalışmada Shi vd. (2014), *Thermotoga thermarum*'dan klonlanmış ve *Escherichia coli*'de ifade edilmiş endo-1,4- β -ksilanaz enziminin moleküler kütlesini 40 kDa olarak bulmuştur. Ayrıca bu enzimin maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığının 80°C, pH değerinin ise 6 olduğu bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmaya benzer bir şekilde 2012 yılında yapılan bir çalışmaya göre *Thermotoga petrophila*'dan klonlanmış ve *Escherichia coli*'de ifade edilmiş olan endo-1,4- β -ksilanaz enziminin SDS-PAGE üzerinde 40 kDa moleküler kütleyle karşılık geldiği belirtilmiştir. Ayrıca endo-1,4- β -ksilanaz enziminin 95°C sıcaklığında ve pH 6.0 değerlerinde maksimum aktiviteyi göstermiştir (ul Haq vd., 2012).

Lu vd. (2008), çalışmalarında *Aspergillus ficuum* AF-98'den klonlanan ksilanazın saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu araştırmışlardır. Saflaştırılmış ksilanaz enzimi SDS-PAGE kullanılarak 35,0 kDa'lık moleküler bir kütleyle sahip monomerik bir protein olduğunu bildirmiştir. Enzimin maksimum etki ettiği sıcaklık 45°C iken maksimum etki ettiği pH 5.0 olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda ksilanaz enziminin Cu²⁺ varlığında

aktivitesinin arttığı ve Hg^{2+} , Pb^{2+} varlığında aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir. Ko vd. (2010), yaptıkları çalışmada *Paenibacillus campinasesnsis* BL11 organizmasından termal olarak kararlı bir ksilanaz enzimi klonlanmış ve *Escherichia coli*'de ifade edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin belirlenen molekül ağırlığının 41 kDa olduğu gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada ksilanaz enziminin SDS-PAGE ile hesaplanan moleküler kütlesinin 2013 yılında yapılan bir çalışmayla aynı moleküler kütleye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada Dhanjoon vd. (2013), 38 kDa'lık moleküler kütleye sahip olan ksilanaz enziminin üretilmesi için termofilik bir organizma olan *Thermotoga hypogea*'yı kullanmışlardır.

Klonlama aşamasından sonra saflaştırılan β -ksilanaz enziminin en önemli özelliği yüksek sıcaklıklarda kararlı olmasıydı. Kararlı yapısından dolayı ksilanazların pek çok endüstriyel alanlarda ve protein mühendisliğinde kullanımı görülmektedir. Yapılan çalışmalarda çeşitli organizmalardan klonlanan β -ksilanaz enziminin aktivitesinin yüksek sıcaklıklarda olduğu görülmüştür.

β -ksilanaz enzimi *Thermotoga naphthophila* organizmasından klonlanıp *E.coli* BL21'de ifade edilmesinden sonra çeşitli biyokütlelerle muamele edilmeden önce biyokütleler ön işlem metodundan geçirildi. Biyokütleler içerdikleri yapılarından dolayı şeker üretimine engel olabilmektedir. Kullandığımız biyokütlelerin yapısında mevcut olan lignin şeker üretimini sınırlandırmaktadır. Bu yüzden lignin vb. istenilmeyen yapıların ortadan kaldırılması için biyokütleler ön işlem aşamasından geçirildi. Yapılan çalışmamızda ön işlem aşaması için asit-alkalin metodu kullanıldı.

Singh vd. (2015), mevcut olan diğer ön arıtma işlemleriyle asit-alkali ön arıtma yöntemini kıyaslamışlardır. Alkali ön işlem biyokütlerde var olan lignin yapısının giderilmesinde etkinliğinin çok yüksek olduğunu aynı zamanda selülozun sindirilebilirliğini arttırdığı vurgulanmıştır. Hoşgün vd. (2017), düşük sıcaklıkta NaOH ön muamelesini fındıktan etanol üretimi için kullanmıştır. Yaptıkları çalışmada biyokütleler NaOH muamelesinden sonra 72 saat boyunca 30°C'de inkübe edilmiştir. Bu işlem sonucunda lignin ve hemiselüloz giderimi sırasıyla %41,18 ve %37,79 olduğu bildirilmiştir.

Luo vd. (2014), çalışmasında pek çok ön arıtma yöntemlerini araştırmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada bu araştırmanın bir metodu kullanılarak ön işlem aşaması için NaOH ile biyokütle muamelesi 121°C’de 15 dakika otoklavlandı ve nötralizasyon için HCl kullanıldı. Ön muamele işleminde kullanılan alkalın reaktifleri biyokütle yapısından ligninin ayrılması için oldukça yüksek potansiyele sahiptir.

Arslan ve Saraçoğlu (2010), fındık kabuklarının ön muamelesi için çeşitli metodlar arasında etanol konsantrasyonuna ilişkin olarak en etkin ön işlem yönteminin NaOH ile muamelesinden sonra olacağını bildirmiştir. Çöpür vd. (2013), fındık kabuklarının biyoetanole dönüşmesi için çeşitli ön arıtma teknikleri kullanmıştır. En yüksek etanol verimini %2 NaOH ile 90 dk muamele ettiğinde görmüştür. Ön işlem aşamasında inhibisyona neden olan inhibitörlerin uzaklaştırılması esastır ve bu işlem fındık kabuklarının etanole dönüşmesi için anahtar faktördür.

Yapılan çalışmada ön işlem aşamasından sonra sakkarifiye edilecek olan fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı biyokütlelerin spektrofotometrede optik yoğunlukları ölçüldükten sonra ürettiği şeker miktarı hesaplandı. Standart olarak glukozun farklı miktardaki konstantrasyonları kullanıldı.

Hamid ve Aftab (2019) tarafından pirinç samanı, buğday samanı, talaş, yumuşak kana ve sert kana biyokütleleri β -ksilanaz enzimi ile muamele edildi ve sonra sakkarifiye edilerek biyokütlelerin ne kadar şeker ürettikleri incelendi. Salınan şeker miktarları sırasıyla 1,52 mg/ml, 3,2 mg/ml, 1,92 mg/ml, 2.96 mg/ml ve 1,16 mg/ml olarak bildirildi. Bizim çalışmamızdan farkı ise standart olarak ksiloz kullanmış olmalarıdır.

Çalışmamıza benzer bir şekilde Zafar vd. (2016), *Bacillus licheniformis* organizmasından elde ettikleri ksilanaz enzimini saman, pirinç samanı ve şeker kamışı substratları ile muamele etmişlerdir. Salınan şeker miktarının sırasıyla 1,95 mg/ml, 1,92 mg/ml, 2,20 mg/ml olduğu bildirildi. Şekerleme sürecinde üretilen şekeri belirlemek için kullanılan yöntem, çalışmamızda kullandığımız yöntemle aynıdır.

Çalışmamızda elde edilen şeker miktarları farklı biyokütlelerle veya aynı biyokütlelerle kıyaslandığında büyük bir fark yoktur. Diğer çalışmaların sonuçlarından farklı olmasının

sebebi totalde kullanılan metotların, enzimlerin ve substratların farklılığından kaynaklanmaktadır.

Hoşgün vd. (2017), selüloz enziminin ön işlem görmüş fındık kabuğu substratına karşı aktif olduğunu bildirmiştir. Ayrıca fındık kabuğundan salınan şekerin biyoetanol üretmek için çok verimli olduğuna değinmiştir. Çeşitli biyokütlelerin hidroliz aşamasının gerçekleştirilebilmesi için bu biyokütleleri hidrolize eden enzimlere ihtiyaç duyarlar. Yapılacak bu adım biyoyakıt üretimi için maliyet düşürücü bir adım olacaktır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Endüstriyel enzim üretimi aşamasında en çok tercih edilen özellik enzimlerin yüksek sıcaklıklara toleranslı olmasıdır. Bu tercihin nedeni enzimler genel olarak yüksek sıcaklıkların olduğu işlemlerde kullanılmaktadır. Başta termofilik enzimler olmak üzere yüksek sıcaklıklara tolerans gösteren enzimler ticari kullanım alanlarında çok tercih edilmektedir.

Enzim teknolojisine olan talebin giderek yükselmesi ve bununla birlikte enzimlerin kullanım alanlarının geniş yelpazeye sahip olması ve enzim üretim maliyetinin düşük olması nedeniyle endüstriyel enzimlerin kullanılması biyoteknolojinin gelişimi açısından oldukça önemlidir. Çeşitli termofilik enzimler arasında ksilanaz enzimleri endüstriyel alanda büyük bir öneme sahiptir. Fazla sayıda kullanım alanı bulunan ksilanaz enzimi için yapılan literatür araştırmalarında enzim üretimi ve saflaştırılması için çok sayıda araştırma olduğu gözlemlendi.

Türkiye akut enerji sıkıntısı çekmektedir. Enerji ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için fosil yakıtlarının zararlarından ötürü sürdürülebilir yakıtlara önem verilmektedir. Biyoetanol fosil yakıtların yerini alabilecek en iyi yakıt adayıdır. β -ksilanaz enziminin farklı biyokütlelerle ön muamelesi aşamasından sonra fermentasyon işlemi ile şeker üretimi ve daha sonra bazı uygulamalar sonucu elde edilmiş şekerlerden biyoetanol üretimi gerçekleştirilebileceği önerilmektedir.

Yapılan çalışmada termofilik bir organizma olan *Thermotoga naphthophila*'dan β -ksilanaz enzim geninin klonlanması, *Escherichia coli*'de ifade edilmesi ve enzim üretimi işlemi başarıyla gerçekleştirildi. Fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı lignoselülozik biyokütleleri β -ksilanaz enzimi için substrat olarak kullanıldı. B-ksilanaz enziminin fermente edilebilir şekerler üretmek için enzimatik hidrolizi gerçekleştirebilen etkili bir kaynak olduğu çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır.

Bu çalışmada β -ksilanazın moleküler kütle tayini SDS-PAGE kullanılarak yapıldı. Ksilanaz enziminin kütesinin 38 kDa olduğu belirlendi. Yapılan literatür araştırmalarında

farklı organizmalardan klonlanan β -ksilanaz enziminin moleküler kütlesinin çalışmamızdaki sonuca benzer olduğu gözlemlendi.

Yapılan çalışmada β -ksilanaz enzimi için substrat olarak kullanılan fındık koçanı, ormangülü dalı ve ormangülü yaprağı kullanıldı. Bu çalışmada, 540 nm spektrofotometre optik yoğunluğu ölçüldü ve kalibrasyon grafiği çizilerek şeker miktarı bilinmeyen biyokütlelerin saldığı şeker miktarları hesaplandı. Açığa çıkan şeker miktarı fındık koçanı 0,8461 mg/ml, ormangülü dalı 0,6976 mg/ml ve ormangülü yaprağı 0,3605 mg/ml olarak hesaplandı.

Fındık kabukları ve *Rhododendron* fermente edilebilir şekerler üretmek açısından oldukça yüksek verimliliğe sahiplerdir. Yapılan çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde β -ksilanaz enziminin termofilik özelliğe sahip olması ve kullandığımız substratların şeker salınımı gerçekleştirmesi sonucunda β -ksilanaz enziminin çeşitli endüstriyel işlemlerde kullanılabilmesi ve özellikle biyoyakıt endüstrisinde kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abu Tayeh H., Najami N., Dosoretz C., Tafesh A. ve Azaizeh H. (2014). Potential of bioethanol production from olive mill solid wastes. *Bioresource Technology*, 152, 24-30.
- Aehle, W. (2007). *Enzymes in Industry Production and Applications*. Ed.; Aehle, W; John Wiley&Sons.
- Akalın B. ve Seyrekbasan A. M. (2015). Dünyadaki biyoetanol politikalarının Türkiye koşulları ile karşılaştırmalı incelenmesi ve Türkiye şartlarına uygunluk açısından biyoetanol üretiminde kullanılan hammaddelerin değerlendirilmesi. *Journal of Agricultural Faculty of Uludağ University*, 29(1), 157-168.
- Akgül M. ve Çamlıbel O. (2008). Manufacture of medium density fiberboard (MDF) panels from *Rhododendron* (*R. Ponticum* L.) biomass. *Building and Environment*, 43(4), 438-443.
- Akoğlu A., Karahan A. G., Çakmakçı M. L. ve Çakır İ. (2010). Bakteriyel selülozun özellikleri ve gıda sanayisinde kullanımı. *Gıda*, 35(2), 127-134.
- Altun B., Çelik H., Gümüş H., Sağlam S., Eminağaoğlu Ö., Türet M., Yücel T. ve Kaya İ. T. (2016). Türkiye ormangülllerinin morfolojik özellikleri (*Rhododendron spp.*) ve doğal yayılış alanları. *Süs Bitkileri Kongresi Tam Metin Bildirileri Kitabı*, s. 62-72.
- Arslan Y. ve Saraçoğlu N. E. (2010). Effects of pretreatment methods for hazelnut Shell hydrolysate fermentation with *Pichia Stipitis* to ethanol. *Bioresource Technology*, 101, 8664-8670.
- Aydoğan H. ve Acaroğlu M. (2004). Biyoetanol-benzin karışımlarının taşıt performansı ve emisyonlarına etkisi. *Fuels and Combustion in Engineering Journal*, 2, 70-75.
- Bajpai P. (2014). Industrial Applications of xylanases. *Xylanolytic Enzymes*, 69-104.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(4), 353-368.
- Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. ve Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8(5), 548-557.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L. ve Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 326-338.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5), 355-383.

- Blanco, J., Coque, J. J. R., Velasco, J. ve Martin, J. F. (1997). Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of thermostable endo- β -1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* UL JB1 with cellulose-binding ability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 208-217.
- Boerjan, W., Ralph, J. ve Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519-546.
- Brown, R. M. (2003). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(3), 487-495.
- Chang, S., Guo, Y., Wu, B. ve He, B. (2017). Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E.coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 249-256.
- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P. ve Eurwilaichitr, L. (2006). Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 46(1), 143-149.
- Cherry, J. R. ve Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 438-443.
- Cohen, S.N., Chang, A. C. ve Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(8), 2110-2114.
- Collins, T., Gerday, C. ve Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3-23.
- Crous, J. M., Pretorius, I. S. ve van ZYL, W. H. (1995). Cloning and expression of an *Aspergillus kawachii* endo-1,4- β -xylanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 28(5), 467-473.
- Cunha M., Romani, A., Carvalho, M. ve Domingues, L. (2018). Boosting bioethanol production from Eucalyptus wood by whey incorporation. *Bioresource Technology*, 250, 256-264.
- Çakmak, U. ve Ertunga, N. S. (2016). Gene cloning, expression, immobilization and characterization of endo-xylanase from *Geobacillus* sp. TF16 and investigation of its industrial applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133, S288-S298.
- Çöpür, Y., Tozluoglu, A. ve Özkan, M. (2013). Evaluating pretreatment techniques for converting hazelnut husks to bioethanol. *Bioresource Technology*, 129, 182-190.
- Decelle, B., Tsang, A. ve Storms, R. (2004). Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4- β -xylanases. *Current Genetics*, 46(3), 166-175.

- Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. ve Cassidy, C. S. (2001). Enzymes from extremophiles. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(2), 144-151.
- Derman E., Abdullah R., Marbawi H. ve Sabullah M. K. (2018). Oil palm empty fruit bunches as a promising feedstock for bioethanol production in Malaysia. *Renewable Energy*, 129, 285-298.
- Dhanjoon, J., Ying, X., Salma, F. ve Ma, K. (2013). Characterization of a thermostable xylanase from the extremely thermophilic bacterium *Thermotoga hypogea*. *Current Biotechnology*, 2(4), 325-333.
- Dholpuria, S., Bajaj, B. K., Karri, S., Bhasin, A., Razdan, K., Gupta, N. ve Sethi, N. (2014). Production and purification of alkali stable xylanase from *Bacillus* sp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(3), 365-377.
- Dodd, D. ve Cann, I. K. O. (2009). Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, 1(1), 2-17.
- El Aty, A. A. A., Saleh, S. A., Eid, B. M., İbrahim, N. A. ve Mostafa, F. A. (2018). Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 129-137.
- Fatima, B., Aftab, M. N. ve Haq, I. (2016). Cloning, purification and characterization of xylose isomerase from *Thermotoga naphthophila* RKU-10. *Journal of Basic Microbiology*, 56(9), 949-962.
- Frock, A. D., Notey, J. S. ve Kelly, R. M. (2010). The genus *Thermotoga*: recent developments. *Environmental Technology*, 31(10), 1169-1181.
- Gibbs, D., Chamberlain, D. ve Argent, G. (2011). *The Red List of Rhododendrons*. Botanic Gardens Conservation International, İngiltere, 128 s.
- Godfrey, T. ve West, S. (1996). *Introduction to industrial enzymology: Industrial enzymology*. MacMillan Press, London, s. 1-8.
- Guo, B., Chen, X. L., Sun, C. Y., Zhou, B. C. ve Zhang, Y. Z. (2009). Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- β -1,4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6), 1107.
- Güney M, S. (2013). Utilization of hazelnut husk as biomass. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 4, 72-77.
- Hachem, M. A., Karlsson, E. N., Bartonek-Roxá, E., Raghothama, S., Simpson, P. J., Gilbert, H. J. ve Holst, O. (2000). Carbohydrate-binding modules from a thermostable *Rhodothermus marinus* xylanase: cloning, expression and binding studies. *Biochemical Journal*, 345(1), 53-60.

- Hamid, A. ve Aftab, M. N. (2019). Cloning, purification, and caharacterization of recombinant thermostable β -xylanase Tnap_0700 from *Thermotoga naphthophila*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 189(4), 1274-1290.
- Hatakeyama, H. ve Hatakeyama, T. (2009). Lignin structure, properties, and applications. *Advances in Polymer Science*, 1-63.
- Hoşgün E. Z., Berikten D., Kıvanç M. Ve Bozan B., (2017). Ethanol production from hazelnut shells through enzymatic saccharification and fermantion by low-temperature alkali pretreatment. *Fuel*, 196, 280-278.
- Jegannathan, K. R. ve Nielsen, P. H. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. *Journal of Cleaner Production*, 42, 228-240.
- Juturu, V. ve Wu, J. C. (2012). Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1219-1227.
- Kara, B. (2012). Çay Çalışı ve Ormangülünün Hızlı Pirolyzi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Trabzon, 45 s.
- Kang Q., Appels, L., Tan, T. ve Dewil, R. (2014). Bioethanol from lignocellulosic biomass: current findings determine research priorities. *The Scientific World Journal*, 1-14.
- Khalil S. R. A., Abdelhafez A. A. ve Amer E. A. M. (2015). Evaluation of bioethanol production from juice and bagasse of some sweet sorghum varieties. *Annals of Agricultural Sciences*, 60(2), 317-324.
- Kirk, O., Borchert, T. V. ve Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opibion in Biotechnology*, 13(4), 345-351.
- Ko, C. H., Tsai, C. H., Tu, J., Lee, H. Y., Ku, L. Y., Kuo, P. A. ve Lai, Y. K. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochemistry*, 45(10), 1638-1644.
- Kocabaş, A., Gümüştas, N. Ve Gönek, S. (2017). Topraktan ksilanaz üreten mikroorganizmaların taranması ve ksilanazın kısmi karakterizasyonu. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(2), 503-508.
- Krengel, U. ve Dijkstra, B. W. (1996). Three-dimensional structure of endo-1,4 β -xylanase | from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum. *Journal of Molecular Biology*, 263(1), 70-78.
- Kristjonson, J. K. ve Stetter K. O. (1991). Thermophilic Bacteria. Ed.; Kristjonsson J. K. CRC Pres, London, 1-13.
- Lam M. K. ve Lee K. T., (2015). Handbook of marine microalgae, Chapter 12. *Bioethanol production from microalgae*, Academic Press, s. 197-208.

- Lapidot, A., Mechaly, A. ve Shooham, Y. (1996). Overexpression and single-step purification of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Journal of Biotechnology*, 51(3), 259-264.
- Latif, F., Asgher, M., Saleem, R., Akrem, A. ve Legge, R. L. (2006). Purification and characterization of a xylanase produced by *Chaetomium thermophile* NIBGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1), 45-50.
- Lee, H. J., Shin, D. J., Cho, N. C., Kim, H. O., Shin, S. Y., Im, S. Y. ve Bai, S. (2000). Cloning, expression and nucleotide sequences of two xylanase genes from *Paenibacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 22(5), 387-392.
- Li, N., Meng, K., Wang, Y., Shi, P., Luo, H., Bai, Y. ve Yao, B. (2008). Cloning, expression and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(2), 231.
- Li, N., Yang, P., Wang, Y., Luo, H., Meng, K., Wu, N. ve Yao, B. (2008). Cloning, expression, and characterization of protease-resistant xylanase from *Streptomyces fradiae* var.k11. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 410-416.
- Lu, F., Lu, M., Lu, Z., Bie, X., Zhao, H. ve Wang, Y. (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology*, 99(13), 5938-5941.
- Luo, H., Wang, Y., Li, J., Wang, H., Yang, J., Yang, Y. ve Yao, B. (2009). Cloning, expression and characterization of a novel acidic xylanase, XYL11B, from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 126-133.
- Luo, J., Fang, Z. ve Smith Jr, R. L. (2014). Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 41, 56-93.
- Lüthi, E., Jasmat, N. B. ve Bergquist, P. L. (1990). Xylanase from the extremely thermophilic bacterium “*Caldocellum saccharolyticum*”: overexpression of the gene in *Escherichia coli* and characterization of the gene product. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2677-2683.
- Mançuhan, C. (2006). Yakma yerine neden gazlaştırma ? *Su ve Çevre Teknolojileri Dergisi*, (6).
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mohanty, S. K. ve Swain, M. R. (2019). *Bioethanol Production From Corn And Wheat: Food, Fuel And Future. In Bioethanol Production From Food Crops*. Academic Press, 59 s.
- Mondou, F., Shareck, F., Morosoli, R. ve Kluepfel, D. (1986). Cloning of the xylanase gene of *Streptomyces lividans*. *Gene*, 49(3), 323-329.

- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J. ve Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3941.
- Moshi, A. P., Nyandele, J. P., Ndossi, H. P., Eva, S. M. ve Hosea, K. M. (2015). Feasibility of bioethanol production from tubers of *Dioscorea sansibarensis* and *Pyrenacantha kaurabassana*. *Bioresource Technology*, 196, 613-620.
- Özbucak T. B., Türkiş S. Ve Çakmak A., (2009). Ordu çevresinde yayılış gösteren bazı *rhododendron* türleri üzerine ekolojik bir çalışma. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2(2): 71-77.
- Padilla-Hurtado, B., Flórez-Ramos, C., Aguilera-Gálvez, C., Medina-Olaya, J., Ramírez-Sanjuan, A., Rubío-Gómez, J. ve Acuña-Zornosa, R. (2012). Cloning and expression of an endo-1,4- β -xylanase from coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *BMC Research Notes*, 5(1), 23.
- Patel, V. R. (2017). Cost-effective sequential biogas and bioethanol production from the cotton stem waste. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 335-345.
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A. ve Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238(4), 627-642.
- Phitsuwan P., Sakka K. ve Ratanakhanokchai K., (2016). Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, 218, 247-256.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. ve Anorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591.
- Rani, S. ve Nand, K. (1996). Development of cellulase-free xylanase-producing anaerobic consortia for use the use of lignocellulosic wastes. *Enzyme and Microbial Technology* 18(1), 23-28.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L. ve Tanticharoen, M. (1999). Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. *Applied Microbiology*, 65(2), 694-697.
- Rennie, E. A. ve Scheller, H. V. (2014). Xylan biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 100-1007.
- RFA (Renewable Fuels Association) (2021). Annual World fuel ethanol production, <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/> (15.04.2021).
- Ruanglek, V., Sriprang, R., Ratanaphan, N., Tirawongsaroj, P., Chantasigh, D., Tanapongpipat, S. ve Eurwilaichitr, L. (2007). Cloning, expression, characterization and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1-2), 19-25.

- Ryu, D. D. Y. ve Mandels, M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2 (2), 91-102.
- Sahoo, D., Ummalyma, S. B., Okram, A. K., Sukumaran, R. K., George, E. ve Pandey, A. (2017). Potential of *Brachiaria mutica* (Para grass) for bioethanol production from Loktat Lake. *Bioresource Technology*, 242, 133-138.
- Sambrook, J. Ve Russell, D. W. (2006). Preparation and transformation of competent *E.coli* using calcium chloride. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot3932.
- Saravanan K., Duraisamy S., Ramasamy G., Kumarasamy A. ve Balakrishnan S., (2018). Evaluation of the saccharification and fermentation process of two different seaweeds for an ecofriendly bioethanol production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 444-449.
- Scheller, H. V. ve Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263-289.
- Sedlmeyer, F.B. (2011). Xylan as by-product of biorefineries: Characteristics and potential use for food applications. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1891-1898.
- Sewsynker-Sukai Y. ve Kana E. B. G., (2018). Simultaneous saccharification and bioethanol production from corn cobs: Process optimization and kinetic studies. *Bioresource Technology*, 262, 32-41.
- Sharma, P. K. ve Chand, D. (2012). Purification and characterization of thermostable cellulase free xylanase from *Pseudomonas* sp. XPB-6. *Advances in Microbiology*, 2(01), 17.
- Shi, H., Zhang, Y., Li, X., Huang, Y., Wang, L., Wang, Y. ve Wang, F. (2013). A novel highly thermostable xylanase stimulated by Ca^{2+} from *Thermotoga thermarum*: cloning, expression and characterization. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 26.
- Shi, H., Zhang, Y., Zhong, H., Huang, Y., Li, X. ve Wang, F. (2014). Cloning over-expression and characterization of a thermo-tolerant xylanase from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnology Letters*, 36(3), 587-593.
- Simpson H. D., Haufler, U. R. ve Daniel, R. M. (1991). An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochemical Journal*, 277(2), 413-417.
- Singh, S., Bissoon, S., ve Christov, L. (2002). Evaluation of the bleach-enhancing effect of xylanases on bagasse pulp. Vol. 21, *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* Press, Elsevier Science, pp. 247-254.
- Singh, J., Suhag, M. ve Dhaka, A. (2015). Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. *Carbohydrate Polymers*, 117, 624-631.

- Sun Y. ve Cheng J., (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.
- Swain M. R., Singh A., Sharma A. K. ve Tuli D. K. (2019). Bioethanol production from food crops, Chapter 11. *Bioethanol Production From Rice-And Wheat Straw: An Overview*. Academic Press, pp. 213-231.
- Takahata, Y., Nishijima, M., Hoaki, T. ve Maruyama, T. (2001). *Thermotoga petrophila* sp. Nov. and *Thermotoga naphthophila* sp. Nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(5), 1901-1909.
- Tolan, J. S. ve Popovici, C. (2002). Mill usage and mechanistic studies of xylanase to enhance bleaching. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. Vol.21. Elsevier, 247-254.
- Topal, Ş. (1985). Enzimler, Mikrobiyolojik Yolla Enzim Üretimi Ve Bu Teknolojide Renni'nin Yeri. Tubitak Marmara Araştırma Enstitüsü, Gebze/Kocaeli, 26 s.
- Ul Haq, I., Hussain, Z., Khan, M. A., Muneer, B., Afzal, S., Majeed, S. ve Akram, F. (2012). Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1,4- β -xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host. *Molecular Biology Reports*, 39(7), 7251-7261.
- URL-1 (2020). <https://www.fishersci.no/shop/products/fermentas-o-generuler-ready-to-use-1kb-dna-ladder/11551615>, (29.03.2020).
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. ve Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, 153(3), 895-905.
- Verma, D. ve Satyanarayana T. (2012). Cloning, expression and applicability of thermo-alkali-stable xylanase of *Geobacillus thermoleovorans* in generating xylooligosaccharides from agro-residues. *Bioresource Technology*, 107, 333-338.
- Verma, D., Kawarabayasi, Y., Miyazaki, K. ve Satyanarayana, T. (2013). Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (mxyl) retrieved from compost-soil metagenome. *PLoS One*, 8(1), 1-8.
- Wainø, M. ve Ingvorsen, K. (2003). Production of β -xylanase and β -xylosidase by extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7(2), 87-93.
- Wang, X. (2009). Photoprotective strategies in overwintering *Rhododendrons*.
- Wang, Y., Zhang, H., He, Y., Luo, H. ve Yao, B. (2007). Characterization, gene cloning, and expression of a novel xylanase XYNB from *Streptomyces olivaceoviridis* A1. *Aquaculture*, 1(267), 328-334.
- Whistler, R. L. ve Richards, E. L., (1970). Hemicelluloses. *The Carbohydrates-Chemistry and Biochemistry*, 2, 447-469.

- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L. ve Saddler, J. N., (1988). Multiplicity of β - 1,4 xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*, 52(3), 305-317.
- Woodley, J. M. (2000). Advances in biochemical engineering/biotechnology. *Advances in Enzyme Technology-UK Contributions*, Ed.; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s. 94-107.
- Yeğin, S. ve Büyükkilleci, A. O. (2015). Mikrobiyok ksilanazlar ve gıda endüstrisinde kullanım alanları. *ANadamiN Gıda*, 13(4), 317-326.
- Yıldırım N. (2018). Nanoteknoloji ve geleceğin çevreci polimeri nanoselüloz. *Ormancılık Araştırma Dergisi*, 5:2 185-195.
- York, W. ve Oneill, M. (2008). Biochemical control of xylan biosynthesis- which end is up ? *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 258-265.
- Zafar, A., Aftab, M. N., ud Din, Z., Aftab, S., Iqbal, I., Shahid, A. ve ul Haq, I. (2016). Cloning, expression and purification of xylanase gene from *Bacillus licheniformis* for use in saccharification of plant biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(2), 294-311.
- Zhou, J., Shi, P., Zhang, R., Huang, H., Meng, K., Yang, P. ve Yao, B. (2011). Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119 GH 11 xylanase: a new pH-stable, protease-and SDS-resistant xylanase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(4), 523-530.
- Zverlov, V., Piotukh, K., Dakhova, O., Velikodvorskaya, G. ve Borriss, R. (1996). The multidomain xylanase A of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is extremely thermoresistant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45(1-2), 245-247.

ÖZGEÇMİŞ



