



**T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

***Jiangella alba* TARAFINDAN ÜRETİLEN BETA-GLUKOZİDAZ,  
BETA-KSİLOZİDAZ VE ALFA-L-ARABİNOFURANOZİDAZ  
ENZİMLERİNİN KİSMİ KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

**Zeynep Gül AYTAS**

Danışman  
**Dr. Öğr. Üyesi ALİ OSMAN ADIGÜZEL**

SAMSUN  
2022

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI



***Jiangella alba* TARAFINDAN ÜRETİLEN BETA-GLUKOZİDAZ,  
BETA-KSİLOZİDAZ VE ALFA-L-ARABİNOFURANOZİDAZ  
ENZİMLERİNİN KISMİ KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

**Zeynep Gül AYTAŞ**

Danışman

**Dr. Öğr. Üyesi ALİ OSMAN ADIGÜZEL**

SAMSUN  
2022

## TEZ KABUL VE ONAYI

Zeynep Gül AYTAŞ tarafından, Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL danışmanlığında hazırlanan “*Jiangella alba* tarafından üretilen beta-glukozidaz, beta-ksilozidaz ve alfa-L-arabinofuranozidaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 14.2.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Mehmet Ali MAZMANCI Mersin Üniversitesi Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Münir TUNÇER Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye (Danışman)	Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY  
... / ... / ...  
Prof. Dr. Ali BOLAT  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet  (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

İmza

.../.../.....

Zeynep Gül AYTAŞ

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı :** *Jiangella alba* tarafından üretilen beta-glukozidaz, beta-ksilozidaz ve alfa-L-arabinofuranozidaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonu

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 14.01.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : %10

Tek kaynak oranı : %2 çıkmıştır.

İmza

... /... / 20...

Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL

## ÖZET

### *Jiangella alba* TARAFINDAN ÜRETİLEN BETA-GLUKOZİDAZ, BETA-KSİLOZİDAZ VE ALFA-L-ARABİNOFURANOZİDAZ ENZİMLERİNİN KİSİMİ KARAKTERİZASYONU

Zeynep Gül AYTAS

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Şubat/2022

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL

Çalışmada *Jiangella alba*'ya ait  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin kısmi saflaştırılmaları ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Literatür araştırmasında *J. alba* ekstraselüler selülaz ve hemiselülaz enzimlerine ait bir çalışma bulunmamaktadır.

Amonyum sülfat çöktürme ile kısmi saflaştırılmış olan enzimlerin optimum sıcaklıkları 40 °C, optimum pH değerleri 8 olarak tespit edilmiştir.  $\beta$ -glukozidaz'ın %2,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın %1 NaCl oranlarında %100 görece aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, enzimlerin %10 oranında NaCl varlığında dahi enzim aktivitesinin %50'den fazlasını koruduğu ve NaCl varlığında ( $\leq$  %12) 1 saat süresince oldukça kararlı kalabildiği gözlemlenmiştir.  $\beta$ -glukozidaz enzimi için elde edilen ölçüm sonuçlarına göre  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$ 'in enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. Tween 20, triton X-100,  $\beta$ -merkaptotanol ve EDTA'nın enzim aktivitesinde artışa neden oldukları tespit edilmiştir. Reaksiyon karışımında aseton ve kloroformun bulunması  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sebep olmamıştır. Ancak deney sonuçlarına göre bütanol varlığında enzimin kısmen inhibe olduğu görülmüştür. Lignoselüloz türevli inhibitörlerden vanilik asitin enzim aktivitesini %9.5 arttırdığı belirlenmiştir.  $\beta$ -ksilozidaz görece aktivitesinin  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  ile önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Kimyasalların ise  $\beta$ -ksilozidaz aktivitesi üzerinde anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Ancak organik çözücülerin enzim aktivitesinde azalmaya neden olduğu kaydedilmiştir. Lignoselüloz türevli inhibitörler ise  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece aktivitesini %30'a kadar arttırmıştır.  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın karakterizasyonu sonucunda ise  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  iyonlarının enzimin görece aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. Kimyasallar açısından tween 20, triton X-100,  $\beta$ -merkaptotanol ve EDTA'nın; çözücülerden ise DMSO, kloroform, izopropanol ve bütanolün  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın görece aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Son olarak, *J. alba* ekstraselüler enzim karışımı (20 mg) kullanılarak ön-muamele edilmiş buğday samanının hidrolizi gerçekleştirilmiş ve 1 g kuru substrat için yaklaşık 160 mg indirgenmiş şeker açığa çıkarılmıştır. Hidroliz sonrasında kalan saman parçaları steryo ve elektron mikroskopları altında görüntülenmiştir. Elde edilen hidroliz ürünleri ise ince tabaka kromatografisi ile belirlenmiştir.

Sonuçta, *J. alba* ile üretilen  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin ve ekstraselüler enzim karışımının biyoetanol üretiminde kullanım potansiyeli olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Biyoetanol, *Jiangella alba*, Karakterizasyon,  $\beta$ -ksilozidaz,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz,  $\beta$ -glukozidaz.

## ABSTRACT

### PARTIAL CHARACTERIZATION OF BETA-GLUCOSIDASE, BETA-XYLOSIDASE AND ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDASE ENZYMES

PRODUCED BY *Jiangella alba*

Zeynep Gül AYTAS

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Biology and Genetic

Master, February/2022

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ali Osman ADIGÜZEL

In the study, the isolation and characterization of the  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase enzymes belonging to *Jiangella alba* were performed. The activity has been tested of enzymes in the presence of metal ions, chemicals, solvents and lignoselulous derivative inhibitors. In the pretreatment stage of bioethanol production, phenolic and acidic compounds are released that can have an inhibitory effect on the enzymes involved in the hydrolysis step. In the study performed, lignoselulose derivative inhibitors have been tested for effects on enzyme activity. There is no study of *J. alba* extracellular cellulase and hemicellulase enzymes. The optimum temperature of the enzymes was found to be 40 °C, and the optimum pH were 8. According to the measurement results obtained for the  $\beta$ -glucosidase enzyme, it was observed that  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  significantly increased the enzyme activity. The presence of acetone and chloroform in the reaction mixture did not have a significant effect on the relative activity of  $\beta$ -glucosidase. However, according to the test results, it was observed that the enzyme was partially inhibited in the presence of butanol. It was determined that vanillic acid, one of the lignocellulose-derived inhibitors, increased the enzyme activity by 9.5%. However, it was observed that  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  significantly increased the  $\beta$ -xylosidase activity. It has been seen in the experimental results that chemicals and solvents do not have an enhancing effect on the enzyme activity and lignocellulose-derived inhibitors increase the activity up to approximately 30%.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  metal ions significantly increase the activity of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase. Tween 20 causes a relative increase on the enzyme activity of triton X-100,  $\beta$ -mercaptoethanol and EDTA. DMSO, chloroform, isopropanol and butanol increase the relative activity of the enzyme. In the presence of DMSO, chloroform, isopropanol and butanol, it was determined that the relative activity of the enzyme increased at a high rate. Finally, hydrolysis of pretreated wheat straw was performed using *J. alba* extracellular enzyme mixture (20 mg). About 160 mg of reduced sugar is released per 1 g of dry substrate. Straw pieces remaining after hydrolysis were visualized under stereo and electron microscopes. The obtained hydrolysis products were determined by thin layer chromatography.

According to the results obtained in the study, it was seen that  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase enzymes have potential to be used in the bioethanol production industry.

**Keywords:** Bioethanol, Characterization, *Jiangella alba*,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\beta$ -glukosidase,  $\beta$ -xylosidase

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisan eğitimim boyunca bilgisi, tecrübesi, fedakarlığı ve anlayışı ile bana destek olan; her ihtiyacım olduğunda elinden geleni yapan, bana sabırla yardımcı olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL'e,

Değerli zamanlarını ayırarak tezimin jürisine katıldıkları, tezi geliştirici fikir ve önerilerini sundukları için Prof. Dr. Mehmet Ali MAZMANCI ve Prof. Dr. Münir TUNÇER'e

Yüksek lisans eğitimimde bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK'a,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca gerekli tüm imkanları bana sunduğu için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji ve Araştırma Merkezi'ne ve ihtiyacım olan her konuda yardımcı olan Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM'a,

Tez çalışmamın konusunu oluşturan *Jiangella alba*'nın temin edilmesini sağlayan ve her ihtiyacım olduğunda yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Hayrettin SAYGIN'a ve Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN'e,

Deney çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, iyi günümde ve kötü günümde benimle olan; zamanından, sabrından ve kendi hayatından fedakarlık ederek bana vakit ayıran; aynı ümitleri beslediğimiz ve aynı yolu yürüdüğümüz sevgili arkadaşlarım Çağrı Seda KUL, Nurayan AYDIN ve Sümeyye CİLMELİ'ye,

Bütün hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle sırtımdaki tüm yükü üstlenen, bilgileriyle ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutan, her düştüğümde elimden tutup kaldıran ve sevgilerini esirgemeyen annem Emine AYTAŞ'a ve babam Recep AYTAŞ'a

Teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep Gül AYTAŞ

# İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI .....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Tezin Amacı .....	2
<b>2. LİTERATÜR TARAMASI .....</b>	<b>4</b>
2.1. Biyokütle Enerjisi.....	4
2.2. Biyoetanol .....	4
2.3. Biyokütle Çeşitleri .....	5
2.4. Lignoselülozik Biyokütle .....	6
2.4.1. Lignin .....	7
2.4.2. Selüloz.....	9
2.4.3. Hemiselüloz .....	10
2.5. Hidroliz Yöntemi .....	10
2.6. Hidroliz Enzimleri.....	10
2.6.1. Selülaz.....	10
2.6.2. $\beta$ -Ksilozidaz .....	14
2.6.3. $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz.....	15
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>18</b>
3.1. Materyal .....	18
3.1.1. Kullanılan Gereçler .....	18
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar .....	19
3.1.3. <i>Jiangella alba</i> 'nın Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri .....	19
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler, Tamponlar ve Standartlar .....	20
3.1.5. SDS-PAGE Jelleri.....	24
3.1.6. Metal İyonları, İnhibitörler ve Çözücüler .....	25
3.2. Metot .....	26
3.2.1. Bakteri Kültürünün Üretilmesi.....	26
3.2.2. <i>J. alba</i> Kültüründen Enzimlerin Geri Kazanımı .....	27

3.2.3. Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	31
3.2.4. Enzim Karakterizasyonu .....	33
3.2.5. Hidroliz .....	35
3.2.6. İnce Tabaka Kromatografisi.....	36
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>37</b>
4.1. <i>J. alba</i> Kültürünün Üretilmesi.....	37
4.2. Enzimlerin Kısmi Saflaştırılmaları.....	38
4.3. Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -Glukozidaz'ın Biyokimyasal Özellikleri .....	39
4.3.1. Sıcaklığın $\beta$ -Glukozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	39
4.3.2. Sıcaklığın $\beta$ -Glukozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi.....	41
4.3.3. pH'nın $\beta$ -Glukozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	42
4.3.4. pH'nın $\beta$ -Glukozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi.....	44
4.3.5. NaCl'ün $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	45
4.3.6. NaCl'ün $\beta$ -Glukozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi .....	46
4.3.7. Metal İyonlarının $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	46
4.3.8. Kimyasalların $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	47
4.3.9. Çözücülerin $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	48
4.3.10. Lignoselüloz Türevli İnhibitörlerin $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	49
4.4. Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -Ksilozidaz'ın Biyokimyasal Özellikleri.....	51
4.4.1. Sıcaklığın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	51
4.4.2. Sıcaklığın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi.....	52
4.4.3. pH'nın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	53
4.4.4. pH'nın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi.....	54
4.4.5. NaCl'ün $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	55
4.4.6. NaCl'ün $\beta$ -Ksilozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi.....	56
4.4.7. Metal İyonları'nın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	57
4.4.8. Kimyasalların $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	58
4.4.9. Çözücülerin $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	59
4.4.10. Lignoselülozik Türevli İnhibitörlerin $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	60
4.5. Kısmi Saflaştırılmış $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Biyokimyasal Özellikleri .....	61
4.5.1. Sıcaklığın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	61
4.5.2. Sıcaklığın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi .....	62
4.5.3. pH'nın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	64
4.5.4. pH'nın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi .....	65
4.5.5. NaCl'ün $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	66

4.5.6. NaCl'ün $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi .....	67
4.5.7. Metal İyonlarının $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi ..	67
4.5.8. Kimyasalların $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	69
4.5.9. Çözücülerin $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi .....	70
4.5.10. Lignoselülozik Türevli İnhibitörlerin $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	71
4.6. Hidroliz .....	72
4.7. SEM Görüntüleme .....	75
4.8. Hidroliz Ürünlerinin TLC ile Görüntülenmesi.....	77
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKÇA.....</b>	<b>84</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>%</b>	:Yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>APS</b>	: Amonyum persülfat
<b>BSA</b>	: Bovin serum albumini
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>CMC</b>	: Karboksimetilselülaz
<b>dk</b>	:Dakika
<b>DMSO</b>	:Dimetil sülfoksit
<b>DNS</b>	: Dinitrosalisilik asit
<b>E</b>	: Enzim
<b>EDTA</b>	: Etilen diamino tetra asetik asit
<b>ES</b>	: Enzim substrat kompleksi
<b>EtOH</b>	: Etanol
<b>FDA</b>	:Amerikan gıda ve ilaç dairesi (Food and drug administration)
<b>FTIR</b>	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
<b>g</b>	:Gram
<b>g</b>	:Dakikada devir sayısı (gravite)
<b>kcal</b>	: Kilokalori
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>Kw</b>	: Kilowatt
<b>L</b>	: Litre
<b>LM</b>	: lignoselülozik materyal
<b>m</b>	: Metre
<b>M</b>	: Molarite
<b>m<sup>3</sup></b>	: Metreküp
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>MWCO</b>	: Moleküler ağırlık sınırı (Molecular weight cut off)
<b>N</b>	: Normalite
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid jel elektroforezi

<b>pH</b>	: Aktüel asitlik (Power of Hydrogen)
<b>PMSF</b>	: Fenilmetil sülfonil florid
<b><i>p</i>-NP</b>	: <i>p</i> -nitrofenol
<b><i>p</i>-NPAF</b>	: <i>p</i> -nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinopiranozoid
<b><i>p</i>-NPGP</b>	: <i>p</i> -nitrofenol-D-glukopiranozoid
<b><i>p</i>-NPXP</b>	: <i>p</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-ksilopiranozoid
<b>psi</b>	: Basınç ölçü birimi (Pounds per square inch)
<b>R<sup>2</sup></b>	: Determinasyon katsayısı
<b>rpm</b>	: Dakikada devir sayısı (revolutions per minute)
<b>sa</b>	: Saat
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>sp.</b>	: Tür
<b>TLC</b>	: Thin layer chromatography
<b>w/v</b>	: Birim hacimdeki kütle
<b>w/w</b>	: Ağırlıkça oran
<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b><math>\beta</math></b>	: Beta

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Biyoetanol üretim basamakları .....	5
Şekil 2.2. Lignoselülozik biyokütlenin yapısı ve içeriği.....	7
Şekil 2.3. Ligninin yapı taşları.....	8
Şekil 2.4. Selülobiyoz molekülünün kimyasal yapısı .....	9
Şekil 2.5. $\beta$ -glukoazidaz'ın etki mekanizması .....	12
Şekil 2.6. $\beta$ -ksilosidazlar tarafından hemiselüloz bozunmasının şematik gösterimi.....	14
Şekil 3.1. Ultrafiltrasyonun uygulaması .....	28
Şekil 3.2. Amonyum sülfatla çöktürme deneylerinin yapılışı.....	29
Şekil 3.3. Protein standartı tablosu ( $\mu\text{g/mL}$ ).....	30
Şekil 3.4. <i>p</i> -NP standartı ( $\mu\text{mol}$ ).....	32
Şekil 4.1. <i>J. alba</i> 'ya ait görüntüler.....	37
Şekil 4.2. Enzim aktivitesi ölçüm deneylerinde reaksiyon karışımlarının farklı sürelerde inkübe edilmelerine bağlı olarak enzimlerin her bir dakikada substrattan salınımına neden olduğu <i>p</i> -NP miktarı.....	38
Şekil 4.3. Farklı fraksiyonlardaki enzimlerin özgül aktivitelerinin ham enzime göre %değişimlerini gösteren grafik.....	39
Şekil 4.4. Farklı fraksiyonlardaki protein profillerinin SDS-PAGE ile gösterilmesi.....	39
Şekil 4.5. Sıcaklığın $\beta$ -glukoazidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	40
Şekil 4.6. Sıcaklığın $\beta$ -glukoazidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.....	42
Şekil 4.7. pH'nın $\beta$ -glukoazidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	43
Şekil 4.8. pH'nın $\beta$ -glukoazidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.....	44
Şekil 4.9. NaCl konsantrasyonunun $\beta$ -glukoazidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	45
Şekil 4.10. NaCl konsantrasyonunun $\beta$ -glukoazidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi .....	46
Şekil 4.11. Metal iyonlarının (1 mM) $\beta$ -glukoazidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	47
Şekil 4.12. Kimyasalların (%1) $\beta$ -glukoazidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	48
Şekil 4.13. Çözücülerin (%10) $\beta$ -glukoazidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. ....	49
Şekil 4.14. Lignoselüloz türevli inhibitörlerin (%1) $\beta$ -glukoazidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	50
Şekil 4.15. Sıcaklığın $\beta$ -ksilosidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi .....	51
Şekil 4.16. Sıcaklığın $\beta$ -ksilosidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi. ....	53
Şekil 4.17. pH'nın $\beta$ -ksilosidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. ....	54
Şekil 4.18. pH'nın $\beta$ -ksilosidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi. ....	55
Şekil 4.19. NaCl konsantrasyonunun $\beta$ -ksilosidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	56
Şekil 4.20. NaCl konsantrasyonunun $\beta$ -ksilosidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.....	57
Şekil 4.21. Metal iyonlarının (1 mM) $\beta$ -ksilosidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi .....	58

Şekil 4.22. Kimyasalların (%1) $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	59
Şekil 4.23. Çözücülerin (%10) $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	60
Şekil 4.24. Lignoselüloz türevli inhibitörlerin (%1) $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi .....	61
Şekil 4.25. Sıcaklığın $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	62
Şekil 4.26. Sıcaklığın $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.....	63
Şekil 4.27. pH'nın $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	64
Şekil 4.28. pH'nın $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi. ....	65
Şekil 4.29. NaCl konsantrasyonunun $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi .....	66
Şekil 4.30. NaCl konsantrasyonunun $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi .....	67
Şekil 4.31. Metal iyonlarının (1 mM) $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi .....	68
Şekil 4.32. Kimyasalların (%1) $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi .....	69
Şekil 4.33. Çözücülerin (%10) $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi .....	71
Şekil 4.34. Lignoselüloz türevli inhibitörlerin (%1) $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.....	72
Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlarda <i>J.alba</i> ham enziminin (a) ve ticari selüloolitik enzim karışımının hidroliz sırasında salınımına neden olduğu indirgenmiş şeker miktarları.....	73
Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlarda <i>J. alba</i> 'dan elde edilen ham enzim ve ticari selüloolitik enzim karışımının kullanıldığı hidroliz prosesleri sonrasında kalan saman parçalarının steryo mikroskop görüntüleri.....	74
Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlarda <i>J. alba</i> 'dan elde edilen ham enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesleri sonrasında kalan saman parçalarının elektron mikroskobu görüntüleri.....	75
Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda ticari selüloolitik enzim karışımı ile gerçekleştirilen hidroliz prosesleri sonrasında kalan saman parçalarının elektron mikroskobu görüntüleri.....	76
Şekil 4.39. Belirlenen optimal koşullarda hidrolize tabi tutulan substrattan elde edilen ürünlerin ince tabaka kromatografisinde elde edilen görüntüleri.....	77

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Biyoetanol üretiminde kullanılan hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri (Linoj et al., 2006).....	6
Tablo 2.2. Farklı lignoselülozik biyokütlelerin yüzde içerikleri (Başar, 2018).....	7
Tablo 2.3. Selülaz üreten aktinomisetler (Saini et al., 2015). ....	11
Tablo 2.4. $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz sıcaklık karakterizasyon değerleri .....	16
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar .....	18
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar .....	18
Tablo 3.3. ISP2 agarın hazırlanması .....	20
Tablo 3.4. ISP2 sıvı besiyerinin hazırlanması.....	20
Tablo 3.5. Sitrat tamponu çözeltilerinin hazırlanması .....	21
Tablo 3.6. Fosfat tamponu çözeltilerinin hazırlanması .....	22
Tablo 3.7. 2X örnek yürütme boyasının hazırlanması .....	22
Tablo 3.8. SDS-PAGE Jel yürütme tamponunun hazırlanması .....	22
Tablo 3.9. Staining solüsyonunun hazırlanması .....	23
Tablo 3.10. Destaining solüsyonunun hazırlanması .....	23
Tablo 3.11. SDS-PAGE yükleme jelinin hazırlanması.....	24
Tablo 3.12. SDS-PAGE Ayırma jelinin hazırlanması .....	25
Tablo 3.13. Bradford çözeltisinin hazırlanması .....	25

# 1. GİRİŞ

Gerek bilimsel gerekse de teknolojik birikim toplulukların tüketim alışkanlıklarını değiştirmiştir. Bu duruma nüfusun hızla artışı da eklendiğinde enerjiye olan bağımlılık giderek artmaktadır. Günümüzde sıklıkla kullanılan enerji kaynakları fosil yakıt kökenlidir. Ancak, fosil yakıtların kullanımı küresel ısınma, sera gazı emisyonu, hava kirliliği, asit yağmurlarının oluşması gibi ekolojik dengenin bozulması sonucu ortaya çıkmış olan sorunları beraberinde getirmektedir. Ayrıca, mevcut fosil yakıt rezervlerinin azalmakta olduğu da bilinen bir gerçek olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sebeple, bilim insanları tarafından yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ilgi her geçen gün artmaktadır.

Son yıllarda fosil yakıtlara alternatif olarak rüzgâr, jeotermal, güneş (solar), hidrolik gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımı artmaktadır. Ancak, bu kaynaklardan elde edilen enerji depolama ve taşıma gibi sorunlardan dolayı sanayi ve ulaşımda kullanılan fosil yakıtların yerini alamamaktadır. Biyokütle temelli biyoetanol gibi yakıtlar ise sürdürülebilir ve çevre dostu olmasının yanısıra depolanma ve taşınma kolaylığı da sunmaktadır. Bundan dolayı, gelecekteki 20 yılın en çok tercih edilecek yenilenebilir enerji kaynağının biyoetanol olacağı düşünülmektedir.

Biyoetanol;  $C_2H_5OH$  ve  $EtOH$  formülleriyle bilinen tahıl alkolü olarak adlandırılan ve 1894'ten bu yana petrol alternatifi olarak kullanılan bir yakıt türüdür. Fosil yakıtlarla kıyaslandığında daha çevreci, düşük maliyetli ve kolay muhafaza edilebilen biyoetanol biyokütle temelli bir yakıt türüdür.

Karbonhidrat ve karbonhidrat türevli bileşikleri içeren bitkisel ve/veya hayvansal kaynaklı hammaddelerin geneli biyokütle şeklinde ifade edilmektedir. Biyokütle temelli yakıtların başlıcaları biyogaz, biyodizel, biyometanol, biyokömür ve hidrojenidir. Bunlar arasından günümüzde en çok talep göreni ise biyoetanoldür. Biyoetanol üretiminde sükröz içeren, nişasta içeren, lignoselülozik ve mikroalgal hammadde kaynakları olmak üzere dört çeşit biyokütle kullanılabilir. Sükröz ve nişasta içeren şeker kamışı, şeker pancarı, sorgum, mısır, buğday, manyok gibi hayvan ve insan beslenmesinde önemli yere sahip olan hammaddeler, gıda ve yem endüstrisindeki fiyatların dengesizliğine yol açma potansiyeline sahip olduğu için marangozluk ve kerestecilik atıkları başta olmak üzere çimen, ot, saman gibi

lignoselülozik hammadde kaynaklarının biyoetanol üretiminde kullanımına yönelik ilgi giderek artmaktadır.

Lignoselüloz; selülüz, hemiselüz ve lignin olarak adlandırılan karbon bazlı üç ana bileşen içeren, bitkilere yapısal olarak sertlik sağlayan bir polimerdir. Lignoselülozik yapının parçalanmasıyla biyoyakıt yapmak için kullanılacak şekerler elde edilebilmektedir. Ligoselüzün parçalanması iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Birinci aşama olan ön-muamele ile lignoselüzün ana bileşenleri arasındaki bağ gevşetilmekte ve ligninin bir kısmı bileşenden uzaklaştırılmaktadır. İkinci aşamada ise kalan selüz ve hemiselüz enzimatik olarak parçalanarak sello/ksilo-oligosakkaritler ve/veya glukoz, ksiloz ve arabinoz gibi monosakkaritler açığa çıkarılmaktadır.

Hidroliz aşamasında başta endoglukanazlar ve endoksilanazlar olmak üzere  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimleri kullanılmaktadır. Endoglukanaz ve endoksilanazlar sırasıyla selüz ve ksilan zincirlerinde rastgele kırıklar meydana getirirlerken  $\beta$ -glukozidaz ve  $\beta$ -ksilozidazlar ise sırasıyla sellobiyoz ve ksilobiyozun glukoz hidrolizini gerçekleştirirler.  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazlar ise farklı arabinoz içeren polisakaritler ve oligosakkaritlerin indirgeyici olmayan uçlarından arabinozun hidrolizini katalize ederler. Bu enzimler bir indükleyici varlığında doğal yollarla ya da rekombinant olarak mikroorganizmalar tarafından üretilebilmektedirler.

### **1.1. Tezin Amacı**

Günümüzde lignoselülozik materyallerin ön-muameleleri genellikle NaOH ve H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gibi alkali ya da asidik kimyasallarla gerçekleştirilmektedir. Kimyasal ön-muamele sonrasında nötralizasyon için lignoselülozik materyal hacminin 20-30 katı kadar su ile birçok defa yıkanmaktadır. Pratikte ise nötralizasyon için karşıt kimyasallar kullanılmakta ve uygulama sonucunda hidroliz basamağında rol alan enzimlerin inhibisyonuna neden olan Na ve Ca başta olmak üzere mineral tuzlar oluşmaktadır. Hidroliz aşamasında kullanılan enzimlerin inhibisyonuna neden olan diğer etmen ise ön-muamele sonrasında açığa çıkan şeker türevli aldehitler, aromatik bileşikler, kısa zincirli organik asitler ve metallerdir. Bundan dolayı, hidroliz için kullanılacak enzimlerin inhibitörlerin varlığında aktivite gösterebilmeleri arzu edilmektedir.

Aktinobakteriler yüksek G+C DNA içeriğine sahip, hem sucul hem de karasal ekosistemlerde geniş yayılım gösteren en büyük bakteri filumlarından birini oluşturan Gram pozitif bakterilerdir. Karmaşık morfolojik farklılıklarına rağmen çoğunlukla miselli yapıya sahip olan aktinobakteriler salgılayabildikleri enzimler sayesinde birçok inhibitörün bulunduğu habitatlar da dahil olmak üzere ekosistemlerde polimerlerin parçalanmasında rol oynamaktadırlar. Bu nedenle, aktinobakterilerden üretilen  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz gibi hücre dışı enzimlerin sert koşullar altında aktivitelerini koruyabilme potansiyeli bulunmaktadır. Şimdiye kadar başta *Streptomyces* genusunda sınıflandırılanlar olmak üzere çok sayıda aktinobakteri türü ile bir çok endüstriyel enzimin üretimi gerçekleştirilmiş ve bu enzimler karakterize edilmiştir. Ancak, literatürde bilginiz dahilinde *J. alba* tarafından üretilen  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin biyokimyasal özelliklerinin sunulduğu bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında, tezin temel amaçlarından biri  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin indükleyici varlığında *J. alba* tarafından batık kültürde üretilmesi, üretilen enzimlerin amonyum sülfat ile kısmi saflaştırılmaları ve kısmi saflıktaki enzimlerin biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesidir. Sunulan tezin diğer bir amacı ise *J. alba* kültür sıvısının NaOH ile ön-muamele edilmiş buğday samanı üzerindeki hidrolitik etkisinin belirlenmesidir.

## **2. LİTERATÜR TARAMASI**

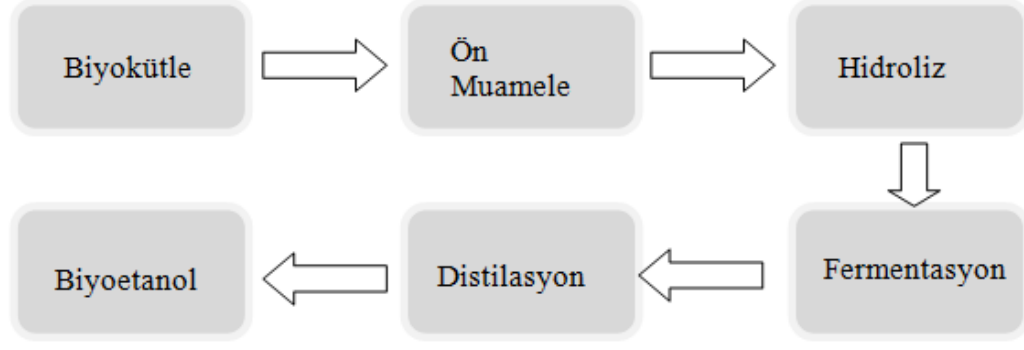
### **2.1. Biyokütle Enerjisi**

Fosil yakıt ve diğer enerji türleri Dünya'nın her yerinde üretim kapasitesine sahip değildir ancak tarım ve sanayi üretimi her ülkede belirli miktarda mevcuttur. Organik materyallerin ve atığın birçok ön-muamele aşamasından geçirilerek ve mikroorganizmalar yardımıyla dönüştürülerek fermente edildiği yenilenebilir enerji çeşidine biyokütle enerjisi denilir. Günümüzde diğer yenilenebilir enerji türlerinin aksine ulaşımda kullanılabilir olması ile dikkat çekmektedir. Elde edilen enerjinin daha dayanıklı olması ve daha verimli, düşük maliyetli bir üretim olması için çalışmalar yapılmaktadır.

Biyokütleden dönüşüm ile elde edilen; biyometanol, biyoetanol, biyobütanol, biyodimetiler, biyometan, biyohidrojen ve sıvı yakıt teknolojisi ürünleri geleceğin yakıtları olarak tanımlanmaktadır. Biyokütleden üretilen yakıtlar; sera gazı emisyonunu azaltır, geleneksel enerji kaynaklarının yerine geçer ve kırsal kesime ekonomik katkı sağlar. Çevreci olması ve üretimde atık materyallerin kullanılması açısından çok büyük potansiyeller taşımaktadır.

### **2.2. Biyoetanol**

Biyoetanol, selüloz bazlı tarım ürünlerinden üretilen bir yakıt türüdür. Etanol; temiz, renksiz, zehirli olmayan ve ısıl değeri benzinden daha düşük olan bir sıvıdır. Etanol; petrol veya biyokütle ile üretilmektedir. Etanol üretimi biyokütle ile yapıldığı zaman biyoetanol olarak isimlendirilir. Biyoetanol yüksek oktan sayısına sahip olduğu halde düşük setan sayısına sahip olması ve kendi kendine tutuşmaya dirençli olması sebebiyle dizel motorlarında kullanımı sorun oluşturabilmektedir. Sahip olduğu kendi kendine tutuşma direnci, benzinli motorlarda sıkıştırma oranının artmasına sebep olduğu için etanolün benzinli araçlarda kullanımı daha avantajlı olmaktadır (Çöpür vd., 2011).



Şekil 2.1. Biyoetanol üretim basamakları.

Biyoetanol üretimi ön-muamele, hidroliz, fermantasyon ve distilasyon olmak üzere 4 ana süreçte gerçekleşmektedir (Şekil 2.1). Uygulanan ön-muamele biyokütlenin kristal yapısını bozar ve mikroorganizma ve enzim tarafından substrat tüketiminin artırılması amacıyla yüzey alanını artırır. Bu işlem ile hücre duvarının yapısını bozar ve hidroliz işleminin etkisini artırır (Yavuz, 2018). Biyokütleden karbonhidrat kaybının en düşük seviyede tutulması, hidroliz aşaması için inhibitör etki oluşturacak yan-ürün oluşmaması ve maliyetin düşük olması ön-muamele yöntemi seçilirken dikkat edilmesi gereken başlıca hususlardır (Adıgüzel, 2013).

Ön-muamele ile ligninden uzaklaştırılan hammaddenin fermente edilebilir glukoz birimlerine dönüşmesi için hidroliz aşamasında enzimlerle muamele olması gerekmektedir.

Üretimde en önemli basamak etil alkol fermantasyonudur. Bakteri, küf veya mayaların küçük yapıları bileşiklerini kullanarak anaerobik ortamda son ürün olarak etanol ve CO<sub>2</sub> oluşturdukları aşamadır. Etanol fermantasyonunda en çok kullanılan maya *Saccharomyces cerevisiae*'dir (Dolğun, 2016).

### 2.3. Biyokütle Çeşitleri

Biyoyakıtlar üretimde kullanılan biyokütlenin türüne göre birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil olarak sınıflandırılır. Birinci nesil biyoyakıt üretiminde besin değeri yüksek olan tarım ürünleri kullanılır. Buğday, arpa, şeker kamışı, mısır veya patatesten üretilen biyoetanol bunlardan biridir (Tablo 2.1). İkinci nesil biyoyakıt üretiminde atıklar ve biyoyakıt üretimine özel olarak yetiştirilen tarım ürünleri kullanılır. Evsel katı atıktan veya lignoselülozik hammaddeden (odunsu bitkiler, dallı darı, miscanthus, arundo vb.) üretilen yakıtlar ikinci nesil yakıtlara örnektir. Üçüncü nesil biyoyakıtların ise ana maddesini mikroalgler oluşturmaktadır. (Başar, 2018).

Üretimin çoğu gıda kaynaklı selülozik ve nişasta bazlı hammadde kaynakları ile gerçekleştirilmektedir. Üretilen biyoyakıtın hammadde kaynağı gıda kaynaklı olduğu zaman şeker kamışı, mısır gibi gıda maddelerinin fiyat artışına neden olabileceği için tartışmalara neden olmaktadır. Buna karşılık dünyada kağıt, karton, kereste, talaş, tarımsal ürün ve tarımsal atık olarak bulunan lignoselülozik biyokütle kullanılması durumunda gıda veya başka bir sektörün olumsuz etkilenmesi söz konusu değildir.

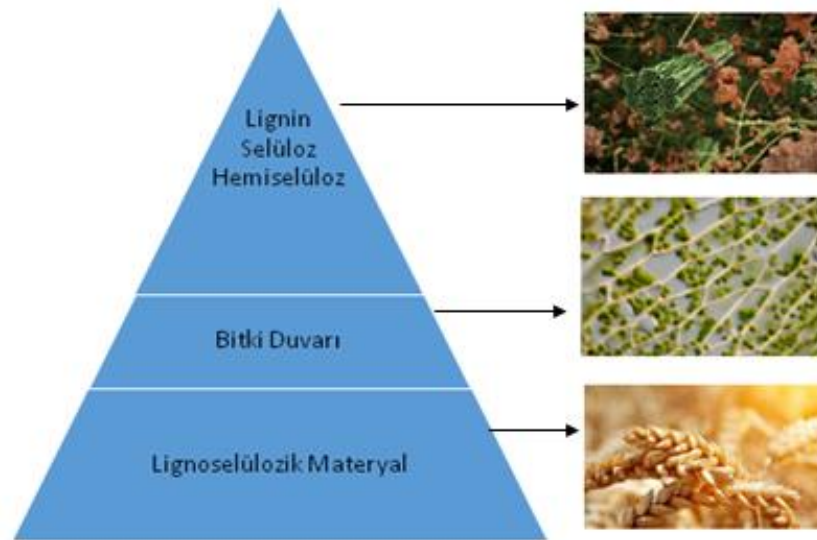
Tablo 2.1. Biyoetanol üretiminde kullanılan hammadde kaynakları ve üretim potansiyelleri.

<b>Hammadde</b>	<b>Biyoetanol Üretim Potansiyeli (Litre/Ton)</b>
Şeker kamışı	70
Şeker pancarı	110
Tatlı patates	125
Patates	110
Kassava	180
Mısır	360
Pirinç	430
Arpa	250
Buğday	340
Sorgum	60

#### **2.4. Lignoselülozik Biyokütle**

Dünya üzerindeki lignoselülozik biyokütlenin %80'ini ormanlarda bulunan lignoselülozik biyokütle oluşturmaktadır. Türden türe değişiklik göstermesiyle birlikte lignoselülozik yapının kütlece %80 civarı karbonhidrat ve ligninden oluşmaktadır.

Bitkiler dış strese karşı korunmayı sağlayan, hücreye yapısal ve mekanik destek veren bir hücre duvarına sahiptirler. Hücre duvarı yapısı itibariyle polisakkarit, protein ve fenolik bileşiklerin bir araya geldikleri yapılardan oluşmaktadır. Sahip olduğu bu yapı hücre duvarını endüstriyel uygulamalar açısından önemli bir kaynak haline getirmektedir (Başar, 2018).



Şekil 2.2. Lignoselülozik biyokütlenin yapısı ve içeriği.

Bitki hücrelerinden elde edilen biyokütle, bir araya gelmiş lignin ve hemiselüloz zincirleri tarafından sarılmış selülozdan meydana gelmektedir (Şekil 2.2). Bu üç bileşen doğada farklı oranlarda bir araya gelmektedir (Tablo 2.2). Selüloz ve hemiselüloz önce şekere, ardından etanole dönüştürülebilir ancak lignin dönüştürülemez. Bu nedenle üretimde ilk önce hemiselüloz-lignin arasındaki bağın bozulması ardından da enzimin selüloza erişiminin en üst seviyede olması amaçlanmaktadır.

Tablo 2.2. Farklı lignoselülozik biyokütlelerin yüzde içerikleri (Başar, 2018).

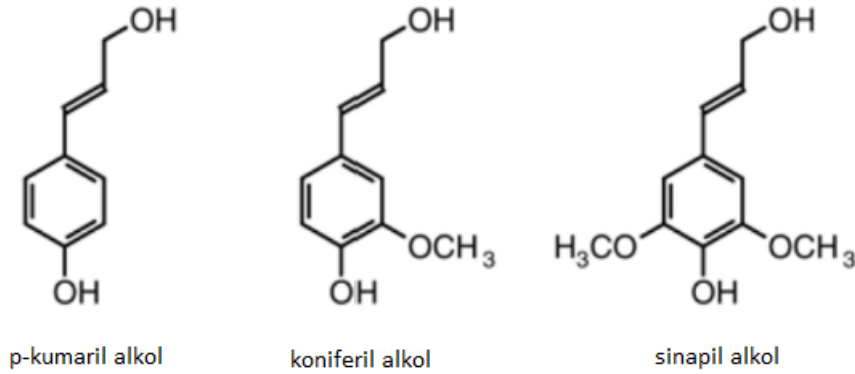
Lignoselülozik Biyokütle	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Mısır Sapı	34.45	27.55	21.81
Mısır Bitkisi	36.3	31.4	17.2
Şeker Kamışı Küşpesi	44	27	24
Tatlı Sorghum Küşpesi	36.9	17.8	19.5
Dallı Darı	32	19.2	18.8
Buğday Samanı	38.7	19	17.3
Pirinç Samanı	35.8	21.5	24.4

### 2.4.1. Lignin

Lignin, 1838'de Fransız bilim insanı Payen tarafından odundan izole edildi. Şu anda kullanılan lignin terimi 1857'de Schulze tarafından latincece odun anlamına

gelen lignumdan türetilmiştir. Ligninin yapı taşlarını *p*-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol oluşturmaktadır (Şekil 2.3). Hem bitki dokusuna kuvvet ve sertlik katan yapısal bir malzemedir hem de hücre duvarının geçirgenliğini ve ısı kararlılığını değiştirir. Hücre duvarının polisakkarit iskeletini güçlendirerek lignoselülozik biyokütlenin diğer polisakkarit zengini materyallerden ayrılmasını sağlar (Oral, 2019).

Lignin odunu bitkilerin kuru ağırlığının %15-40'ını oluşturarak yeryüzündeki en bol aromatik polimer olmaktadır. Yıllık üretimi  $5-36 \times 10^8$  ton civarında olduğu için kimya endüstrisi için önemli bir aromatik katkı kaynağı olma potansiyeline sahiptir (Borand, 2019).



Şekil 2.3. Ligninin yapı taşları.

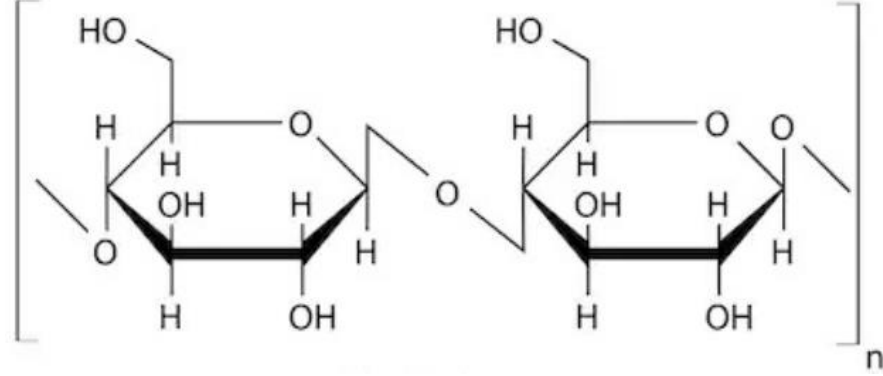
Ağırlık bakımından en yüksek lignin içeriği %30-40 civarında gymnosperm ve angiospermlerden elde edilen odunsu bitkilerde olmakla birlikte diğer lignin kaynaklarında yalnızca %3-25 civarındadır (Oral, 2019).

Bugün yaklaşık 50 milyon ton lignin kağıt hamuru ve kağıt sektörü tarafından üretilirken bunun %48'i yanma ve enerji üretiminde kullanılmaktadır. Lignin kompozit malzeme üretiminde kullanılmaktadır.

Lignoselülozik hammaddeden lignin izolasyonu iki kategoride incelenmektedir. İlk kategori lignoselülozik hammaddelerdeki selüloz ve hemiselüloz polisakkaritlerini hidrolize ederek veya çözümlenerek geriye kalıntı olarak ligninin kaldığı yöntemdir. İkinci kategori, kağıt ve biyoetanol üretim yöntemlerinde kullanılan selüloz liflerinin ayrılması için ligninin çözülerek uzaklaştırılması yani delignifikasyonudur (Olgun, 2019).

### 2.4.2. Selüloz

(C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub> formüllü selüloz, anhidroglukoz birimlerinin uç uca β-(1,4) bağı ile bağlanmasıyla oluşan bir polisakarittir. Formüldeki n, polimerizasyon derecesini gösterir. Her iki birimden birisi diğerine 180°'lik dönüşle bağlanmıştır. Zincirde yan dallanmaların olmaması ve içerdiği van der Waals etkileşimleri sayesinde çözünmez kristalin mikrofibriller oluşmaktadır (Başar, 2018).



Şekil 2.4. Sellobiyoz molekülünün kimyasal yapısı.

Selüloz yapısında birbiri ardına gelen iki glukoz birimi sellobiyoz olarak adlandırılır (Şekil 2.4). Selülozun her bir monomer biriminde 3 adet hidroksil grubu, monomerlerin birbirine bağlanmasını ve selüloz molekülünün hidrofilik özellik kazanmasını sağlar. Aynı zamanda yapısında bulunan bu hidrojen bağları sayesinde yüksek bir gerilme mukavemeti vardır (Msakni, 2020). Selülozun hidroksil gruplarının farklı bileşiklerle reaksiyona girmesi sonucu selüloz türevleri oluşur. Bu reaksiyonlar sonucunda ester, eter, alkolat ve oksidayson ürünleri oluşumu gözlenir (Kırcı vd., 2001).

Karasal ortamda fotosentezin birincil ürünü olarak karşımıza çıkan selüloz; yeşil algler, balçık kalıp *Dictyostelium* ve tunikatlar gibi bazı deniz hayvanları ve az sayıda bakteri tarafından üretilmektedir (Msakni, 2020).

Bitki hücrelerinden selülozun ilk keşfi 1838 yılında Anselme Payne tarafından gerçekleştirilmiştir. O günden bu güne çeşitli alanlarda kullanılan selülozun üretim ve tüketimi git gide artmaktadır. Selüloz, polimerik ürün olması sebebiyle kağıt, karton gibi temel kullanım alanları dışında tekstil, boya, ilaç, LCD ekran gibi sanayi alanlarında da kullanıma sahiptir. Tarımda toprağı gübrelemek için, hayvancılıkta da sığırlara yem olarak selüloz kullanımı gerçekleştirilmektedir. Üretilen ahşapın %50 den fazlasının, pamuğun ise %94'ünden fazlasının ana bileşenini oluşturur. Aynı

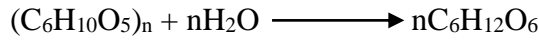
zamanda biyosferde yer alan karbon moleküllerinin yarısından fazlası selüloza aittir (Msakni, 2020).

### 2.4.3. Hemiselüloz

Hemiselüloz değişik şeker monomerlerinden oluşan, selüloz ve lignin ile birlikte bitki hücre duvarlarının yapısını oluşturan polisakkarittir. Sahip olduğu amorf yapı nedeniyle selüloza göre dayanıklılığı düşüktür. Lignin ve selüloz arasında bağlantı elemanı görevi görerek bu yapının bir arada durmasında ve dayanıklılığının artmasında görevlidir. Birkaç yüz ile binler arasında değişen selüloz monomer diziliminin aksine 50-200 monomerden oluşan bir yapıya sahiptir (Başar, 2018). Doğada sık olarak karşımıza çıkan hemiselülozlar uronik asit, ksilan ve arabinoz moleküllerinden oluşmaktadır.

### 2.5. Hidroliz Yöntemi

Ön-muamele sonrası hidroliz aşamasında lignoselülozik materyalin şeker monomerlerine kadar parçalanabilmesi amacıyla kullanılan enzimlerin başında endoglukanazlar ve endoksilanazlar gelmektedir.



Bu işlem sürecinde polisakkarit yapıdaki karbonhidratların yapısına 1 molekül H<sub>2</sub>O eklenmesiyle lignoselülozik malzeme parçalanarak basit şekere ayrıştırılır. Yaygın olarak asidik ve enzimatik hidroliz metodları kullanılmaktadır (Yavuz, 2018).

Enzimatik hidroliz yönteminde doğal olarak meydana gelen proteinler (enzimler) kullanılarak selülozun fermente edilebilir şekere dönüşmesi sağlanmaktadır. Reaktörlerde yüksek şeker verimi ile korezyon oluşumu gözlenmediği gibi hidrolizin etkin gerçekleştiği pH ve sıcaklık değerleri kullanılacak enzimin kaynağına göre çeşitlilik göstermektedir (Yavuz, 2018).

### 2.6. Hidroliz Enzimleri

#### 2.6.1. Selülaz

Selülaz enzimi selülozdaki β-(1,4) glikozidik bağlarını hidroliz eder. Selülozun glikoz birimlerine tam dönüşebilmesi için endo-1,4-β-glukanaz (EC. 3.2.1.4), ekzo-1,4-β-glukanaz (EC. 3.2.1.91) ve β-glukozidazların (EC. 3.2.1.21) bir arada çalışması gerekmektedir. Endoglukanazlar amorf bölgeleri rastgele hidrolizleyerek selo-

oligosakkaritlerin oluşumunu sağlarken ekzoglukanazlar dış  $\beta$ -(1,4) zincirini rastgele keser ve  $\beta$ -sellobiyoz oluşumunu sağlar (Msakni, 2020).  $\beta$ -glukozidaz oluşan sellobiyoz birimlerini glukoz parçalar (Aygan ve Battaloğlu, 2015).

Ksilan içeriğinin tamamen hidrolizi birden çok mikrobiyal enzimin iş birliği ile gerçekleşmektedir (Uluçay, 2018). Ksilanolitik enzim sistemi endoksilanaz,  $\beta$ -ksilozidaz,  $\alpha$ -glukoronidaz,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz ve asetilksilan esteraz enzimlerini kapsamaktadır. Bu enzimler ksilani monomerlerine parçalamak için bir arada aktivite gösterirler. Ksilanazlar molekül ağırlığı 6-80 kDa arasında değişen, 40 ile 60 °C sıcaklıkta ve pH 4.5 ile 6.5 arasında aktivite gösteren tek polipeptid zincirli glikoproteinlerdir (Taccı ve Sertbaş, 2019).

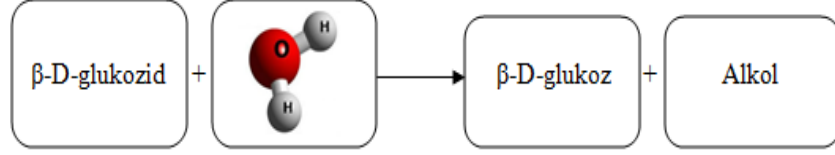
Hidroliz veriminin artırılması için selülozların ve ksilanazların bir arada çalışması gerekmektedir. Bundan dolayı lignoselülozik degradasyon için aksesuar ya da yardımcı enzimler olarak tanımlanan  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz gibi enzimlerinde kullanılması önerilmektedir. *Streptomyces albogriseolus*, *Streptomyces nitrosporeus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces flavogriseus*, *Streptomyces griseorubens*, *Streptomyces actuosus* selülaz üreten aktinomisetlerdendir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Selülaz üreten aktinomisetler (Saini et al., 2015).

<b>Aktinomiset</b>	<b>Selüloolitik Enzim</b>	<b>Kaynakça</b>
<i>Streptomyces albogriseolus</i>	$\beta$ -glukozidaz	Van Zyl, 1985
<i>Streptomyces nitrosporeus</i>	$\beta$ -glukozidaz	Van Zyl, 1985
<i>Streptomyces lividans</i>	Selülaz	Kluepfel et al., 1986
<i>Streptomyces flavogriseus</i>	Selülaz	McCarthy, 1987
<i>Streptomyces griseorubens</i>	Selülaz	Murugan et al., 2007
<i>Streptomyces actuosus</i>	Endoglukanaz	Prasad et al., 2013

### **2.6.1.1. $\beta$ -Glukozidaz**

Sistemik adı  $\beta$ -D-glukozid glukohidrolaz (EC.3.2.1.21) olarak geçmektedir. Beta glikozidaz gıda, atık ve biyoyakıt işleme için önemli bir endüstriyel enzimdir.  $\beta$ -glukozidaz ikili glikoz birimlerinden oluşan sellobiyozu veya kısa zincirli oligosakkaritleri parçaladığı için biyokütle hidrolizinde önemli rol oynar (Liew et al., 2018).



Şekil 2.5.  $\beta$ -glukozidaz'ın etki mekanizması.

$\beta$ -glukozidazlar etki ettikleri maddenin glikozid bağınyı hidroliz ederler ve glikonun anomerik konfigrasyonunu korurlar (Şekil 2.5). Ürün olarak açığa çıkan  $\beta$ -D-glukoz ile reaksiyona giren substrattaki  $\beta$ -D-glikozid aynı yapıdadır (Dolma, 2013).

#### 2.6.1.1.1. $\beta$ -Glukozidaz'ın Biyoteknolojik Uygulamaları

Son yıllarda izoflavon glikozitlerin hidrolizi, lignoselülozik biyokütleden yakıt etanol üretimi, aromatik bileşiklerin salınması gibi çeşitli biyoteknolojik süreçlerdeki potansiyel rolleri sebebiyle  $\beta$ -glukozidazlara büyük ilgi duyulmaktadır. Son on yılda biyokütleden üretilen biyoyakıt programının ortaya çıkmasıyla birlikte  $\beta$ -glukozidaz enzim sınırlayıcı bileşen olarak merkez konumunu kazanmıştır. Sellobiyoz ve kısa selodekstrinlerin glukoza dönüşümünün son adımını oluşturması sebebiyle hız sınırlayıcı bileşen konumundadır (Liew et al., 2018).

$\beta$ -glukozidazlar mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerde yaygın olarak bulunmakta ve biyolojik yollarda önemli görevleri üstlenmektedir. Bazı bitkilerde hastalık esnasında glukozidaz enzimler, glikozitleri toksik aglikonlara dönüştürmekte ve hastalık yapıcı koşulları ortadan kaldırmaktadır. Aynı zamanda bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili birkaç yüz  $\beta$ -glukozidik ürün olduğu saptanmıştır. Ancak bu ürünlerin ortaya çıkmaları için  $\beta$ -glukozidaz enzimleri ile hidrolizlenmeleri gerekmektedir. Bu enzimler içecek sanayisinde, meyve suyu ve şarap üretiminde kullanılarak ürünlerde tat, lezzet ve aroma değişmesine ve kalite artışına sebep olmaktadır. Bundan dolayı özellikle tarım ve ormancılık alanlarında , biyoteknolojik çalışmalarda beta glikozidaz enzimleri bilimsel araştırmalar açısından zenginlik göstermektedir (Ekmekci, 2016).

Glukosinolatlar ve bunların parçalanmasıyla açığa çıkan ürünlerin insanlar üzerinde antikanserojen etki yaptığı konusunda spekülasyonlar mevcuttur. Henüz tüm mekanizmaları açığa çıkarılmamasına karşılık kemirgenler üzerinde yapılan

çalışmalarda, çiğ ya da pişmiş olan turpgillerin (brokoli, karnabahar, lahana gibi) aril hidrokarbon hidroksilaz aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir (Ekmekci, 2016).

$\beta$ -glukozidazların katalizlediği bir diğer reaksiyon lignifikasyondur. Biyosferde selülozdan sonra en çok bulunan ikinci bileşik lignindir. Koniferil alkol lignin oluşumunda en önemli öncül maddedir ve  $\beta$ -glukozidaz tarafından hidroliz edilen koniferinden türeyen bir bileşiktir. Bu duruma bakıldığı zaman bazı bitki  $\beta$ -glukozidazları lignin biyosentezinde rol almaktadır (Dolma, 2013).

Günümüzde kullanılan ticari selülozik enzimler daha çok *Trichoderma* ve *Aspergillus* mantarlarından elde edilmektedir. *Aspergillus niger* mikroorganizmalar içinde bu güne kadar bilinen en etkili  $\beta$ -glukozidaz üreticisidir. *Trichoderma reseei*, endoglukanazlar (%18), sellobiyohidrolazlar (%72) ve  $\beta$ -glukozidazlar (<%1) içeren sellzlar üretmiştir. *Aspergillus niger* kaynaklı  $\beta$ -glukozidaz genellikle *T. reseei*'nin sellolitik kokteylini tamamlamak için kullanılır (Liew et al., 2018).

Literatür araştırması neticesinde  $\beta$ -glukozidaz'ların pH 4 ile 10 arasında ve sıcaklık 0 ile 40 C arasında kararlı olarak çalıştığı tespit edilmiştir. Çoğu  $\beta$ -glukozidaz için enzim aktivitesinin en yüksek olduğu pH'nın yaklaşık 7 olduğu belirlenmiştir.  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık, enzimin elde edildiği kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Bazı  $\beta$ -glukozidaz'ların 55-60 C üzerindeki sıcaklıklarda geri dönüşümsüz şekilde inaktive olduğu tespit edilmişken bazılarının ise 50-55 C'de yüksek derecede aktif ve kararlı olduğu rapor edilmiştir (Dolma, 2013).

*Aloe vera* yapraklarıyla yapılan bir çalışmada optimum pH 4.4 ve optimum sıcaklık değerisi 55 C olarak bulunmuştur. Yıl içerisinde enzim aktivitesinin kiş aylarında arttığı ve yaz aylarında azaldığı gözlemlenmiştir (Dolma, 2013).

*Prunus armeniaca L.* (kayısı çekirdeği)  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH değerisi 5 ve optimum sıcaklık değerisi 55 C olarak bulunmuştur (Ekmekci, 2016). Farklı araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalarda, optimum pH ve sıcaklık değerleri ayda 5.5 ve 40 C (Zhang et al., 2005), zeytinde 5.5 ve 42 C (Kara vd., 2011) ve vanilya çekirdeğinde ise 6.5 ve 39 C (Marquez et al., 2008) olduğu belirlenmiştir.

Faiz ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada Trabzon'un Hıdırnebe Yaylasından toplanan *Lepista flaccida* mantar türünden  $\beta$ -glukozidaz enziminin

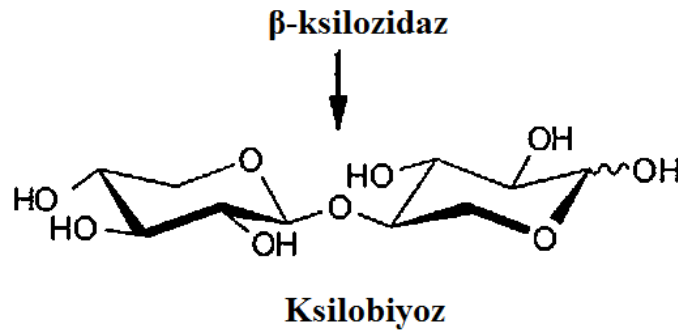
optimum pH değeri 4, optimum sıcaklık değeri 60 °C olarak bulunmuştur. Kısmen saflaştırılan enzimin 30 dakikalık inkübasyon sonunda 40 °C'ye kadar kararlılığını yüksek oranda, 50 ve 60 °C'de ise yarı yarıya koruyabildiği gözlemlenmiştir.

Jung ve Lee'nin (2010) yapmış olduğu çalışmada kanalizasyon arıtma tesisinden izole edilen *Acinetobacter kyonggiensis*'e ait  $\beta$ -glukoazidazın optimum pH değeri 7 ve optimum sıcaklık değeri 30 °C olarak belirlenmiştir.

### 2.6.2. $\beta$ -Ksilozidaz

$\beta$ -ksilozidaz (EC 3.2.1.37) ksilan hidrolizinin son ürünü olan D-ksiloz oluşumuna kadar merkezi bir rol oynayan hemiselülozdur. Endoksilozidazlar tarafından parçalanan ana şeker zincirini beta ksilozidaz enzimleri trimerlere, dimerlere ve monomerlere parçalar (Şekil 2.6).

$\beta$ -ksilozidazlar çoğunlukla küçük D-ksiloz oligosakkaritleri için oldukça seçicidir. Bu oligosakkaritlerin polimerizasyon derecesi arttıkça enzimin aktivitesi azalır. Selüloz kodlayan genler gibi endoksilanazları ve  $\beta$ -ksilozidazları kodlayan genlerin çoğu hem *Aspergillus*, *Trichoderma* ve *Penicillium*'da hem de *Agaricus bisporus*, *Magnaporthe grisea*'da tanımlanmıştır (Akel vd., 2009).



Şekil 2.6.  $\beta$ -Ksilozidazlar tarafından hemiselüloz bozunmasının şematik gösterimi.

#### 2.6.2.1. $\beta$ -Ksilozidaz'ın Biyoteknolojik Uygulamaları

Ksilanolitik enzimlerden olan  $\beta$ -ksilozidaz, odun işleme sektöründeki ilk basamak olan kabuktan ayırma işleminde kullanılmaktadır (Aygan, 2018).

Geleneksel yöntemde kağıt beyazlatmak için kullanılan klor çevreye zarar vermektedir. Kimyasal kullanımını azaltmak ve kağıt hamurundan lignini ayrıştırmak için  $\beta$ -ksilozidaz enzimi alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Beg et al., 2001).

Son birkaç yılda mikrobiyal ksilozidazların üretimi kimya, ilaç ve gıda endüstrilerindeki potansiyel uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir.

Diğer hidrolaz grubu enzimlerle birlikte fırıncılık sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Hemiselülaz enzimlerinin (endo-1,4- $\beta$ -D-glukanaz; 1,4- $\beta$ -ksilanaz;  $\beta$ -glukozidaz;  $\beta$ -ksilozidaz vb.) ticari üretimi için *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* ve *Aspergillus* 'a ait suşlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu enzimlerin ana işlevi hamurun işlenebilirliğini, kalitesini ve kararlılığını iyileştirmektir. Suda çözünmeyen hemiselülozun çözünmesini ve hamur ile arasında bağ oluşmasını sağlar.

$\beta$ -ksilozidaz enzimi termofilik aerobik *Bacillus stearothermophilus*, anaerobik *Clostridium acetobutylicum* ve termofilik aktinomiset olan *Thermomonospora fusca*'dan izole edilmiş ve karakterize edilmiştir.

Jin ve arkadaşları (2020) yapmış oldukları bir çalışmada *Aspergillus fumigatus* XC6 tarafından üretilen ısıl-kararlı  $\beta$ -ksilozidaz enzimini izole etmişlerdir. Substrat olarak *p*-NPX kullanarak pH 4.5 ve 75 °C'de çalıştığı tespit edilmiştir. Saflaştırmış oldukları  $\beta$ -ksilozidaz enzimi ısıl kararlılık açısından bakıldığında karşılaştırılan mantar suşlarından daha yüksektir. Çalışma sonuçları *A. fumigatus* XC6  $\beta$ -ksilozidaz enziminin maliyet etkin lignoselülozik biyoetanol üretimi için umut verici endüstriyel uygulamaya sahip olabileceği gözlenmiştir (Jin et al., 2020).

### **2.6.3. $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz**

$\alpha$ -L-arabinofuranozidazlar (EC 3.2.1.55), L-arabinoz salınımına sebep olan enzimlerdir. Oligosakkaritlerdeki  $\alpha$ -L-(1,2),  $\alpha$ -L-(1,3) ve  $\alpha$ -L-(1,5) arabinosil bağlarının hidrolizinde yer alırlar. Hemiselülozun tam bozunmasını sağlamak için  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz diğer hemiselüloolitik enzimlerle sinerji içinde çalışır (Squillaci et al., 2017). Arabinofuranozidazlar bakteri, mantar ve bitkilerde yaygın olarak bulunurlar. Son zamanlarda endüstriyel prosesler yüksek sıcaklıklarda çalıştığından ekstremofilik mikroorganizmalardan  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ların tanımlanması için çok çaba sarf edilmiştir. Örneğin fermantasyon koşulları minimum 60 °C'ye ayarlanarak kontaminasyon problemini ortadan kaldırmak ve akışkan ortam sağlamak amaçlanmaktadır (İlgü vd., 2018).

### 2.6.3.1. $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Biyoteknolojik Uygulamaları

$\alpha$ -L-arabinofuranozidazlar lignoselülozik materyalin fermentatif ürünlere daha verimli dönüştürülmesi, hayvan besleme yeminin sindirilebilirliğinin artırılması, küspenin delignifikasyonu, şarap üretimi sırasında monoterpenil glikozitlerin hidrolizi ve meyve sularının berraklaştırılması gibi çeşitli tarımsal endüstriyel proseslerdeki pratik uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Squillaci et al., 2017).

Orman ve tarımsal atıklar gibi biyokütlenin etanol, metan ve hidrojene verimli şekilde dönüşmesi, çevre dostu, yenilenebilir enerji üretimi için çok önemlidir. Bunu başarılabilmesi için  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın içinde bulunduğu ksilanolitik enzim sisteminin sinerjik çalışması önemlidir (Savran, 2018).

Hayvan yemlerinde sıklıkla  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz kullanımı görülmektedir. Yemdeki anti-besinsel faktörün parçalanması, lifle çevrili ve sindirilemeyen hücre duvarının parçalanması, hayvanlar tarafından parçalanamayan özgül kimyasal bağların parçalanması ksilanolitik enzimlerin hayvan yemi endüstrisinde kullanılmasının nedenleridir (Savran, 2018).

$\alpha$ -L-arabinofuranozidaz hidroliz ürünü (L-arabinoz), gıda maddesi olarak kullanım için ABD (FDA) ve Japonya tarafından onaylanmış düşük kalorili bir tatlandırıcıdır.

İlgü ve arkadaşları (2018) daha önceden rapor edilmemiş *Geobacillus vulcani*  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazın heterolog ifadesini ve biyokimyasal karakterizasyonunu 16S rRNA'da bildirmişlerdir. Optimum pH değerinin 5 ve optimum sıcaklık değerinin 70 °C olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2.4.  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enziminin sıcaklık karakterizasyon değerleri (İlgü vd., 2018).

	Opt. pH	Opt. Sıcaklık	Kaynakça
<i>Geobacillus vulcani</i>	5	70	İlgü vd.
<i>Ruminiclostridium thermocellum</i>	-	82	Taylor et al.
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	5.5	80	Lim et al.
<i>Geobacillus caldoxy lolyticus Tk4</i>	6	75-80	Canakcı vd.
<i>Bacillus stearothermophilus T-6</i>	-	70	Gilead and Shoham
<i>Thermotoga maritima</i>	7	90	Miyazaki
<i>Thermotoga petrophilia</i>	6	73	Squina et al.

Tablo 2.4'e bakıldığında Gram-pozitif bakterilerden elde edilen  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazların düşük pH değerlerinde daha aktif olduğu, Gram-negatiflerden elde edilenlerin ise görece daha yüksek pH'larda daha aktif olduğu sonucuna varılmaktadır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan Gereçler

Bu tez çalışması sırasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi KİTAM'da mevcut bulunan cihazlardan çalışmanın amacına uygun olanlar kullanılmış olup, Tablo 3.1'de verilmektedir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.

<b>Cihaz</b>	<b>Marka/Model</b>
Buz Makinesi	Scotsman AF 206
-80 °C'lik derin dondurucu	Platilab 500 V 4-STD
-20 °C'lik derin dondurucu	Vestel BZP-XL3402 XE
+4 °C'lik soğuk do lap	Vestel BZP-XL3402 XE
Çalkalamalı inkübatör	Miprolab MCI 120
Etüv	Ecocell
Diyaliz Kiti	Sigma Pur-A-Lyzer™ Maxi 12000
FTIR	Thermo scientific NICOLET İS10
Hassas terazi	Radwag AS 220.R2
Isı bloğu	DryBath
Jel görüntüleme cihazı	ChemiDoc
Liyofilizatör	Labconco
Manyetik karıştırıcı	WiseStir®
Mikrosantrifüj	Sprout
Otoklav	Taunauer
pH metre	Mettler Toledo Seven Compact
SEM	JEOL JSM-7001F
SDS-PAGE jel elektroforez cihazı	Biorad
SDS-PAGE jel güç kaynağı	Biorad
Santrifügal Filtre	Amicon® Ultra-0.5 mL 10K
Soğutmalı santrifüj	NUVE NF 800R
Sonikatör	Kudos
Stereo mikroskop	LEICA EZ4D
Steril kabin	Miprolab Msafe 1200
TLC plaka	MERCK, 1.05730
Ultrafiltrasyon cihazı	Amicon 8003
UV spektrofotometresi	Thermo Scientific Multiskan Go
Vortex	Velpo

### 3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışması sırasında çalışmanın amacına uygun olanlar kullanılmış olan kimyasallar Tablo 3.2’de verilmektedir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Marka/Model
Agar	Biolife
Amonyum per sülfat	Merck
Amonyum sülfat	Merck
APS	PanReac AppliChem
Asetik asit	Sigma
Bradford çözeltilisi	Sigma
Brillant blue R250	Sigma
2-bütanon	Sigma
Bütanol	Sigma
BSA	Sigma
Comassie blue	Merck
D+Glukoz	PanReac AppliChem
D+Ksiloz	Sigma
Diyaliz kiti	Pur-A-Lyzer™ midi
EDTA	PanReac AppliChem
Etanol	Chem Lab
Fenol	Tekkim
Formik asit	Merck
Glasiyel asetik asit	Merck
Gliserin	Sigma
Glisin	PanReac AppliChem
Guaiakol	Sigma
İzoamil alkol	Tekkim
Malt özütü	Merck
2-β-merkaptotanol	Sigma
Metanol	Chem Lab
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Tekkim

### 3.1.3. *Jiangella alba*'nın Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri

**ISP2 Agar:** *Jiangella alba*'nın üretilmesi ve eğik katı agarda saklanması için Tablo 3.3’e göre hazırlanmış olan besiyeri, 121 °C’de 15 dk otoklavlanarak sterilize

edilmiştir. Ardından laminar kabinde petrilere 5 mL dökülerek, kullanılıncaya kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3. ISP2 agarın hazırlanması.

Bileşimi	g/L
Maya özütü	4
Malt özütü	10
D-Glikoz	4
Agar	14
CaCO <sub>3</sub>	2
Saf su	1000 mL

**ISP2 Sıvı Besiyeri:** *Jiangella alba*’nın sıvı besiyerinde üretilmesi için Tablo 3.4’e göre hazırlanmış olan besiyeri, 121 °C’de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Tablo 3.4. ISP2 sıvı besiyerinin hazırlanması.

Bileşimi	g/L
Maya özütü	4
Malt özütü	10
D-Glikoz	4
Saf su	1000 mL

### 3.1.4. Kullanılan Çözeltiler, Tamponlar ve Standartlar

#### 3.1.4.1. Çözeltiler

**Gliserol stok çözeltisi:** *Jiangella alba* kültürlerinin stoklanması için hazırlanmıştır. %30’luk gliserol içerecek şekilde hazırlanan stok tüpleri 121 °C’de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

**PMSF çözeltisi:** Enzim çözeltisi içerisindeki proteaz aktivitesinin inhibe edilmesi amacıyla 0.1 M PMSF çözeltisi izopropanol ile hazırlanmıştır.

**NaOH çözeltisi:** Lignoselülozik biyokütlenin ön-muamelesinde kullanılmak amacıyla %1’lik NaOH çözeltisi hazırlanmıştır.

**DNS çözeltisi:** Enzimatik hidroliz sonucunda açığa çıkan indirgen şekerin analiz edilmesi için hazırlanmıştır. 1 g DNS 50 mL suda çözüldükten sonra üzerine 30 g Potasyum Sodyum Tartarat ilave edilmiştir. Karışıma 20 mL 2N NaOH eklendikten sonra son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Miller, 1951).

**Substrat çözeltileri:** Enzim numuneleri içerisindeki  $\beta$ -glukozidaz'ın enzim aktivitesinin ölçülmesi için *p*-nitrofenol-D-glukopiranozoid;  $\beta$ -ksilozidaz'ın enzim aktivitesinin ölçülmesi için *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-ksilopiranozoid ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın enzim aktivitesinin ölçülmesi için *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinopiranozoid 10 mM olacak şekilde 10 mL dH<sub>2</sub>O'da çözümlenerek hazırlanmıştır.

**Bradford çözeltisi:** Numunelerdeki protein miktarlarının Bradford yöntemiyle belirlenmesi için Tablo 3.5'teki çözelti hazırlanmıştır.

Tablo 3.5. Bradford çözeltisinin hazırlanması.

Bileşimi	g/L
Comasie Blue G250	0.350 g
Etanol	100 mL
Fosforik Asit	200 mL
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**TLC yürütme çözeltisi:** Şeker standartlarının ve hidrolizatların TLC plaka üzerinde yürütülmesi için formik asit, 2-bütanon, tert-bütanol, distile su'dan (3:1:1 v/v/v) oluşan çözücü hazırlanmıştır.

**TLC görselleştirme çözeltisi:** TLC'de yürütülen bileşiklerin görselleştirilmesi için 3.25 g fitalik asit, 2 mL anilin ve 100 mL bütanol ile hazırlanan çözelti hazırlanmıştır.

**Akrilamid:bisakrilamid çözeltisi:** 29.2 g akrilamid ve 0.8 g bisakrilamid bir miktar suda çözülmüş ve son hacmi 100 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Koyu renkli bir şişede buz dolabında saklanmıştır (Bollag et al., 1996).

**%10 APS çözeltisi:** SDS-PAGE jellerini hazırlamak amacıyla 0.1 g APS 1 mL distile suda çözümlenerek hazırlanmıştır.

**%10 SDS çözeltisi:** Proteinlerin denatürasyonu ve SDS-PAGE jelinde ayrıştırılmasında kullanılmak üzere 0.1 g SDS 1 mL distile suda çözümlenerek hazırlanmıştır.

**SDS-PAGE jeli boyama çözeltisi.** SDS-PAGE jelindeki protein bantlarının görünür hale gelmesi için Tablo 3.6'daki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.6. Boyama solüsyonunun hazırlanması.

Bileşimi	g/L
Comassie Blue R250	1 g
Metanol	500 mL
Glacial asetik asit	100 mL
dH <sub>2</sub> O	400 mL

**SDS-PAGE jelinden boya giderme çözeltisi:** SDS-PAGE jelinin boyama işlemi sonrasında jelden boyanın giderilmesi ve bantların net bir şekilde görselleştirilmesi için Tablo 3.7'deki gibi hazırlanmıştır.

Tablo 3.7. Boya giderme solüsyonunun hazırlanması.

Bileşim	L
Etanol	50 mL
Glacial Asetik Asit	100 mL
dH <sub>2</sub> O	850 mL

#### 3.1.4.2. Tamponlar

**Sitrat tamponu:** Enzimin pH 4 ile 6 aralığındaki aktivitesini belirlemek için 100mM sitrat tamponu kullanılmıştır. 20 mL 100 mM C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O ve 20 mL 100 mM C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>.2H<sub>2</sub>O hazırlandıktan sonra istenilen pH'ya ayarlamak için Tablo 3.8'de belirtilen hacimlerde karıştırılmış ve distile su ile belirlenen miktarlara tamamlanmıştır.

Tablo 3.8. Sitrat tamponu çözeltilerinin hazırlanması.

pH	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O	Distile Su	Toplam Hacim
4	5.9 mL	4.1 mL	10 mL	20 mL
5	3.5 mL	6.5 mL	10 mL	20 mL
6	1.15 mL	8.85 mL	10L	20L

**Fosfat tamponu:** Enzimin pH 6 ile 8 aralığındaki aktivitesini belirlemek için 100 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. 20 mL 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ve 20 mL 100 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> hazırlandıktan sonra istenilen pH'ya ayarlamak için Tablo 3.9'da belirtilen hacimlerde karıştırılmış ve distile su ile belirlenen miktarlara tamamlanmıştır.

Tablo 3.9. Fosfat tamponu çözeltilerinin hazırlanması.

pH	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Distile Su	Toplam Hacim
6	8.77 mL	1.23 mL	10 mL	20 mL
7	1.6 mL	8.4 mL	10 mL	20 mL
8	0.5 mL	9.5 mL	10 mL	20 mL

**Tris-HCl tamponu:** Enzimlerin pH 8 ile 10 aralığındaki aktivitesini ve kararlılığını belirlemek için 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. 0.24 g Trisma base 20 mL'de çözülerek 100 mM hazırlanmıştır. 8 M NaOH ve 1M HCl solüsyonları ile tamponun pH değeri 8, 9 ve 10'a ayarlanmıştır.

**2X Örnek yükleme tamponu:** SDS-PAGE jelde yürütülecek olan örneklerin gün ışığı altında görünebilmeleri için Tablo 3.10'daki değerlere göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.10. 2X örnek yükeme tamponunun hazırlanması.

Kullanılacak Çözelti	Miktar
0,5 M Tris- HCl pH 6.8	3.75 mL
%50 Gliserol	15 mL
%1 Bromfenol Blue	0.3 mL
%10 SDS	6 mL
dH <sub>2</sub> O	30 mL

30 mL dH<sub>2</sub>O ile çözülerek hazırlanmıştır. Boya içeren bu solüsyondan 95 µL alınmış ve üzerine 5 µL β-merkaptoetanol eklenerek örnek yükleme tamponu hazırlanmıştır.

**1X Yürütme tamponu:** Protein numunelerinin SDS-PAGE jelinde yürütülmesi amacıyla hazırlanmıştır. Tablo 3.11'de belirtilen şekilde hazırlanmış olan 10X yürütme tamponundan 100 mL alınmış, 900 mL dH<sub>2</sub>O'ya eklenerek 1X yürütme tamponu hazırlanmıştır.

Tablo 3.11. SDS-PAGE Jel yürütme tamponunun hazırlanması.

Bileşimi	g/L
Trisma Base	303
Glisin	144
SDS	10
dH <sub>2</sub> O	1000 mL

**SDS-PAGE yükleme jeli tamponu:** 6.8 g Trisma Base tartılarak 80 mL dH<sub>2</sub>O'da çözülmüş, pH 6.8'e ayarlanmıştır. dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**SDS-PAGE ayırma jeli tamponu:** 18.16 g Trisma Base tartılarak 80 mL dH<sub>2</sub>O'da çözülmüş, pH 8.8'e ayarlanmıştır. dH<sub>2</sub>O ile toplam hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.

### 3.1.4.3. Standartlar

***p*-NP standartı:** Enzim aktivitelerinin belirlenmesinde substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenol-D-glukopiranozoid (*p*-NPGP), *p*-nitrofenil-β-D-ksilopiranozoid (*p*-NPXP), ve *p*-nitrofenil-α-L-arabinopiranozoid (*p*-NPAF)'den serbest bırakılan *p*-nitrofenol (*p*-NP) miktarının ölçülmesi amacıyla standar oluşturmak için dH<sub>2</sub>O içerisinde 10 mM'lık *p*-nitrofenol stok çözeltisi hazırlanmıştır.

**Protein standartı:** Numunelerdeki protein miktarlarının belirlenmesi için 1 mg/mL BSA stok çözeltisi hazırlanmıştır.

**TLC için şeker standartları:** Hidrolizat son ürünlerin tanımlanması amacıyla TLC'de kullanılmak üzere standart olarak glukoz, ksiloz, mannoz, arabinoz, sellobiyoz ve laktozun %2'lik standart çözeltileri hazırlanmıştır.

### 3.1.5. SDS-PAGE Jelleri

**SDS-PAGE yükleme jeli:** SDS-PAGE jelde örnek yükleme kuyucuklarının oluşturulduğu ve örneklerin ayırma jeli başlangıcında aynı hizaya gelene kadar göç ettikleri jel olup, Tablo 3.12'ye göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.12. SDS-PAGE yükleme jelinin hazırlanması.

Kullanılacak Çözelti	Miktar
Akrilamid:bisakrilamid	0.666 mL
Yükleme jeli tamponu	1.28 mL
dH <sub>2</sub> O	3.11 mL
% 10 SDS	50 µL
% 10 APS	60 µL
TEMED	15 µL

**SDS-PAGE ayırma jeli:** SDS-PAGE jelde proteinlerin ağırlıklarına göre farklı bantlar oluşturdukları jel olup, Tablo 3.13'e göre hazırlanmıştır.

Tablo 3.13. SDS-PAGE ayırma jelinin hazırlanması.

Kullanılacak Çözelti	Alınması Gereken Miktar
Akrilamid:bisakrilamid	3.3 mL
Ayırma jeli tamponu	2.5 mL
dH <sub>2</sub> O	4.1 mL
% 10 SDS	100 µL
% 10 APS	25 µL
TEMED	15 µL

### 3.1.6. Metal İyonları, İnhibitörler ve Çözücüler

CuCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, AgNO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, KCl ve FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için 400 mM stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerinden ise toplam reaksiyon karışımında 1 mM olacak şekilde, 4 mM'lık kimyasal solüsyonları hazırlanmıştır.

SDS, PMSF, DTT, Tween 80, Triton-X-100, β-merkaptotanol, EDTA, etanol, aseton, metanol, DMSO, kloroform, izopropanol ve bütanol gibi çözücülerin ve fenol, asetik asit ve guaiakol gibi inhibitörlerin görece enzim aktivitesine olan etkisinin belirlenmesi için reaksiyon karışımındaki oranları %1 olacak şekilde çözeltileri hazırlanmıştır.

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Bakteri Kültürünün Üretilmesi**

#### **3.2.1.1. Karbon Kaynağı Olarak Kullanılan Samanın Ön-muamele ile Hazırlanması**

Bakteri gelişimi sırasında lignoselülozik degradasyonda rol alan enzimlerin indüklenebilmesi için karbon kaynağı olarak NaOH ile ön-muamele edilmiş buğday samanı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan buğday samanı Mersin'in Tarsus ilçesinde yerel hayvancılık yapanlardan temin edilmiştir. Buğday samanı ön-muamele öncesinde 60 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kuru buğday samanı öğütülerek ön-muameleyle hazır hale getirilmiştir. Ön-muamele için 10 g buğday samanı 100 mL %1'lik NaOH çözeltisi içinde 15 dk otoklavlanmıştır. Otoklavlama sonrasında saman santrifüj ile çöktürülerek sıvı kısımdan ayrıştırılmıştır. Yüksek miktarda çözünebilir lignin içeriğine sahip olduğu düşünülen koyu kahverengi renkteki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra ön-muamele görmüş saman hacminin 2 katı kadar su ile 10 defa yıkanmıştır. Daha sonra 70 °C'de 12 saat bekletilerek kurutulmuştur.

#### **3.2.1.2. *J. alba*'nın Katı Kültürde Çoğaltılması**

OMÜ Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarında bulunan *J. alba*'nın %20'lik gliserol stoğundan alınan 100 µL süspansiyon ISP2 agar besiyeri üzerine yayılmıştır. Besiyeri, bakterileri kolonilerinin sporlanabilmesi için 10 gün 30 °C'de inkübe edilmiştir.

#### **3.2.1.3. *J. alba*'nın Pasajlanması**

*J. alba* çalışma boyunca haftalık düzenli aralıklarla pasajlanmıştır. Pasajlama için ISP2 agar besiyeri kullanılmış olup pasajlama sırasında hücreler 30 °C'de üretilmişlerdir.

#### **3.2.1.4. *J. alba* Stoklarının Hazırlanması**

*J. alba* stoklarının hazırlanması için bakteri ISP2 sıvı besiyerinde üretilmiştir. Bunun için agar yüzeyinden steril öze ile sıyrılan sporlar sıvı kültüre inoküle edilmiştir ve sıvı kültür 180 rpm çalkalamalı koşullar altında 30 °C'de, 7 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, sıvı kültürden alınan 1 mL'lik hücre süspansiyonu %20 gliserol içeren steril ependorflara eklenmiştir. Daha sonra,

üzerine 60 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilerek karışım vakit kaybetmeksizin vortekslenmiştir. DMSO, şırınga yardımıyla 0.22 µm gözenek çapına sahip GVS marka filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir. Hazırlanan *J. alba* stokları -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.1.5. *J. alba* Aşı Kültürünün Hazırlanması**

Taze hazırlanmış *J. alba* katı kültüründen alınan bir öze dolusu spor 250 mL’lik Erlenmeyer’ler içerisindeki 50 mL ISP2 sıvı besiyerlerine aktararak 30 °C ve 180 rpm çalkalamalı koşullarda logaritmik fazın ortalarına gelecek şekilde 3 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen bakteri süspansiyonu aşı kültür olarak kullanılmıştır.

#### **3.2.1.6. *J. alba* ile β-Glukozidaz, β-Ksilozidaz ve α-L Arabinofuranozidaz Enzimlerinin Üretimi**

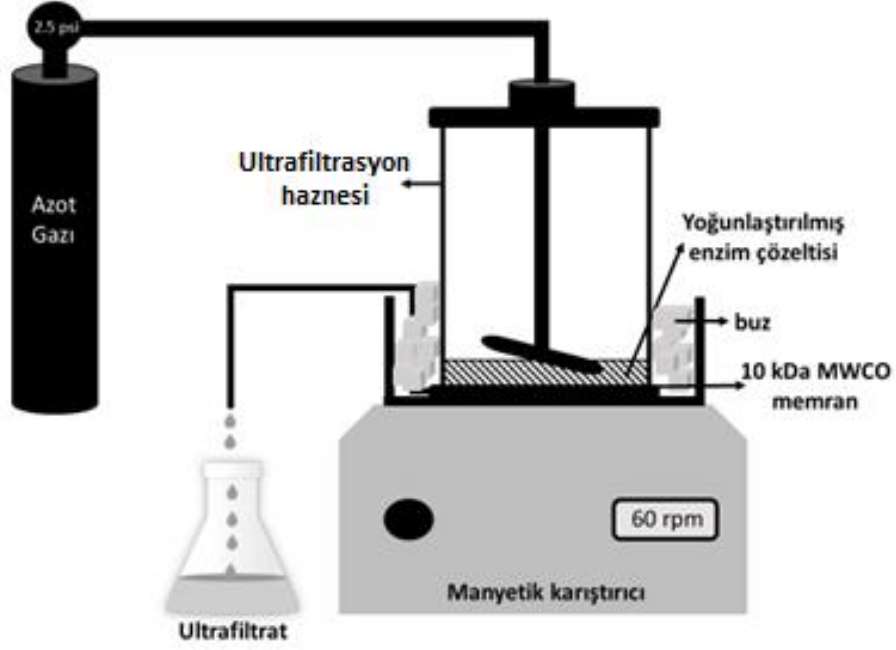
Enzim üretimi 250 mL’lik erlenlerde 50 mL’lik modifiye edilmiş ISP2 sıvı besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifiye ISP2 sıvı besiyeri besiyerine % 1.5 oranında NaOH ile ön-muamele görmüş samanın eklenmesiyle hazırlanmıştır. Enzim üretimi son konsantrasyon %2 (v/v) olacak şekilde aşı kültürün besiyerine ilave edilmesiyle başlatılmıştır. Enzimlerin üretimi, *J. alba*’nın belirtilen besiyerinde 5 gün süresince 30 °C ve 180 rpm’de inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.2. *J. alba* Kültüründen Enzimlerin Geri Kazanımı**

Enzim üretimi gerçekleştirildikten sonra kültür 50 mL’lik falkon tüplere aktarılmış ve +4 °C’de 10.000 x g kuvvetinde 15 dk süresince santrifüjlenmiştir. Falkon tüplerdeki süpernatantlar birleştirilmiş ve enzim üzerinde parçalayıcı etki göstermesi muhtemel proteazların aktivitesinin sınırlanması için son konsantrasyonu 100 µM (w/v) olacak şekilde fenilmetilsülfonil florür (PMSF) ilave edilmiştir. Elde edilen enzim çözeltisi ham enzim numunesi olarak kullanılmıştır.

##### **3.2.2.1. Ham Enzim Çözeltisinin Yoğunlaştırılması**

Ham enzim çözeltisinin yoğunlaştırılması Şekil 3.1’de gösterildiği gibi ultrafiltrasyonla gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi +4 °C’de Amicon 8200 ultrafiltrasyon haznesine doldurulan ham enzim çözeltisinin 10 kDa moleküler ağırlık sınırına (MWCO: molecular weight cut off) sahip membrandan azot gazı basıncı (2.5 psi) kullanılarak geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Ultrafiltrasyonun uygulaması.

### 3.2.2.2. Amonyum Sülfat Çöktürme

Ultrafiltrasyon sistemiyle yoğulaştırılarak elde edilen enzim solüsyonu iki eşit parçaya bölünmüş ve bunlardan birisi Şekil 3.2’de gösterilen akış diyagramındaki gibi %80 amonyum sülfat doygunluğuna ulaşacak şekilde tek basamaklı olarak, diğeri ise %50, %65 ve %80 amonyum sülfat doygunluğuna ulaşacak şekilde 3 basamaklı olarak amonyum sülfat çöktürmesine tabi tutulmuştur. Çöktürme işlemi sırasında kullanılacak olan amonyum sülfat miktarı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$g (NH)_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V(S_2 - S_1)}{3,54 - S_2}$$

V= Süpernatantın hacmi

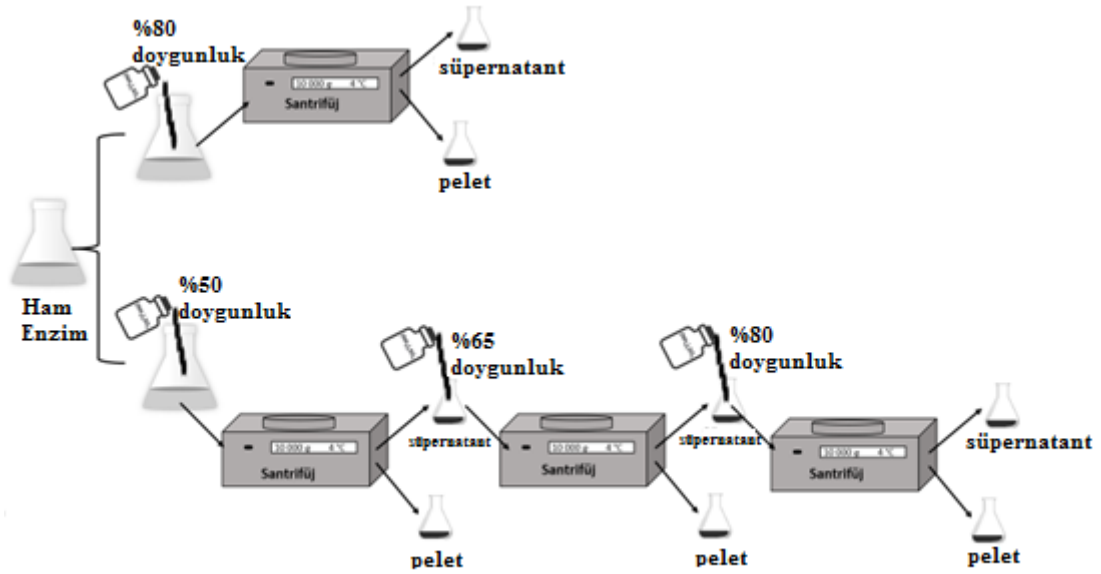
S<sub>1</sub>= İlk amonyum sülfat doygunluğu

S<sub>2</sub>= İstenilen amonyum sülfat doygunluğu

Belirtilen formüle göre %50 doygunlukta olması için gerekli olan miktarda amonyum sülfat tartılarak + 4-8 °C’deki enzim solüsyonuna yavaş yavaş eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanmıştır. Karışım bir gece boyunca +4 °C’de manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Proteinlerin çökeltmesi için %50 amonyum sülfat doygunluğundaki ham enzim çözeltisi +4 °C’de 10.000 x g

kuvvetinde 10 dk santrifüjlenmiştir. Çökeltilen proteinler iki katı miktarda fosfat tamponu ile çözülmüştür.

%50 amonyum sülfat çöktürmesinden sonra uygulanan santrifüjleme sonrasında kalan süpernatant üzerine toplamda %65 doygunluğa sahip olacak şekilde amonyum sülfat eklenmiştir. Böylece %50-65 amonyum sülfat doygunluğunda çökelen proteinlerin geri kazanılması amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen tüm işlemler (amonyum sülfatla doyurma, santrifüjleme) işlemler bir önceki basamaktaki gibi uygulanmıştır. Bir sonraki basamakta, benzer işlemler gerçekleştirilerek %65-80 amonyum sülfat doygunluğunda çökelen proteinler geri kazanılmıştır (Şekil 3.2).



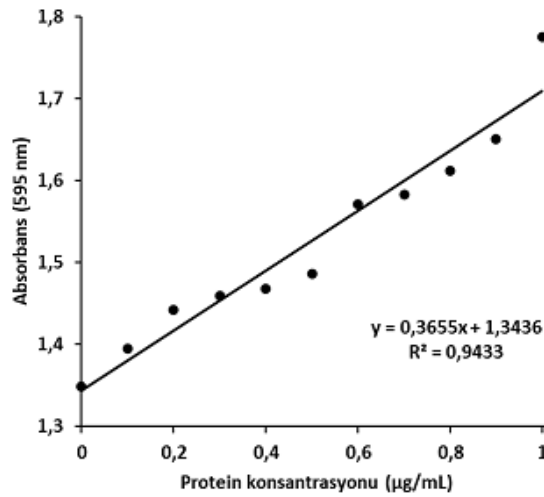
Şekil 3.2. Amonyum sülfatla çöktürme deneylerinin yapıları.

### 3.2.2.3. Diyaliz

Amonyum sülfatla çöktürme işlemi ile elde edilen protein çözeltileri Pur-A-Lyzer™ midi marka kit kullanılarak diyaliz edilmiştir. Kit diyaliz membranı içerisine 3 mL enzim çözeltisi ilave edildikten sonra diyaliz kiti beher içerisindeki 100 mM fosfat tampona daldırılmıştır. Beher +4 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. Beher içerisindeki tampon çözelti inkübasyon süresince manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmış ve tampon 6 saatlik aralıklarla düzenli olarak tazelenmiştir. Böylelikle amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında ortamda bulunan ve enzimin çalışmasını engelleyen amonyum tuzları kısmi saflaştırılmış enzim çözeltilerinden uzaklaştırılmıştır.

### 3.2.2.4. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Enzim numunelerindeki protein miktarının ölçülmesi Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak Bovin Serum Albumini (BSA) standart grafiği çizilmiştir. BSA standartlarının hazırlanması için dH<sub>2</sub>O'da çözülmüş 1 mg/mL'lik BSA stoğundan tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL aktarılmış ve her tüpün toplam hacmi 100 µL olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır. Çözeltilerin üzerine 1000 µL Bradford çözeltisi eklenmiş ve karışım 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra, karışımın 595 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometre ile ölçülmüştür. Elde edilen değerler kullanılarak Excell programında protein standart grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Protein standart grafiği.

Enzim numunelerindeki protein miktarlarının belirlenmesi için uygun oranda seyreltilmiş numunenin 100 µL'si üzerine 1 mL Bradford çözeltisi eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildikten sonra 595 nm dalga boyundaki absorbansı belirlenmiştir. Elde edilen absorbansa karşılık gelen protein miktarı çizilen standart grafiğe ait formül yardımıyla hesaplanmıştır.

### 3.2.2.5. SDS-PAGE Yöntemi

Enzim numunelerindeki proteinlerin ayrıştırılarak profillenmesi için SDS-PAGE yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde proteinler, akrilamid jel boyunca elektrik akımı yardımıyla yürütülerek denatüre edici koşullar altında ayrıştırılmıştır. Akrilamid jel yükleme jeli ve ayırıcı jel olmak üzere iki kısımdan oluşturulmuştur. Ayırma jelinin (%10'luk) hazırlanması için ilk olarak 2.5 mL ayırıcı jel tamponu,

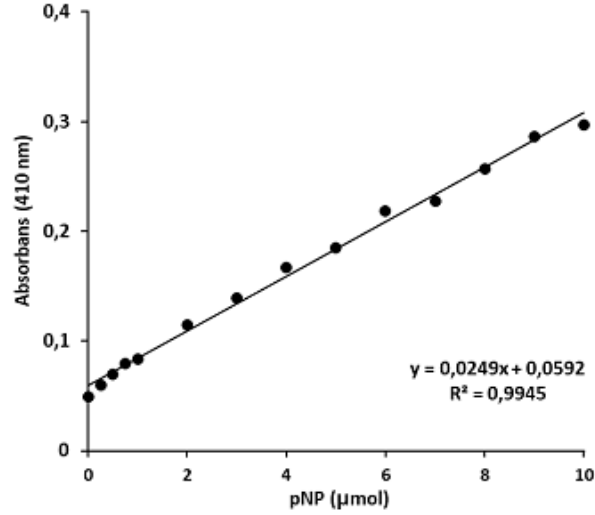
3.33 mL akrilamid-bis akrilamid ve 100 µL SDS (%10) içeren çözeltiye 4.1 mL distile su ilave edilmiştir. Daha sonra, akrilamidin polimerleşmesi için karışıma 25 µL %10'luk APS ve 15 µL TEMED ilave edilmiştir. Karışım polimerleşmeden önce 5/4'ünü dolduracak şekilde jel kasetine yüklenmiştir. Jel kasetine yüklenen karışımın üzerine 1 mL izopropanol ilave edilerek jelin yüzeyinin düzleşmesi sağlanmıştır. Polimerizasyon gerçekleştiğinde izopropanol boşaltılmış, dH<sub>2</sub>O ile jel yüzeyi yıkanmış ve 666 µL akrilamid-bis akrilamid, 1.28 mL yükleme jel tamponu, 3.11 mL distile su, 50 µL %10'luk SDS, 60 µL %10'luk APS ve 15 µL TEMED ile ayırma jelinin yapımında belirtildiği gibi hazırlanan %5'lik yükleme jeli kasete dökülmüştür. Ardından örnek yükleme kuyularının oluşması için kasete tarak yerleştirilmiştir.

Polimerizasyon gerçekleşince kaset tanka yerleştirilerek tank yürütme tamponu ile doldurulmuştur. Protein örnekleri (30 µL) ise boya içeren örnek yükleme tamponu (20 µL) ile karıştırılarak 95 °C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Denatüre edilen örnekler jelde oluşturulan kuyulara yüklendikten sonra jel ilk olarak 30 V akıma maruz bırakılmıştır. Örnekler yükleme jelini geçip, ayırma jelinin üst kısmında yoğunlaştıklarında ise akım 80 V'a yükseltilerek yürütme işlemine devam edilmiştir. Yürütme, örnek yükleme tamponundaki boyanın jelin en altına ulaşmasıyla sonlandırılmıştır. Yürütme işlemi bittiğinde kaset açılarak jel alınmıştır. Yükleme jeli uzaklaştırılarak jelin üst kısmı kesikle işaretlenmiştir. Jeller proteinlerin boyanması ve fikse edilmesi için boyama çözeltisinde 45 dk 30 rpm'de oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından, jel taze boya çözeltisi içinde aynı koşullarda 45 dk bekletilmiştir. Jeller boya giderme çözeltisi içerisinde 30 rpm'de, oda sıcaklığında, 1 gece boyunca inkübe edilerek proteinlere bağlanmayan boyaların uzaklaştırılması sağlanmıştır.

### **3.2.3. Enzim Aktivitesinin Belirlemesi**

#### **3.2.3.1. *p*-NP Standartının Hazırlanması**

Enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanılacak substratların parçalanma ürünü olan *p*-NP'e ait standart grafiğin çizilmesi için 100 mM'lık pH 7 fosfat tamponu ile hazırlanan 0-10 µmol'lük *p*-NP çözeltilerinin 410 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. Absorbans değerlerine karşı derişim grafiği ise Microsoft Excel programı yardımı ile Şekil 3.4'de gösterildiği gibi çizilmiştir.



Şekil 3.4. *p*-NP standart grafiği.

### 3.2.3.2. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

$\beta$ -Glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi için sırasıyla, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glukopiranozid (*p*-NPGP), *p*-Nitrofenil- $\beta$ -D-ksilopiranozid (*p*-NPXP) ve *p*-Nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranozid (*p*-NPAF) substratları kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı 100 mM pH 7 fosfat tampon ve 5 mM substrat içerecek şekilde hazırlandıktan sonra 37 °C'de 20 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, enzim aktivitesinin durdurulması için tüplere reaksiyon karışımının 2 katı hacminde 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenmiş ve karışımın 410 nm dalgaboyundaki absorbansı kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi sonucu salınan *p*-NP miktarı *p*-NP standart grafiği (Şekil 3.4) yardımıyla hesaplanmıştır. Reaksiyon süresince substrattan kendiliğinden salınan *p*-NP'ün miktarının tespit edilmesi için enzim çözelti eklenmemiş reaksiyon karışımının aynı koşullarda inkübasyonu sonucu 410 nm dalgaboyundaki absorbansı belirlenmiştir. Ayrıca, enzim çözeltisinin reaksiyon karışımının 410 nm dalgaboyundaki absorbansına etkisinin belirlenmesi için substratsız reaksiyon karışımı kullanılmıştır. Bir ünite (U) enzim aktivitesi 1 mL enzim çözeltisinin belirlenen şartlar altında 1 dakikada substrattan salınımına sebep olduğu µmol cinsinden *p*-NP miktarı olarak ifade edilmiştir.

### **3.2.4. Enzim Karakterizasyonu**

#### **3.2.4.1. Sıcaklığın Enzimlerin Aktiviteleri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi**

Enzim aktivitesinin ölçümü, ilgili enzim için hazırlanan reaksiyon karışımlarının 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir enzim için ayrı ayrı tespit edilen en yüksek aktivitenin ölçüldüğü sıcaklık değerleri ilgili enzimin “optimum sıcaklık” değeri olarak kaydedilmiştir. Optimum sıcaklıkta ölçülen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve bu değer temel alınarak diğer sıcaklıklar için ölçülen aktiviteler “%görece aktivite” olarak sunulmuştur.

#### **3.2.4.2. Sıcaklığın Enzimlerin Kararlılıkları Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi**

Sıcaklığın enzim kararlılığı üzerine etkisi belirlenirken kısmi saflaştırılmış enzim çözeltileri 40, 50, 60 ve 70 °C’de ayrı ayrı 1, 2, 3 ve 4 saat ön-inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, enzimlerin aktiviteleri optimum sıcaklıkta kısım 3.2.3.2’de belirtildiği gibi belirlenmiştir. Ön-inkübasyona bırakılmamış kısmi saflıktaki enzim çözeltilerinin aynı koşullardaki aktiviteleri %100 olarak kabul edilmiş ve sonuçlar “%kalan aktivite” şeklinde sunulmuştur.

#### **3.2.4.3. pH’nın Enzimlerin Aktiviteleri Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi**

pH’nın kısmi saflıktaki  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin aktiviteleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi her bir enzim için tanımlanan reaksiyon karışımındaki tamponun ve pH değerlerinin değiştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; pH 4-6, pH 6-8 ve pH 8-10 aralığının test edilmesi için sırasıyla sitrat, fosfat ve Tris-HCl tamponları kullanılmıştır. Enzimatik aktivite analizleri her enzim için daha önce tespit edilen optimum sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Enzimlerin en çok aktivite gösterdiği pH değerleri “optimum pH değerleri” olarak belirlenmiştir. Optimum pH değerinde ölçülen enzim aktiviteleri ise %100’lük aktivite olarak kabul edilmiş, diğer pH’larda ölçülen aktiviteler ise “%görece aktivite” olarak sunulmuştur.

#### **3.2.4.4. pH’nın Enzimlerin Kararlılıkları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

pH’nın kısmi saflıktaki  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin kararlılıkları üzerindeki etkisinin belirlenmesi için enzimler farklı

pH'lardaki tampon sistemleri içerisinde 1 saat süresince oda sıcaklığında ön-inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, enzim aktiviteleri önceki deneylerle belirlenmiş optimal koşullar altında standart olarak belirlenmiştir. Ön-inkübasyona bırakılmamış enzim çözeltisinin optimal koşullar altındaki aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve sonuçlar “% görece aktivite” şeklinde sunulmuştur.

#### **3.2.4.5. NaCl'ün Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

NaCl'ün  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın enzim aktiviteleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi için reaksiyon karışımları farklı oranlarda NaCl (%0, 1, 2, 4, 8 ve 12) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra, enzim aktiviteleri her enzim için tanımlanan optimal koşullar altında belirlenmiştir. Enzim aktivitesi ölçümleri ilgili enzime ait optimum sıcaklık ve optimum pH'da gerçekleştirilecektir. Ölçülen en yüksek enzim aktivite değeri %100 olarak kabul edilmiştir.

#### **3.2.4.6. NaCl'ün Enzimlerin Kararlılıkları Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**

Aktivitelerinin belirlenmesi öncesinde enzimler farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren tampon sistemlerinde oda sıcaklığında 1 saat süresince ön-inkübasyona bırakılmıştır. Ön-inkübasyon sonrasında enzim aktiviteleri tespit edilmiştir. NaCl'süz tampon sistemlerinde 1 saat ön-inkübasyona bırakılan enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.

#### **3.2.4.7. Metal İyonlarının Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi**

Enzim aktiviteleri, 1 mM  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{KCl}^+$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  içeren reaksiyon karışımları kullanılarak optimum koşullar altında tespit edilmiştir. Metal iyonu içermeyen reaksiyon karışımlarındaki enzimlerin aktiviteleri %100 olarak değerlendirilmiş olup, sonuçlar buna göre “% görece aktivite” şeklinde verilmiştir.

#### **3.2.4.8. Kimyasalların Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi**

$\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın enzim aktiviteleri %1 oranında PMSF, DTT, tween 20, triton X-100, SDS,  $\beta$ -merkaptetanol ve EDTA içeren reaksiyon karışımları kullanılarak optimum koşullar altında tespit edilmiştir. Herhangi bir kimyasal içermeyen reaksiyon karışımlarındaki enzimlerin aktiviteleri %100 olarak değerlendirilmiş olup, sonuçlar buna göre “% görece aktivite” şeklinde verilmiştir.

### 3.2.4.9. Çözücülerin Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Enzimlerin aktiviteleri reaksiyon karışımında %1 oranında ayrı ayrı etanol, metanol, aseton, DMSO, izopropanol ve bütanolün bulunduğu koşullarda ölçülmüştür. Her bir enzim için, çözücü bulundurmeyen reaksiyon karışımındaki enzim aktivitesi %100 olarak değerlendirilmiş olup, sonuçlar buna göre “%görece aktivite” şeklinde verilmiştir.

### 3.2.4.10. Lignoselüloz Türevli İnhibitörlerin Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

$\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın enzim aktiviteleri %1 guaiakol, asetik asit, fenol, şiringik asit, ferulik asit, vanilik asit ve sinapik asit içeren reaksiyon karışımları kullanılarak optimum koşullar altında tespit edilmiştir. Lignoselülozik inhibitör içermeyen reaksiyon karışımlarındaki enzimlerin aktiviteleri %100 olarak kabul edilmiş olup, diğer aktiviteler “%görece aktivite” biçiminde verilmiştir.

### 3.2.5. Hidroliz

Model lignoselülozik materyal olarak kullanılan NaOH ile ön-muamele edilmiş kuru substratın 0.2 gramı 50 mL'lik Falkon tüp içerisine yerleştirilerek otoklavlanmıştır. Üzerine, sterilize edilmiş 8 mL 100 mM fosfat tamponu (pH 8) ilave eklenmiştir. Daha sonra son konsantrasyon 0-20 mg/g kuru substrat olacak şekilde 20-kat yoğunlaştırılmış enzim ilave edilmiş ve tüpteki toplam hacim 15 mL'ye tamamlanmıştır.

Negatif kontrol olarak; 0.2 g kuru substrat üzerine son hacim 15 mL olacak şekilde steril tampon ilave edilmiştir. Pozitif kontrol; kullanılan enzimlerle aynı yoğunlukta *Aspergillus niger*'den elde edilmiş ticari selüloolitik enzim karışımı ilave edilerek hazırlanmıştır.

Hidroliz işlemi, Falkon tüpler içerisinde hazırlanan karışımın enzimlerin optimum çalışma sıcaklığında, 150 rpm çalkalamalı koşullarda, 4 saat süresince inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sırasında başlangıç anı da olmak üzere her 1 saatte tüp nazikçe karıştırıldıktan sonra (birkaç kez alt üst edilerek) 300  $\mu$ L örnek alınmıştır. Örnek 12.000 x g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra -20 °C'de saklanmıştır.

### **3.2.5.1. DNS Metodu ile İndirgenmiş Şeker Miktarı Analizi**

Hidrolizin tamamlanmasını takiben tüm örneklerdeki indirgenmiş şeker miktarı DNS yöntemi ile analiz edilmiştir. Santrifüje edilerek -20 °C'de saklanmış olan örnekten 200 µL alınarak üzerine 400 µL DNS çözeltisi eklenmiştir. 99 °C'de 5 dk kaynatma işlemi yapılmıştır. Çözeltinin üzerine 1 mL dH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbanans ölçümü yapılmıştır.

Ayrıca, tüplerdeki hidroliz sıvısı 12.000 x g'de 10 dk santrifigasyon ile geri kazanılarak liyofilize edilmiştir. Tüplerde kalan saman parçaları ise yıkandıktan sonra hızla elektron mikroskopisi ve FTIR analizi için hazırlanmıştır.

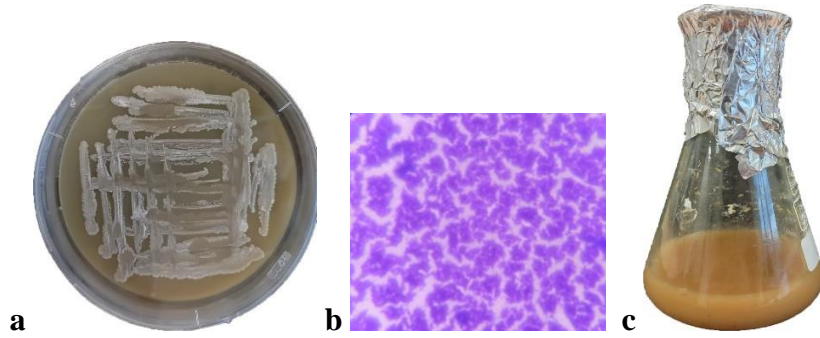
### **3.2.6. İnce Tabaka Kromatografisi**

Liyofilize edilmiş olan hidrolizatlar üzerine 250 µL udH<sub>2</sub>O ilave edilmiş ve protein yoğunluğu 2 mg/g kuru substrat olacak şekilde TLC plaka üzerine yüklemesi yapılmıştır. %2'lik hazırlanmış stok standart çözeltilerinden 100 µL alınmış ve bir araya getirilmiştir. Standart çözeltinin ve hidrolizatların plaka üzerinde yürütülmesi formik asit, 2-bütanon, tert-bütanol, distile sudan (3:1:1 v/v/v) oluşan çözücü sistemi aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Yürütülen bileşiklerin görselleştirilmesi için 3.25 g fitalik asit, 2 mL anilin ve 100 mL bütanol ile hazırlanan çözelti plaka üzerine püskürtüldükten sonra plaka 95 °C'de leke oluşumu gözlemleninceye kadar bekletilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

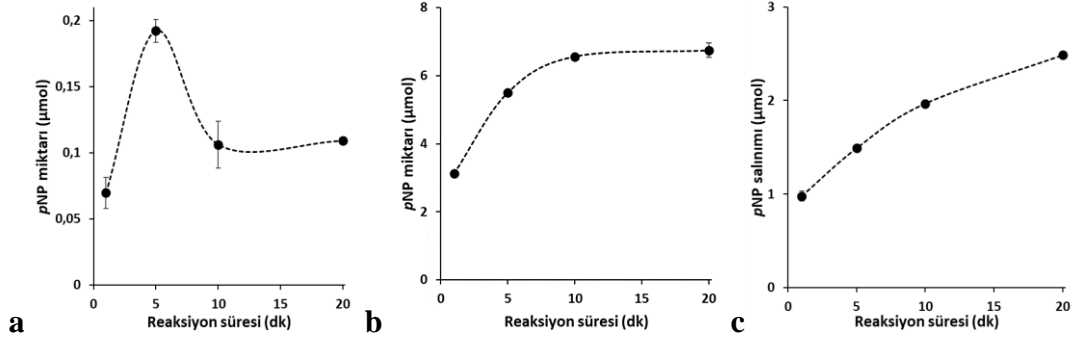
### 4.1. *J. alba* Kültürünün Üretilmesi

Gliserol stoğundan ISP2 agar besiyerine yayılan *J. alba* başarılı bir şekilde üretilerek (Tablo 3.1) pasajlanmıştır. Pasajlamalar sırasında kontaminasyon durumu hem kültürel hem de mikroskopik olarak kontrol edilmiştir. Daha sonra,  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimleri modifiye ISP2 sıvı besiyerinde (Tablo 3.2) *J. alba* tarafından üretilmiş ve ilk aşamada enzim aktivite analizlerinde kullanılacak reaksiyon süreleri belirlenmiştir.



Şekil 4.1. (a) *J. alba*'nın katı kültürdeki görüntüsü, (b) *J. alba*'nın Gram boyama sonrası mikroskop görüntüsü, (c) enzim üretimi sonrası *J. alba* sıvı kültürünün görüntüsü.

Üretim sonrasında elde edilen ham enzim kullanılarak enzim aktivitesi analizlerinde kullanılmak üzere en uygun reaksiyon süresi, enzim-substrat karışımının farklı sürelerde (1-20 dk) inkübe edilmesiyle tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen enzim analizi deneyleri neticesinde farklı reaksiyon sürelerinde  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın sırasıyla, *p*-nitrofenol-D-glukopiranozid, *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-ksilopiranozid ve *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-arabinopiranozid'den her bir dakika serbest bıraktığı *p*-NP miktarı Şekil 4.2'de gösterilmiştir.  $\beta$ -glukozidaz enziminin dakikada serbest bıraktığı *p*-NP miktarının reaksiyon süresinin 5'den 10 dakikaya yükseltilmesiyle azaldığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz tarafından süreye karşı substrattan salınan *p*-NP grafiklerinde lineer çizgi oluşturdukları alanın 0-5 dk aralığı olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar neticesinde enzim aktivitelerinin belirlenmesi için inkübasyon süresinin 5 dk olması gerektiği tespit edilmiştir.

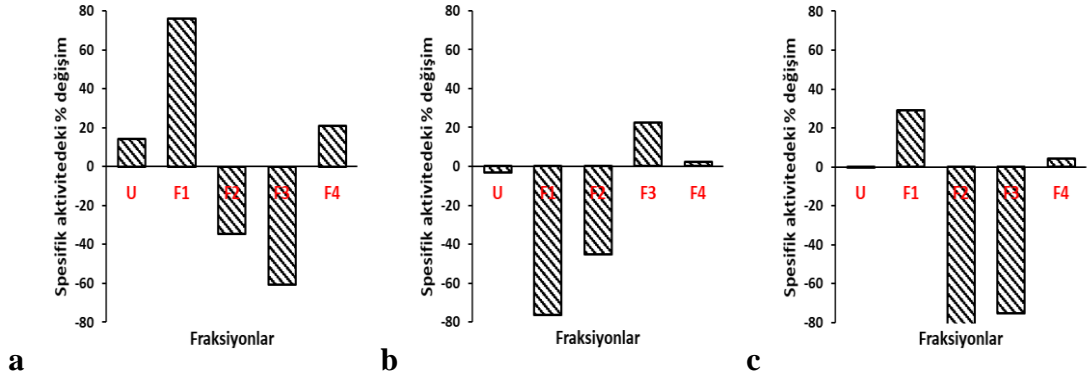


Şekil 4.2. Enzim aktivitesi ölçüm deneylerinde reaksiyon karışımlarının farklı sürelerde inkübe edilmelerine bağlı olarak β-glukozidaz (a), β-ksilozidaz (b) ve α-L-arabinofuranozidaz (c) enzimlerinin her bir dakikada substrattan salınımına neden olduğu p-NP miktarı.

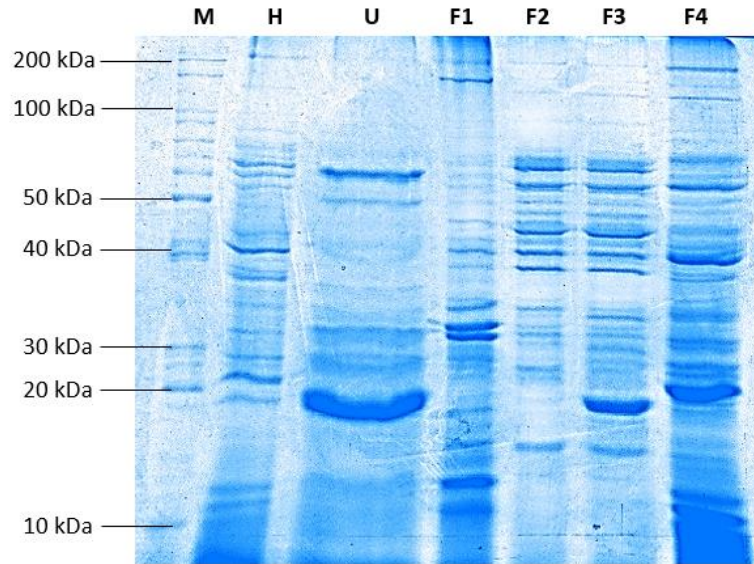
#### 4.2. Enzimlerin Kısmi Saflaştırılmaları

Farklı yöntemler kullanılarak ham enzimden (H) kısmen saflaştırılmış fraksiyonlardaki protein içerikleri ve enzim aktivitelerinden faydalanılarak özgül aktiviteleri hesaplanmıştır. İlk fraksiyon ham enzim çözeltisinin 20 kat yoğunlaştırılmasıyla elde edilmiştir (U). Diğer fraksiyonlar ise %50 (F1), %50-65 (F2), %65-80 (F3) ve %80 (F4) amonyum sülfat doyumunda geri kazanılmış enzim preparatları şeklinde hazırlanmıştır.

β-Glukozidazın H, U, F1, F2, F3 ve F4'deki özgül aktivitesi sırasıyla,  $0,67 \pm 0,12$ ,  $0,75 \pm 0,06$ ,  $1,23 \pm 0,04$ ,  $0,42 \pm 0,1$ ,  $0,25 \pm 0,02$ ,  $0,79 \pm 0,07$  U/mg protein olarak hesaplanmıştır. β-Ksilozidaz enziminin özgül aktivitesi H, U, F1, F2, F3 ve F4'de sırasıyla,  $10,59 \pm 2,19$ ,  $10,00 \pm 1,24$ ,  $2,42 \pm 0,64$ ,  $5,70 \pm 0,26$ ,  $12,84 \pm 0,83$  ve  $10,60 \pm 1,31$  U/mg protein olarak bulunmuştur. H, U, F1, F2, F3 ve F4'ki özgül aktivite değerleri ise α-L-arabinofuranozidaz için sırasıyla  $4,69 \pm 0,11$ ,  $4,68 \pm 0,09$ ,  $6,06 \pm 0,22$ ,  $0,71 \pm 0,09$ ,  $1,15 \pm 0,21$  ve  $4,87 \pm 0,93$  U/mg protein olarak belirlenmiştir (Şekil 4.3). Özetle; β-glukozidaz ve β-ksilozidaz enzimlerinin özgül aktivitelerinin en yüksek olduğu fraksiyonun F1 olduğu, α-L-arabinofuranozidaz için ise F3 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca ham enzim ve her bir fraksiyondaki proteinler SDS-PAGE ile poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Farklı fraksiyonlardaki  $\beta$ -glukozidaz (a),  $\beta$ -ksilozidaz (b) ve  $\alpha$ -L-arabinofuranosidaz (c) enzimlerinin özgül aktivitelerinin ham enzime göre %değişimlerini gösterir grafik. U Ultrafiltrasyonla 20-kat yoğunlaştırılmış enzim preparatını ifade etmektedir. F1, F2, F3 ve F4 ise sırasıyla %50, %50-65, %65-80 ve %80 amonyum sülfat doygunluğunda geri kazanılmış enzim preparatlarını ifade etmektedir.



Şekil 4.4. Farklı fraksiyonlardaki protein profillerinin SDS-PAGE ile gösterilmesi. M, H ve U sırasıyla şahit proteinlerin, ham enzim preparatının ve ultrafiltrasyonla 20-kat yoğunlaştırılmış enzim preparatının poliakrilamid jelde yürütüldüğü hatları ifade etmektedir. F1, F2, F3 ve F4 ise sırasıyla %50, %50-65, %65-80 ve %80 amonyum sülfat doygunluğunda geri kazanılmış enzim preparatlarının yürütüldüğü hatları ifade etmektedir.

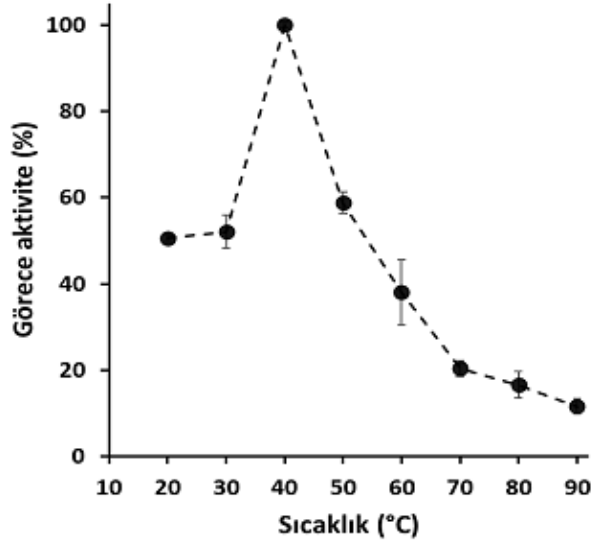
Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'e bakıldığında  $\beta$ -glukozidaz için en iyi fraksiyon değeri %65,  $\beta$ -ksilozidaz için en iyi fraksiyon değeri %80 ve  $\alpha$ -L-arabinofuranosidaz için en iyi fraksiyon değeri %50 olarak görülmektedir.

### 4.3. Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -Glukozidaz'ın Biyokimyasal Özellikleri

#### 4.3.1. Sıcaklığın $\beta$ -Glukozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Farklı sıcaklıkların (20-90 °C)  $\beta$ -glukozidaz'ın enzim aktivitesi üzerindeki katalitik etkileri 100 mM'lık pH 7 fosfat tamponu ile hazırlanan reaksiyon ortamında

test edilmiştir. Deney sonuçlarına bakıldığında  $\beta$ -glukozidaz'ın enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklığın 40 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). Enzimin görece aktivitesinin 30 °C'de %52'ye, 20 °C'de ise %50'ye düştüğü görülmüştür. Sıcaklık artışına bağlı olarak 50 °C'de %58 aktivite görülürken 60 °C'de %37 aktivite görülmüştür. Enzim aktivitesi 70 °C'den sonra görece aktifliğini oldukça yitirmektedir.



Şekil 4.5. Sıcaklığın  $\beta$ -glukozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

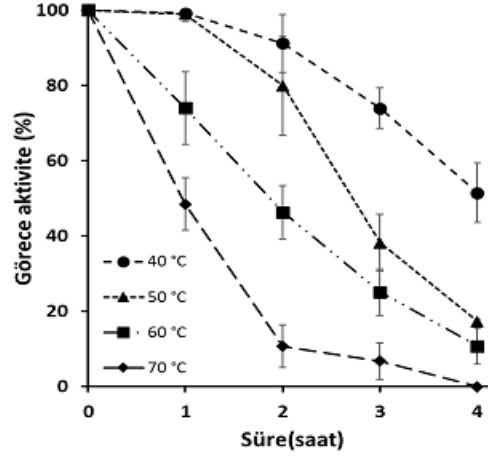
$\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklık değerleri genellikle enzimin elde edildiği kaynağa göre değişiklik göstermektedir. Ancak, mezofilik sıcaklıklarda gelişim gösteren aktinomisetlerden elde edilen  $\beta$ -glukozidaz, genellikle bu sıcaklıklarda yüksek aktivite sergilemektedirler. *J. alba* tarafından üretilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin mezofilik sıcaklık aralıklarında yüksek aktivite sergilediği görülmüştür. *J. alba*'nın mezofilik karakterli olması açısından elde edilen sonuçlar şaşırtıcı olmamıştır.

Literatürde *Jiangella* taksonunda sınıflandırılan herhangi bir bakteri türünden elde edilmiş  $\beta$ -glukozidaz enzimine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bundan dolayı sonuçlar başka aktinobakteri türlerinden elde edilen sonuçlarla kıyaslanabilmektedir. Ancak endüstriyel alanda mezofilik karaktere sahip aktinomisetler endoglukanaz ve endoksilanaz elde edilmesi amacıyla daha yoğun olarak kullanıldıkları için literatürde çoğunlukla termofilik özelliğe sahip türler bulunmaktadır. Buna göre; *Micromonospora chalybeata*'nın indükleyici olarak selüloz

bulunan sıvı besiyerinde ekstraselüler olarak ürettiği  $\beta$ -glukozidaz'ın optimum sıcaklık değerinin 52 °C olduğunu belirlenmiştir (Gallagher et al., 1996). Selülitik bir aktinomiset olan *Thermobifida fusca*'nın ürettiği  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 50 °C olduğu rapor edilmiştir (Spiridonov and Wilson, 2001). Lee and Lee (2010) yapmış oldukları çalışmada kanalizasyon arıtma tesisinden izole edilen *Acinetobacter kyonggiensis* ile üretilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 30 °C olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise *Streptomyces albaduncus* ile ekstraselüler olarak üretilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklık değerinin 30 °C olduğu tespit edilmiştir (Harchand ve Singh, 1996). *Cellulomonas biazotea* NIAB442'den intraselüler olarak elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum sıcaklık değeri 38 °C olarak belirlenmiştir (Siddiqui et al., 1997).

#### 4.3.2. Sıcaklığın $\beta$ -Glukozidaz'ın Karlılığı Üzerindeki Etkisi

Farklı sıcaklıkların (40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C) ve farklı sürelerin (30, 60, 120, 180 ve 240 dk)  $\beta$ -glukozidaz'ın enzim aktivitesi üzerindeki katalitik etkileri 100 mM'lık pH 8 fosfat tamponu ile hazırlanan reaksiyon ortamında test edilmiştir.  $\beta$ -glukozidaz, optimum sıcaklığı olan 40 °C'de 1. ve 2. saatte görece aktivitesinin %100'e yakınına korurken 3. saatten sonra görece aktivitesinin %73'e düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim 4 saat 40 °C'de inkübe edildiğinde görece aktivitesini %50 oranında kaybettiği görülmüştür. Bununla beraber, 50 °C'de 3. saatten, 60 °C'de 2. saatten, 70 °C'de ise 1. saatten itibaren enzimin görece aktivitesinin %50 nin altına düştüğü görülmektedir (Şekil 4.6). Elde edilen sonuçlara göre, enzim 40 °C ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra görece aktivite azalması açısından büyük bir fark olmamasına karşılık 60 °C ve 70 °C'lerde görece enzim aktivitesinde oldukça önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak yine de bu sıcaklıklarda gerçekleştirilecek 1-2 saatlik endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6. Sıcaklığın  $\beta$ -glukozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

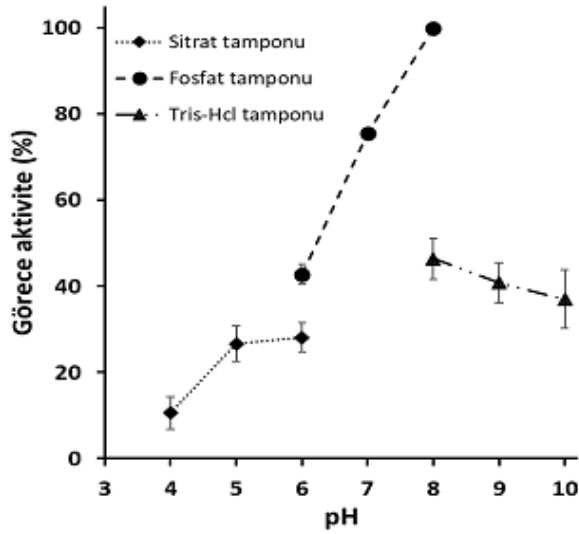
Gallagher et al. (1996), aktinomiset olan *Micromonospora chalybeata*'e ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin 30 °C'de 1 saat dayanabildiğini ancak 50 °C'den sonra en fazla 10 dakika dayanabildiğini gözlemlemiştir. Moldoveanu and Kluepfel (1983), *Streptomyces* sp. CB-12 suşuna ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin 40 °C'de 1 saatlik inkübasyon sonunda görece enzim aktivitesinin %70'ini koruduğunu bulmuşlardır. Harchand and Singh (1996), *Streptomyces albaduncus*'a ait  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinin optimum olduğu 30 °C'de enzim aktivitesini 15 dakika süreyle %90'a kadar korurken 30 dakika sonra %75'e düştüğünü gözlemlemiştir. Ayrıca, 40 °C'de 15 dakika içerisinde görece enzim aktivitesinin %40'a kadar düştüğünü belirtmişlerdir. Spiridonov and Wilson (2001), termofilik bir aktinobakteri olan *Thermobifida fusca*' ile üretilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin 60 °C'de kararlı kalabildiğini ancak 65 °C'de hızlıca inaktive olduğunu bulmuşlardır. Gong et al. (2014), *Aspergillus niger* Au0847 suşuna ait  $\beta$ -glukozidaz'ın enzim aktivitesinin en yüksek gözlemlendiği sıcaklık değerini 65 °C bulmuşlardır. Ancak enzim bu sıcaklıkta 40 dk bekletildiğinde görece aktivitesinin %20'ye yakını kaybettiğini, 70 °C'de 20 dk bekletildiğinde ise görece aktivitesinin %50'sinden fazlasını kaybettiğini belirlemişlerdir.

Çalışmamızda *J. alba*  $\beta$ -glukozidaz enziminin literatürdeki diğer mezofilik aktinomisetlere göre kararlılığını korumada daha başarılı olduğu görülmektedir.

#### 4.3.3. pH'nın $\beta$ -Glukozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Elde edilmiş olan enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerlerinin saptanması için 100 mM sitrat tamponu (pH 4-6), 100 mM fosfat tamponu (pH 6-8)

ve 100 mM Tris-HCl (pH 8-10) tamponu kullanılmıştır. Enzim analizleri neticesinde  $\beta$ -glukozidaz'ın pH 8 fosfat tamponunda en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir (%100). Bununla birlikte pH'sı 7'ye ayarlanmış fosfat tamponunda %64 olarak belirlenmiştir. pH değeri 4, 5 ve 6 olan sitrat tamponunda  $\beta$ -glukozidaz'ın görece aktivite değerleri sırasıyla %0.10, %16 ve %71 olarak belirlenmiştir. pH değeri 8, 9 ve 10 olan Tris-HCl tamponunda ise  $\beta$ -glukozidaz'ın görece aktivite değerleri sırasıyla %21, %14 ve %15 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. pH'nın  $\beta$ -glukozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

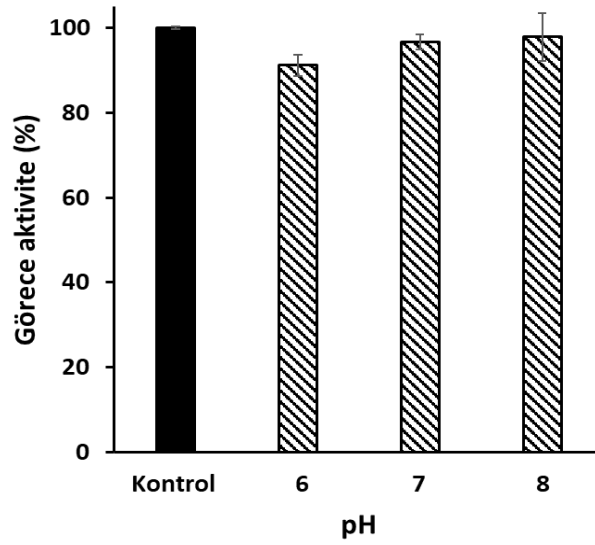
Gallagher et al. (1996), *Micromonospora chalybeata*'e ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimal pH değerini 7.25 olarak bulmuşlardır. Spiridonov and Wilson (2001), *Thermobifida fusca*'dan elde ettikleri  $\beta$ -glukozidaz için pH 6.5 ile 8.5 aralığını denemişlerdir ve enzimin optimum pH'sının 7 olduğunu tespit etmişlerdir. Harchand and Singh (1996), *Streptomyces albaduncus*'a ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin 6.5 ile 9 pH aralığında enzimin kararlı olduğunu ve pH 9 ile 11 arasında enzim aktivitesinin %80'e düştüğünü bulmuşlardır. *Cellulomonas biazotea* NIAB442'den intraselüler olarak elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH değeri 6.6 olarak belirtilmiştir.

*Jiangella alba*  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH değeri, literatür verilerinden elde edilen aktinomisetlere ait olan pH değerinden daha yüksek seyretmektedir. *J. alba*'ya ait en yakın pH değerini *Streptomyces albaduncus* vermektedir.

#### 4.3.4. pH'nın $\beta$ -Glukozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi

$\beta$ -Glukozidaz 100 mM pH 6, 7 ve 8 fosfat tamponunda 1 saat 40 °C'de inkübe edildi. Analiz edilen pH değerleri ayrı ayrı incelendiğinde orijinal enzim aktivitesinin optimum pH değeri olan fosfat 8'de %100'e pH 6 ve 7'ye oranla daha yakın seyrettiği gözlenmiştir.

Enzimin 1 saat süre ile pH 7'de kalması inkübasyon süresi göz önüne alındığında görece enzim aktivitesini arttırmıştır. Optimum değer olan pH 8'de inkübasyon süresi görece enzim aktivitesini %3 oranında düşürmüştür.



Şekil 4.8. pH'nın  $\beta$ -glukozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

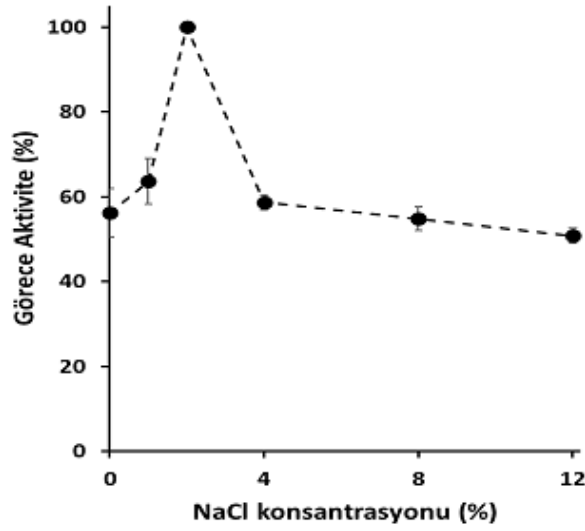
Yapılan literatür araştırmasına göre biyoetanol üretiminde yaygın olarak kullanılan bir fungus olan *Aspergillus niger* Au0847 suşuna ait  $\beta$ -glukozidazın pH 2 ile 6 arasındaki değerlerde enzimin kararlılığını önemli ölçüde koruduğu, ancak pH 6'dan sonraki değerlerde görece aktivitede %20 oranında kayıp yaşandığı bulunmuştur (Gong et al., 2014). Saha and Bothast (1996), bir askomikota olan *Candida peltata*'dan elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin optimum pH değerini 5 olarak bulmuşlardır. Görece enzim aktivitesinin pH 4 ile 6 arasında 30 dakika boyunca kararlı olduğunu ve aktivitenin pH 3'de %62'ye düştüğünü tespit etmişlerdir.

*J. alba*'ya ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin elde edilen sonuçlar biyoetanol üretiminde kullanılan bakterilere ait literatür araştırmalarından elde edilen bulgular

ile farklılık göstermektedir. İnkübasyon süresinin kısalığı da göz önüne alındığında çok daha kararlı bir şekilde enzimin korunduğu görülmektedir.

#### 4.3.5. NaCl'ün $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Farklı NaCl oranlarında inkübe olan  $\beta$ -glukozidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği NaCl oranı %2'dir. enzim aktivitesi, %1'lik NaCl oranında korunmakla birlikte %63'tür.  $\beta$ -glukozidaz'ın görece enzim aktivitesi reaksiyon karışımındaki tuz konsantrasyonu %4 iken %58, %8 iken %54, %12 iken %50 olarak kaydedildi. Bu değerlere bakıldığında NaCl konsantrasyonunun *J. alba*  $\beta$ -glukozidaz'ı üzerindeki etkisinin düşük olduğu ve enzim verimliliğini düşürmediği görülmüştür.



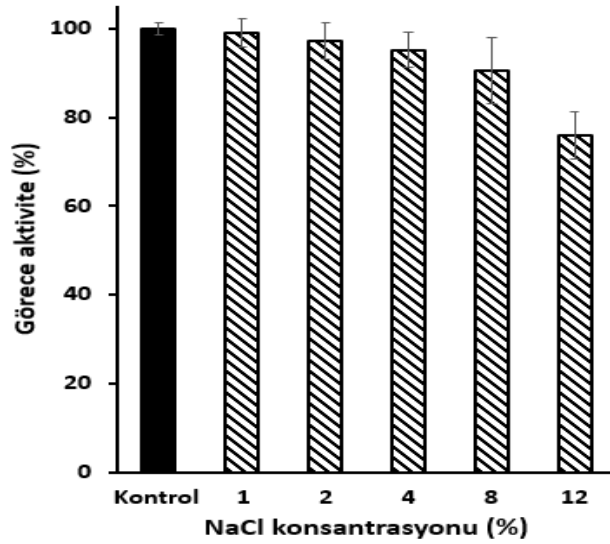
Şekil 4.9. NaCl konsantrasyonunun  $\beta$ -glukozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

Qu et al. (2020), halofilik *Pseudoalteromonas* sp. *GXQ-1*'den elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin 0 ile 4.5 M konsantrasyonlarında NaCl varlığında görece enzim aktivitesini ölçmüşlerdir. NaCl (3 M) varlığında görece enzim aktivitesinin en üst seviyede olduğunu ve normal enzim aktivitesinin 8.74-katı olduğunu bulmuşlardır. NaCl konsantrasyonu arttıkça aktivasyonun azaldığını ve 4.5 M olduğunda 4.13-katı aktivite olduğu gözlemlenmiştir. Harchand and Singh (1996), *Streptomyces albaduncus* 'a ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin 5 mM NaCl varlığında görece enzim aktivitesini %100 olarak gözlemlemişlerdir. Siddiqui et al. (1997), *Cellulomonas biazotea* NIAB442'den intraselüler olarak elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin görece aktivitesinin ise 0.5 M NaCl varlığında %50'sinin inhibe olduğu görülmüştür.

Literatür araştırmalarında elde edilen bulgularda *J. alba*  $\beta$ -glukozidaz enziminin halofilik olmadığı ancak %12 NaCl varlığında görece enzim aktivitesine yarı ömürlü devam ettiği için tuza hassasiyetinin düşük olduğu görülmektedir.

#### 4.3.6. NaCl'ün $\beta$ -Glukozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi

Gerçekleştirilen deneyler  $\beta$ -glukozidazın NaCl varlığında kararlılığını önemli ölçüde koruyabildiğini göstermektedir.  $\beta$ -Glukozidaz %1, %2 ve %4 NaCl varlığında 1 saat oda sıcaklığında ön-inkübasyona bırakıldığında görece enzim aktivitesinde NaCl'den kaynaklı önemli bir azalma meydana gelmemiştir. Ancak, enzimin %12 oranında NaCl ile ön-inkübasyonu görece enzim aktivitesinde %25'lik bir azalmaya neden olmuştur. Farklı konsantrasyonlarda NaCl ile ön-inkübasyonu sonucunda enzimin kontrole göre kalan görece aktivitesi Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



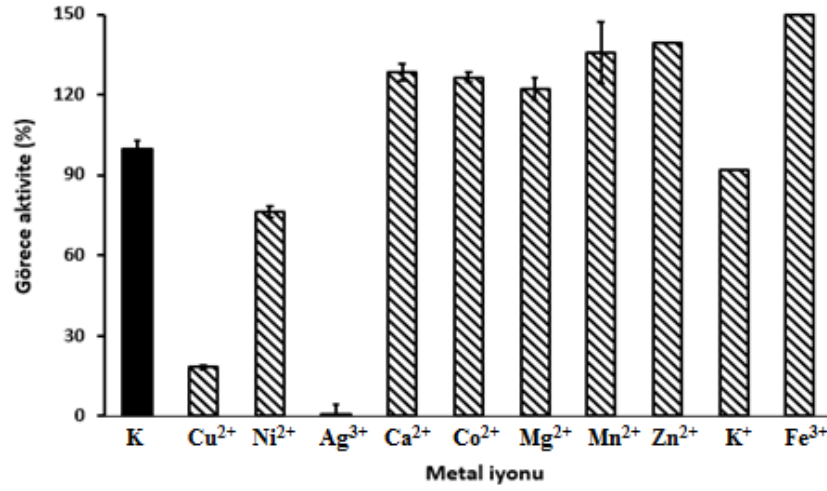
Şekil 4.10. NaCl konsantrasyonunun  $\beta$ -glukozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

Elde edilen sonuçlara göre *J. alba*'ya ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin biyoetanol üretim sürecinde, hidroliz prosesi süresince kararlılığını koruyarak enzim aktivitesini en çok verimle sürdürdüğü açığa çıkmıştır.

#### 4.3.7. Metal İyonlarının $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Metal iyonlarının (1 mM) görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Buna göre;  $\text{Cu}^{2+}$  (görece aktivite: %18.2), ve  $\text{Ag}^{3+}$  (görece aktivite: %0) görece enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte,  $\text{K}^+$  ise görece enzim aktivitesi üzerinde %7.8'lik bir azalmaya neden olmuştur. Buna

karşın,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$ 'in  $\beta$ -glukozidaz'ın görece enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. Metal iyonlarının (1 mM)  $\beta$ -glukozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

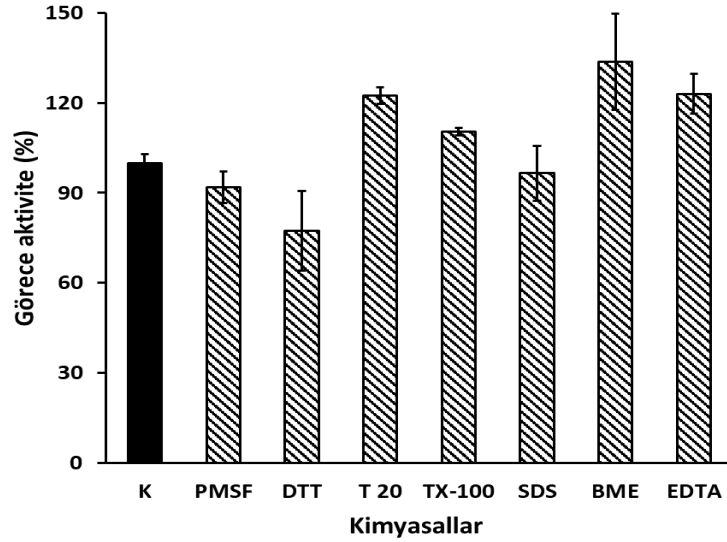
Nakano et al. (1998), *Clavibacter michiganense*'den izole edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Ni}^{2+}$  varlığında görece enzim aktivitesinde artış veya azalma olmadığını rapor etmişlerdir. Kim et al. (2012), *Weissella cibaria* 37'den klonlanarak elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin  $\text{Ca}^{2+}$  (5 mM) varlığında görece enzim aktivitesinin %108.2'ye çıktığını bulmuşlardır. Buna karşılık 5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  (%46,1) ve  $\text{Zn}^{2+}$  (%56,7)'nin görece enzim aktivitesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Siddiqui et al. (1997), aktinomiset olan *Cellulomonas biazotea* NIAB442'den intraselüler olarak elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin 0.5 mM  $\text{Mn}^{2+}$  varlığında görece aktivitesinin %50 inhibe olduğunu görmüşlerdir.

*J. alba*  $\beta$ -glukozidaz'ının  $\text{Cu}^{2+}$  varlığında inhibe olması ve  $\text{Ca}^{2+}$  varlığında aktive olması literatürle uygunluk göstermektedir. Buna karşın enzimin  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$ 'in varlığında görece aktivitenin artması metal iyonlara hassasiyetinin diğer aktinomisetlere oranla daha az olduğunu ve endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

#### 4.3.8. Kimyasalların $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Son oranı %1 olacak şekilde reaksiyon karışımına ilave edilen kimyasalların  $\beta$ -glukozidaz'ın görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.12'de gösterilmektedir. Buna göre, PMSF (görece aktivite: %91.9) ve SDS'in (görece aktivite: %96.5) görece aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Reaksiyon karışımında DTT'nin bulunduğu koşullarda ise enzim aktivitesinin görece %77.3'e düştüğü belirlenmiştir. Buna karşılık, tween 20, triton X-100,  $\beta$ -merkaptotanol ve EDTA'nın görece enzim aktivitesinde sırasıyla görece %22.4, %10.4, %33.6 ve %22.9'lük artışa neden oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Kimyasalların (%1)  $\beta$ -glukozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, PMSF: enilmetilsülfonil florür, DTT: ditiyotreitol, T 20: tween 20, TX-100: Triton X-100, SDS: sodyum dedosil sülfat, BME:  $\beta$ -merkaptotanol, EDTA: etilendiamin tetraasetik asit.

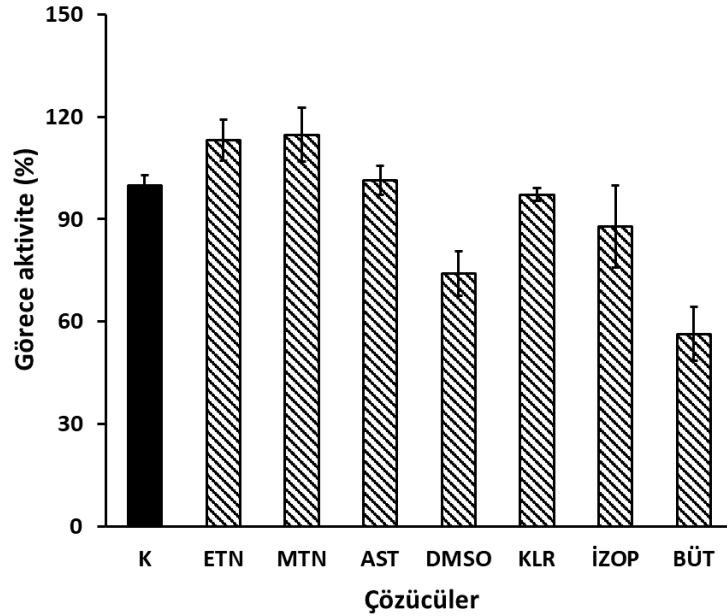
Harchand and Singh (1996), *Streptomyces albaduncus*'a ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin 5 mM EDTA varlığında görece enzim aktivitesini %95 olarak gözlemlemişlerdir. Kim et al. (2012), *Weissella cibaria* 37'den klonlanarak elde edilen  $\beta$ -glukozidaz enziminin SDS varlığında görece enzim aktivitesinin %16.9'a düştüğünü gözlemlemişlerdir. EDTA (%95.34) ve PMSF (%94.01)'nin görece enzim aktivitesinde hafif azalmaya sebep olduğu görülmüştür.

Aktinomisetlere ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin, literatür değerlerine göre çoğu kimyasalın varlığında inhibe olduğu ya da etkilenmediği görülmektedir. Buna karşılık *J. alba*'ya ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin bazı kimyasallar varlığında görece aktivitesinin yükseldiği tespit edilmiştir. Özellikle sülfidril bağlarına etki eden  $\beta$ -merkaptotanol'ün görece enzim aktivitesini yükseltmesi enzimin yapısında sülfidril bağlarının bir veya birden fazla olduğunu bize göstermektedir.

#### 4.3.9. Çözücülerin $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Şekil 4.13'de sunulan grafiğe göre etanol ve metanolün görece enzim aktivitesinin %13.1 ve %14.7 oranında arttırdığı belirlenmiştir. Reaksiyon

karışımında aseton (görece aktivite: %101.2) ve kloroformun (görece aktivite: %97.2) bulunması  $\beta$ -glukozidaz'ın görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sebep olmamıştır. Bununla birlikte; izopropanol, DMSO ve bütanol varlığında enzimin görece aktivitesi sırasıyla, %87.8, %74.1 ve %56.4 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Çözücülerin (%1)  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, ETN: etanol, MTN: metanol, AST: aseton, DMSO: dimetilsülfoksit, KLR: kloroform, İZOP: izopropanol, BÜT: bütanol.

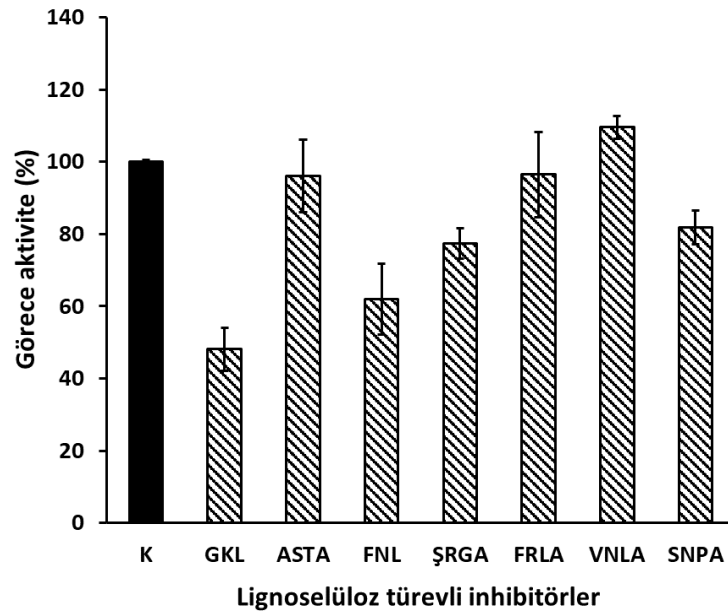
Hwang et al. (2018), flavobakter olan *Olleya aquimaris* DAU311'den izole edilen organik çözücü tolerantı olan  $\beta$ -glukozidaz enziminin %10 konsantrasyondaki DMSO, metanol, etanol, aseton ve izopropanol görece aktivitesi sırasıyla, %106, %89, %91, %102 ve %72 olarak belirlenmiştir.

Literatürde görülen değerler ile kıyaslandığında farklı çözücülerin farklı etkilere sebep olduğu görülmektedir. *J. alba*  $\beta$ -glukozidaz enziminin %1 konsantrasyona kadar tüm çözeltilerde en az yarı ömürle çalıştığı ve tamamen inhibe olmadığı tespit edilmiştir. Etanol, metanol ve izopropanolün görece enzim aktivitesini artırması biyoetanol üretiminde olumlu etkiye sahip olabilmektedir.

#### 4.3.10. Lignoselüloz Türevli İnhibitörlerin $\beta$ -Glukozidaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Lignoselüloz, hidroliz öncesinde genellikle ligninin uzaklaştırılması ve yapının gevşetilebilmesi için alkali ya da asidik kimyasallarla ön-muamele edilmektedir. Ön-

muamele neticesinde ise hidroliz basamağında görev alan enzimler üzerinde inhibitör etki gösterebilecek bir takım fenolik ve asidik bileşikler açığa çıkmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada liginoselüloz türevli bazı inhibitörlerin  $\beta$ -glukozidaz'ın görece aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. (Şekil 4.14). Buna göre; guaiakol (görece aktivite: %48.1), fenol (görece aktivite: %62), şiringik asit (görece aktivite: %77.3) ve sinapik asitin (görece aktivite: %81.9) görece enzim aktivitesini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Asetik asit ve ferulik asitin görece enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın; vanilik asitin görece enzim aktivitesini %9.5 arttırdığı belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Liginoselüloz türevli inhibitörlerin (%1)  $\beta$ -glukozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, GKL: guaiakol, ASTA: asetik asit, FNL: fenol, ŞRGA: şiringik asit, FRLA: ferulik asit, SNPA: Sinapik asit.

İnhibitörler biyokütlenin ön-muamelesi sırasında oluşur. Yapısal polimerden (selüloz, hemiselüloz ve lignin) türeler. Liginoselülozik hidrolizatların hem enzimatik hidrolizi hem de fermantasyonu üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olurlar.

Tramontina et al. (2015), *Aspergillus niger*'de liginoselülozik biyokütle üretiminde ve fermantasyonunda açığa çıkan inhibitörlerin  $\beta$ -glukozidaz enzimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre 40 mM asetik asit ve furfuralda görece enzim aktiviteleri sırasıyla %90 ve %86'dır.

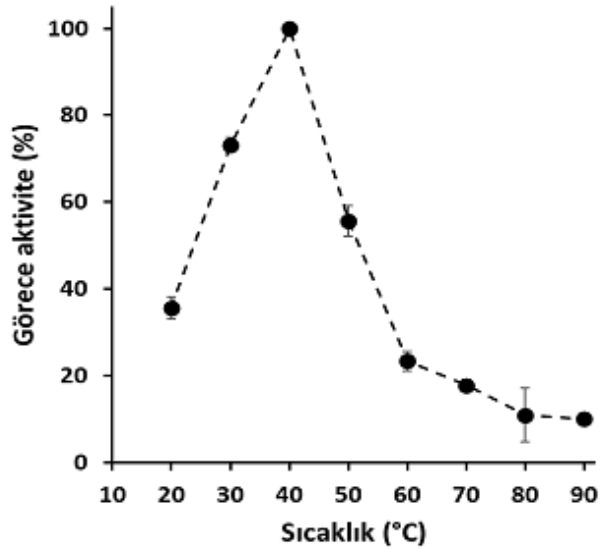
*J. alba*'ya ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin biyoetanol üretiminde yeri olan *Aspergillus niger*'e ait  $\beta$ -glukozidaz enzimiyle benzer sonuçlar verdiği görülmüştür.

Literatüre uyumlu sonuçların elde edilmesi ve lignoselüloz türevli inhibitörlerden vanilik asitin aktivator görevi görmesi *J. alba*'ya ait  $\beta$ -glukozidaz enziminin biyoetanol üretiminde kullanılma potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

#### 4.4. Kısmi Saflaştırılmış $\beta$ -Ksilozidaz'ın Biyokimyasal Özellikleri

##### 4.4.1. Sıcaklığın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Farklı sıcaklıkların (20-90 °C)  $\beta$ -ksilozidaz üzerindeki katalitik etkileri 100 mM'lık pH 7 fosfat tamponu ile hazırlanan reaksiyon ortamında test edilmiştir. Deney sonuçlarına bakıldığında  $\beta$ -ksilozidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığın 40 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15). Görece enzimin aktivitesinin 30 °C'de %73'e, 20 °C'de ise %35'e düştüğü görülmüştür. Sıcaklık artışına bağlı olarak 50 °C'de %55 görece aktivite görülürken 60 °C'de %23 görece aktivite görülmüştür. Enzim aktivitesi 60 °C'den sonra görece aktifliğini oldukça yitirmektedir.



Şekil 4.15. Sıcaklığın  $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

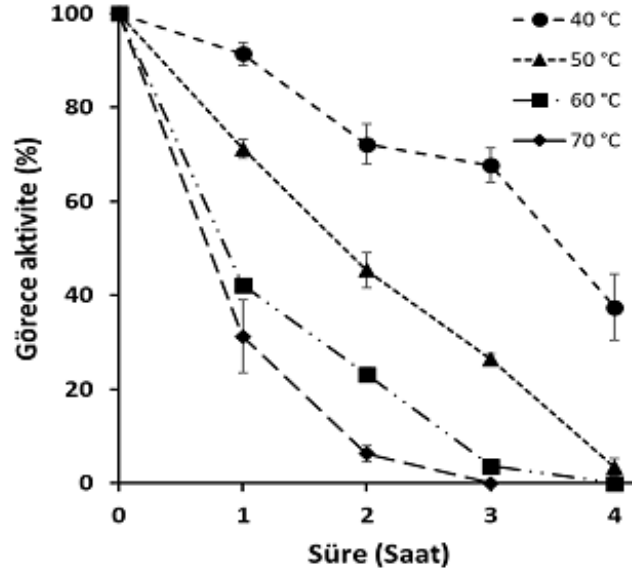
Endüstriyel alanda mezofilik karaktere sahip aktinomisetler endoglukanaz ve endoksilanaz elde edilmesi amacıyla daha yoğun olarak kullanıldıkları için literatürde çoğunlukla termofilik özelliğe sahip türler bulunmaktadır. Tunçer (1999), *Thermomonospora fusca* BD25'e ait  $\beta$ -ksilozidaz enziminin optimum sıcaklık değerini 65 °C olarak bulmuştur. Almeida et al. (1995), *Humicola grisea var. thermoidea*'nın  $\beta$ -ksilozidaz enziminin optimum sıcaklık değerini 50 °C olarak rapor etmişlerdir. Flores et al. (1996), *Streptomyces sp.* CH-M-1035'in optimal sıcaklık

değerini 50 °C olarak bulmuşlardır. Kluepfel et al. (1986), *Streptomyces lividans* 1326'ya ait β-ksilozidaz enziminin optimum sıcaklık değerini 60 °C olarak bulmuşlardır. Bu değer *S. flavogriseus* 'a ait β-ksilozidaz enziminin optimum sıcaklık değerinden 10 °C daha fazladır. Belfaqui and Penninckx (2000), *Streptomyces sp.* EX 10 suşundan izole edilen bifonksiyonel β-ksilozidaz'ın optimal sıcaklık değeri potasyum fosfat pH 7 tamponunda 45 °C olarak tespit edilmiştir.

Aktinomiset olan *Streptomyces sp. EX 10*, *S. Flavogriseus*, *Streptomyces sp. CH-M-1035*'e ait olan β-ksilozidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri birbirine yakınlık göstermektedir. Çalışmada izole edilen *J. alba*'dan üretilen β-ksilozidaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık literatür verileriyle tam bir uyum içerisinde olup, mezofilik karaktere sahip olduğu görülmüştür.

#### **4.4.2. Sıcaklığın β-Ksilozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi**

Farklı sıcaklıkların ( 40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de) ve farklı sürelerin (30, 60, 120, 180 ve 240 dk) β-ksilozidaz'ın görece aktivitesi üzerindeki etkileri 100 mM'lık pH 8 fosfat tamponu ile hazırlanan reaksiyon ortamında test edilmiştir. β-ksilozidaz, optimum sıcaklığı olan 40 °C'de 1. ve 2. saatte görece aktivitesinin %100'e yakınına korurken 3. saatten sonra %67'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim 4 saat 40 °C'de inkübe edildiğinde görece aktivitesini %50 oranında kaybettiği görülmüştür. Bununla beraber, 50 °C'de 2. saatten, 60 °C'de 1. saatten itibaren enzimin görece aktivitesinin %50'nin altına düştüğü görülmektedir (Şekil 4.16). Elde edilen sonuçlara göre, enzim 40 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra aktivite azalması açısından büyük bir fark olmamasına karşılık 50 °C, 60 °C ve 70 °C'lerde enzim görece aktivitesinde oldukça önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak yine de 50°C ve 60 °C'lerde gerçekleştirilecek 1-2 saatlik endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.16. Sıcaklığın  $\beta$ -ksilozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

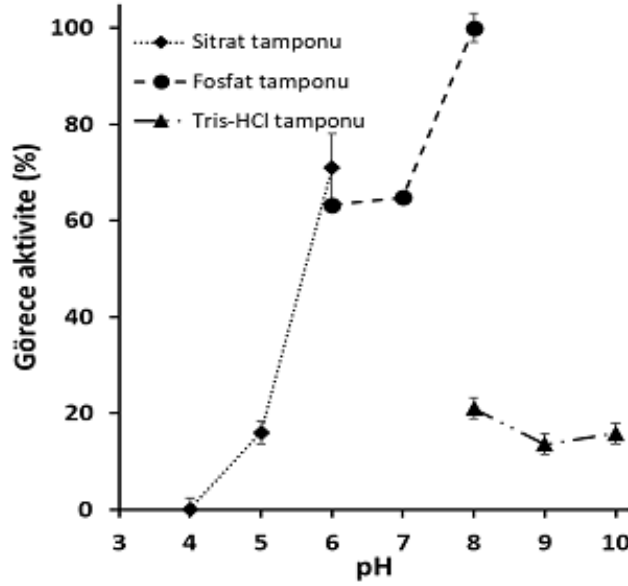
Almeida et al. (1995), *Humicola grisea var. thermoidea*'ya ait  $\beta$ -ksilozidaz enziminin 50 °C'de 60 dk'ya kadar inkübe edildiğinde görece aktivitesinde belirgin bir değişiklik olmadığını gözlemlemişlerdir. Buna karşılık 60 °C'de 26 dk inkübe edildiğinde enzimin yarı ömürle inhibe olduğunu bulmuşlardır. Kluepfel et al. (1986), *Streptomyces lividans* 1326'ya ait  $\beta$ -ksilozidaz enziminin 37 °C'de enzim görece aktivitesinin 24 saat boyunca kararlı olarak korunduğunu bulmuşlardır. 40 °C'de 24 saat, 50 °C'de 3 saat gerçekleşen inkübasyonun ardından görece enzim aktivitesinin %50'nin altına düştüğü gözlemlenmiştir. Belfaquih and Penninckx (2000), *Streptomyces sp.* EX 10 suşundan izole edilen bifonksiyonel  $\beta$ -ksilozidaz'ın 25, 30 ve 40 °C'de 1 saat süreyle kararlı kalabildiğini ve görece enzim aktivitesinin korunduğunu bulmuşlardır.

*Jiangella alba*  $\beta$ -ksilozidaz enziminin sıcaklığa olan hassasiyetine dair elde edilen sonuçlar, literatürdeki diğer aktinomisetlerle büyük benzerlik göstermektedir.

#### 4.4.3. pH'nın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Elde edilmiş olan enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerlerinin saptanması için 100 mM pH 4-6 sitrat tamponu, 100 mM pH 6-8 fosfat tamponu ve 100 mM pH 8-10 Tris-HCl tamponu kullanılmıştır. Enzim analizleri neticesinde  $\beta$ -ksilozidaz'ın pH 8 fosfat tamponunda en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir (%100). Bununla birlikte pH 7 fosfat tamponunda %64, pH 8 Tris-HCl tamponunda ise %20'lik görece enzim aktivitesi tespit edilmiştir.

pH değeri 4, 5 ve 6 olan sitrat tamponunda ise  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece aktivite değerleri sırasıyla %1, %17 ve %74 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.17. pH'nın  $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

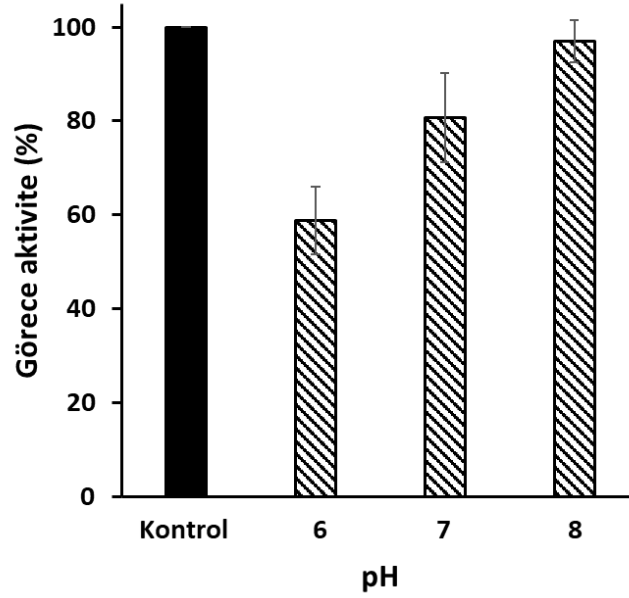
Kluepfel et al. (1986), *Streptomyces lividans* 1326'ya ait  $\beta$ -ksilozidaz enziminin optimum pH değerini 6 olarak bulmuşlardır. Flores et al. (1996), *Streptomyces sp.* CH-M-1035'in optimal pH değerini bulmak için pH 3.5 ile 7.5 arasındaki asetat tamponunu deneyerek optimum pH değerini 6 olarak bulmuşlardır. pH 7'de %60 görece enzim aktivitesi görülmüştür. Almeida et al. (1995), *Humicola grisea var. thermoidea*'ya ait  $\beta$ -ksilozidaz'ın özgül aktivitesinin en yüksek olduğu pH değerini 6 olarak bulmuşlardır. Belfaqui ve Penninckx (2000), *Streptomyces sp.* EX 10 suşundan izole edilen bifonksiyonel  $\beta$ -ksilozidaz'ın optimal pH değerini 7.5 olarak bulmuşlardır.

Literatür verileri değerlendirilerek yapılan çalışmadan elde edilen *J. alba*  $\beta$ -ksilozidaz enziminin alkali özellik gösterdiği belirlenmiştir.

#### 4.4.4. pH'nın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi

$\beta$ -Ksilozidaz 100 mM pH 6, 7 ve 8 fosfat tamponunda 1 saat 40 °C'de inkübe edilmiştir. Analiz edilen pH değerleri ayrı ayrı incelendiğinde görece enzim aktivitesinin fosfat tamponunda pH 6 ve 7'ye oranla pH 8'de %100'e daha yakın seyrettiği gözlenmiştir (Şekil 4.18).

Enzimin 1 saat süre ile pH 7’de kalması, inkübasyon süresi göz önüne alındığında görece aktivitesini azaltmıştır. Optimum değer olan pH 8’de inkübasyon süresi görece enzim aktivitesini %4 oranında düşürmüştür. Enzimin pH 6’da 1 saat inkübe edilmesi görece enzim aktivitesinin %50’sini kaybetmesine neden olmuştur.



Şekil 4.18. pH'nın  $\beta$ -ksilozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

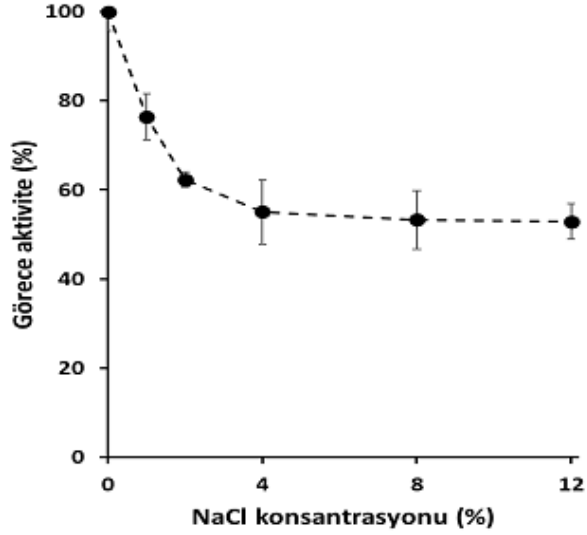
Almeida et al. (1995), *Humicola grisea var. thermoidea*'dan ekstraselüler olarak elde edilen  $\beta$ -ksilozidaz enziminin pH 4 ile 9 değerleri arasında 60 dakikaya kadar kararlı kalabildiğini bulmuşlardır. Belfaquih and Penninckx (2000), *Streptomyces sp. EX 10* suşundan izole edilen bifonksiyonel  $\beta$ -ksilozidaz enziminin 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmesi sonucu pH 7’de görece enzim aktivitesini %100’e kadar koruyabildiğini rapor etmişlerdir. Aynı zamanda pH 5 ile 8 arasında %75 görece aktivite ile çalıştığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda karakterizasyonu gerçekleştirilen  $\beta$ -ksilozidaz enziminin optimum pH değerine göre literatürdeki diğer aktinomisetler ile karşılaştırıldığında kararlılığının düşük olduğu gözlenmiştir.

#### 4.4.5. NaCl’ün $\beta$ -Ksilozidaz’ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Farklı NaCl oranlarında inkübasyonu gerçekleştirilen  $\beta$ -ksilozidaz’ın NaCl varlığında inaktive olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19). Görece enzim aktivitesi, %1’lik tuz oranında görece korunmakla birlikte %76’dır. Görece  $\beta$ -ksilozidaz aktivitesi reaksiyon karışımındaki tuz konsantrasyonu %4 iken %55, %8 iken %53,

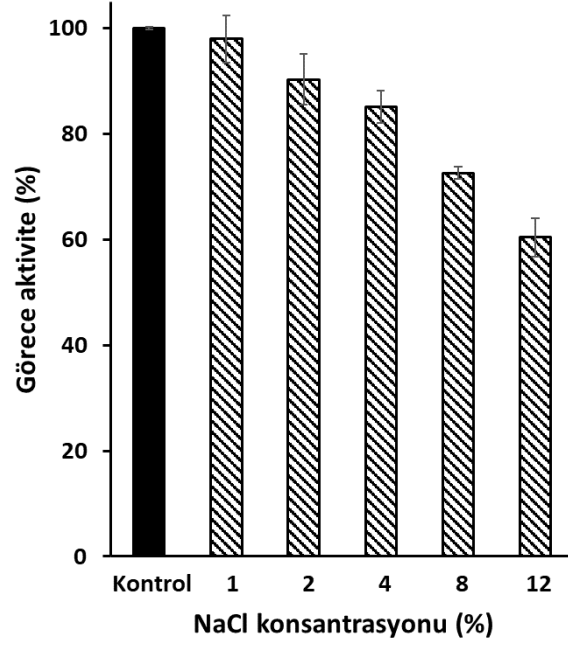
%12 iken %52 olarak gözlemlenmiştir. Bu değerlere bakıldığında NaCl konsantrasyonunun *Jiangella alba*  $\beta$ -ksilozidaz'ı üzerindeki etkisinin olduğu ancak enzim verimliliğini yüksek oranda düşürmediği görülmüştür.



Şekil 4.19. NaCl konsantrasyonunun  $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

#### 4.4.6. NaCl'ün $\beta$ -Ksilozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi

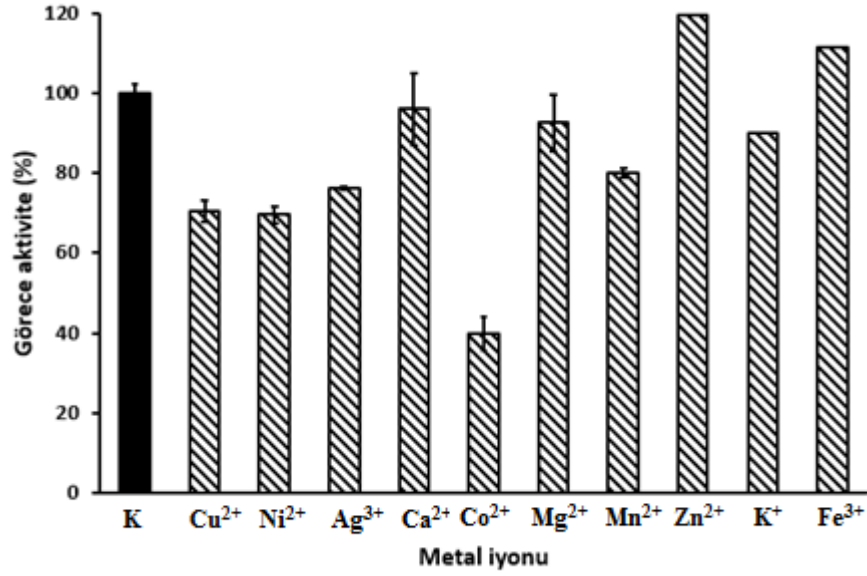
Yapılan deney sonucunda,  $\beta$ -ksilozidaz'ın NaCl varlığında kararlılığını önemli ölçüde koruyabildiğini göstermektedir.  $\beta$ -ksilozidaz %1 ve %2 NaCl varlığında 1 saat oda sıcaklığında ön-inkübasyona bırakıldığında görece enzim aktivitesinde NaCl'den kaynaklı önemli bir azalma meydana gelmemiştir. Ancak, enzimin %4, %8 ve %12'lik tuz konsantrasyonunda görece enzim aktivitesinde sırasıyla %15, %28 ve %40 oranında azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.20. NaCl konsantrasyonunun  $\beta$ -ksilozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

#### 4.4.7. Metal İyonları'nın $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Metal iyonlarının (1 mM) görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.21'de gösterilmiştir. Buna göre;  $\text{Ca}^{2+}$  (görece aktivite: %96) ve  $\text{Mg}^{2+}$ 'un (görece aktivite: %93) görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisini olmadığı görülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre  $\text{Co}^{2+}$  (görece aktivite: %40) görece enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte,  $\text{Cu}^{2+}$  (görece aktivite: %70),  $\text{Ni}^{2+}$  (görece aktivite: %70) ve  $\text{Ag}^{3+}$  (görece aktivite: %76) görece enzim aktivitesi üzerinde azalmaya neden olmuştur. Buna karşın,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$ 'in  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.21. Metal iyonlarının (1 mM)  $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

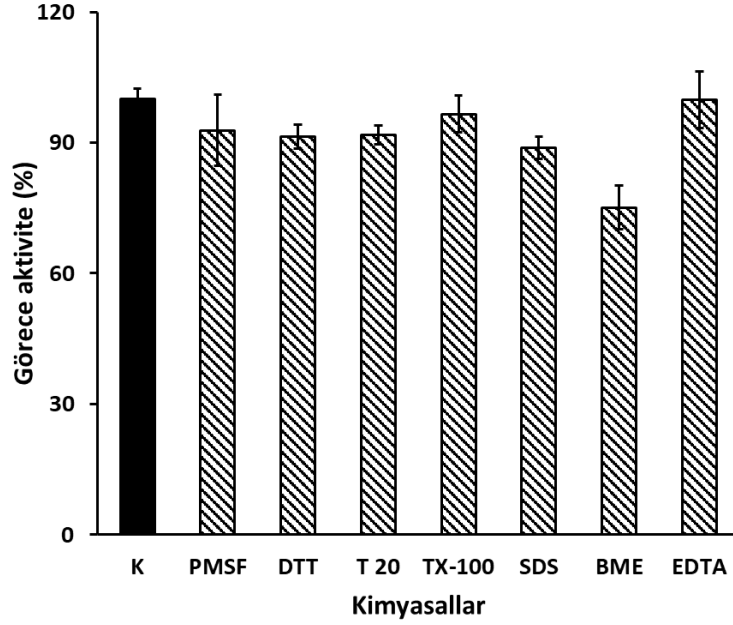
Pinphanichakarn et al. (2004), yaptıkları çalışmada *Streptomyces sp.* CH7'den izole edilen  $\beta$ -ksilozidaz enziminin, reaksiyon karışımında 1 mM olacak şekilde metal iyonlarına maruz bırakarak görece aktivitesini ölçmüşlerdir. Ca<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup>'ın görece enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Buna karşılık, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup>'nın görece enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiği görülmüştür. Çalışmaya göre, Co<sup>2+</sup> görece enzim aktivitesini kısmen inhibe ederken (görece aktivite: %19), Mg<sup>2+</sup> görece enzim aktivitesini bir miktar arttırmıştır (görece aktivite: %112).

*Streptomyces sp.* CH7'den izole edilen  $\beta$ -ksilozidaz enzimi üzerinde Ca<sup>2+</sup> ve Mn<sup>2+</sup> etkide bulunmamakta ve Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> tamamen inhibe etmektedir. Buna karşılık *J. alba*'dan elde edilen  $\beta$ -ksilozidaz enzimi Fe<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> varlığında görece yüksek aktivite göstermektedir. Co<sup>2+</sup>'ın *J. alba*  $\beta$ -ksilozidaz'ının görece enzim aktivitesi üzerindeki etkisi literatür ile tam uyum göstermektedir.

#### 4.4.8. Kimyasalların $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Son oranları %1 olacak şekilde reaksiyon karışımına ilave edilen kimyasalların  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.22'de gösterilmektedir. Buna göre, PMSF (görece aktivite: %93), DTT (görece aktivite: %91) ve Tween 20'nin (görece aktivite: %92) görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Reaksiyon karışımında SDS ve  $\beta$ -

merkaptolan olduğunda g6rece enzim aktivitesinin sırasıyla %89 ve %75'e d6ştüğü belirlenmiştir. Buna karşılık triton X-100 ve EDTA'nın g6rece enzim aktivitesinde artış veya azalışa neden olmadığı tespit edilmiştir.



şekil 4.22. Kimyasalların (%1)  $\beta$ -kilozidaz'ın aktivitesi 6zerindeki etkisi. K: kontrol, PMSF: enilmetils6lfonil flor6r, DTT: ditiyotreit6l, T 20: tween 20, TX-100: Triton X-100, SDS: sodyum dedosil s6lfat, BME:  $\beta$ -merkaptolan, EDTA: etilendiamin tetraasetik asit.

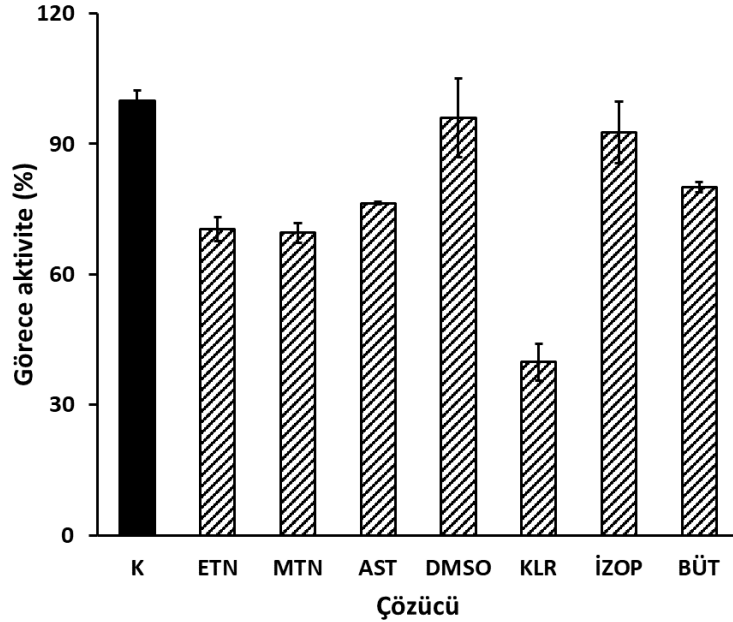
Pinphanichakarn et al. (2004), yaptıkları 6alışmada *Streptomyces sp.* CH7'den izole edilen  $\beta$ -kilozidaz enzimi, reaksiyon karşımındaki son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde  $\beta$ -merkaptolan'e maruz bırakılmıştır.  $\beta$ -merkaptolan'6n g6rece enzim aktivitesini %20 arttırdığı g6r6lm6řt6r.

İzolasyon ve karakterizasyonu ger6ekleştirilen *J. alba*'dan  $\beta$ -kilozidaz enzimine  $\beta$ -merkaptolan'6n etkisi literat6r6n aksine inhibit6r etki g6stermektedir. Buna bakarak enzimin yapısında s6lfidril bağlarının az olduğu veya hi6 olmadığı s6ylenmektedir. Kimyasalların g6rece enzim aktivitesi 6zerinde inhibit6r etkisinin az olmasından dolayı enzimin end6striyel kullanımda potansiyeli y6ksektir.

#### 4.4.9. 66z6c6lerin $\beta$ -Kilozidaz'ın Aktivitesi 6zerindeki Etkisi

Son oranları %1 olacak şekilde reaksiyon karşımına ilave edilen 66z6c6lerin  $\beta$ -kilozidaz'ın g6rece enzim aktivitesi 6zerindeki etkileri şekil 4.23'te g6sterilmektedir. Buna g6re kloroform g6rece enzim aktivitesini %39.8'e

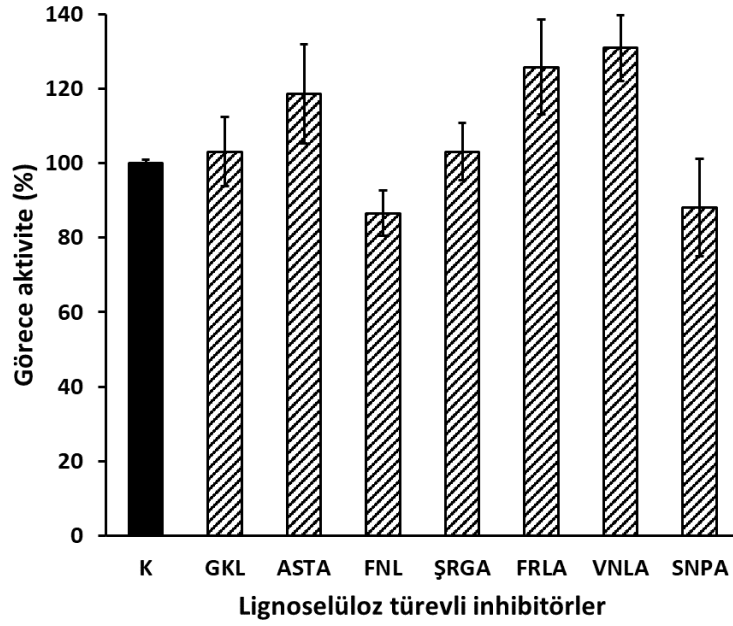
düşürmüştür. Reaksiyon karışımında DMSO (görece aktivite: %96) ve izopropanolün (görece aktivite: %92.6) bulunması  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sebep olmamaktadır.



Şekil 4.23. Çözücülerin (%1)  $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, ETN: etanol, MTN: metanol, AST: aseton, DMSO: dimetilsülfoksit, KLR: kloroform, İZOP: izopropanol, BÜT: bütanol.

#### 4.4.10. Lignoselülozik Türevli İnhibitörlerin $\beta$ -Ksilozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Biyoetanol üretim sürecinde lignoselülozun alkali ya da asidik kimyasallarla ön-muamele edilmektedir. Ön-muamele neticesinde ise hidroliz basamağında görev alan enzimler üzerinde inhibitör etki gösterebilecek bir takım fenolik ve asidik bileşikler açığa çıkmaktadır. Tez çalışması kapsamında lignoselüloz türevli bazı inhibitörlerin  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 4.24). Buna göre; fenol (görece aktivite: %86.6) ve sinapik asitin (görece aktivite: %88,1) görece enzim aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Guaiakol ve şiringik asitin görece enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın; asetik asit, ferulik asit ve vanilik asitin görece enzim aktivitesini sırasıyla %18.6, %25.7 ve %30.9 oranında arttırdığı belirlenmiştir.



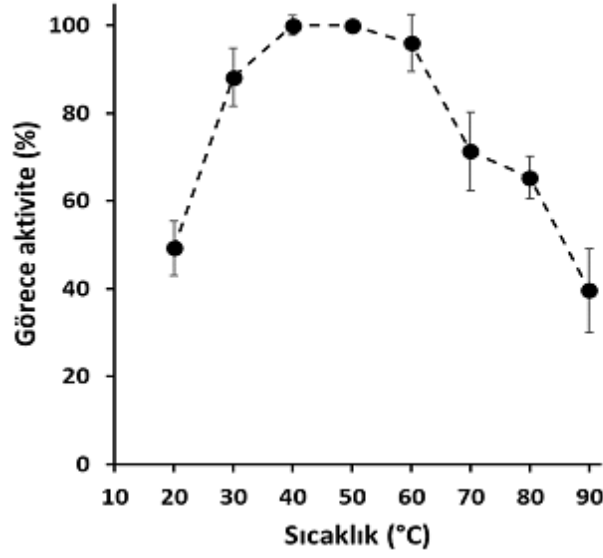
Şekil 4.24. Lignoselüloz türevli inhibitörlerin (%1)  $\beta$ -ksilozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, GKL: guaiakol, ASTA: asetik asit, FNL: fenol, ŞRGA: şiringik asit, FRLA: ferulik asit, SNPA: Sinapik asit.

Çalışmamızda lignoselülozun ön muamelesi sonucu açığa çıkan, hidroliz ve fermantasyon enzimlerinin çalışmasını engelleyen kimyasalların *J. alba*  $\beta$ -ksilozidaz enzimi üzerinde inhibitör etkinin aksine aktivatör etki gösterdiği açığa çıkmıştır.

#### 4.5. Kısmi Saflaştırılmış $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Biyokimyasal Özellikleri

##### 4.5.1. Sıcaklığın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Farklı sıcaklıkların (20-90 °C)  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz üzerindeki katalitik etkileri 100 mM'lık pH 7 fosfat tamponu ile hazırlanan reaksiyon ortamında test edilmiştir. Deney sonuçlarına bakıldığında  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklıkların 40 ve 50 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.25). Enzimin görece aktivitesinin 30 °C'de %88'e, 20 °C'de ise %49'a düştüğü görülmüştür. Sıcaklık artışına bağlı olarak 60 °C'de %95 görece enzim aktivitesi görülürken 70 °C'de %71 görece aktivite görülmüştür. Görece enzim aktivitesi 90 °C'den sonra dahi %39 aktivite göstermeye devam etmektedir.



Şekil 4.25. Sıcaklığın  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

Endüstriyel alanda mezofilik karaktere sahip aktinomisetler endoglukanaz ve endoksilanaz elde edilmesi amacıyla daha yoğun olarak kullanıldıkları için literatürde çoğunlukla termofilik özelliğe sahip türler bulunmaktadır.

Tunçer (1999), *Thermomonospora fusca* BD25'e ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın optimum sıcaklığını 65 °C olarak bulmuştur. Literatüre bakıldığında bazı bakterilerin  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin optimum sıcaklık değerleri şu şekilde sıralanabilir; *Bacteroides xyloxyticus*'un 50 °C (Schyns et al., 1994), *Bifidobacterium adolescents*'in 30-40 °C (Schyns et al., 1994) ve *Butyrivibrio fibrisolvens*'in 55 °C (Hespell and O'Bryan, 1992). Aktinomisetlerden elde edilen  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın optimum sıcaklık değerleri şu şekilde sıralanabilmektedir; *Streptomyces avermitilis* NBRC1 4893 için 45 °C (Ichinose et al., 2008), *S. chartensis* için 55°C (Matsuo et al., 2000) ve *Streptomyces lividans* 66 için 60 °C (Damásio et al., 2012).

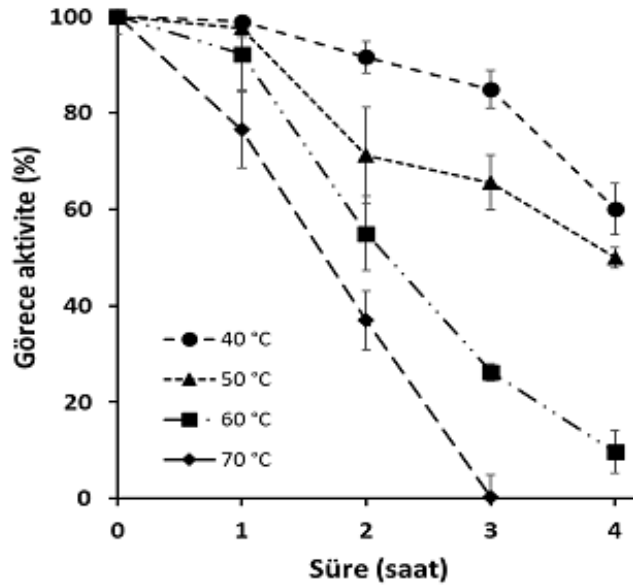
Çalışmada *J. alba*'dan elde edilen  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimine ait optimum sıcaklık değeri literatür verilerine uyum göstermektedir.

#### 4.5.2. Sıcaklığın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi

$\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın farklı sıcaklıklarda (40 °C, 50 °C, 60 °C ve 70 °C'de) ve farklı sürelerde (30, 60, 120, 180 ve 240 dk) gösterdiği görece enzim aktivitesi değerleri 100 mM'lık pH 8 Tris-HCl tamponunda test edilmiştir.  $\alpha$ -L-

arabinofuranozidaz'ın, optimum sıcaklığı olan 40 °C'de 1. ve 2. saatte görece enzim aktivitesinin %100'e yakını korurken 3. saatten sonra görece enzim aktivitesinin %84'e düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim 4 saat 40 °C'de inkübe edildiğinde görece aktivitesini hala %50'nin üstünde koruduğu görülmüştür. 50 °C'de 4. saatten itibaren görece enzim aktivitesinin ömrünün yarıldığı görülmektedir. Bununla beraber, 60 °C'de 3. saatten, 70 °C'de ise 2. saatten itibaren enzimin görece aktivitesinin %50'nin altına düştüğü görülmektedir (Şekil 4.26).

Elde edilen sonuçlara göre, enzim 40 °C, 50 °C ve 60 °C'de 1 saat inkübe edildikten sonra görece aktivitede büyük bir azalma olmamaktadır. Buna karşılık 70 °C'de görece enzim aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir. Enzimin bu sıcaklıklarda gerçekleştirilecek endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.26. Sıcaklığın  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

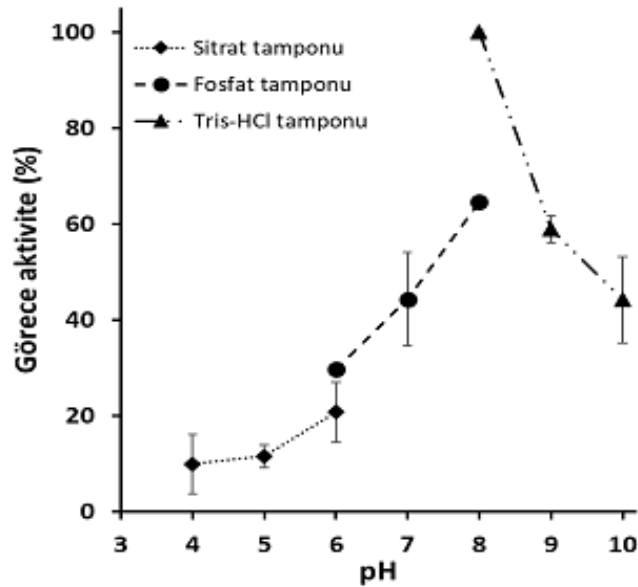
Tunçer (2000), *Thermomonospora fusca* BD25'e ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın 50 °C'de 1,5 saat inkübe edilmesinin ardından görece enzim aktivitesinin %83'e düştüğünü bulmuştur. Ichinose et al. (2008), *Streptomyces vermitilis* NBRC 14893'ten elde edilen exo-1,5- $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın görece enzim aktivitesini 30 °C'de 60 dakika inkübasyon sonunda %80'ini koruduğunu tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada *Streptomyces lividans* 66 suşundan ekstraselüler olarak üretilen  $\alpha$ -L-

arabinofuranozidaz enziminin pH 6 ve 68 °C'de 12 dakikada görece enzim aktivitesini yarıladiğini tespit etmişlerdir (Manin et al., 1994).

Aktinomiset takımına ait olan *J. alba*'nın  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi 70 °C'de 1 saat inkübe edildiğinde %70'in üzerinde görece aktivite gösterirken literatür araştırmalarında elde edilen bulgularda aktinomiset olan *Streptomyces lividans*'a ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi 12 dakikada %50'ye düşmektedir. *Jiangella alba*  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enziminin sıcaklık karşısında kararlılığını koruyabildiği söylenebilir.

#### 4.5.3. pH'nın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Elde edilmiş olan enzimlerin optimum aktivite gösterdiği pH değerlerinin saptanması için 100 mM sitrat tamponu (pH 4-6), 100 mM fosfat tamponu (pH 6-8) ve 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8-10) kullanılmıştır. Enzim analizleri neticesinde  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın pH 8 Tris-HCl tamponunda en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir (%100). Bununla birlikte pH 9'a ayarlanmış Tris-HCl tamponunda %58, pH 8'e ayarlanmış fosfat tamponunda ise %64'lük görece aktivite tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, pH 10 Tris-HCl tamponunda ve pH 7 fosfat tamponunda görece aktivitede çok yakın değerlerde görülmektedir. pH değeri 4, 5 ve 6 olan sitrat tamponunda ise  $\beta$ -glukozidaz'ın görece aktivite değerleri sırasıyla %10, %11 ve %21 olarak belirlenmiştir.



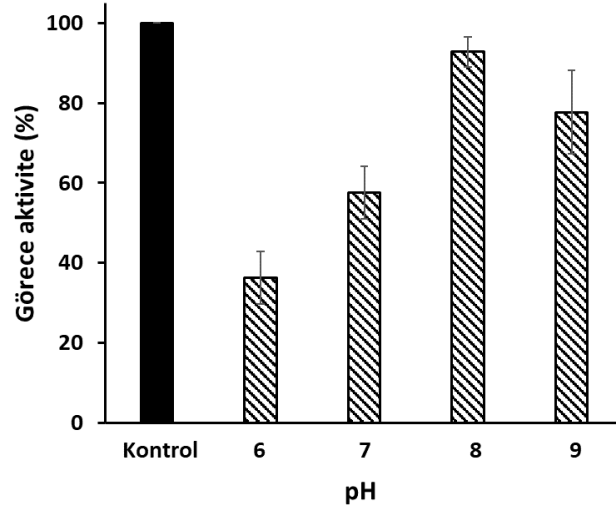
Şekil 4.27. pH'nın  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

*Bacillus subtilis*'ten ekstraselüler olarak elde edilen  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enziminin optimum pH değeri 8 (Inacio et al., 2008), *Bifidobacterium longum* H-1 için pH 4.7 (Lee et al., 2011), *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* için pH 5.5 (Lim et al., 2010) olduğu görülmüştür. Literatürde elde edilen sonuçlara göre aktinomisetlerin optimum pH değerleri şu şekilde sıralanabilir; *Streptomyces avermitilis* NBRC1 4893 için pH 6 (Ichinose et al., 2008) , *S. charteusis* için pH 5.5 (Matsuo et al., 2000), *S. thermoviolaceus* OPC-520 için pH 5 (Tsujiho et al., 2014), *Streptomyces sp.* PC22 için pH 6 (Raweesri et al., 2008), *Streptomyces lividans* 66 için pH 6 (Damasio et al., 2012). Kaji et al. (2014) yapmış oldukları bir çalışmada iyi bir  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz üreticisi olan *Streptomyces sp.* No. 17-1 suşundan elde ettikleri enzimin optimum pH değerini 30 °C'de 30 dk inkübe ederek 6 olarak tespit etmişlerdir. Ichinose et al. (2008), *Streptomyces avermitilis* NBRC 14893'ten exo-1,5- $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın optimum pH değeri 6'da görece enzim aktivitesinin kararlı kaldığını ve pH 5 ile 6.5 arasındaki değerlerde görece enzim aktivitesinin %80'e kadar muhafaza edildiğini bulmuşlardır.

İzole edilerek karakterizasyonu yapılan *J. alba*  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi, *Bacillus subtilis* ile aynı optimum pH değerine sahiptir. Buna karşılık literatür verilerine göre aktinomisetlerden daha alkali özellik göstermektedir.

#### **4.5.4. pH'nın $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi**

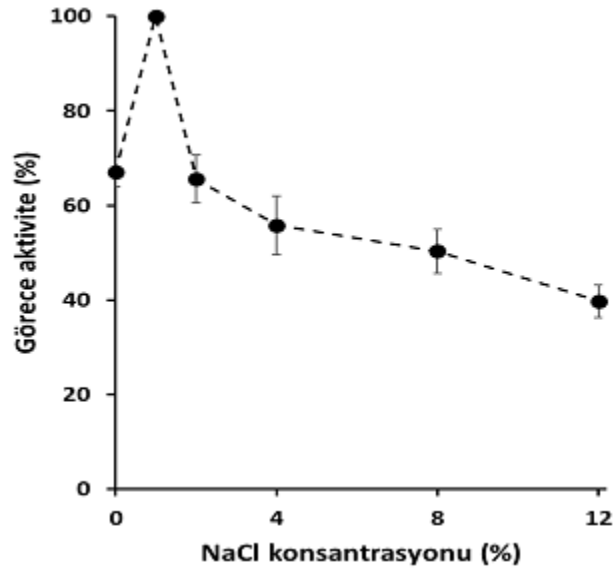
$\alpha$ -L-arabinofuranozidaz 100 mM, pH 6 ve 7 fosfat tamponu ile 100 mM pH 8 ve 9 Tris-HCl tamponunda 1 saat 40 °C'de inkübe edilmiştir. Analiz edilen pH değerleri ayrı ayrı incelendiğinde görece enzim aktivitesinin optimum pH değeri olan Tris-HCl tamponu pH 8'de %100'e pH 6, 7 ve 9'a oranla daha yakın seyrettiği gözlenmiştir. Tris-HCl tamponu pH 9'daki görece aktivite değeri, fosfat tamponu pH 7'ye oranla %100'e daha yakındır. Optimum değer olan pH 8'de inkübasyon süresi görece enzim aktivitesini %8 oranında düşürmüştür.



Şekil 4.28. pH'nın  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

#### 4.5.5. NaCl'ün $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Farklı NaCl konsantrasyonlarında inkübe edilen  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın en yüksek aktivite gösterdiği NaCl konsantrasyonu %1'dir. Görece enzim aktivitesinin, %1'lik tuz konsantrasyonunda tuzsuz ortamdakine oranla arttığı ve %112 olduğu görülmüştür. Görece  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz aktivitesi reaksiyon karışımındaki tuz konsantrasyonu %2 iken %65, %4 iken %56, %8 iken %50, %12 iken %40 olarak kaydedilmiştir.



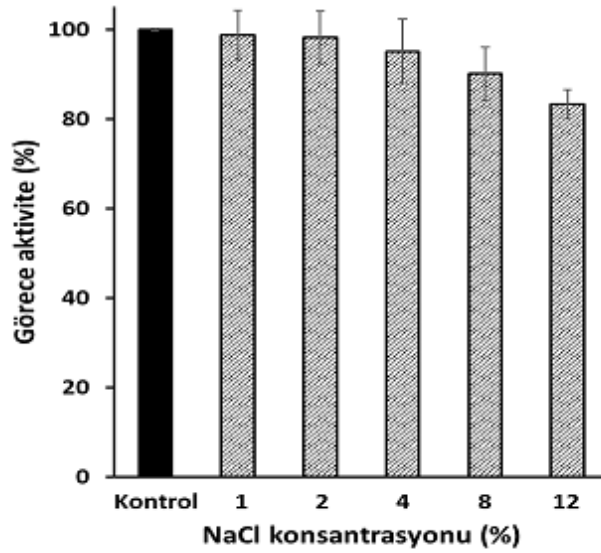
Şekil 4.29. NaCl konsantrasyonunun  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

Kaji et al. (1981), iyi bir  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz üreticisi olan *Streptomyces* sp. No. 17-1 suşunun görece enzim aktivitesini ölçmek için 1 mM NaCl varlığında, pH 6 fosfat tamponunda, 30 °C’de 10 dk inkübe etmiştir. 1 mM’lık NaCl konsantrasyonunun  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz’ın görece enzim aktivitesini değiştirmedeğini bulmuşlardır.

Çalışmada izole edilen *J. alba*’dan üretilen  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi, literatür verilerine bakıldığında diğer aktinomisetlere oranla daha yüksek NaCl oranlarına dayanıklı olduğu tespit edilmiştir.

#### 4.5.6. NaCl’ün $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz’ın Kararlılığı Üzerindeki Etkisi

Gerçekleştirilen deneyler enzimin NaCl varlığında kararlılığını önemli ölçüde koruyabildiğini göstermektedir.  $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz %1, %2 ve %4 NaCl varlığında 1 saat oda sıcaklığında ön-inkübasyona bırakıldığında görece aktivitesinde NaCl’den kaynaklı önemli bir azalma meydana gelmemiştir. Ancak, enzimin %12 oranında NaCl ile ön-inkübasyonu görece aktivitesinde %18’lik bir azalmaya neden olmuştur. Farklı konsantrasyonlarda NaCl ile ön-inkübasyonu sonucunda enzimin kontrole göre kalan aktivitesi Şekil 4.30’da gösterilmiştir.

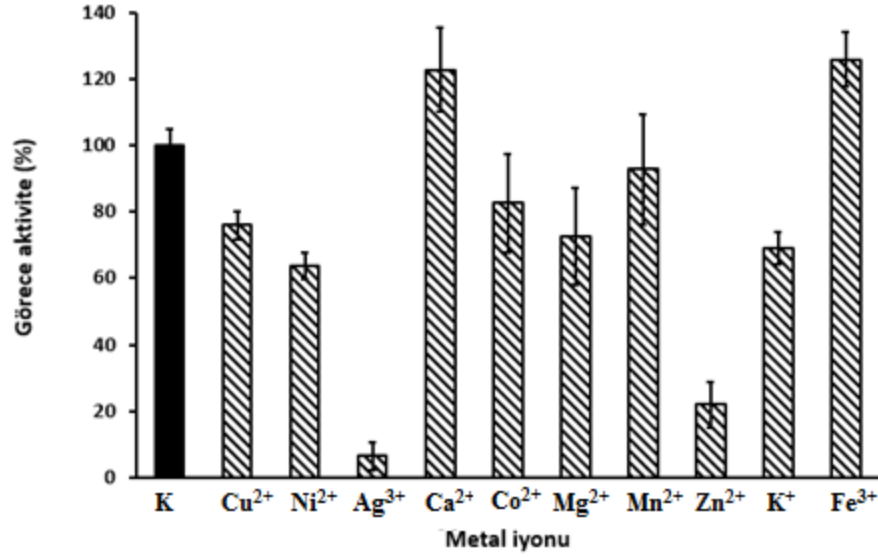


Şekil 4.30. NaCl konsantrasyonunun  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz’ın kararlılığı üzerindeki etkisi.

#### 4.5.7. Metal İyonlarının $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz’ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Metal iyonlarının (1 mM) görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Buna göre;  $Ag^{3+}$  (görece aktivite: %6) ve  $Zn^{2+}$  (görece

aktivite: %22) görece enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Bununla birlikte,  $Ni^{2+}$  (görece aktivite: %63) görece enzim aktivitesi üzerinde azalmaya neden olmuştur. Buna karşın,  $Ca^{2+}$  (görece aktivite: %122),  $Mn^{2+}$  (görece aktivite: %92) ve  $Fe^{2+}$ 'in (görece aktivite: %125)  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın görece enzim aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.31. Metal iyonlarının (1 mM)  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi.

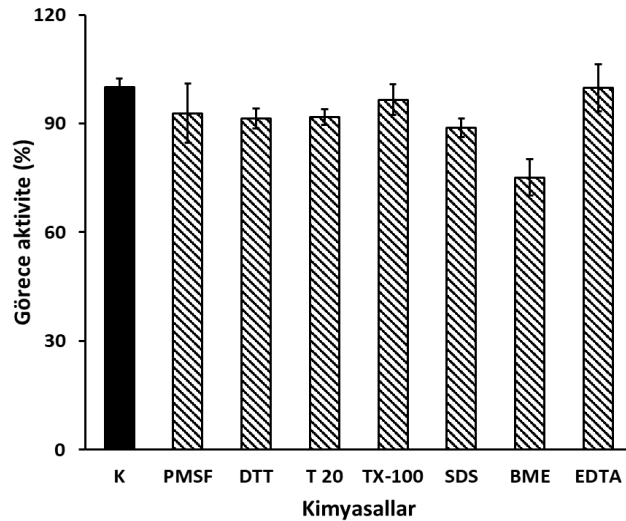
Kaji et al. (1981), iyi bir  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz üreticisi olan *Streptomyces* sp. No. 17-1 yabancı suşundan ekstraselüler olarak elde edilen enzimi metal iyonları varlığında 30 °C'de 30 dk inkübe etmişlerdir. 1 mM  $Hg^{2+}$  varlığında görece enzim aktivitesi tamamen inhibe olurken  $Ag^+$  ve  $Ca^+$  varlığında bir kısmı inhibe olmuştur. Schyns et al. (1994), *Bacteroides xylanolyticus* X5-1 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın metal iyonları varlığında görece enzim aktivitesini test etmişlerdir. Yapılan çalışmada görece enzim aktivitesini  $Hg^{2+}$ 'nın (0.1 mM) tamamen,  $Cu^{2+}$ 'ın (görece aktivite: %85) ise kısmen inhibe ettiğini bulmuşlardır. Buna karşılık  $Mg^{2+}$  (1 mM) (görece aktivite: %98) ve  $Ca^{2+}$ 'un (1 mM) (görece aktivite: %106) görece enzim aktivitesini değişikliğe uğratmadığını bulmuşlardır. Hespell and O'Bryan (1992), *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113'ten saflaştırdıkları  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimini 1 mM metal iyonu içeren 100 mM fosfat tamponu ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe etmişlerdir.  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$ 'ın görece enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Kosugi et al. (2002), *Clostridium cellulovorans*'a ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazı izole etmiş ve saflaştırmışlardır. 10 mM  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Mn^{2+}$ 'ın görece enzim aktivitesine hiçbir

etkisinin olmadığı ancak 1-5 mM  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ve  $\text{Zn}^{2+}$ 'nin görece enzim aktivitesini inhibe ettiğini bulmuşlardır.

Çalışmadan elde edilen verilere *J. alba*  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enziminin görece aktivitesi  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  varlığında yükselirken,  $\text{Ag}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Ni}^{2+}$  varlığında ise düşmektedir. Literatür verileri dikkate alındığında  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi genel olarak  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ve  $\text{Mn}^{+}$  varlığında aktifliğini korurken;  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Ag}^{+}$  varlığında kısmen ve ya tamamen inhibe olmaktadır. *J. alba*'ya ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimine ait metal iyonu aktivasyon verileri literatür ile uyum göstermektedir.

#### 4.5.8. Kimyasalların $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Son konsantrasyonları %1 olacak şekilde reaksiyon karışımına ilave edilen kimyasalların  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın görece enzim aktivitesi üzerindeki etkilerine bakıldığında DTT'nin (görece aktivite: %90) görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Reaksiyon karışımında PMSF ve SDS'in bulunduğu koşullarda ise sırasıyla görece enzim aktivitesinin %75 ve %80'e düştüğü belirlenmiştir. Buna karşılık; tween 20, triton X-100,  $\beta$ -merkaptoetanol ve EDTA'nın görece enzim aktivitesinde sırasıyla %22.2, %68.9, %37.5 ve %33.1'lik artışa neden oldukları tespit edilmiştir.



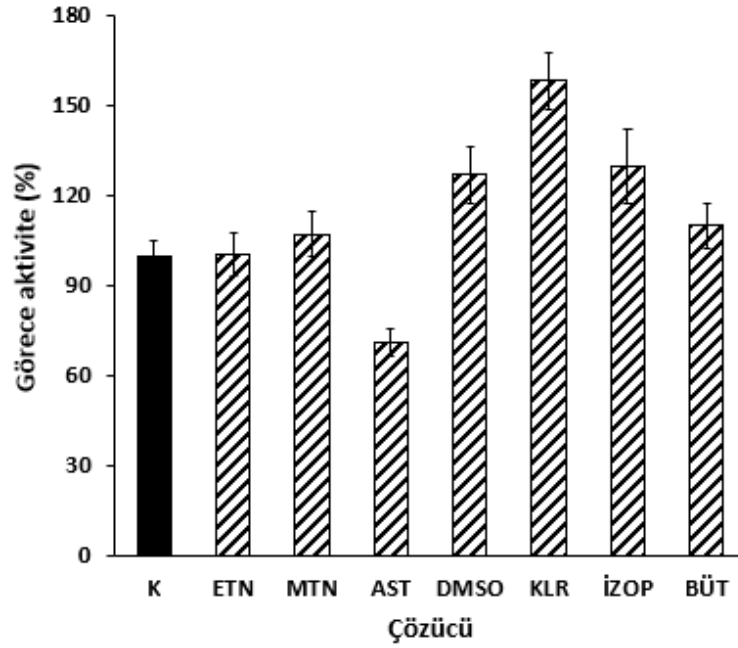
Şekil 4.32. Kimyasalların (%1)  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, PMSF: enilmetilsülfonil florür, DTT: ditiyotreitol, T 20: tween 20, TX-100: Triton X-100, SDS: sodyum dedosil sülfat, BME:  $\beta$ -merkaptoetanol, EDTA: etilendiamin tetraasetik asit.

Schyns et al. (1994), *Bacteroides xylanolyticus* X5-1 suşundan saflaştırılan  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın kimyasallar varlığında görece enzim aktivitesini test etmişlerdir. Yapılan çalışmada DTT'nin (0.1 mM) (görece aktivite: %70) görece enzim aktivitesini azalttığını, buna karşılık  $\beta$ -merkaptotanol (1 mM) (görece aktivite: %98) ve EDTA'nın (1 mM) (görece aktivite: %102) görece enzim aktivitesini değişikliğe uğratmadığını bulmuşlardır. Hespell and O'Bryan (1992), *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113'ten saflaştırdıkları  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimini 1 mM inhibitör içeren 100 mM fosfat tamponu ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe etmişlerdir. EDTA ve SDS'in görece enzim aktivitesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını bulmuşlardır. Kosugi et al. (2002), *Clostridium cellulovorans*'a ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazı izole etmiş ve saflaştırmışlardır. 10 mM EDTA'nın görece enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Elde edilen verilere göre PMSF ve SDS'in *J. alba*  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi üzerinde inhibitör etkisi olmasına karşılık  $\beta$ -merkaptotanol ve EDTA'nın aktivatör etkisi bulunmaktadır. Literatür verileri dikkate alındığında  $\beta$ -merkaptotanol ve EDTA'nın diğer takımlarda bulunan bakterilere ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinde görece etkisinin az olduğu, buna karşılık DTT'nin inhibitör etki gösterdiği görülmektedir.

#### **4.5.9. Çözücülerin $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi**

Şekil 4.33'de sunulan grafiğe göre etanol ve metanolün görece enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı ve bunların varlığında enzimin %100 aktivitede çalıştığı görülmüştür. Reaksiyon karışımında aseton (görece aktivite: %71.4) bulunması  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın görece aktivitesini azaltmıştır. Bununla birlikte; DMSO, kloroform, izopropanol ve bütanol varlığında enzimin görece aktivitesini %27.2, %58.5, %29.7 ve %10.2 oranında arttırdığı belirlenmiştir.



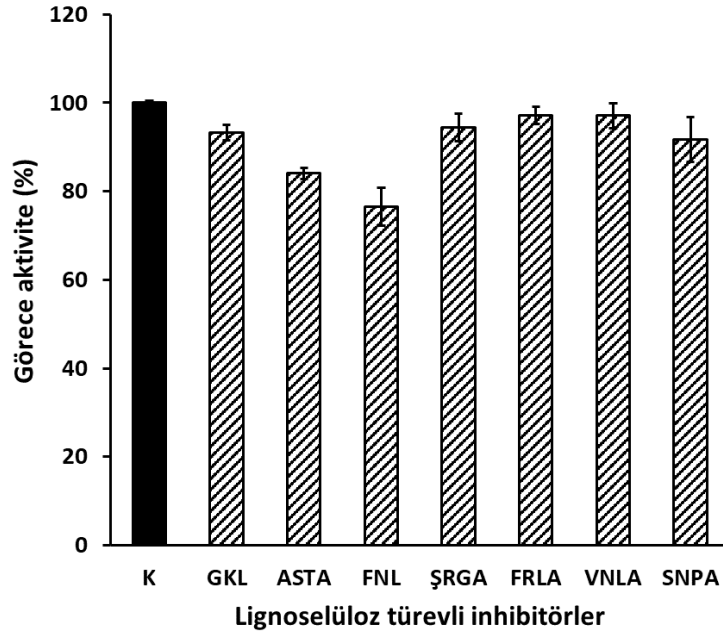
Şekil 4.33. Çözücülerin (%1)  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, ETN: etanol, MTN: metanol, AST: aseton, DMSO: dimetilsülfoksit, KLR: kloroform, İZOP: izopropanol, BÜT: bütanol.

Hespell and O'Bryan (1992), *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113'ten saflaştırdıkları  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimini %1 (v/v) etanol içeren 100 mM fosfat tamponu ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe etmişlerdir. Etanolün enzimin görece aktivitesine etki etmediği bulunmuştur.

Çalışmadaki veriler değerlendirildiğinde *J. alba*'ya ait  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimine etanolün etkisinin literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Aseton haricindeki çözücülerin görece enzim aktivitesini yükseltmesi enzimin endüstriyel kullanım potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

#### 4.5.10. Lignoselülozik Türevli İnhibitörlerin $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz'ın Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Biyoetanol üretim prosesinde ön-muamele neticesinde, hidroliz basamağında görev alan enzimler üzerinde inhibitör etki gösterebilecek bir takım fenolik ve asidik bileşikler açığa çıkmaktadır. Bu çalışma kapsamında lignoselüloz türevli bazı inhibitörlerin  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Şekil 4.34). Buna göre; asetik asit (görece aktivite: %84) ve fenolün (görece aktivite: %76.4) görece enzim aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Guaiakol, şiringik asit, ferulik asit, vanilik asit ve sinapik asitin görece enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.34. Lignoselüloz türevli inhibitörlerin (%1)  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın aktivitesi üzerindeki etkisi. K: kontrol, GKL: guaiakol, ASTA: asetik asit, FNL: fenol, ŞRGA: şiringik asit, FRLA: ferulik asit, SNPA: Sinapik asit.

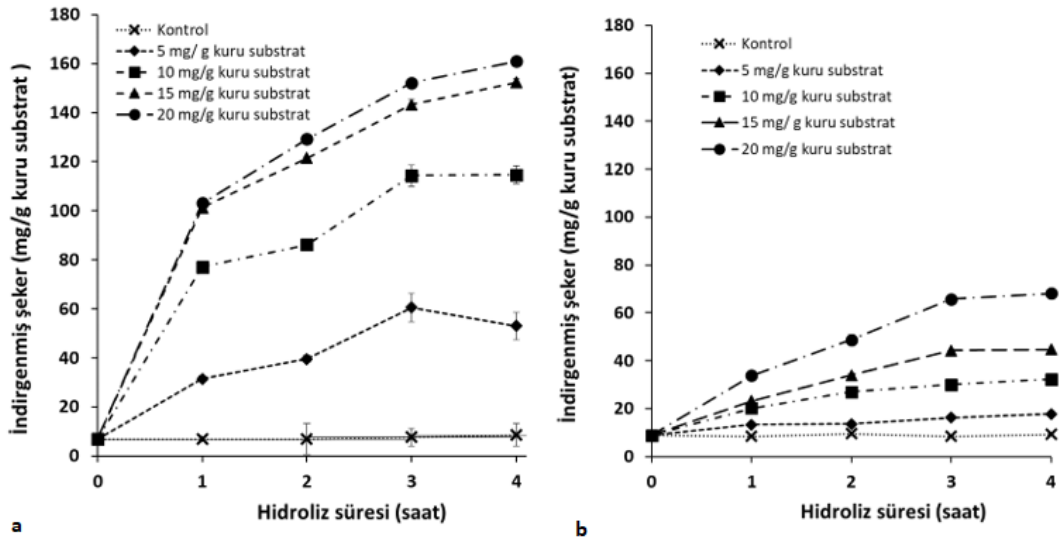
Kaji et al. (1981), iyi bir  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz üreticisi olan *Streptomyces* sp. No. 17-1 yabani suşundan ekstraselüler olarak elde edilen enzimini 0,1 mM *p*-CMB (Sodyum *p*-kloromerkuribenzoat) varlığında 30 °C'de 30 dk inkübe etmişlerdir. Görece enzim aktivitesinin %67'ye düştüğü görülmüştür.

Literatürde lignoselülozik biyokütlenin ön muamelesi sonrasında açığa çıkan ve inhibitör etkiye sahip olan kimyasallar çalışma kapsamında *J. alba*  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi üzerinde aktivatör etki sergilemiştir.

#### 4.6. Hidroliz

*J. alba*'dan elde edilen ham enzimin lignoselülozik materyallerin hidrolizinde kullanılma potansiyeli aynı amaç için kullanılan *A. niger* ile üretilmiş ticari selüloolitik enzim karışımınıniki ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. İlk olarak, farklı konsantrasyonlarda enzim varlığında %1'lik NaOH ile ön-muamele görmüş buğday samanının hidroliz sonucunda açığa çıkan indirgenmiş şeker miktarları tespit edilmiştir (Şekil 4.35). *J. alba* ile üretilen ham enzimin ön-muameleli buğday samanının üzerindeki hidrolitik etkisinin en yoğun olduğu zamanın ilk 1 saat olduğu görülmüştür. Ayrıca hidroliz aşamasında enzim miktarının 5 mg/g kuru substrat'tan 15 mg/g kuru substrat'a artırılması 4 saatlik proses sonunda açığa çıkan indirgenmiş şeker miktarında önemli bir artışa sebep olmuştur. Prosesin 3. ve 4. saatleri arasında

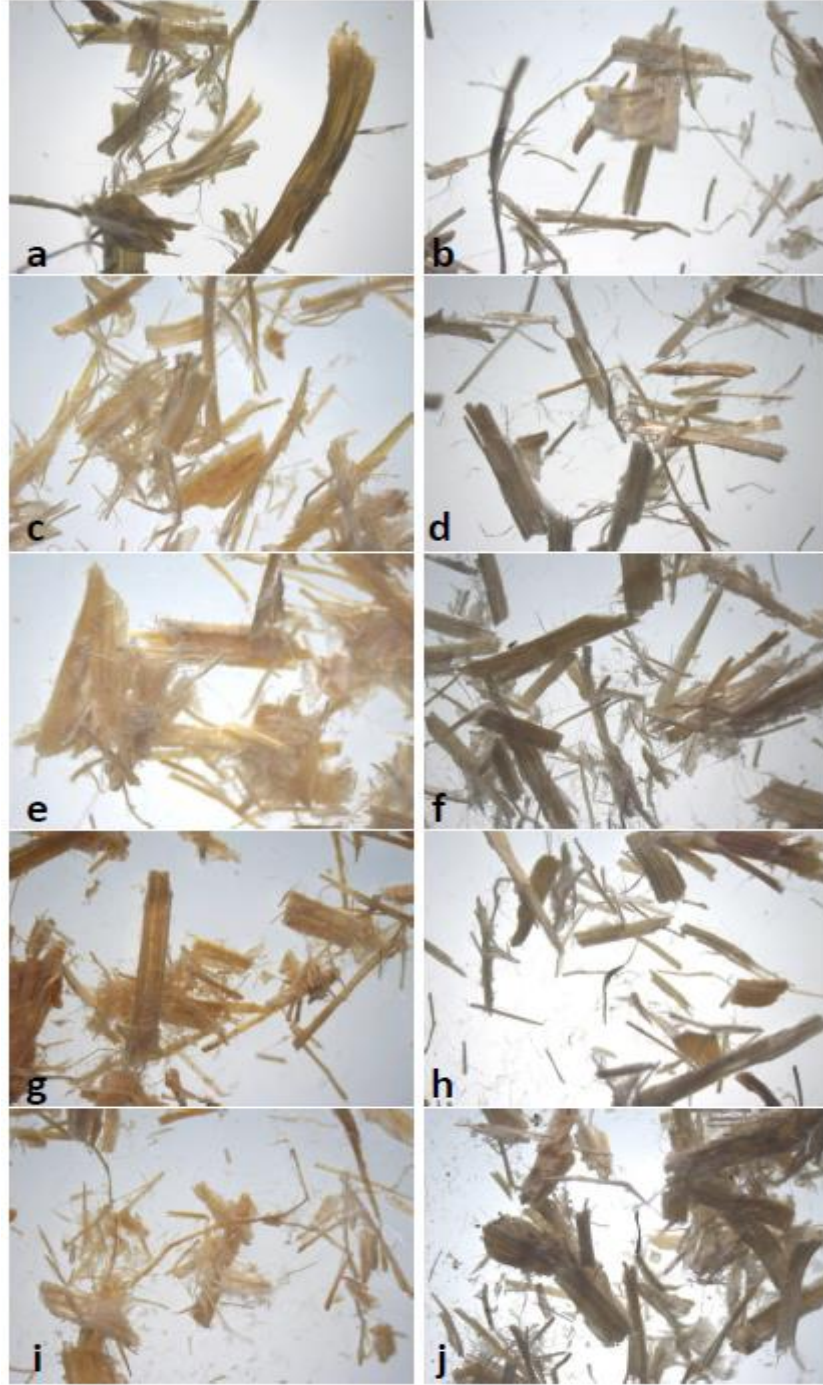
enzimin tüm konsantrasyonları için hidroliz veriminde diğer saatlerdekine oranla önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Hidroliz için ticari selüloolitik enzim karışımının kullanıldığı koşullarda da benzer bulgular kaydedilmiştir. Hidroliz prosesi sonunda *J. alba*'dan elde edilen ham enzimin (20 mg/g kuru substrat) ve ticari selüloolitik enzim karışımının (20 mg/g kuru substrat) açığa çıkmasına sebep olduğu indirgenmiş şeker miktarları sırasıyla 160.5 mg/g kuru substrat kuru substrat ve 68.25 mg/g kuru substrat olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde *J. alba* ham enziminin *A. niger* ile üretilmiş ticari selüloolitik enzim karışımına iyi bir alternatif olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlarda *J. alba* ham enziminin (a) ve ticari selüloolitik enzim karışımının hidroliz sırasında salınımına neden olduğu indirgenmiş şeker miktarları.

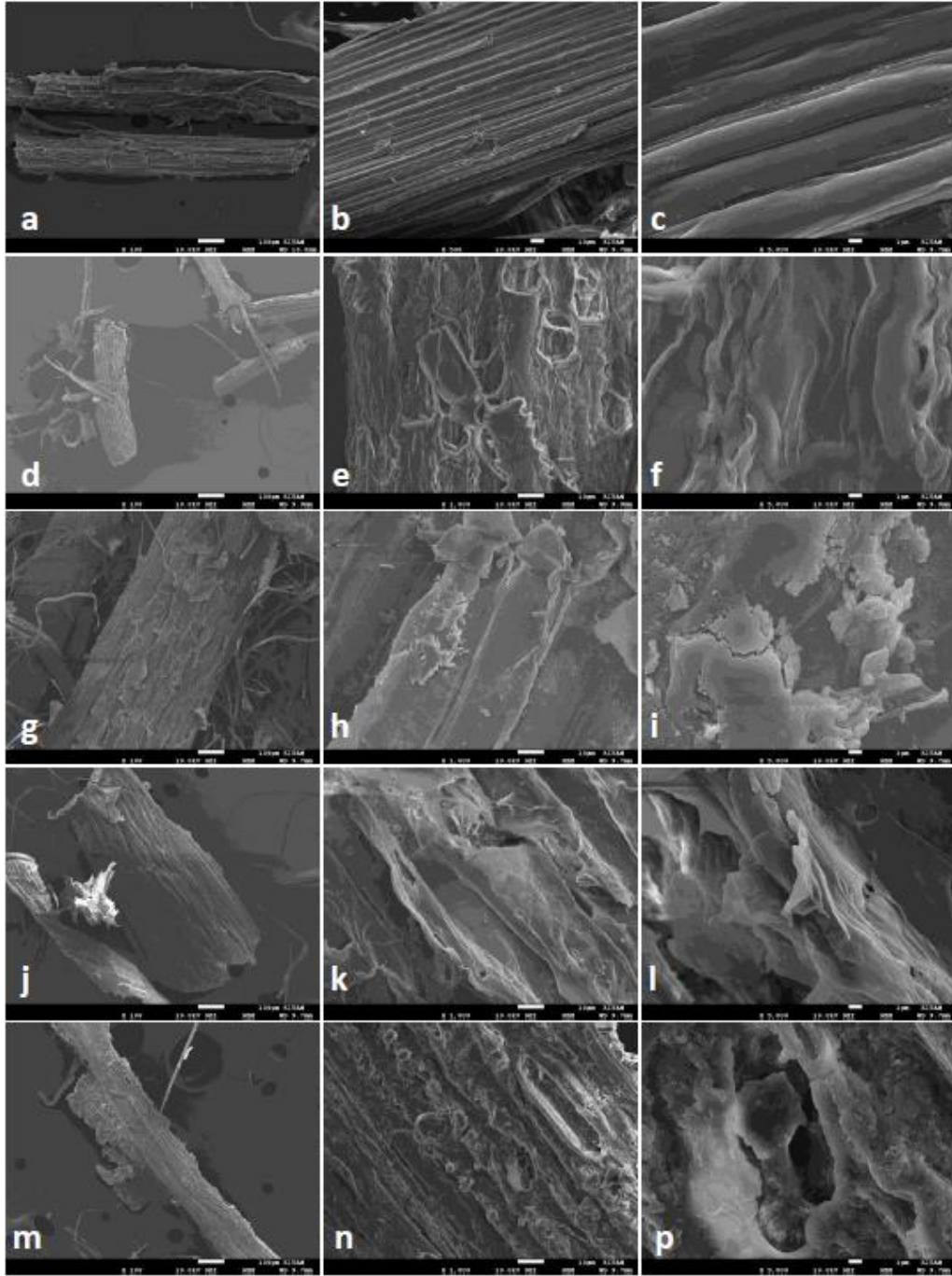
Proses sonunda, hidroliz verimi kalan saman parçalarının steryo ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri üzerinden de değerlendirilmiştir. Steryo mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde, zamana bağlı olarak *J. alba* ham enziminin bir bütün halindeki saman parçasının ince selüloz liflere ayrılmasını (saçaklanmasını) sağladığı görülmektedir. Benzer saçaklama etkisine ticari enzimlerle hidroliz sonrasında daha az rastlandığı gözlemlenmiştir. Elektron mikroskobu görüntüleri değerlendirildiğinde hidroliz prosesi öncesinde selüloz liflerinin oldukça belirgin olduğu ve saman yüzeyinin pürüzsüz olduğu görülmektedir (Şekil 4.36). Enzimatik hidroliz sonucunda saman yüzeyindeki pürüzsüzlüğün zamana bağlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, her iki enzim için de zamana bağlı olarak saman yüzeyinde çentikler, oyuklar ve yarıkların arttığı görülmüştür. *J. alba* enzimleri ile

gerçekleştiren hidroliz prosesi sonrasında saman yüzeyindeki dejenarasyonun ticari enziminkinden daha fazla olduğu açıkça görülmektedir.

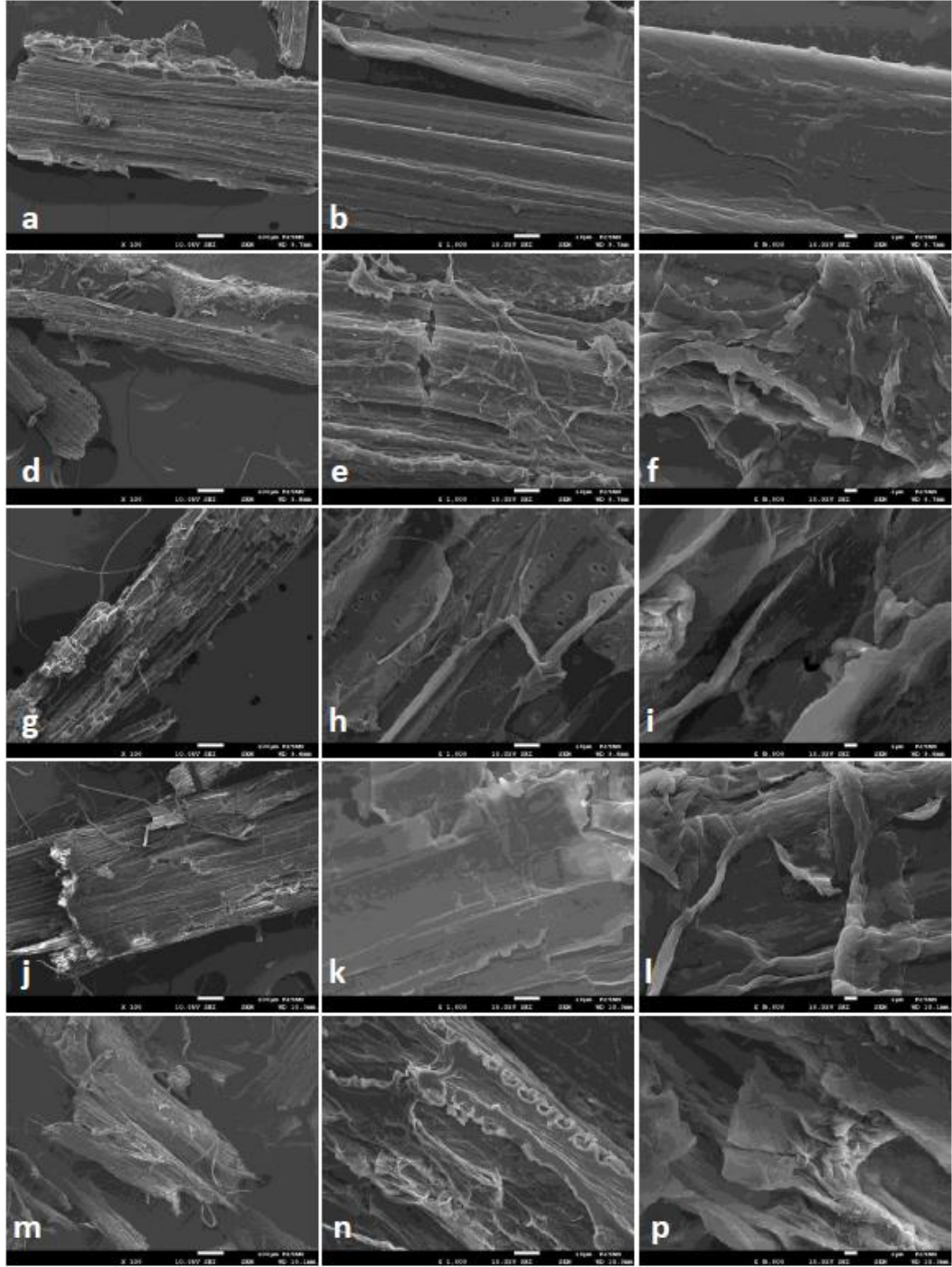


Şekil 4.36. Farklı konsantrasyonlarda *J. alba*'dan elde edilen ham enzim ve ticari selüloolitik enzim karışımının kullanıldığı hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının stereo mikroskop görüntüleri. (a) ve (b)'de sırasıyla *J. alba* ham enzimi ve ticari enzimlerle yapılan hidroliz deneylerinin başlangıcındaki saman parçaları gösterilmektedir. (c), (e), (g), ve (i)'de ise *J. alba* ham enzimi ile sırasıyla 0, 5, 10 ve 15 mg/g kuru substrat ile gerçekleştirilen hidroliz sonrası kalan saman parçaları gösterilmektedir. (d), (f), (h), ve (j)'de ise ticari enzim ile sırasıyla 1, 2, 3 ve 4 saatlik hidroliz sonrası kalan saman parçaları gösterilmektedir.

#### 4.7. SEM Görüntüleme



Şekil 4.37. Farklı konsantrasyonlarda *J. alba*'dan elde edilen ham enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesleri sonrasında kalan saman parçalarının elektron mikroskobu görüntüleri. (a) ve (b) ve (c)'de sırasıyla hidroliz deneylerinin başlangıcındaki saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları gösterilmektedir. (d), (e) ve (f)'de 5 mg/g kuru substrat enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları; (g), (h) ve (i)'de 10 mg/g kuru substrat enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları; (j), (k) ve (l)'de 15 mg/g kuru substrat enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları; (m), (n) ve (o)'de 20 mg/g kuru substrat enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları gösterilmektedir.

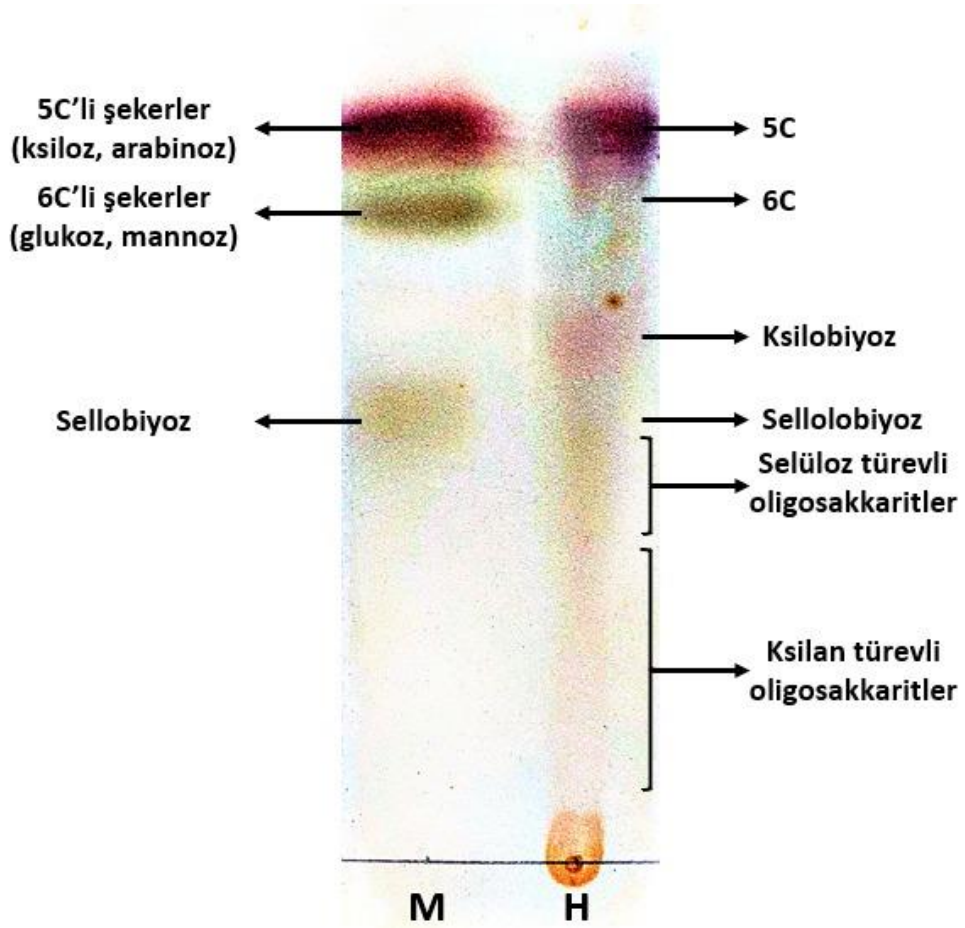


Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlarda ticari selülitik enzim karışımı ile gerçekleştirilen hidroliz prosesleri sonrasında kalan saman parçalarının elektron mikroskobu görüntüleri. (a) ve (b) ve (c)'de sırasıyla hidroliz deneylerinin başlangıcındaki saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları gösterilmektedir. (d), (e) ve (f)'de 5 mg/g kuru substrat enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları; (g), (h) ve (i)'de 10 mg/g kuru substrat L enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları; (j), (k) ve (l)'de 15 mg/g kuru substrat enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları; (m), (n) ve (p)'de 20 mg/g kuru substrat enzim ile gerçekleştirilen hidroliz prosesi sonrasında kalan saman parçalarının 100X, 1000X ve 5000X'lik elektron mikrografları gösterilmektedir.

Samanın *J. alba* ham enzimiyle degradasyon öncesindeki ve sonrasında elde edilen SEM görüntüleri karşılaştırıldığında 20 mg/g kuru substrat enzim varlığında yüzey kısmının tamamen kırıldığı görülmektedir. Dış parankim dokunun 15 mg/g kuru substrat enzim varlığında 4 saatte kısmen kaybolduğu ve alttaki parankim dokusunun açığa çıktığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.37). 4 saatlik inkübasyon sonucunda 10-15-20 mg/g kuru substrat ham enzim karışımı sayesinde komposttaki lignin bozulması artmış ve iç parankim dokusu açığa çıkmıştır.

*J. alba* enzim karışımının saman üzerindeki etkileri, ticari enzimin oluşturduğu etkiler ile karşılaştırıldığında etkinliklerinin yakın olduğu ve *J. alba* enziminin ticari degradasyonda kullanılabilir olduğu görülmektedir.

#### 4.8. Hidroliz Ürünlerinin TLC ile Görüntülenmesi



Şekil 4.39. Belirlenen optimal koşullarda hidrolize tabi tutulan substrattan elde edilen ürünlerin ince tabaka kromatografisinde elde edilen görüntüleri. M hattı %2'lik standart çözeltisini; H hattı liyofilize edilmiş hidrolizatı ifade etmektedir.

Lignoselülozik materyalin ön-muamelesi ve *J. alba* ham enzimi ile hidrolizi sonucu elde edilen ürün ince tabaka kromatografisinde (TLC) gözlemlenmiştir.

Liyofilize edilmiş olan hidroliz prosesinin son ürününün yürütülmesi sonucu içerisinde ksiloz, arabinoz, glukoz, mannoz, sellobiyoz ve laktoz bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.39). *J. alba* ham enzim karışımında  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazın varlığı elde edilmiş olan TLC görüntüsü ile kanıtlanmıştır. 4 saat 40 °C inkübasyon koşullarında gerçekleşen hidroliz sonucuna göre enzim karışımında bulunan  $\alpha$ -L-arabinofuranozidazın verimliliğinin daha yüksek olduğu ve şeker indirgeme oranının;  $\beta$ -glukozidaz ve  $\beta$ -ksikozidaz'dan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen veriler ışığında *Jiangella alba*'ya ait  $\beta$ -glukozidaz'ın veya selülozu  $\beta$ -glukozidaz tarafından parçalanabilir sellobiyoz birimlerine dönüştüren endoglukanazların verimliliğinin, endoksilanazlara oranla daha düşük olduğu sonucuna varılmaktadır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yüzyılda küresel sıcaklıkta artışa sebep olan CO<sub>2</sub>, metan, azot ve flora kloru karbonlar fosil yakıtlar ve endüstriyel süreçler sonucunda açığa çıkmaktadır. Sera gazı emisyonunun daha az olması ve artan nüfustan dolayı açığa çıkan enerji ihtiyacının giderilmesi için biyoetanol üretimi her geçen yıl daha fazla teşvik edilmektedir.

Biyoetanol üretim prosesinde enzim karışımları ve fermantatif mayalar kullanılmaktadır. Lignoselülozik materyalin ön muamele ile ligninden uzaklaştırılmasının ardında enzimler yardımıyla degrades olması gerekmektedir. Enzimler, canlı hücrelerde gerçekleşen kimyasal dönüşümlerin gerçekleşmesinde rol oynayan kompleks organik moleküllerdir.

Endüstriyel mikrobiyolojide başta *Streptomyces* genusunda sınıflandırılanlar olmak üzere aktinomiset takımı kendine büyük yer bulmaktadır. Aktinomisetler tarafından üretilen proteaz, selülaz, lipaz, ksilanaz, pektinaz vb. enzimleri günümüzde deterjan, fırıncılık, tekstil başta olmak üzere bir çok alanda kullanılmaktadır (Prakash et al., 2013).

Hemiselülaz, selülaz ve lignin; bitki hücre duvarında bulunan, biyoetanol üretiminde biyokütle olarak kullanılan lignoselülozik materyalin yapısını oluşturan polisakkaritlerdir. Hemiselüloz ve selülozun biyoetanol üretim prosesinde hidrolize edilmesi için çoğunlukla kullanılan enzimler şunlardır: endoglukanaz, ekzoglukanaz,  $\beta$ -glukozidaz, sellobiyaz, ksilozidaz,  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz,  $\beta$ -(1,4)-D mannanaz. Ancak, literatürde *Jiangella alba* ile üretilen  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin biyokimyasal özelliklerinin sunulduğu bilginiz dahilinde bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmada  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -ksilozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimleri indükleyici varlığında *J. alba* ile batık kültürde üretildi. Üretilen enzimler amonyum sülfat ile kısmi saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Aynı zamanda *J. alba* kültür sıvısının NaOH ile ön-muamele edilmiş buğday samanı üzerindeki hidrolitik etkisi belirlenerek enzim karışımının biyoetanol endüstrisinde kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

Farklı sıcaklıkların (20-90 °C)  $\beta$ -glukozidaz üzerindeki katalitik etkileri 100 mM'lık pH 7 fosfat tamponu ile hazırlanan reaksiyon ortamında test edilmesi

sonucunda enzimin 30-50 °C aralığında aktifliğinin yüksek olduğu bulunmuştur. 20 °C’de ve 50 °C’de görece enzim aktivitesinin yarılandığı gözlenmiştir. 40 °C’de üç saat görece aktivitesini koruduğu, dördüncü saat %50 oranında kaybettiği görülmüştür. 50-70 °C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilecek 1-2 saatlik endüstriyel uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.  $\beta$ -glukozidaz’ın pH 8 fosfat tamponunda en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. Fosfat tamponu pH 6 ile 8 arasında enzimin aktifliğinin yüksek olduğu görülmüştür. Görece enzim aktivitesinin fosfat tamponu pH 6 ile 8 arasında 1 saat aktifliğini koruduğu belirtilmiştir. Enzimin pH 8’de 1 saat süre ile inkübe olması görece aktivitesinde değişime sebep olmazken pH 7’de kalması inkübasyon süresi göz önüne alındığında görece aktivitesini arttırmıştır.

Farklı NaCl oranlarında inkübe olan  $\beta$ -glukozidaz’ın %1-12 arasındaki oranlarda aktifliğini koruduğu gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler enzimin NaCl varlığında kararlılığını önemli ölçüde koruyabildiğini göstermektedir. 1 mM metal iyonunun görece enzim aktivitesi üzerindeki etkilerine bakıldığında görece enzim aktivitesini  $\text{Cu}^{2+}$  ve  $\text{Ag}^{3+}$ ’ün tamamen,  $\text{K}^{+}$ ’un kısmen inhibe ettiği görülmüştür. Buna karşın,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{CO}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$ ’in  $\beta$ -glukozidaz’un görece aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. Reaksiyon karışımına ilave edilen %1 oranına sahip kimyasalların  $\beta$ -glukozidaz’ın görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelendiğinde PMSF, DTT ve SDS’in görece enzim aktivitesi üzerinde inhibe edici bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Buna karşılık, tween 20, triton X-100,  $\beta$ -merkaptotanol ve EDTA’nın görece enzim aktivitesinde artışa neden oldukları tespit edilmiştir. Etanol ve metanolün görece enzim aktivitesinin artışına; izopropanol, DMSO ve bütanol enzimin kısmen inhibe olmasına neden olduğu görülmüştür. Aynı zamanda reaksiyon karışımında aseton ve kloroformun bulunması görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sebep olmamıştır.

Lignoselüloz türevli inhibitörlerin  $\beta$ -glukozidaz’ın görece aktivitesi üzerindeki etkilerine bakıldığında guaiakol, fenol, şiringik asit ve sinapik asitin görece enzim aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür. Asetik asit ve ferulik asitin enzimin görece aktivitesini etkilemediği ancak vanilik asitin görece enzim aktivitesini arttırdığı görülmüştür.

Yapılan karakterizasyon denemeleri sonucunda  $\beta$ -ksilozidaz’un 30-50 °C arasında aktif şekilde çalıştığı görülmüştür. Enzim aktivitesi 60 °C’den sonra

aktifliğini oldukça yitirmektedir. Enzim 40 °C'de 3 saat aktifliğini korurken dördüncü aktivitesini %50 oranında kaybettiği görülmüştür. Bununla beraber, 50 °C'de 2. saatten, 60 °C'de 1. saatten itibaren enzimin aktivitesinin %50'nin altına düştüğü görülmektedir. Farklı pH'lara ait farklı tamponlarla yapılan deneyler neticesinde  $\beta$ -ksilozidaz'ın pH 7 ile 8 fosfat tamponunda en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir Ancak pH değeri 8'e ayarlanmış Tris-HCl tamponunda %20'lik görece aktivite tespit edilmiştir.  $\beta$ -Ksilozidaz pH 6 ile 8 fosfat tamponu aralığında 1 saat 40 °C'de inkübe edildiğinde aktifliğini kaybetmediği görülmüştür.

Enzimin 1 saat süre ile pH 7'de kalması inkübasyon süresi göz önüne alındığında kalan enzim aktivitesini azaltmıştır. Optimum değer olan pH 8'de inkübasyon süresi kalan enzim aktivitesini %4 oranında düşürmüştür. Enzimin pH 6'da 1 saat inkübe edilmesi kalan aktivitesinin %50'sini kaybetmesine neden olmuştur. Görece enzim aktivitesi, %1-12'lik tuz konsantrasyonlarında korunmaktadır. Yapılan deneyler sonucunda enzimin NaCl varlığında kararlılığını önemli ölçüde koruyabildiğini göstermektedir.

Metal iyonlarının (1 mM) görece enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelendiğinde  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$ 'un görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisini olmadığı görülmüştür. Ölçüm sonuçlarına göre  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  ve  $Ag^{3+}$ 'ün görece enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği,  $Co^{2+}$ 'ın yarı yarıya inhibe ettiği görülmüştür. Buna karşın,  $Zn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$ 'in  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. %1 oranındaki PMSF , DTT ve Tween 20'nin görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Reaksiyon karışımında SDS'in ve  $\beta$ -merkaptolanol'ün bulunduğu koşullarda görece enzim aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. %1 oranındaki kloroform görece enzim aktivitesini tamamen inhibe ederken, DMSO ve izopropanol  $\beta$ -ksilozidaz'ın görece aktivitesi üzerinde önemli bir etkiye sebep olmamıştır.

Lignoselüloz türevli inhibitörlerin enzim üzerindeki etkileri incelendiğinde %1'lik fenol ve sinapik asitin görece enzim aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Guaiakol ve şiringik asitin görece enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın; asetik asit, ferulik asit, ve vanilik asitin görece enzim aktivitesini yüksek oranda arttırdığı belirlenmiştir.

$\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimi orijinal aktivitesini 30-40 °C arasında korumuştur. 40 °C'de 4 saat inkübe olması ile enzim aktivitesi inhibe olmamıştır. 60 °C'de 3. saatten, 70 °C'de ise 2. saatten itibaren enzimin görece aktivitesinin %50'nin altına düştüğü görülmektedir.  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın pH 8 ile 9 Tris-HCl tamponunda en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Tris-HCl pH 8 ile 9'da 1 saat 40 °C inkübe olması görece enzim aktivitesinde azalmaya neden olmamıştır.

Farklı NaCl oranlarında inkübe olan  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın %1 NaCl varlığında görece aktivitesinin arttığı, %12 NaCl varlığında ise enzimin yarı yarıya inhibe olduğu görülmüştür. Gerçekleştirilen deneyler enzimin NaCl varlığında kararlılığını önemli ölçüde koruyabildiğini göstermektedir.  $\alpha$ -L-Arabinofuranozidaz %1-12 NaCl varlığında 1 saat inkübasyona bırakıldığında görece aktivitesinde NaCl'den kaynaklı önemli bir azalma meydana gelmemiştir.

1 mM  $Ag^{3+}$  ve  $Zn^{2+}$  görece enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Buna karşın,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Fe^{2+}$ 'in  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz'ın görece aktivitesini önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir.

Reaksiyona eklenen %1'lik DTT'nin görece enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Reaksiyon karışımında PMSF ve SDS'in bulunduğu koşullarda ise sırasıyla enzim aktivitesinin görece düştüğü belirlenmiştir. Buna karşılık; tween 20, triton X-100,  $\beta$ -merkaptotanol ve EDTA'nın enzim aktivitesinde görece artışa neden oldukları tespit edilmiştir.

%1'lik etanol ve metanolün görece enzim aktivitesi üzerinde etkisinin olmadığı ve aseton bulunması görece enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür. Bununla birlikte; DMSO, kloroform, izopropanol ve bütanol varlığında enzimin görece aktivitesinin arttırdığı belirlenmiştir. Asetik asit ve fenolün görece enzim aktivitesini azalttığı saptanmıştır. Guaiakol, şiringik asit, ferulik asit, vanilik asit ve sinapik asitin görece enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin ise önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan hidroliz deneyi sonucunda elde edilen TLC ve SEM görüntüleri ışığında  $\beta$ -glukozidaz,  $\beta$ -silozidaz ve  $\alpha$ -L-arabinofuranozidaz enzimlerinin;

1. Lignoselüloz türevli bileşiklerle inhibe olmaması; lignoselüloz temelli şekerlerin yakıtı dönüştürülmesinde,
2. NaCl varlığında aktifliğini koruması fırıncılıkta,

3. Bazik pH'da aktif olması; meyve suyu ve biranın bulanıklığının giderilmesinde,
4. Kağıt ve kağıt endüstrisinde hamurun beyazlatılmasında, kullanılabilceği görölmektedir.

## KAYNAKÇA

- Adıgüzel, A. O. (2013). Biyoetanolün genel özellikleri ve üretimi için gerekli hammadde kaynakları. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(2), 204-220.
- Akel, E., Metz, B., Seiboth, B., and Kubicek, C.P. (2009). Molecular regulation of arabinan and L-arabinose metabolism in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Eukaryotic cell*, 8(12), 1837-1844.
- Aygan, A., ve Battaloğlu, G. (2015). Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. P-5 Tarafından Endoglukanaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, (11), 11-20.
- Başar, İ.A. (2018). Dallı darı bitkisinden hidrojen peroksit-asetik asit ön arıtma yöntemi ile biyoyakıt üretim prosesinin optimizasyonu.
- Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G.S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3), 326-338.
- Belfaouh, N., and Penninckx, M.J. (2000). A bifunctional  $\beta$ -xylosidase-xylose isomerase from *Streptomyces* sp. EC 10. *Enzyme and microbial technology*, 27(1-2), 114-121.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., Edelstein, S.J. (1996). *Protein Methods* (2nd Edt). Wiley-Liss Press, Usa. 414s
- Borand, M.N.E. (2012). *Effects of pretreatment methods on lignocellulosic bioethanol production* (Doctoral dissertation).
- Çavuşoğlu Dolma, G. (2013). Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağından  $\beta$ -glukozidaz enzimini kodlayan genin klonlanması.
- Çöpür, Y., Tozluoğlu, A., ve Özyürek, Ö. (2011). Selülozik biyoetanol üretim teknolojisi. *Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi Ormancılık Dergisi*, 7(1), 10-37.
- Damáso, A.R.D.L., Pessela, B.C., Segato, F., Prade, R.A., Guisan, J.M., Polizeli, M.D.L.T.M. (2012). Improvement of fungal arabinofuranosidase thermal stability by reversible immobilization. *ProcessBiochem.* 47(12), 2411–2417.
- De Almeida, E.M., Polizeli, M.D.L.T., Terenzi, H.F., and Atilio Jorge, J. (1995). Purification and biochemical characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Hemicolla grisea* var. *thermoidea*. *FEMS microbiology letters*, 130(2-3), 171-175.
- Dolgun, S.B. (2016). *Dallı darı bitkisinden (*Panicum Virgatum* L.) biyoetanol üretiminde seyreltik asit ve kireç ön uygulamalarının optimizasyonu ve bazı genotiplerin biyoetanol verimliliklerinin belirlenmesi* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Ekmekci, Z. (2016). *Malatya kayısı (*Prunus Armeniaca* L.) çekirdeğinden Beta-Glukozidaz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu* (Master's thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Faiz, Ö., Elvan, H., Ertungab, N. S., Çolak, A., ve Yıldırım, M. *Lepista flaccida* (Sowerby: Fr.) Pat. Mantarından  $\beta$ -Glukozidaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.
- Flores, M.E., Pérez, R., and Huitron, C. (1997).  $\beta$ -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *Letters in applied microbiology*, 24(5), 410-416.
- Gallagher, J., Winters, A., Barron, N., McHale, L., and McHale, A.P. (1996). Production of cellulase and  $\beta$ -glucosidase activity during growth of the actinomycete *Micromonospora chalcone* on cellulose-containing media. *Biotechnology Letters*, 18(5), 537-540.

- Gong, G., Zheng, Z., Liu, H., Wang, L., Diao, J., Wang, P., and Zhao, G. (2014). Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* and its application in the hydrolysis of geniposide to genipin. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 788-794.
- Harchand, R.K., and Singh, S. (1997). Characterization of cellulase complex of *Streptomyces albaduncus*. *Journal of basic microbiology*, 37(2), 93-103.
- Hespell, R.B., and O'Bryan, P.J. (1992). Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), 1082-1088.
- Hwang, E. J., Lee, Y. S., and Choi, Y. L. (2018). Cloning, purification, and characterization of the organic solvent tolerant  $\beta$ -glucosidase, Oa BGL84, from *Olleya aquimaris* DAU311. *Applied Biological Chemistry*, 61(3), 325-336.
- Ichinose, H., Yoshida, M., Fujimoto, Z., and Kaneko, S. (2008). Characterization of a modular enzyme of exo-1, 5- $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and arabinan binding module from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(3), 399-408.
- İlgü, H., Sürmeli, Y., ve Şanlı-Mohamed, G. (2018). A thermophilic  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus vulcani* GS90: heterologous expression, biochemical characterization, and its synergistic action in fruit juice enrichment. *European Food Research and Technology*, 244(9), 1627-1636.
- Inácio, J.M., Correia, I.L., deSá-Nogueira, I. (2008). Two distinct arabinofuranosidases contribute to arabino-oligosaccharide degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 154(9),2719–2729
- Jin, X., Song, J., Ma, J., and Liu, G. Q. (2020). Thermostable  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus fumigatus*: Purification, characterization and potential application in lignocellulose bioethanol production. *Renewable Energy*, 155, 1425-1431.
- Kaji, A., Sato, M., and Tsutsui, Y. (1981). An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces* sp. no. 17-1. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 925-931.
- Kara, H., Sinan, S., Turan, Y. (2011). “Purification of beta-glucosidase from olive (*Olea europaea* L.) fruit tissue with specifically designed hydrophobic interaction chromatography and characterization of the purified enzyme”, *Journal of Chromatography B*, 879, 1507-1512.
- Kırcı, H. (2001). Selüloz Türevleri Ve Kullanım Yerleri.
- Kluepfel, D., Shareck, F., Mondou, F., and Morosoli, R. (1986). Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 230-234.
- Kocabaş, D. S. Gıda Endüstrisinde Enzimlerin Rolü Ve İlgili Yasal Düzenlemeler.
- Kumar, A. K. (2015). UV mutagenesis treatment for improved production of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase from newly isolated thermotolerant actinomycetes, *Streptomyces griseoaurantiacus*. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 1-10.
- Lee, J.M., Kim, Y.R., Kim, J.K., Jeong, G.T., Ha, J.C., Kong, I.S. (2015). Characterization of salttolerant  $\beta$ -glucosidase with increased thermostability under high salinity conditions from *Bacillus* sp. SJ-10 isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (7) 1335–1346.
- Lee, H. J., and Lee, S. S. (2010). *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a  $\beta$ -glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *The Journal of Microbiology*, 48(6), 754-759.

- Lee, K. W., Han, N. S., and Kim, J. H. (2012). Purification and characterization of beta-glucosidase from *Weissella cibaria* 37. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(12), 1705-1713.
- Lee, J.H., Hyun, Y.J., Kim, D.H. (2011). Cloning and characterization of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase and bifunctional  $\alpha$ -L-arabinopyranosidase/ $\beta$ -D-galactopyranosidase from *Bifidobacterium longum* H-1.J. *Appl. Microbiol.* 111 (5), 1097–1107
- Liew, K. J., Lim, L., Woo, H. Y., Chan, K. G., Shamsir, M. S., and Goh, K. M. (2018). Purification and characterization of a novel GH1 beta-glucosidase from *Jeotgalibacillus malaysiensis*. *International journal of biological macromolecules*, 115, 1094-1102.
- Lim, Y.R., Yoon, R.Y., Seo, E.S., Kim, Y.S., Park, C.S., Oh, D.K. (2010). Hydrolytic properties of a thermostable arabinofuranosidase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *J. Appl. Microbiol.* 109(4), 1188–1197.
- Li, Y., Bu, M., Chen, P., Li, X., Chen, C., Gao, G., Feng, Y., Han, W., Zhang, Z. (2018). Characterization of a thermophilic monosaccharide stimulated  $\beta$ -glucosidase from *Acidothermus cellulolyticus*, *Chem. Res. Chin. Univ.* 34 (2) 212–220.
- Mai, Z., Yang, J., Tian, X., Li, J., Zhang, S. (2013). Gene cloning and characterization of a novel salt-tolerant and glucose-enhanced  $\beta$ -glucosidase from a marine streptomycete, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169 (5) 1512–1522.
- Manin, C., Shareek, F., Morosoli, R., and Kluepfel, D. (1994). Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces lividans* 66 and DNA sequence of the gene (abfA). *Biochemical Journal*, 302(2), 443-449.
- Marquez, O. and Waliszewski K. N. (2008). “The effect of thermal treatment on  $\beta$ glucosidase inactivation in vanilla bean (*Vanilla planifolia* Andrews)”, *Int. J. of Food Sci. and Technol.*, 43, 1993-1999.
- Matsuo, N., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., Kusakabe, I. (2000). Purification, characterization and gene cloning of two  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases from *Streptomyces chartreusis* GS901. *Biochem. J.* 346(1), 9–15
- Miller, G.L. (1951). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- Moldoveanu, N., and Kluepfel, D. (1983). Comparison of  $\beta$ -glucosidase activities in different *Streptomyces* strains. *Applied and environmental microbiology*, 46(1), 17-21.
- Msakni, S. (2020). *Türkiye topraklarından izole edilmiş Bacillus sp. suşlarından selüloz enzim üretiminin taranması, besinsel optimizasyon, enzimin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve yünlü kumaştaki bitki atıklarının giderilmesinde etkinliği* (Master's thesis, Bursa Uludağ Üniversitesi).
- Murashima, K., Kosugi, A., and Doi, R. H. (2002). Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5088-5095.
- Nakano, H., Okamoto, K., Yatake, T., Kiso, T., and Kitahata, S. (1998). Purification and characterization of a novel  $\beta$ -glucosidase from *Clavibacter michiganense* that hydrolyzes glucosyl ester linkage in steviol glycosides. *Journal of fermentation and bioengineering*, 85(2), 162-168.
- Olgun, Ç. (2019). *Farklı Lignin Yapılarına Sahip Hammaddelerden Lignin Esaslı Karbon Lifi Üretimi* (Doctoral Dissertation, Kastamonu Üniversitesi).

- Pinphanichakarn, P., Tangsakul, T., Thongnumwon, T., Talawanich, Y., and Thamchaipenet, A. (2004). Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(7), 727-733.
- Poria, V., Saini, J. K., Singh, S., Nain, L., and Kuhad, R. C. (2020). Arabinofuranosidases: characteristics, microbial production, and potential in waste valorization and industrial applications. *Bioresource technology*, 304, 123019.
- Prakash, D., Nawani, N., Prakash, M., Bodas, M., Mandal, A., Khetmalas, M., and Kapadnis, B. (2013). Actinomycetes: a repertory of green catalysts with a potential revenue resource. *BioMed research international*, 2013.
- Prasad, P., Singh, T. and S. Bedi (2013). "Characterization of the cellulolytic enzyme produced by *Streptomyces griseorubens* (Accession No. AB184139) isolated from Indian soil," *Journal of King Saud University—Science*, vol.25, no.3, pp.245–250.
- Pyeon, H.M., Lee, Y.S., Choi, Y.L. (2019). Cloning, purification, and characterization of GH3  $\beta$ glucosidase, MtBgl85, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221, *Peer J* 7 e7106.
- Qu, X., Ding, B., Li, J., Liang, M., Du, L., Wei, Y., and Pang, H. (2020). Characterization of a GH3 halophilic  $\beta$ -glucosidase from *Pseudoalteromonas* and its NaCl-induced activity toward isoflavones. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1392-1398.
- Rashid, M.H., Siddiqui, K.S. (1997). Purification and characterization of a  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger*, *Folia Microbiol.* 42 (6) 544–550.
- Raweesri P., Riangrunrojana P., Pinphanichakarn P. (2008). -L-Arabinofuranosidase from *Streptomyces* sp. PC22: Purification, characterization and its synergistic action with xylanolytic enzyme in the degradation of xylan and agricultural residues. *Bioresour. Technol.* 99(18), 8981–8986
- Saha, B. C., and Bothast, R. J. (1996). Production, purification, and characterization of a highly glucose-tolerant novel beta-glucosidase from *Candida peltata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), 3165-3170.
- Saini, A., Aggarwal, N. K., Sharma, A., and Yadav, A. (2015). Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. *Enzyme research*, 2015.
- Savran, İ. (2018). *Aspergillus terreus* ksilanolitik sisteminin batık ve katı kültürde hücre dışı proteinlerinin karşılaştırılmalı proteomik analizi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Schyns, P. J. Y. M. J., De Frankrijker, J., Zehnder, A. J. B., and Stams, A. J. M. (1994). Production, purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Bacteroides xylanolyticus* X5-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 42(4), 548-554.
- Siddiqui, K. S., Rashid, M. H., Ghauri, T. M., Durrani, I. S., and Rajoka, M. I. (1997). Purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Cellulomonas biazotea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(2), 245-247.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Pandey, A., and Ganansounou, E. (2017). Genetic modification: a tool for enhancing beta-glucosidase production for biofuel application. *Bioresource technology*, 245, 1352-1361.
- Spiridonov, N. A., and Wilson, D. B. (2001). Cloning and biochemical characterization of BglC, a  $\beta$ -glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*. *Current microbiology*, 42(4), 295-301.

- Squillaci, G., Esposito, A., and La Cara, F. (2017). Free and immobilized thermophilic alpha-L-arabinofuranosidase for arabinose production. *Arch Ind Biotechnol*. 2017; 1 (1): 27-34 28 *Arch Ind Biotechnol 2017 Volume 1 Issue, 1*, 14-16.
- Takcı, H. A. M., and Sertbaş, G. Bacillus Spp. Suşlarından Ksilanaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 9(2), 335-348.
- Tramontina, R., de Andrades, D., Henn, C., Silva, J. L., Simão, R. C., Maller, A., ... and Kadowaki, M. K. (2015). Characterization of a novel *Aspergillus niger* beta-glucosidase tolerant to saccharification of lignocellulosic biomass products and fermentation inhibitors. *Chemical Papers*, 69(8), 1050-1057.
- Tsuji, H., Takada, C., Wakamatsu, Y., Kosaka, M., Tsuji, A., Miyamoto, K., Inamori, Y. (2014). Cloning and Expression of an  $\alpha$ -Arabinofuranosidase Gene (stxIV) from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC520, and Characterization of the Enzyme. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(2), 434-438
- Tuncer, M. (2000). Characterization of beta-Xylosidase and alpha-L-Arabinofuranosidase Activities From *Thermomonospora Fusca* BD25. *Turkish Journal of Biology*, 24(4), 753-768.
- Uluçay, O. (2018). Termal kaynaklardan izole elde edilen çeşitli Bacillus türlerinden 1, 4- $\beta$ -endo ksilanaz enziminin üretilmesi, saflaştırılması ve ticari kullanılabilirliğinin araştırılması.
- Xue, D.S., Chen, H.Y., Ren, Y.R., Yao, S.J. (2012). Enhancing the activity and thermostability of thermostable  $\beta$ -glucosidase from a marine *Aspergillus niger* at high salinity, *Process Biochem.* 47 (4) 606-611.
- Yavaş, Y. (2012). *Hemiselülaz enziminin tam buğday unlu keklerin fiziksel özellikleri üzerine etkisi* (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Yavuz, T. (2018). Üzüm posasından biyoetanol üretiminin araştırılması/Investigation of bioethanol production from grape pomace.
- Yıldırım, O., Tunay, D., and Ozkaya, B. (2021). Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of chemical pretreated cotton stalk using response surface methodology for enhanced bioethanol production yield. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-12.
- Yıldız, S. (2012). *Poli (laktik asit)'in silikon kauçuk ile toklaştırılması* (Master's thesis, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

## ÖZ GEÇMİŞ

Zeynep Gül AYTAŞ, Samsun Onur Ateş Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'nden 2019 yılında mezun oldu. 2019 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programına girdi. Zeynep Gül AYTAŞ orta derecede İngilizce bilmektedir.

### İletişim Bilgileri

Öğrenci no :19211737

ORCID ID : 0000-0001-6883-2899

### Yayımlar:

- 1.
- 2.

### Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

- 1.
- 2.