

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT ASPERGILLUS NIGER KSİLANAZ
ÜRETİMİNİN YÜKSEK EKSPRESYON İÇİN OPTİMİZASYONU
VE KISMEN SAFLAŞTIRILMIŞ ENZİMİN
NİTELENDİRİLMESİ

CÜNEYT AKDENİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2019

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REKOMBİNANT ASPERGILLUS NIGER
KSİLANAZ ÜRETİMİNİN YÜKSEK
EKSPRESYON İÇİN OPTİMİZASYONU VE
KISMEN SAFLAŞTIRILMIŞ ENZİMİN
NİTELENDİRİLMESİ

CÜNEYT AKDENİZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK
II. TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SEVNUR MANDACI

GEBZE

2019

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**OPTIMIZATION OF RECOMBINANT
ASPERGILLUS NIGER XYLANASE
PRODUCTION FOR HIGH EXPRESSION
AND QUALIFICATION OF PARTIALLY
PURIFIED ENZYME**

CÜNEYT AKDENİZ
**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. DR. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK
II. THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. SEVNUR MANDACI

GEBZE
2019



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 26./06./2019 tarih ve 2019./29 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 8./10./2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Cüneyt AKDENİZ'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Dr.Öğr.Üyesi Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK

ÜYE

: Prof.Dr.Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Dr.Öğr.Üyesi Mustafa YAMAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

Ksilanaz enzimi farklı sektörlerdeki kullanımının yanısıra ekmekçilik sektöründe de kullanılmaktadır. *A. niger* kendine has özellikleri ile diğer ksilanaz üreten mikroorganizmalardan daha yüksek düzeyde ksilanaz üretebilmektedir. Bu tez çalışmasında ksilanazB geninin homolog anlatımının yapıldığı rekombinant suşlar incelenmiş ve seçilmiş transformantlarda ksilanaz üretimi erlenlerde optimize edilmiştir. Çalışma kapsamında *A. niger* transformantlarından diğerlerine göre daha yüksek aktivite vermiş ksilanazB transformantları 5-1-5 ve 12-1-7 kullanılmış, transformantların sahip olduğu glaA promotorunun farklı şekerlerle indüklenmesi sonucu oluşan ksilanaz üretimi incelenmiştir. Rekombinant suşta glaA promotorunun indüklenmesinde optimum maltoz yüzdesi %0,4 olarak ortaya konmuştur. Optimum üretim ortamı olarak malt çimli besiortamı belirlenmiştir. Seçilen 12-1-7 transformantı malt çimli ortamda, diğer seçilen 5-1-5 transformantından daha etkili olmuştur. Fermantasyon kültürünün etkileri karşılaştırıldığında ise, ham süpernatantlarda elde edilen ksilanaz aktivitesi malt çimli statik erlen kültüründe 39 U/ml iken aynı ortamın katı kültüründe 81 U/ml olmuştur. Erleninde yapılan üretimde rekombinant enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 50 °C, optimum pH değerinin ise 6 olduğu saptanmıştır.

Ham enzimin kısmen saflaştırılması sonrasında iki farklı büyüklükte protein elde edilmiş, bunlar kısaca rE1 ve rE2 olarak adlandırılmıştır. 33,1 kDa büyüklükteki rE1'in 355,6 U/miligram ve 21,6 kDa büyüklükteki rE2'nin 472,6 U/miligram spesifik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Karakterizasyon adımlarında rE1 ve rE2'nin optimum sıcaklıklarının yakın ancak diğer özelliklerinin farklı olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus niger*, ksilanaz, homolog ekspresyon.

SUMMARY

The xylanase enzyme is used in the bakery sector as well as in other sectors. Recombinant strains where homologous expression of xylanaseB gene were examined and xylanase production in selected transformants were optimized in flasks. In this study, xylanase B transformants 5-1-5 and 12-1-7 which gave higher activity than *A. niger* transformants were used and xylanase production caused by the induction of glaA promoter with different sugars was examined. The optimum maltose percentage in inducing glaA promoter in the recombinant strain was 0.4 %. The malt grass medium was determined as the optimum production environment. The selected 12-1-7 transformant was more effective in malt grass than the other selected 5-1-5 transformant. When the effects of the fermentation culture were compared, the xylanase activity obtained in the crude supernatants was 39 U/ml in the malt grassed static flask culture and 81 U/ml in the solid culture of the same medium. It was determined that the temperature at which the recombinant enzyme showed optimum activity was 50 °C and the optimum pH value was 6 in the production made in the flask.

After partial purification of the crude enzyme, two different sized proteins were obtained, which are briefly referred to as rE1 and rE2. rE1 of 33.1 kDa has a specific activity of 355.6 U/milligram and rE2 of 21.6 kDa has a specific activity of 472.6 U/milligram. In the characterization steps, it was observed that the optimum temperatures of rE1 and rE2 were close but the other properties were different.

Keywords: *A.niger*, xylanase, homologous expression.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tecrübesi ve yaşanan olumsuzluklarda çözüm yollarıyla yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma için laboratuvarını açarak bize her türlü kolaylığı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Sevnur MANDACI'ya teşekkür ederim.

Laboratuvarda birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum çalışma arkadaşlarım (Kübra BAYRAK ve Büşra GÜMÜŞ) ile bilgi ve tecrübeleriyle her daim yanımda olan değerli hocalarıma (Ceyda PEMBECİ KODOLBAŞ, Levent YASİN KURT, Dr. Dilek COŞKUNER ÖZTÜRK, Nurçin ÇELİK ÖZTÜRK, Emrah VARDAR) desteklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak sadece bu çalışma boyunca değil bütün yaşamım boyunca yanımda olup beni koşulsuz destekleyen aileme (Ayşegül AKDENİZ, Mesut AKDENİZ, Cengiz AKDENİZ) ve hayat arkadaşım Kübra TUTKUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışma ARDEB 1003 destekli, 115O052 proje numarasıyla (alt proje numara:115O053) Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ (GENEL BİLGİLER)	4
2.1. Enzimler	4
2.2. Ksilan	4
2.3. Ksilanaz	5
2.4. <i>Aspergillus niger</i>	8
2.5. Glukoamilaz(glaA) Promotoru	8
2.6. Statik Kültür Fermantasyonu	10
2.7. Katı Kültür Fermantasyonu	10
2.8. Jel Filtrasyon Kromatografi	11
2.9. İyon Değişim Kromatografi	11
2.10. Elektroforez Uygulamaları	12
2.11. Ekmek Yapımı ve Ksilanaz	12
3. MATERYAL VE METOD	14
3.1. Materyaller	14
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar	14
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	15
3.1.3. Kullanılan Kitler	16
3.1.4. Kullanılan Besiyerleri	17
3.1.4.1. Sentetik Besiyortamı (CM, kompleks medyum)	17
3.1.4.2. Levasseur Besiyortamı	17
3.1.4.3. Melaslı Besiyortamı	18

3.1.4.4. Malt Çimli Besiortamı	19
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler	20
3.1.5.1. Ksilanaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	20
3.1.5.2. SDS Page, Zimogram, Gümüş Boyama Jellerinde Kullanılan Çözeltiler	21
3.1.5.3. Karakterizasyon Çözeltileri	22
3.1.5.4. Protein Tayini Kimyasallar	23
3.1.5.5. Kriyo Sıvı Çözeltisi	23
3.1.5.6. Küf Büyüme Ortamı PDA (Potato Dextrose Agar)	23
3.1.5.7. Birincil Tarama Ortamı	24
3.1.5.8. Kalitatif (Görsel) Aktivite Testi Ortamı	24
3.1.5.9. Kullanılan Suşlar	24
3.2. Metodlar	25
3.2.1. KsilanazB Geni Varlığının PCR İle Gösterimi	25
3.2.1.1. Aday Transformantlarda KsilanazB'nin PCR İle Kontrolü	25
3.2.1.2. Agaroz Jel Elektroforez	27
3.2.2. Transformantların Saklanması ve -80 °C'den Küf Sporu Canlandırma	27
3.2.3. <i>A.niger</i> Transformantlarında Birincil Tarama	28
3.2.4. İkincil Tarama	28
3.2.4.1. <i>A.niger</i> N593'te Ksilanaz Üretimi	28
3.2.4.1.1. Ksilanaz Aktivite Tayin Metodu	29
3.2.4.1.2. Ksiloz Kalibrasyon Grafiği Oluşturulması	30
3.2.4.2. <i>A.niger</i> Transformantlarının Ksilanaz Üretimi	32
3.2.4.3. Yüksek Aktivite Veren <i>A.niger</i> Transformantlarında İkinci Ksilanaz Üretimi	32
3.2.4.4. Küf Yaşının Enzim Üretimine Etkisinin İncelenmesi	33
3.2.4.5. Enzim Üretiminde Optimum Maltoz Miktarının Belirlenmesi	33
3.2.4.6. Enzim Üretiminde Farklı Şekerlerin Etkisinin İncelenmesi	33
3.2.5. Enzim Üretiminde Besiortamı Optimizasyonu	34

3.2.5.1. Levasseur Besiortamında Ksilanaz Üretimi	34
3.2.5.2. Melaslı Besiortamında Ksilanaz Üretimi	34
3.2.5.3. Malt Çimli Besiortamında Ksilanaz Üretimi	35
3.2.5.4. Malt Çimli Statik Kültür Ortamında Ksilanaz Üretimi	36
3.2.5.4.1. Malt Çimli Statik Kültürde Optimum Maltoz Yüzdesinin Belirlenmesi	37
3.2.5.5. Malt Çimli Katı Kültür Ortamında Ksilanaz Üretimi	37
3.2.5.6. Malt Çimli Kültür Enzimlerinin Liyofilize Edilmesi	39
3.2.6. Rekombinant Küften Ksilanaz Saflaştırılmasına Yönelik Çalışmalar	39
3.2.6.1. Amonyum Sülfat ve Etanol Çöktürmeleri	39
3.2.6.1.1. Bradford Metodu İle Protein Tayini	40
3.2.6.2. Ultrafiltrasyon İle Süpernatantın Konsantrasyonu	41
3.2.6.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi	42
3.2.6.3.1. SDS-PAGE	42
3.2.6.3.2. Zimogram	43
3.2.6.3.3. Gümüş Boyama	43
3.2.6.4. HiTrap DEAE Sepharose FF Kromatografisi	44
3.2.6.5. Diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-selüloz) Kromatografisi	44
3.2.6.6. HiScreen Capto DEAE Kromatografisi	45
3.2.6.7. Ham 12-1-7'den Saflaştırılmış rE1 ve rE2'nin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi	47
3.2.7. Rekombinant Ksilanazın Biyokimyasal Analizleri	47
3.2.7.1. Ham Rekombinant Ksilanazın Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	47
3.2.7.2. Ham Rekombinant Ksilanazın Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	47
3.2.7.3. Ham Rekombinant Ksilanazın Termal Stabilitésinin Belirlenmesi	48
3.2.7.4. Ham Rekombinant Ksilanazın pH Kararlılığının Belirlenmesi	48
3.2.7.5. Ham Rekombinant Ksilanazın Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi	48

3.2.7.6. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1)	
Optimum pH Değerinin Belirlenmesi	49
3.2.7.7. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1)	
Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi	49
3.2.7.8. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1)	
Termal Stabilitesinin Belirlenmesi	49
3.2.7.9. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1)	
pH Kararlılığının Belirlenmesi	50
3.2.7.10. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1)	
Substrat Stabilitesinin Belirlenmesi	50
4. BULGULAR	51
4.1. Aday Transformantların PCR Sonuçları	51
4.2. Birincil Tarama Sonuçları	52
4.3. <i>A.niger</i> N593'te Ksilanaz Aktivitesi Sonuçları	54
4.4. <i>A.niger</i> Transformantlarında Ksilanaz Aktivite Sonuçları	55
4.5. Seçilen <i>A.niger</i> Transformantlarında İkinci Ksilanaz Aktivite Sonuçları	57
4.6. Enzim Üretiminde Küf Yaşına Bağlı Aktivite Sonuçları	59
4.7. Enzim Üretiminde Maltoz Miktarına Bağlı Aktivite Sonuçları	59
4.8. Enzim Üretiminde Farklı Şekerlere Bağlı Ksilanaz Aktivite Sonuçları	61
4.9. Enzim Üretiminde Besiortamı Optimizasyonu	61
4.9.1. Levasseur Besiortamı Aktivite Sonuçları	62
4.9.2. Melash Besiortamı Aktivite Sonuçları	62
4.9.3. Malt Çimli Çalkalamalı Kültür Aktivite Sonuçları	63
4.9.4. Malt Çimli Statik Kültür Aktivite Sonuçları	64
4.9.4.1. Malt Çimli Statik Kültürde Optimum Maltoz Yüzdesinin Belirlenmesi	65
4.9.5. Malt Çimli Katı Kültür Aktivite Sonuçları	66
4.10. Malt Çimli Kültür Enzimlerinin Liyofilizasyon Sonuçları	66
4.11. Saflaştırma ve Karakterizasyon Sonuçları	67
4.11.1. Amonyum Sülfat ve Etanol Çöktürmeleri Sonucu	67
4.11.2. Ultrafiltrasyon Sonucu	67
4.11.3. Jel Fitrasyon Kromatografisi Sonucu	68

4.11.4. HiTrap DEAE Sepharose FF Kromatografi Sonucu	70
4.11.5. Diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-selüloz)	
Kromatografi Sonucu	71
4.11.6. HiScreen Capto DEAE Kromatografi Sonuçları	73
4.11.7. Ham 12-1-7'den Saflaştırılmış rE1 ve rE2'nin	
Moleküler Ağırlıkları	77
4.11.8. Rekombinant Ksilanazın Biyokimyasal Analizleri	78
4.11.8.1. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin	
Optimum pH Sonuçları	78
4.11.8.2. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin	
Optimum Sıcaklık Sonuçları	79
4.11.8.3. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin	
Termal Stabilite Sonuçları	81
4.11.8.4. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin	
pH Kararlılığı Sonuçları	81
4.11.8.5. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin	
Substrat Özgüllüğü Sonuçları	83
4.11.8.6. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant	
Ksilanaz Enziminin Optimum pH Sonuçları	83
4.11.8.7. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant	
Ksilanaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları	85
4.11.8.8. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant	
Ksilanaz Enziminin Termal Stabilite Sonuçları	86
4.11.8.9. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant	
Ksilanaz Enziminin pH Kararlılığı Sonuçları	87
4.11.8.10. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant	
Ksilanaz Enziminin Substrat Spesifite Sonuçları	88
5. SONUÇ	90
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Açıklamalar

Kısaltmalar

∞	: Sonsuz işareti
ARDEB	: Araştırma Destek Programları Başkanlığı
CM	: Kompleks medyum
EDTA	: N', N', N', N'-Tetrametiletilediamin
HCl	: Hidroklorik asit
kDa	: Kilodalton
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum hidrojen fosfat
L	: Litre
Mg	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	: Dakika başına dönüş
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
sn	: Saniye
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TE	: Tris-EDTA Tamponu
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
μ l	: Mikrolitre
U	: Ünite

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Ksilanı tam hidrolize eden ksilanotik enzimlerin etki bölgeleri.	6
2.2: glaA promotoru kontrolünde UNENksilanazB geni ve pGWf vektörünün pyrA bölgesi.	9
3.1: Ksiloz standart eğri grafiği.	32
3.2: Rekombinant küf transformantlarıyla erlen kültür çalışmaları.	34
3.3: Liyofilize edilmiş ham preparat.	35
3.4: Statik kültür ortamı.	36
3.5: Katı kültür ortamında gerçekleştirilen işlemler.	38
3.6: BSA kalibrasyon grafiği.	41
3.7: Ultrafiltrasyon işlemi.	42
3.8: Kramatografide kullanılan sistem.	45
4.1: PCR analiz sonucu.	51
4.2: Fungal transformantların birincil tarama petri görüntüleri.	54
4.3: Alıcı <i>A. niger</i> N593'te ölçülen ksilanaz aktivitesi (U/ml).	54
4.4: Sentetik besiortamında üretim sonrası erlen görüntüleri.	57
4.5: Seçilen UNENxynB1 transformantları ikinci ksilanaz aktiviteleri.	58
4.6: Seçilen UNENxynB2 transformantları ikinci ksilanaz aktiviteleri.	58
4.7: Küf yaşına bağlı ksilanaz aktiviteleri.	59
4.8: 5-1-5 transformantında optimum maltoz miktarının belirlenmesi.	60
4.9: 12-1-7 transformantında optimum maltoz miktarının belirlenmesi.	60
4.10: Enzim aktivitesine bağlı renk değişimi.	63
4.11: 12-1-7 malt çimli statik kültürde günlere bağlı aktivite değişimi.	65
4.12: Jel filtrasyon kolonu fraksiyonlarının 280 nm'deki absorbansları.	68
4.13: Jel filtrasyon kolonu fraksiyonlarının ksilanaz aktiviteleri.	69
4.14: Jel filtrasyon kolonu fraksiyonlarının SDS Page ve zimogram görüntüsü.	69
4.15: HiTrap DEAE-FF kolonu fraksiyonlarının SDS Page görüntüsü.	71
4.16: DEAE-selüloz kolonu fraksiyonlarının 280 nm'deki absorbansları.	71
4.17: DEAE-selüloz kolonu fraksiyonlarının ksilanaz aktiviteleri.	72
4.18: DEAE-selüloz kolonu fraksiyonlarının SDS Page görüntüsü.	72

4.19:	HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 1. SDS Page görüntüsü.	74
4.20:	HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 2. SDS Page görüntüsü.	74
4.21:	HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 3. SDS Page görüntüsü.	75
4.22:	HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 4. SDS Page görüntüsü.	76
4.23:	12-1-7 rE1'in moleküler ağırlığı.	77
4.24:	12-1-7 rE2'nin moleküler ağırlığı.	77
4.25:	12-1-7 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum pH profili.	78
4.26:	5-1-5 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum pH profili.	79
4.27:	12-1-7 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum sıcaklık profili.	80
4.28:	5-1-5 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum sıcaklık profili.	81
4.29:	Kısmi saf (rE2) ksilanazın optimum pH profili.	84
4.30:	Saf (rE1) ksilanazın optimum pH profili.	84
4.31:	Kısmi saf (rE2) ksilanazın optimum sıcaklık profili.	85
4.32:	Saf (rE1) ksilanazın optimum sıcaklık profili.	85

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Kullanılan kimyasallar.	14
3.2: Kullanılan cihazlar.	16
3.3: Sentetik besiortamı içeriği.	17
3.4: Levasseur besiortamı içeriği.	18
3.5: Melaslı besiortamı içeriği.	19
3.6: Malt çimli besiortamı içeriği.	20
3.7: SDS jel içeriği.	22
3.8: <i>A.niger</i> aday klonları için PCR koşulları.	27
3.9: Ksiloz kalibrasyon grafiği için gerekli hacimler.	31
3.10: Ksiloz kalibrasyon eğrisinde çözelti konsantrasyonları ve OD ₅₂₀ değerleri.	31
3.11: BSA protein standartlarının hazırlanmasında uygulanan miktarlar.	40
3.12: BSA protein standartları ile elde edilen absorbans değerleri.	41
4.1: Aday transformantların PCR ve birincil tarama sonuçları.	53
4.2: <i>A.niger xynB1</i> transformantlarında indüklemeye bağlı aktivite.	55
4.3: <i>A.niger xynB2</i> transformantlarında indüklemeye bağlı aktivite.	56
4.4: Küf transformantların farklı şekerlere bağlı ksilanaz aktivitesi.	61
4.5: Levasseur besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi.	62
4.6: Melaslı besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi.	62
4.7: Malt çimli çalkalamalı besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi.	64
4.8: Malt çimli statik besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi.	64
4.9: Malt çimli statik kültürde maltoza bağlı değişen ksilanaz aktivitesi.	65
4.10: Malt çimli katı kültürde günlere bağlı değişen ksilanaz aktivitesi.	66
4.11: Amonyum sülfat ve etanol çöktürmesi saflaştırma tablosu.	67
4.12: Ultrafiltrasyon saflaştırma tablosu.	68
4.13: Jel filtrasyon kolonu saflaştırma tablosu.	70
4.14: HiTrap DEAE Sepharose FF kolon fraksiyonları aktivite tablosu.	70
4.15: DEAE-selüloz kolonu saflaştırma tablosu.	73
4.16: HiScreen Capto DEAE 1. kolon saflaştırma tablosu.	75
4.17: HiScreen Capto DEAE 2. kolon saflaştırma tablosu.	76

4.18:	Ham rekombinant 12-1-7'nin farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.	81
4.19:	Ham rekombinant 5-1-5'in farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.	81
4.20:	Ham rekombinant 12-1-7'nin farklı pH'lardaki kararlılığı.	82
4.21:	Ham rekombinant 5-1-5'in farklı pH'lardaki kararlılığı.	82
4.22:	Ham rekombinant 12-1-7'nin farklı substratlara özgü aktivitesi.	83
4.23:	Ham rekombinant 5-1-5'in farklı substratlara özgü aktivitesi.	83
4.24:	Kısmi saf (rE2) ksilanazın farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.	86
4.25:	Saf (rE1) ksilanazın farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.	86
4.26:	Kısmi saf (rE2) ksilanazın farklı pH'lardaki kararlılığı.	87
4.27:	Saf (rE1) ksilanazın farklı pH'lardaki kararlılığı.	88
4.28:	Kısmi saf (rE2) ksilanazın farklı substratlara özgü aktivitesi.	88
4.29:	Saf (rE1) ksilanazın farklı substratlara özgü aktivitesi.	89

1. GİRİŞ

Enzim sektörünün önemi ülkeler için yadsınamayacak düzeydedir. Ülkelerin kendi enzimlerini kendi öz kaynakları ile üretmeleri önemli bir gerekliliktir; çünkü sektörün büyüklüğü göz önüne alındığında ithal edilen enzimler ekonomiler için büyük bir külfettir. Tarım ülkesi olmamız gerekliliği göz önüne alındığında tarımsal atıkların geri dönüşümü konusu da önemli bir çevresel sorundur. Bu tarımsal sanayi atıklarının güvenli olarak yeniden kullanılabilmesi, enzim üretiminde hammadde kaynağı olabilmesi hem çevre hem de ekonomi için önemli bir katkı getirmektedir [Jaybhave et al., 2016] [Kanimozhi et al., 2014].

Ülkemiz insanının en önemli besin kaynaklarından biri ekmektir [Özberk vd., 2016]. Ksilanaz enziminin farklı alanlardaki ihtiyacının yanı sıra ekmekçilik sektörü özelinde ekmek yapımında kullanılması, öneminin büyüklüğünü göstermektedir. Bu çalışmanın yer aldığı UN-EN (Unlu Mamuller Sektörüne Yönelik Endüstriyel Enzime Ait Ekonomik Üretim Sistemlerinin Geliştirilmesi/İyileştirilmesi) projesinin ilk aşamasında homolog rekombinasyon teknikleriyle *Aspergillus niger* transformantları elde edilmişti. Bu tez kapsamında ise eldeki transformantların taranması, düşük maliyet ve yüksek fayda ile ksilanaz enzim üretimine yönelik üretim basamaklarında optimizasyon ve enzimin bazı biyokimyasal özelliklerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Teze temel olan çalışmalar kapsamında yapılanlar aşağıda özetlenmiştir [Bayrak, 2019]:

115O052 numaralı UN-EN projesinin Alt Projesi (Proje numara:115O053) kapsamında TÜBİTAK MAM küf koleksiyonu taranarak ksilanaz üreticisi olduğu belirlenen suşlar elde edilmiştir. Moleküler tiplendirmeler yapılarak (18S rRNA gen ve ITS bölgelerine yönelik) bu suşların *A. niger* olduğu kesinleşmiş ve ksilanaz salgıladıkları belirlenmiştir. Seçilen suşlardan 5 ve 12'nin genomik DNA'ları kullanılıp ksilanazB (GH11 ksilanaz aile grubunda yer almaktadır) geni in vitro çoğaltılmış ve DNA dizileri okunmuştur. 5 no'lu suş MRC200804 için 18S rRNA'ya

ait 820 bp'lık ve ITS bölgesine ait 831 bp'lık DNA dizileri elde edilmiş ve NCBI'a kaydedilmiştir (Genbank MF078658 ve MF078659). Benzer şekilde 12 no'lu suş MRC200803 için de 18S rRNA'sına ait 824 bp ve ITS bölgesine ait 598 bp uzunluktaki DNA dizileri netleştirilerek NCBI'a kaydedilmiştir (Genbank MF078660 ve MF078661). Böylece ksilanaz salgılayan 5 ve 12 no'lu doğal *Aspergillus niger* MRC200803 ve MRC200804 suşlarının moleküler tiplmesi tamamlanmıştır. Belirlenen bu genlerin daha kolay işlev göstereceği plazmitlere aktarmak amacıyla ilk olarak RNA'ları elde edilmiş, bu RNA'lar cDNA'ya çevrilmiş, cDNA da plazmite aktarılıp dizilenmiştir. Plazmitlerdeki ksilanazB varlığı PCR ile doğrulanmıştır. Ardından ksilanazB için ekspresyon plazmidi oluşturulmuş ve oluşturulan rekombinant plazmid önce *E.coli* DH5 α 'a daha sonra da fungusa aktarılmıştır. KsilanazB'nin ilgili plazmid DNA'dan, restriksiyon endonükleaz bölgelerinden kesilerek genin anlatımı yapılacak olan pGWf fungal vektör ile birleştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. KsilanazB'nin homolog ekspresyon amaçlı fungal vektöre aktarılması yönelimli klonlama ile planlanmıştır. Bu doğrultuda hem vektör hem de UNEN ksilanazB insörtü PacI ve NotI bölgesinden kesilerek ligasyon kurulmuştur. Bunun için pGWf vektörü ATK593 kiti ile temin edilmiştir. pGW635 kökenli fungal ekspresyon ve sekresyon vektörüdür. *A. niger* pyrA geni, gen anlatımı sağlayacak glukoamilaz promotörü ve insersiyon yapılabilecek tek noktada kesen PacI ve NotI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulundurur. Yönelimli klonlamaya uygun, komplementer olmayan yapışkan uçlar kesim sonrası elde edilebilmekte ve gen doğru oryantasyonda vektörle birleşmektedir. Plazmitte DNA dizileri ile ksilanazB insersiyonu tanımlanmıştır. Böylece fungal vektörde glaA promotörü kontrolünde ksilanazB1 ve ksilanazB2 protein okuma bölgesi içeren, kanamisinli ortamda seçilen transformantlar elde edilmiştir. Oluşturulan rekombinant ekspresyon plazmidleri sırasıyla pAExynB1, pAExynB2 olarak adlandırılmıştır. DNA dizilemesi ile ksilanazB insertlerinin dizileri teyit edilmiş böylece hedef ksilanaz (ksilanazB) pGW635 derivatif fungal ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Son olarak UNEN ksilanazB'nin ekspresyon plazmidi ile fungal transformasyonu için pyrA dizisi içermeyen *A. niger* N593 suşu temin edilmiştir (ATK593, Karasugen). *A. niger* N593'ün transformasyonunda PEG yöntemi uygulanmış ve *A.niger* N593'de transformantlar elde edilmiştir. Böylece glaA promotörü kontrolünde ksilanazB1 ve ksilanazB2 protein okuma bölgesi içeren, üridinsiz ortamda seçilebilen transformantlar elde edilmiştir. rAB1 kodlu transformant: rAB1 suşu, pAEXynB1 plazmidinin *Aspergillus*

niger N593'e transformasyonundan elde edilmiştir. Benzer şekilde rAB2 kodlu transformant olan rAB2 suşu, pAEXynB2 plasmidinin *Aspergillus niger* N593'e transformasyonundan elde edilmiştir.

UNEN Projesi ARDEB 1003 destekli 115O052 (alt proje numarası 115O053) özelinde çalışılan ksilanaz geninin homolog olarak anlatımından üretilen ksilanazın karakterizasyonu tez kapsamında planlanmıştır. Bu plan doğrultusunda:

- Rekombinant genin homolog sistemde anlatımı laboratuvar ölçekli erlenlerde farklı koşullarda üretilmiş,
- Kontrollü üretim ve verim parametreleri belirlenmiş,
- Rekombinant enzimin belirli özellikleri ortaya konmuştur.

Tez çalışmaları sonunda elde edilecek veriler yeni ulusal biyoteknolojik ürünlere ışık tutmuş olacaktır. Özellikle fungusların üretici organizma olarak seçildiği ksilanaz gibi hidrolazlar grubu enzimlerin üretim süreçlerinde optimizasyon yapılarak, maksimum verimin sağlanacağı koşullar belirlenmiş olacaktır. Elde edilen bilgiler ksilanazın pilot ölçekte üretimi için temel teşkil edecektir.

2.KAYNAK ÖZETLERİ (GENEL BİLGİLER)

2.1. Enzimler

Enzimler protein yapısında olup, hücrelerde biyokimyasal reaksiyonlarda rol alırlar. Bu reaksiyonlarda tepkime hızını arttırarak, kimyasal yapıları değişmeden tepkimeden çıkarlar. Enzimler farklı çalışma koşullarında (sıcaklık, pH vs.) maksimum aktiviteyi verirler. Bu koşullar farklı enzimler için farklı değerlere sahip olabilmektedir [Kıran vd., 2006]. Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilen enzimlerin kullanım alanı geniştir. Enzim üretiminde mikroorganizmalar genetik düzenlemelere uygunluğu, hızlı büyümeleri, yüksek aktivite vermeleri, yaşadıkları ortamın kolay kontrolü ve ekonomik olmaları nedenleriyle tercih sebebidir [Kıran vd., 2006] [Rao et al., 1998] Enzim sektörünün hacmi, hem enzimlerin hem de enzimleri kullanan üretim kollarının çeşitliliği nedeniyle günden güne büyümektedir. Bu nedenle enzim üretimi özelinde rekombinant enzim üretimi oldukça önemlidir.

Rekombinant DNA, canlının kendi yapısında bulunmayan DNA moleküllerinin genetik mühendislik teknikleriyle düzenlenerek, farklı parçaların bir araya getirilmesiyle oluşturulur. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişimiyle ksilanotik enzimler de endüstriyel uygulamalar için daha kolay seçilmiştir [Beg et al., 2017]. Bu süreçte karşılaşılan temel zorluklar selüloitik enzim içermeyen ksilanlı sistemlerin üretimi ve ksilan içeren genlerin önemli endüstriyel organizmalarda fermentasyon koşullarının belirlenmesi olmuştur [Ahmed et al., 2009]. Fungal bir suştan enzimi saf olarak elde etmenin zorluğu da rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla aşmaya başlanmıştır [Korona et al., 2006]. Enzimi daha fazla üretmek ve ticari kullanımlara uyacak şekilde sahip olduğu özellikleri değiştirebilmek amacıyla, ksilanaz kodlayan genler homolog ve heterolog konaklara klonlanmıştır [Aslam et al., 2009].

2.2. Ksilan

Hemiselüloz, lignoselülozik polimerler arasında selülozdan sonra gelen yenilenebilir bir biyomateryaldir [Paës et al., 2012]. Ksilan bitki hücre duvarlarında

hemiselüloz yapı içinde yer alan, hemiselülozun başlıca bileşeni olan bir polisakkarittir [Ruanglek et al., 2007].

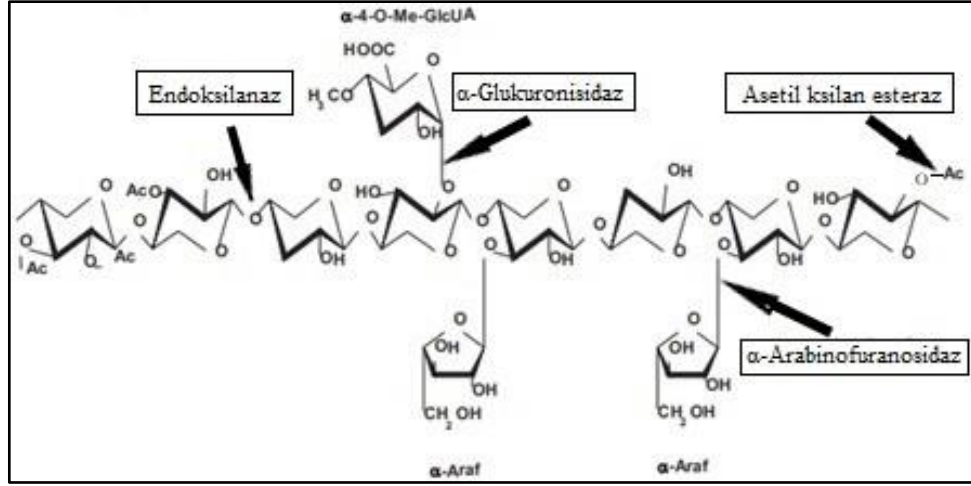
Ksilanlar düz ya da dallanmış şekilde bulunur, alkali ortamlarda çözünebilirler. Bazı asitler karşısında kolayca hidrolize olurlar ve sulu çözeltileri alkolle çöktürülebilir [Uffen, 1997]. Ksiloz şekerleri β -1,4-glukozidik bağlarla bağlanarak kompleks bir yapı olan ksilanı oluşturur. Endo- β -1,4 ksilanaz enzimi β -ksilozidik bağları kopararak D-ksiloz parçalarını oluşturur [Paës et al., 2012].

Ksilan tahıl tanelerinin lifli içeriğinde bulunur. Bununla beraber arabinoksilanlar buğday, arpa, çavdar, pirinç, yulafta tanımlanmıştır [Izydorczyk et al., 1995]. Bu tahılların ekmek yapımında kullanımı ksilanaz enziminin ekmekçilik sektöründe kullanımını önemli hale getirmektedir.

2.3. Ksilanaz

Ksilanaz, hemiselülozun ana bileşeni olan ksilanın hidrolizini katalizler. Böylece hücre yaşamsal faaliyetleri için gerekli karbon kaynağı sağlanır ve bitki hücre duvarı yıkılır [Collins et al., 2005]. Çok çeşitli organizmalar tarafından ksilanaz üretilmektedir. Bununla birlikte filamentöz mantarların (*A.niger*) ürettiği ksilanazın miktarı, hücrenin bozulması gerçekleşmeden ksilanazı ortama doğrudan salgıladığı için, bakterilerde, mayalarda ve aktinomisetlerde bulunanlardan çok daha yüksektir [Singh et al., 2019] [Paës et al., 2012] [Fleiner et al., 2010].

Ksilanın kompleks bir yapısı olduğundan ksiloza dönüşümünü ortak çalışabilen farklı enzim grupları sağlamaktadır [Motta et al., 2016] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Ksilanı tam hidrolize eden ksilanotik enzimlerin etki bölgeleri.

Bu gruba oluşturan enzimlerin tamamı ksilanolitik enzimleri oluşturur ve bunlar aşağıda sınıflandırılmıştır [Singh et al., 2019] [Collins et al., 2005]:

- Ksilan iskeletindeki iç glikozid bağları rastgele kıran β -1,4-Endoksilanazlar (E.C.3.2.1.8, β -1,4-D-ksilanazlar) [Polizeli et al., 2005].
- Ksilooligosakkaritleri indirgen olmayan uçlarından kıran β -D-ksilosidazlar (E.C.3.2.1.37, β -1,4-D-ksilozid ksilohidrolazlar) [Zanoelo et al., 2004].
- Arabinaz ikiye ayrılır: ksilandaki dallanmış arabinanları parçalayan ekzo- α -L-arabinofuranosidaz (E.C.3.2.1.55) ve sadece lineer arabinanları hidroliz eden endo-1,5- α -L-arabinaz (E.C.3.2.1.99) [Kaneko et al., 1993] [Vries et al., 2000].
- Asetil gruplarını uzaklaştırarak endoksilanazların etkinlik göstermesini sağlayan asetil-ksilan esterazlar (E.C.3.1.1.6) [Polizeli et al., 2005].
- Ksiloz gruplarından glukuronik asit yan zincirlerini ayıran α -D-glukuronidazlar (E.C.3.2.1.139).
- Arabinoz ve ferulik asit arasındaki bağı parçalayan ferulik asit esterazlar (E.C. 3.1.1) ve arabinoz ve p-kumarik asit arasındaki bağı parçalayan p-kumarik asit esterazlar (E.C. 3.1.1) [Williamson et al., 1998] [Crepin et al., 2004].
- Ekzo- β -1,4-ksilanazlar (α -1,4-D-ksilan ksilohidrolazlar).

Ksilanaz enziminin çeşitli özellikleri bulunmaktadır [İnce, 2006]:

- Hidrolik aktiviteden sorumlu katalitik bölgeleri ve substrat bağlamayla termal stabiliteden sorumlu katalitik etkisi olmayan bölümleri vardır.
- Ksilanazlar aminoasit dizileri homolojisi ve hidrofobik küme analizlerine göre iki ana aileye ayrılır: Aile F üyesi (GH10) ksilanazlar yüksek bir molekül ağırlığa (>30kDa) ve asidik pI'ya, Aile G grubu (GH11) ksilanazlarsa düşük molekül ağırlığa (<30kDa) ve bazik pI'ya sahiptir. Aile grupları özelleştikçe bu özellikler değişebilmektedir [Paës et al., 2012] [Ahmed et al., 2009] [Singh et al., 2019].
- Termostabil ksilanazlar içinde GH11 ksilanazları GH10 ksilanazlarına göre çözünmeyen polimerik ksilanazlar üzerinde çok daha aktiftir. Ek olarak daha fazla arabinoksilanı hidroliz edebilirler [Beaugrand et al., 2004].
- Genellikle fungal ksilanazlar asidik pH'da (4-6), bakteri ve aktinomiset ksilanazları daha geniş pH aralığında (5-9) aktif olmaktadır [Singh et al., 2019].
- Endoksilanazların elde edildiği kaynağa göre pI aralığı (3-10) arasında değişmektedir.
- Ksilanazın optimum sıcaklık değeri 35-60 °C gibi çok geniş bir aralıkta görülür. İstisna durumlarda optimum sıcaklığı 70-90 °C olan ksilanazlar da bulunmaktadır [Singh et al., 2019].
- GH11 ailesi ksilanazları unlu mamul sektörüne uygun ksilanazlardır. [Beaugrand et al., 2004] [Paës et al., 2012] [Decelle et al., 2004].
- Fungal ksilanazlar bakteriyal ksilanazlardan daha düşük ısı dirence sahiptir.
- Ksilooligosakkaritlerin zincir uzunluğu ksilanaz aktifliğini değiştirebilir, kısa zincirli olanlarda ksilanaz aktivitesi de azalır.
- Endüstride çok geniş bir kullanım alanına sahiptir: kağıt hamuru hazırlanırken beyazlaştırıcı olarak kullanılan klor miktarını azaltır, et tavuklarında yemden daha yüksek bir fayda sağlayarak kilo artışı sağlar, meyve suyu berraklaştırmada selüloz ve pektinaz ile beraber kullanılır, çeşitli enzimlerle birlikte biyoyakıt üretimi için kullanılabilir, gıda sektöründe hamur işleme özelliğini iyileştirerek ürün kalitesini artırır [Singh et al., 2019] [Motta et al., 2016] [Butt et al., 2008] [Kıran vd., 2006].

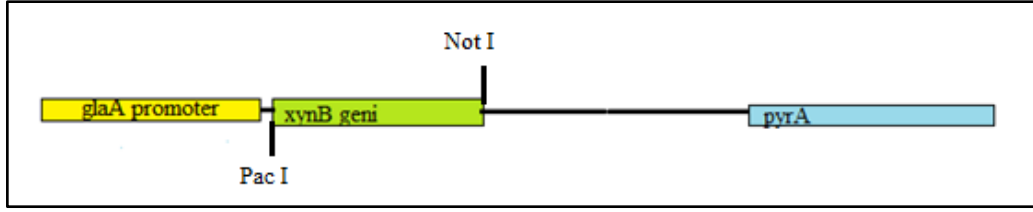
2.4. *Aspergillus niger*

*Aspergillus*lar doğada çok geniş yayılma alanlarına sahip olup, 185'in üzerinde tür içeren küf mantarlarıdır [Borsa et al., 2015]. Özellikle toprakta ve çürümekte olan organik maddeler üzerinde aktiflik gösterirler [Schuster et al., 2002].

*Aspergillus*ların diğer mikroorganizmalardan bir farkı da çok düşük nemli alanlarda yaşayabilmeleridir. *Aspergillus* ticari ksilanaz üretimi için tercih edilen bir konakçıdır. Ksilanazı daha çok üretmek ve endüstriyel anlamda geliştirebilmek için küf kökenli genlerin klonlanıp çalışması sağlanmaktadır. Fungal ksilanazlara ait genlerin homolog ve heterolog sistemlere aktarılmasıyla elde edilen rekombinant ksilanazlar endüstriyel üretim için önemlidir [Ahmed et al., 2009] [Izidoro et al., 2014]. Bir *Aspergillus* türü olan *A.niger* ise yüksek sıcaklıklara direnç gösterebilme, geniş bir pH aralığında stabil olma ve ksilanazB'de bulunan yüksek substrat özgüllüğü ile rekombinant enzim üretiminde kullanılan güçlü bir mikroorganizmadır [Ahmed et al., 2009]. *A.niger* protein salgılanma ve modifikasyon yetenekleriyle *E.coli* ve *Pichia pastoris*'e göre daha yüksek etkinlik sergilemektedir [An et al., 2019]. Bu özelliklerine rağmen, *A.niger*'in metabolik aktivite ve enzim üretimi çevre koşullarına karşı (pH, kültür zamanı, sıcaklık, inokulasyon oranı, substrat, kültür etme şekli) oldukça hassastır, bu nedenle enzim üretiminde yapılacak optimizasyon çalışmaları önemli hale gelmektedir [Simoës et al., 2016] [Lu et al., 2010].

2.5. Glukoamilaz (*glaA*) Promotoru

pGW635 kökenli fungal ekspresyon ve sekresyon vektörüdür. *A.niger* *pyrA* geni, gen anlatım sağlayacak glukoamilaz (*glaA*) promotoru ve insersiyon yapılabilecek tek noktada kesen *PacI* ve *NotI* restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulundurulur. Yönelimli klonlamaya uygun, komplementer olmayan yapışkan uçlar kesim sonrası elde edilebilmekte ve gen doğru oryantasyonda vektörle birleşmektedir. Vektör *PacI* ve *NotI* ile kesilmiş, ligasyon ve transformasyon ile ksilanazB (*xynB*) geni alıcı suşa aktarılarak transformantlar elde edilmiştir [Bayrak, 2019]. Şekil 2.2'de *glaA* promotoru, ksilanazB geni ve *pyrA* bölgesi pGWf vektöründe gösterilmiştir.



Şekil 2.2: glaA promotoru kontrolünde UNENksilanazB geni ve pGWf vektörünün pyrA bölgesi.

Plazmid pGWf *A.niger* glukoamilaz (glaA) promotoru içermektedir ve maltoz varlığında indüklenerek gen ekspresyonunu sağlamaktadır [Tamayo Ramos et al., 2011]. pGW vektör sistemi aynı zamanda *A.niger* pyrA seleksiyon sistemi ile transformantların üridinsiz minimal ortamda gelişimini sağlamaktadır.

Glukoamilaz enzimi bir glikoproteindir ve nişastayı α -1,4 ve α -1,6 glikozidik bölgelerinden hidroliz eder. Diğer isimleri amiloglukosidaz ve I-amilaz'dır. Teknik ismi ise α -1,4 glukoz glikohidrolazdır. Glukoamilazın çoklu zincir mekanizması vardır ve substratı rastgele yerlerden kırar [James et al., 1997]. Mekanizma şu şekilde çalışır: D-glikosid bağı oksijeni, enzimin aktif bölgesi olan imidazol ya da amino grup tarafından gelen Hidrojen iyonu ile protonlanır. Yetersiz elektronlu karbon-1 grubu, hidroksil donor grubundan ya da serin grubundan elektron çeker. Karbon iyonlarının ortasından ve nötral D-glukozil fragmentten yapı açılır. Hidroksil iyonu karbonyum iyonun ortasına eklenir. Son adımda β -konfigürasyona hidroksil grup eklenir. Böylece hidrolizin β -D glukoz ürünü oluşmuş olur [James et al, 1997].

glaA ekspresyonu karbon seviyesine bağlı olarak polisakkarit degradasyonundan sorumlu [Ruijter et al., 1997] belirli yolaklarda çalışsa da, glaA promoter'ın kontrolünde olan proteinin sentezi tam olarak anlaşılamamıştır [Ganzlin et al., 2008]. Endüstride, *A.niger* üzerinde metod geliştirme ve optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Rekombinant tekniklerle modifikasyon özellikleri gelişmiş *A. niger*'de yüksek ekspresyon etkinliği sağlanarak glukoamilaz üretimi arttırılmıştır [An et al., 2019].

Glukoamilaz (glaA) promotorunun çalışmasında başta maltoz olmak üzere maltodekstrin, maltotrioz, amiloz, glukoz etkili olmaktadır [Ganzlin et al., 2008]. [Withers et al., 1998] [Gouka et al., 1996] [Fowler et al., 1990]. Bazı suşlarda maltozun glikozdan daha yüksek indüklemeye yaptığı [Barton et al., 1972] [Verdoes et al., 1994] bazı suşlarda ise farkın olmadığı belirtilmiştir.

Kültür etme şekline göre de promotor etkisi değişmektedir. Kemostat ve çalkalamalı erlen kültürde *A.niger* için maltoz glikoza göre yüksek bir indüklenme kaynağı olmuştur [Pedersen et al., 2000]. Promotor kontrolünde indükleyicilerin ve biyokütle çoğaltımında kullanılan karbon kaynaklarının karşılıklı etkileri göz önüne alındığında bir baskılama olmadığından da emin olunması gerekmektedir [Rajoka et al., 2005] [Fowler et al., 1990]. Glukoamilaz promotorunun baskılanma durumunda düşük miktarda şeker kullanılması gerektiğine dikkat çekilmekle beraber glukoamilazı kodlayan glaA geninin yüksek yüzdede maltoz ile indüklenerek transkripsiyonu da literatürde gösterilmiştir [Minetoki et al., 1995]. Promotor indükleyicisi olarak arabinoskan da bulunmaktadır [Munster et al., 2014].

Bir diğer *Aspergillus* türü *A.oryzae* ve *A.terrus*'de maltozun indükleyici, glikozun represe edici etkisi görülmüştür [Hata et al., 1992] [Ghosh et al., 1990].

2.6. Statik Kültür Fermantasyonu

Aspergillus niger şuşlarında katı kültür fermantasyonu yaygın olarak çalışılmakta olup, bazı durumlarda enzim üretiminin hareketsiz-statik şekilde olduğu fermantasyon kültürleri de çalışılmıştır [Heinen et al., 2018].

2.7. Katı Kültür Fermantasyonu

Aspergillus niger şuşlarında yaygın olarak katı kültür fermantasyonu çalışılmaktadır. Katı kültür ortamında serbest su bulunmaz, mikroorganizma gelişimini nemlendirilmiş katı haldeki substratlar üzerinden sağlar. Böylece organizma kendi doğal büyüme ortamına benzer ortamda gelişir, bu da diğer kültür etme şekillerine göre avantaj sağlamaktadır [Parameswaran et al., 2019]. Nem oranının düşük olması nedeniyle de fungusların kullanımı koşullara oldukça uygundur [Maciel et al., 2008]. Ucuz substrat kullanımı ve düşük kontaminasyon riski gibi avantajları da bulunmaktadır [Beg et al., 2017]. Bu kültürde agro-endüstriyel atıklar kullanılabilir, böylece zararlı maddeler biyolojik olarak parçalanır ve uygun alanlara yönelik enzim üretimleri gerçekleştirilir [Sargın, 2003] [Parameswaran et al., 2019].

2.8. Jel Filtrasyon Kromatografi

Molekül büyüklüklerine göre proteinleri ayırmada kullanılan bir tekniktir. Kolona yüklenen örneklerde farklı boyutlardaki proteinler bulunmakla beraber, kolon içeriğini çapraz bağlı kopolimerler oluşturmaktadır [Wilson et al., 2010] [Sweden et al., 2002]. Kullanılan gözenekli matris ile ürün molekül büyüklüğü ve şekline göre ayrılır.

Çalışma prensibi şu şekildedir: Örnek yüklemesi yapılmadan önce kolon materyali dengelenmelidir. Örnek yükleme sonrası kolon içinde ilerlemeye başlar, büyük moleküller jel materyalinin gözeneklerine giremez ve elüsyon sıvısı ile öncelikli olarak kolondan çıkarlar. Küçük moleküller gözenekler arasına girerek, hareketli faz arasında dağılırlar. Elüsyon sıvısı ile de arkadan gelirler. Böylece önce büyük moleküller, sonra küçük moleküller toplanır [Tuncer, 2008].

2.9. İyon Değişim Kromatografi

Nükleik asitler, proteinler, yüklü moleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan zıt yüklü iyonların birbirini tutmasıyla çalışan bir tekniktir. Katyon ve anyon değiştirici olmak üzere iki tip iyon değiştirici vardır. Negatif yüklü gruplara sahip katyon değiştiriciler pozitif yüklü katyonları çeker; anyon değiştiriciler ise pozitif yüklüdür ve negatif yüklü anyonları çeker. Negatif yükler asidik, pozitif yükler bazik gruplarla etkileşmektedir [Wilson et al., 2010].

Çalışma prensibi şu şekildedir: Ayrıştırma kolon materyalinde sağlanacağından, ortam pH ve iyonik kuvvet özellikleri ile dengelenmelidir. Dengeleme asidik ve bazik kimyasallara kolon materyalinin teması ile olur. İstenen pH'a getirilen kolona, kolon materyali ile aynı pH'a getirilen örnek yüklenir. Ayrıştırma aşamasında yüklü moleküller, klor ve sodyum gibi iyonlarla yer değiştirip kolon matrisine geçici olarak bağlanırlar. Bağlanmayan moleküller kolonda ilerlemeye devam eder ve kolondan önce ayrılırlar. Bağlanan yüklü moleküller ise elüsyon tamponun pH'sının değiştirilmesi ya da iyonik kuvvetin artırılmasıyla kolondan ayrılırlar. Bu da elüsyon sıvısındaki tuz oranının aşamalı olarak artırılmasıyla gerçekleştirilir [Tuncer, 2008].

2.10. Elektroforez Uygulamaları

Elektriksel alan uygulanan parçacıklar belirli yönlerde hareket ederler. Pek çok önemli biyolojik molekül (aminoasitler, peptitler, nükleik asitler, proteinler) farklı pH'daki çözeltilerde anyon ve katyon oluşturabilen yüklü gruplara sahiptir. Bu yüklü gruplar sahip oldukları net yük doğrultusunda, elektriksel alan altında anoda ya da katoda doğru giderler. İyonizasyon önemli olduğu için işlemler uygun bir tampon çözelti içinde gerçekleştirilir. pH değişikliği moleküllerin hareket hızını değiştireceğinden, hazırlık aşamasında dikkatli olunmalıdır [Wilson et al., 2010].

Elektroforezde akrilamid jel kullanılırsa bu poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) adını alır. Protein karışımlarının analizinde sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sıklıkla kullanılır. SDS ve Beta merkaptotanol proteinlerin disülfid bağlarını kırarak tersiyer protein yapısını denatüre eder. Böylece üç boyutlu yapılar negatif yüklü düz bir çubuk halini alır. Ortamdaki negatif yükler nedeniyle zincir proteinler katlanamaz. Yöntemde esas olan proteinleri büyüklük olarak göstermek olduğundan, saflaştırılmış proteinler jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılabilirler. Proteinlere bağlanan comassie mavisi ya da gümüş nitrat gibi boyalarla da görüntülenebilirler [Wilson et al., 2010].

2.11. Ekmek Yapımı ve Ksilanaz

Ekmek tüketim miktarı geleneksel insan yiyeceği kapsamında tüm dünyada her yıl artış göstermektedir [Cunha et al., 2018].

“Türkiye’de Ekmek ve Tahıl Ürünleri Pazarı araştırmasına göre, 2017 yılında 40 milyar liraya ulaşan pazarın, yıllık artış hızı azalsa da, 2021 yılında 42 milyar liraya ulaşması bekleniyor. Pazarın yüzde 75’ini ise ekmek tüketimi oluşturmaktadır.” [Web 1, 2018].

Fırıncılıkta ksilanaz kullanımı 1970’li yıllara dayanmaktadır, 1990 sonrasında ise kullanım oranı artmaya başlamıştır. Günümüzde de ksilanaz çeşitli enzimlerle birlikte ekmekte gerekli özelliklerin sağlanması için kullanılmaktadır. Bu sektörde kullanılan ksilanaz enzimi GH11 ksilanaz ailesinde yer almaktadır [Decelle et al.,

2004] [Liu et al., 2018]. Hemiselülozlar buğday ununda bulunur ve ekmek yapımında önemli role sahiptir. Hemiselüloz üyesi olan arabinoksilan da ksilanaz enziminin substratı olarak iş görür. Ekmeklik undaki arabinoksilan bileşikler kendi ağırlığının on katı kadar suyu bağlayabilir. İki çeşidi vardır: Suda çözünenleri viskozite üzerinde, suda çözünmeyenleri su tutma kapasitesi üzerinde etkilidir [Güner vd., 2008] [Altınel vd., 2018].

Ksilanaz, arabinoksilan zincirlerine nokta hedefi olmadan etki ederek polimer yapıyı ksiloz ve ksilobioz alt birimlere parçalar. Farklı mekanizmaları nedeniyle bütün ksilanaz tipleri ekmek yapımında kullanıma uygun değildir. Ekmek yapımında kullanılan ksilanazlar suda çözünmeyen arabinoksilanlar üzerine etkilidir. Ksilanaz enziminin seçimi ortamın pH ve sıcaklık değerleri ile ilişkili olarak sektörün belirlediği parametreler önemlidir [Güner vd., 2008].

Ekmekçilikte ksilanazlar hamurun yoğrulmasına, ekmek içi yumuşaklığına ve hamurun kabarma özelliklerine etki eder [Ahmad et al., 2014]. Tahıllardan gelebilecek doğal ksilanaz inhibitörleri ksilanazın etkisini göstermesini engelleyebilir [Courtin et al., 2002], bu durum daha fazla ksilanaz kullanılmasıyla çözülür [Altınel vd., 2018]. Böylece ksilanaz unun bileşiminde bulunan arabinoksilanı parçalar. Bunun sonucunda arabinoksilanın tuttuğu su açığa çıkar, hamur daha yumuşak hale gelir ve makine ile işlenebilirliği artar. Ekmek içi yapısı geç olunca da iyi bir fırın sıçraması sağlanır, yüksek hacimli ve yumuşak bir ürün oluşur. Hamurun kolay işlenmesi için kullanılan ksilanaz miktarına da dikkat edilmelidir. Ksilanazın fazla kullanımı cıvık bir hamur oluşturur [Güner vd., 2008]. Ekmekte raf ömrünün ksilanaz kullanımına bağlı olarak arttığı çalışmalar da bulunmaktadır [Butt et al., 2008].

3. MATERİYAL VE METOD

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar, kimyasal ülke ve kodlarıyla birlikte Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasallar.

Kimyasal Adı	Kod, Ülke
Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit	D6005, Zymo Research, Amerika Birleşik Devletleri
Xylazyme AX Tablet (Ksilanaz arabinoksilan içeren tablet)	T-XAX-1000T, Megazyme, Amerika Birleşik Devletleri
Amicon® Ultra-15 Santrifüj filtresi	UFC901024, Millipore, Amerika Birleşik Devletleri
EZ-Vision Three Gel Loading Dye	N313-KIT, VWR, Amerika Birleşik Devletleri
Standart Taq DNA Polimeraz	M0320S, New England Biolabs (NEB), Amerika Birleşik Devletleri
Agaroz	A5093, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Akrilamid/Bis-akrilamid, %30	A3574, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Amonyum persülfat	A3678, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Asetik asit	27225, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Bacto agar	214010, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Bovine serum albumin (BSA)	A7030, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Coomassie brilliant blue R-250	A1092.0025, Applichem
Etanol	100983.2500, Merck, Almanya
Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA)	ED4S, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Gliserol	G2025, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Glisin	G8898, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Metanol	24229, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum klorit	13423, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	L3771, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)	T7024, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Coomassie brilliant blue G-250	1.15444.0025, Merck, Almanya
Perklorik asit	311421, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Magnezyum klorit	M8266, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Magnezyum sülfat heptahidrat	M7506, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
D-(+)-Glukoz	G5400, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum hidroksit	S8045, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum karbonat	13418, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Gümüş nitrat	85228, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri

Tablo 3.1: Devam.

Potasyum sodyum tartarat tetrahidrat	218255, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum sülfat	13464, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Bakır (II) sülfat pentahidrat	209198, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sülfürik asit 95-97%	1.00731.2500, Merck, Almanya
Amonyum molibdat tetrahidrat	09878, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)	T7024, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum arsenat dibasic heptahidrat	S9663, Fluka, Amerika Birleşik Devletleri
Sitrik asit	251275, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
D-(+)-Ksiloz	95729, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum tiyosülfat pentahidrat	1.06516.1000, Merck, Almanya
Sodyum sitrat tribasic dihidrat	S4641, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Potasyum fosfat monobasic	P5655, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Potasyum fosfat dibasic	P2222, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sodyum sitrat monobasic	71497, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Sükroz	S-0389, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Maltoz	M2250, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Maltodekstrin	419672, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Gliserol	J.T.Baker, Amerika Birleşik Devletleri
Potato Deskroz Agar	Merck, Almanya
Merkaptoetanol	M-7154, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Propanol	100995, Merck, Almanya
Glasiyal asetik asit %99.5	27225, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Congo Red	C-6277, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Trisodyum sitrat dihidrat	S-1804, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Üridin	U-3750, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Arabinoksilan (buğday unu, yoğunluk ~ 30 cSt)	P-WAXYM, Megazyme, Amerika Birleşik Devletleri
Birchwood (huş ağacı) ksilan	X-0502, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Beechwood (kayın ağacı) ksilan	X4252, Sigma, Amerika Birleşik Devletleri
Beechwood (kayın ağacı) ksilan	38500.02, Serva, Almanya
Triton-X-100	648462, Calbioche, Amerika Birleşik Devletleri

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar, cihazların ülke ve kodlarıyla birlikte Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Kod, Ülke
Thermocycler	TC-512, Techne, Birleşik Krallık
Isıtıcı blok	Techne Dri-Block, DB-2A, Birleşik Krallık
Elektroforez sistem	PowerPac HC, Bio-Rad, Amerika Birleşik Devletleri
Güç sağlayıcı	Bio-Rad, Amerika Birleşik Devletleri
NanoDrop	ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri
Güvenlik kabini	Esco Class II, Singapur
PCR kabini	Biosan, Letonya
Vorteks	Dragon Lab, Çin
Buz makinası	F125 Compact, Icematic, İtalya
15 ml, 50 ml Falkon tüpler	Axygen, Amerika Birleşik Devletleri Falcon, Amerika Birleşik Devletleri
Petri	Greiner, Almanya
Su banyosu	Lauda LCB 0726, Almanya
Jel görüntüleme sistemi	Azure Biosystem C600, Amerika Birleşik Devletleri
UV transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
pH ölçüm cihazı	Metrohm, İsviçre
Otoklav	Sistek, Türkiye
Liyofilizatör	Alpha 1-2 LDplus, Christ, Almanya
Çalkalayıcı	KS 260, IKA, Almanya
37 °C İnkübatör	Nüve, Türkiye
Spektrofotometre	SmartSpec™ Plus, Bio-Rad, Amerika Birleşik Devletleri
Santrifüj	5417R, Eppendorf, Amerika Birleşik Devletleri SL 16R, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter, Amerika Birleşik Devletleri
Eppendorf	Eppendorf, Almanya
0.5 ml, 1.5 ml Mikrosantrifüj tüp	Axygen, Amerika Birleşik Devletleri
4 °C Buzdolabı	Arçelik, Türkiye
-20 °C derin dondurucu	Bosh, Almanya
Mikrodalga Fırın	Arçelik, Türkiye

3.1.3. Kullanılan Kitler

Genomik DNA'nın izole edilmesinde Quick DNA fungal/bacterial miniprep kiti kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri Tablo 3.3, Tablo 3.4, Tablo 3.5, Tablo 3.6’da verilmiştir.

3.1.4.1. Sentetik Besiortamı (CM, kompleks medyum)

Sentetik besiortamı Tablo 3.3’deki kimyasal içeriklerine göre oluşturulmuştur [Graaff, 1989]:

Tablo 3.3: Sentetik besiortamı içeriği.

Karbon	Azot	Eser element	Tuz
%0,2 maltoz	2 g/L meat peptone 1 g/L maya özütü 1g/L kasamino acids (Yeast ribonükleik asit)	EDTA ZnSO ₄ .7H ₂ O MnCl ₂ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O	6 g/L NaNO ₃ , 1,5 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,5 g/L KCl, 0,5 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O

- Eser element: (1000 X stok) ZnSO₄.7H₂O 4,4 g/L, MnCl₂.4H₂O 1 g/L, FeSO₄.7H₂O 1 g/L, CoCl₂.6H₂O 0,32 g/L, CuSO₄.5H₂O 0,32 g/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 1,5 g/L, EDTA 10 g/L.
- Hazır olarak temin edilen 10X Sentetik besiortamı (Karasugen’den temin edilmiştir) su ile 1X’e seyreltilmiş ve otoklav edilmiştir. 1 molar maltoz çözeltisi steril olarak hazırlanmış 0.22 µm’lik amicon filtreden geçirilerek, %0,2 olacak şekilde eklenmiştir.

3.1.4.2. Levasseur Besiortamı

Levasseur besiortamı Tablo 3.4’deki kimyasal içeriklerine göre oluşturulmuştur [Levasseur et al., 2005]:

Tablo 3.4: Levasseur besiortamı içeriği.

Karbon	Azot	Eser element	Tuz	Vitamin	Ek vitamin
Maltoz (% 5) 50 gr	5 g/L yeast extract 2 g/L casamino acids	EDTA ZnSO ₄ .7H ₂ O MnCl ₂ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O	6 g/L NaNO ₃ , 1,5 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,5 g/L KCl, 0,5 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O	Thiamine Ribovlavine-5P p-aminobenzoic acid Nicotinamide Pyridoxine-HCl Panthothenic acid Biotine	Thiamine Biotine Nicotinic acid

- Eser element: (1000 X stok) ZnSO₄.7H₂O 4,4 g/L, MnCl₂.4H₂O 1 g/L, FeSO₄.7H₂O 1 g/L, CoCl₂.6H₂O 0,32 g/L, CuSO₄.5H₂O 0,32 g/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 1,5 g/L, EDTA 10 g/L. (100 ml besiyerine 100 µl eklenmiştir)
- 500X Vitamin: Thiamine 10 mg, ribovlavine-5P 100 mg, p-aminobenzoic acid 10 mg, nicotinamide 100 mg, pyridoxine-HCl 50 mg, panthothenic acid 10 mg, biotine 2 mg. (100 ml besiyerine 200 µl eklenmiştir)
- 100X Ek vitamin karışımı: Thiamine 0,05 mg/mL, nicotinamide 0,1 mg/mL, biotine 1 µg/mL. (ek vitamin içeren erlenlerde 100 ml besiyerine 1 ml eklenmiştir)

3.1.4.3. Melash Besiortamı

Melash besiyortamı Tablo 3.5'deki kimyasal içeriklerine göre oluşturulmuştur:

Tablo 3.5: Melaslı besiortamı içeriği.

Karbon ve Azot	Tuz	Eser element	Vitamin	Ek vitamin
% 1 Melas 4 g/L Soya unu	6 g/L NaNO ₃ , 1,5 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,5 g/L KCl, 0,5 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O	EDTA ZnSO ₄ .7H ₂ O MnCl ₂ .4H ₂ O CoCl ₂ .6H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O FeSO ₄ . H ₂ O	Thiamine Ribovlavine-5P p-aminobenzoic acid Nicotinamide Pyridoxine(B6)-HCl Panthothenic acid Biotine	Thiamine Nicotinic acid Biotine

- Eser element: (1000 X stok) ZnSO₄.7H₂O 4,4 g/L, MnCl₂.4H₂O 1 g/L, FeSO₄.7H₂O 1 g/L, CoCl₂.6H₂O 0,32 g/L, CuSO₄.5H₂O 0,32 g/L, (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 1,5 g/L, EDTA 10 g/L . (100 ml besiyerine 100 µl eklenmiştir)
- 500X Vitamin: Thiamine 10 mg, ribovlavine-5P 100 mg, p-aminobenzoic acid 10 mg, nicotinamide 100 mg, pyridoxine-HCl 50 mg, panthothenic acid 10 mg, biotine 2 mg (100 ml besiyerine 200 µl eklenmiştir)
- 100X Ek vitamin karışımı: Thiamine 0,05 mg/mL, nicotinamide 0,1 mg/mL, biotine 1 ug/mL. (100 ml besiyerine 1 ml eklenmiştir)
- 1000 ml tuzlu ortama 4 gr soya unu katılarak otoklavlanmıştır. 100 ml besiyeri için: 88,7 ml soya unlu besiyeri, 10 ml tuzlu ortam, 200 µl vitamin, 100 µl eser element ve 1 ml otoklavlanmış melas eklenmiştir. (ek vitamin olan erlenlere ise 1 ml ek vitamin eklenmiştir)

3.1.4.4. Malt Çimli Besiortamı

Malt çimli besiortamı Tablo 3.6'daki kimyasal içeriklerine göre oluşturulmuştur [Sargın, 2003]:

Tablo 3.6: Malt çimli besiortımı içeriği.

$C_6H_5NO_3O_7.2H_2O$	2,5 gr/L
KH_2PO_4	5 gr/L
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 gr/L
$CaCl_2.2H_2O$	0,1 gr/L
Malt çimi	50 gr/L

- Tuzlar litrelik çözelti olacak şekilde tartılıp, otoklav edilmiştir. 100 ml tuz çözeltisine 5 gram malt çimi eklenmiştir.

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

- Üridin: 1,7 gram üridin 14 ml iki kez distile suda çözülmüş ve 0.22 μ m'lik amicon filtreden geçirilmiştir.
- Sükroz: 17,11 gram sükroz son hacim 50 ml olacak şekilde çözülmüş ve 0.22 μ m'lik amicon filtreden geçirilmiştir.
- Maltodekstrin: 10 ml iki kez distile suda 2 gr maltodekstrin çözülmüş, 0.22 μ m'lik amicon filtreden geçirilmiştir.

3.1.5.1. Ksilanaz Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- Çözelti A: 25 g susuz sodyum karbonat, 25 g sodyum potasyum tartarat ve 200 g susuz sodyum sülfat tartılıp, 800 ml distile suda çözülerek son hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
- Çözelti B: 30 g bakır sülfat pentahidrat tartılıp, 4 damla konsantre sülfürik asit içeren 200 ml distile suda çözülmüştür.
- Çözelti C: 50 g amonyum molibdat tartılıp, 900 ml distile suda çözülmüştür ve üzerine dikkatli bir şekilde 42 ml konsantre sülfürik asit ilave edilmiştir. Aynı yerde 6 g sodyum arsenat heptahidrat tartılıp 50 ml distile suda çözülmüş ve daha sonra hazırlanan ilk karışımın üstüne ilave edilmiştir. Son hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Çözünme gerçekleşmemiş ise çözelti 55 °C'ye kadar ısıtılmıştır.
- Çözelti D: 1 ml çözelti B, 25 ml çözelti A'ya ilave edilmiştir.

- Çözelti E: Çözelti C analizden hemen önce distile su ile 5 kat seyreltilmiştir. 4 °C’de 1 ay kararlı olduğundan çalışmalarda buna dikkat edilmiştir.
- 1M pH 4.7 sodyum asetat tamponu: 82 g susuz sodyum asetat tartılıp 800 ml distile suda çözülerek pH 4,7 olana kadar glacial asetik asit ilave edilmiştir. Son hacim 1000 ml’ye tamamlanmıştır.
- %1’lik arabinoksilan substrat: 1 g medium viscosity wheat arabinoxylan (orta viskoz buğday arabinoksilan) tartılıp, üzerine 6 ml %95 etanol ve 80 ml soğuk distile su ilave edilmiştir. 120 °C’ye kadar ısıtılmış karıştırıcının üzerine konularak 15 dakika çözünmesi için karıştırılmıştır. Çözündükten sonra üzerine 10 ml sodyum asetat tampon (1 M, pH 4,7) ilave edilip son hacmi 100 ml’ye tamamlanmıştır. Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla birkaç damla toluen ilave edilmiştir. Çözelti oda sıcaklığında yaklaşık 2 hafta kararlı olduğundan çalışmalarda buna dikkat edilmiştir. Ksilanaz aktivitesi için Megazyme’den temin edilen unlu mamul sektörü enzimi hedeflenmiş olduğundan buğday arabinoksilanın substrat olarak kullanılmıştır.
- Stok ksiloz çözeltisi: 0,05 g ksiloz tartılıp, 100 ml, 100 mM, pH 4,7 sodyum asetat tampon içinde çözünerek hazırlanmıştır.

3.1.5.2. SDS Page, Zimogram, Gümüş Boyama Jellerinde Kullanılan Çözeltiler

- Fix buffer: %50 metanol, %12 asetik asit, 0,5 ml %37 formaldehit
- Yıkama çözeltisi: %50 etanol
- Ön muamele çözeltisi: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L)
- Bant fix çözeltisi: AgNO_3 (2 gr/L), 0,75 ml %37 formaldehit
- Geliştirme çözeltisi: Na_2CO_3 (60 g/L), 0,5 ml %37 formaldehit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 mg/L)
- Durdurma çözeltisi: %50 metanol, % 12 asetik asit
- Triton X-100: 99.75 ml su + 0.25 ml Triton X-100.
- %0,2’lik congo red: 10 ml distile suda 1,5 gram NaCl çözülürken, 40 ml etanolde 0,1 gram congo red çözülmüştür. İki çözelti birleştirilip gece boyu karıştırılmış ve kaba filtreden geçirilmiştir.

SDS Page içeriğinde kullanılan kimyasallar Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7: SDS jel içeriği.

%12’lik SDS jeli (ayırma jeli) (2 jel için)		%5’lik yükleme jeli (yığma jeli) (2 jel için)	
Distile su	3,35 ml	Distile su	2,25 ml
1,5 M Tris HCl pH 8,8	2,5 ml	1,5 M Tris HCl pH 6,8	1 ml
%10 SDS	100 µl	%10 SDS	40 µl
%30 akrilamit-bisakrilamit (29:1)	4 ml	%30 akrilamit-bisakrilamit (29:1)	0,66 ml
%10 APS	100 µl	%10 APS	40 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

- %12’lik SDS jeli camlar arasına yaklaşık 3,5 ml eklenmiştir. Jelin düz bir çizgide olması ve oluşan köpüklerin önlenmesi için izopropanol eklenmiştir. Katılaşma sonunda alkol dökülmüş, jel su ile yıkanmış ve kurutma kağıtları ile ıslak alanlar kurulanmıştır. Üzerine %5’lik yükleme jeli eklenip seviye taşma noktasına kadar getirilmiştir. Taraklar camlar arasına yerleştirilmiştir. Katılaşma sonunda kullanıma hazır hale gelmiştir.

3.1.5.3. Karakterizasyon Çözeltileri

- pH 3 (sodyum sitrat) tampon: 1 molar sodyum sitrat tribasic dihidrat üzerine 1 molar sitrik asit eklenerek pH 3 yapılmıştır.
- pH 4 (sodyum sitrat) tampon: 1 molar sodyum sitrat tribasic dihidrat üzerine 1 molar sitrik asit eklenerek pH 4 yapılmıştır.
- pH 5 (sodyum sitrat) tampon: 1 molar sodyum sitrat tribasic dihidrat üzerine 1 molar sitrik asit eklenerek pH 5 yapılmıştır.
- pH 6 (sodyum sitrat) tampon: 1 molar sodyum sitrat tribasic dihidrat üzerine 1 molar sitrik asit eklenerek pH 6 yapılmıştır.
- pH 7 (sodyum fosfat) tampon: 1 molar disodyum fosfat ve 1 molar disodyumhidrojenfosfat ile pH 7 yapılmıştır.
- pH 8 (sodyum fosfat) tampon: 1 molar disodyum fosfat ve 1 molar disodyumhidrojenfosfat ile pH 8 yapılmıştır.

- pH 9 (glisin sodyum hidroksit) tampon: 1 molar glisin ve 1 ml sodyumhidroksit ile hazırlanmış, pH 9 yapılmıştır.
- pH 10 (glisin sodyum hidroksit) tampon: 1 molar glisin ve 1 ml sodyumhidroksit ile hazırlanmış, pH 10 yapılmıştır.

3.1.5.4. Protein Tayini Kimyasallar

- BSA (bovine serum albumin): Stok çözeltiden (1X) derişimi 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L olan standart çözeltiler hazırlanmıştır.
- Bradford Reaktifi: 0,6 gram Coomassie Brilliant Blue G-250 tartılarak, 1 litre %2'lik perklorik asitte çözülmüştür ardından filtre kağıdından süzölmüş ve siyah şişede saklanmıştır. (Doğru hazırlandıysa spektrofotometrede 469 nm'de boş havaya karşı okutulduğundan 1,3 - 1,5 arasında değeri okunmalıdır.)

3.1.5.5. Kriyo Sıvı Çözeltisi

- 250 ml'lik cam şişe içine 90 ml distile su, 10 gram gliserol ve 0,3 gram agar-agar eklenmiş ve şişe otoklavlanmıştır (121 °C - 15 dakika). Şişenin içerisinde yoğun bir sıvı olduğundan otoklav işlemi tekrar edilmiştir. Ardından kullanılacağı zamana kadar +4 °C'e kaldırılmıştır. Kullanımı öncesinde bu kriyo sıvısı 45 °C'lik su banyosunda akışkan hale gelinceye kadar bekletilmiştir.

3.1.5.6. Küf Büyüme Ortamı PDA (Potato Dextrose Agar)

- 500 ml'lik cam şişe içine 400 ml distile su ve 15,6 gram potato dektroz agar eklenmiş ve şişe otoklavlanmıştır (121 °C, 15 dakika). Süre sonunda sıvı donmaya başlamadan petri plaklara dökölmüş ve +4 °C'e kaldırılmıştır.

3.1.5.7. Birincil Tarama Ortamı

- Vogel tuz çözeltisi ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ 2,5g/L, KH_2PO_4 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g/L, NH_4NO_3 2g/L ve $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,1g/L), Megazyme azo boyalı tablet (2 tablet / 50 ml) ve agar (20g/L)'dan oluşmaktadır. Ortam oluşturulduktan sonra otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.5.8. Kalitatif (Görsel) Aktivite Testi Ortamı

- Azo boyalı buğday arabinoksilanlı substrat (T-XAX-1000T, Megazyme) tabletleri ile aktivite tamponlu ortam hazırlanmıştır: 100 ml 0,1 Molar NaAc pH 4,7 tamponu, % 0,2 azo boyalı sustrat (4 tablet 100 ml'de) ve % 1,5 bacto agar eklenerek katı ortam oluşturulmuştur. Kullanılan plate plakları 6 bölmeden oluşmakta olup her bir bölmesine 2,5 ml agarlı substrattan eklenmiş ve donduktan sonra kullanıma hazır olmuştur.

3.1.5.9. Kullanılan Suşlar

A.niger suş N593 (Karasugen-Türkiye) üridin oksotrofu olup düşük proteolitik aktiviteye sahiptir.

- rAB1 kodlu transformant: rAB1 suşu, pAEXynB1 plasmidinin *Aspergillus niger* N593'e transformasyonundan elde edilmiştir.
- rAB2 kodlu transformant: rAB2 suşu, pAEXynB2 plasmidinin *Aspergillus niger* N593'e transformasyonundan elde edilmiştir.

3.2. Metodlar

3.2.1. KsilanazB Geni Varlığının PCR İle Gösterimi

UNENksilanazB (UNENxynB) geninin *Aspergillus niger* N593'e entegrasyonu sonrasında transformantlar elde edilmiştir [Bayrak, 2019]. UNENxynB1 ve UNENxynB2 genlerinin (MF170635.1, MF170634.1) *A.niger* N593 alıcısına transformasyonunda pGWf vektörü kullanılmıştır. Burada plazmid pGWf *A.niger* glukoamilaz (glaA) promotoru içermektedir ve promotor maltoz varlığında indüklenerek gen ekspresyonunu sağlamaktadır. Tez kapsamında glaA promotorunu indüklemek, ksilanaz üretilmesini sağlamak ve eldeki transformantlardan en iyisini bulmak amacıyla öncelikle arabinoksilan içeren maltoz ilaveli sentetik besi ortamlarında aktivite takibi yapılmıştır. KsilanazB geninin varlığını göstermek için transformantlardan genomik DNA izole edilmiş ve PCR analizi ile kontrol yapılmıştır.

3.2.1.1. Aday Transformantlarda KsilanazB'nin PCR İle Kontrolü

PDA ortamında gelişen transformantların sporları 5 ml steril %0.1 Tween 80 ile kazanıp toplanmıştır. Spor solüsyonunun 400 µl'si kullanılarak genomik DNA izolasyonu Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit'i ile yapılmıştır:

- 50/100 mg (ıslak ağırlık) fungal hücre, ZR Bashing Bead Lysis Tüpü (0,1 ya da 0,5 mm) 200 µl suyla ya da izotonik bufferla (PBS gibi) süspanse edilmiş, üstüne 750 µl Bashing Bead Buffer eklenmiştir.
- Çalkalayıcıda maksimum hızda tüpler 5 dakika sallanmıştır. (Laboratuvar vorteksinde 20 dakika yapılabilir.)
- ZR Bashing Tüpü 10.000 G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 400 µl süpernatant Zymo-Spin III-F Filter toplama tüpüne aktarılmış ve 8000 G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. (İkinci alternatif olarak küf süpernatantı 0,45 µm'lik amicon filtreden filtreden geçirilip işleme bu adımdan başlanabilir)

- 4.adımdaki toplama tüpündeki süzüntüye 1,200 µl Genomic Lysis Buffer eklenmiştir.
- Toplama tüpündeki karışımın 800 µl'si, Zymo-Spin II C kolona aktarılmış ve 10.000 G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Toplama borusundan geçen akış atılmış ve 6.adım tekrarlanmıştır.
- Yeni bir toplama tüpünde Zymo-Spin II C kolonuna 200 µl DNA ön yıkama tamponu eklenmiş ve 10.000 G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Zymo-Spin II C kolona 500 µl g-DNA yıkama buffer eklenmiş ve 10.000 G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Zymo-Spin II C kolonu temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve doğrudan sütun matrisine 100 µl (minimum 35 µl) DNA elution buffer eklenmiştir. DNA'yı elde etmek için 10.000 G'de 30 saniye santrifüj edilmiştir.

Böylece ultra saf DNA hazır hale gelmiştir. Nanodropta DNA'nın ng/µl değeri ve saflığı ölçülmüştür. Elde edilen genomik DNA'ların 150 ng'ı ile vektöre ait tasarlanan ileri GWF (CTTCAGCTTCCCCTCGTGCA) ve geri primerleri GWR (GCGAGGTCCAATGCATTAATGC) kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur [Bayrak, 2019]. x değeri 150'nin nanodropta ölçülen DNA'nın ng/µl değerine bölünmesiyle bulunmuştur. x harici reaksiyon bileşenleri 11,5 µl'dir. Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacağından, tamamlama bileşeni ultra saf su olacaktır. Eklenecek su da 38,5'dan x değeri çıkarılarak her DNA izolasyonu yapılan transformanta bağlı olarak hesaplanmıştır [Bayrak, 2019]. PCR koşulları Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8: *A.niger* aday klonları için PCR koşulları.

PCR reaksiyon bileşenleri		Miktar		
150 ng gDNA		x		
Taq-Mg serbest buffer (10X)		5 µl		
MgCl ₂ (25 mM)		3 µl		
GWF primer (10 µM)		1 µl		
GWR primer (10 µM)		1 µl		
dNTP karışım (10 mM)		1 µl		
Taq DNA polimeraz		0,5 µl		
ddH ₂ O		38,5 – x µl		
	BASAMAKLAR		SICAKLIK	SÜRE
	ilk denatürasyon		95 °C	30 sn
	30 döngü	denatürlenme	95 °C	30 sn
		tutunma	54.1 °C	1 dk
		uzama	68 °C	1 dk
	son uzama		68 °C	5 dk
	son tutunma		4 °C	∞

3.2.1.2. Agaroz Jel Elektroforez

PCR koşulları gerçekleştirildikten sonra agaroz jel elektroforez yapılmıştır. %1'lik agaroz jele marker (2 µl), örnekler (10 µl örnek + 2 µl marker) şeklinde yüklenmiş ve 80 Volt'da yürütülmüştür. Yürüme sonunda jel önce etidyum bromürlü (1X) buffer, sonra normal buffer (1X Tris Asetat Edta) ile yıkanmıştır. Ardından UV ile görüntülenmiştir. Marker olarak, GeneRuler DNA ladder mix kullanılmıştır.

3.2.2. Transformantların Saklanması ve -80 °C'den Küf Sporu Canlandırma

Küf transformantlarının saklanması için, PDA petri plakları içinde büyütülmüş (6-7 gün) küfler üzerine 8-9 ml akışkan haldeki kriyo sıvısından eklenmiş ve sporlar kazıyıcı yardımıyla kazınmıştır. Bu sporla karışık kriyo sıvısından her bir kriyo tüpüne 0,5 ml alınmış ve tüpler -80 °C'e kaldırılmıştır.

-80 °C'den çıkarılan kriyo tüpündeki sporlar öze yardımı ile ateş başında steril olarak plate'e yayılmıştır. Küfler yeterli büyüme gösterdikten sonra (4-7 gün), ikinci defa PDA petri plaklara yine steril şekilde öze ile yayılmıştır. Sporlar bu haliyle yeterli büyüme gösterdikten sonra kültür ortamlarında kullanılmak üzere hazır hale gelmiştir.

3.2.3. *A.niger* Transformantlarında Birincil Tarama

Birincil tarama ortamına %0,2 olacak şekilde steril maltoz eklenmiş, ardından karışım çok iyi çalkalanarak her Petriye 15 ml olacak şekilde dökülmüştür. Petrideki tablet parçalarının yüzeye iyi dağılarak donması sağlanmıştır. Taraması yapılacak transformantların 7 günlük (30 °C) PDA (Potato Dextrose Agar) ortamındaki kültüründen %0,1 Tween 80 kullanılarak 10^5 spor/ml olacak şekilde spor süspansiyonları hazırlanmıştır. Petrilerin merkezine gelecek şekilde, steril 6 mm'lik disklerden bir parça aseptik olarak yerleştirilmiştir. Herbir suş için iki paralel olacak şekilde, petri üzerindeki diske 10 µl spor süspansiyonu emdirilerek aşılanmış ve yaklaşık 30 dk ortam koşulunda bekletilmiştir. Ardından ters çevrilmeden, 30 °C'de 3 gün inkübe edilip sonuçlar değerlendirilmiştir. Her deneme setinde aynı koşullarda spor içermeyen sıvı emdirilmiş bir kör de eklenmiştir. İnkübasyonu tamamlanan kültürlerde tablette bulunan azo(mavi) boyanın agar içerisine difüzyonuna bakılarak her bir örneğin difüzyon çapları (mm olarak) ölçülmüş ve paralel petri sonuçlarının ortalaması alınarak kaydedilmiştir.

3.2.4. İkincil Tarama

Birincil taramaları tamamlanan aday transformantların sentetik besi ortamında verdiği aktiviteler izlenmiştir.

3.2.4.1. *A.niger* N593'te Ksilanaz Üretimi

Transformantların sıvı kültürlerindeki aktivitelerinin incelenmesine başlamadan önce, UNENxynB aktarılmasında alıcı olarak kullanılan *A.niger* N593'ün zamana

bağlı ksilanaz aktivitesi sorgulanmıştır. 250 ml'lik erlenlere 50 ml sentetik besi ortamı, orta viskoz buğday arabinoksilanı (%0,2), %2'lik spor aşılama (50 ml kültür için deneylerde $1-5 \times 10^8$ spor/ml konsantrasyondaki süspansiyonlardan 1 ml aşılanmıştır, sonraki kültür ortamlarında da aynı orandaki aşılama kullanılmıştır) ve suşun büyümesi için üridin (500 µl) eklenmiştir. (*A.niger* N593 üridin oksotrof bir suş olduğu için besi ortamında üridine ihtiyaç duymaktadır.)

Bu koşullarda hazırlanan erlenler 30 °C'de, 200 devir/dk çalkalanarak kültüre edilmiştir. Belli aralıklarda erlen kültüründen aktivite bakmak için 500 µl örnek alınıp santrifüjlenerek (10.000 rpm, +4 °C, 30 sn), kalan üst sıvıda ksilanaz aktivitesi ölçülmüştür. Ksilanaz aktivitesi iki paralel olarak ölçülmüş ve değeri U/ml olarak verilmiştir. (Erlen kültüründen örnek alma ve santrifüjleyip aktivite bakma adımları bundan sonra hazırlanan kültürlerde de aynı koşullarla yapılmıştır)

3.2.4.1.1. Ksilanaz Aktivite Tayin Metodu

Burada ve izleyen çalışmalarda, ksilanaz aktivitesi tayin metodu olarak Nelson-Somogyi indirgen şeker analizini temel alan [Somogyi, 1952] ve Megazyme firması tarafından modifiye edilen protokol takip edilmiştir. Aktivite tayini aşağıda yazıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Su banyosunda 40 °C'de, 5 dakika ön ısıtmaya bırakılan %1'lik orta viskoz buğday arabinoksilan substratından 500 µl alınıp üzerine yine su banyosunda 40 °C'de, 5 dakika ön ısıtmaya bırakılan uygun oranlarda seyreltilmiş enzim örneğinden 200 µl alınıp karıştırılmıştır ve su banyosunda 40 °C'de, 5 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 500 µl çözelti D ilavesiyle durdurulmuş ve tekrar karıştırılarak kaynar su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 5 dakika soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerine 3 ml çözelti E ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır. Tüm örnekler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiş ve spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Blank (kör) olarak 200 µl enzim örneği yerine 200 µl 100 mM, pH 4,7 sodyum asetat tampon kullanılmıştır.

Aktivite deneyi sonunda tüplerde açığa çıkan indirgen şeker miktarı ksiloz kalibrasyon grafiği çiziminden elde edilen doğrunun eğiminin aşağıdaki formülde yerine konulması ile hesaplanmıştır.

- Ksilanaz Aktivitesi (Unit/mL): $[(OD_{520}/Eğim) \times SF]/(Enzim\ hacmi \times inkübasyon\ süresi)]$

Bu formülde;

- OD_{520} : Köre karşı okunmuş reaksiyon çözeltisinin absorbans değeri
- Eğim: Farklı ksiloz konsantrasyonlarına karşı çizilmiş grafiğin eğim değeri
- İnkübasyon süresi: Enzim ve substratın reaksiyona girdiği süre (5 dakika)
- SF: Enzimin substrat ile reaksiyona girmeden önceki ön seyreltme anındaki seyreltme faktörü
- Enzim Hacmi: Enzimin substrat ile reaksiyona girmeden önceki hacmi (0,2 ml)'dir.

Fungal üreticilerin ortamına salgıladığı ham ksilanaz miktarları U/ml olarak verilmiştir. 1 ünite (U) ksilanaz enzimi; 40 °C'de ve pH 4,7'de arabinoksilandan dakikada 1 mikromol ksiloz açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmış ve hesaplanmıştır.

3.2.4.1.2. Ksiloz Kalibrasyon Grafiği Oluşturulması

Hazırlanan stok ksiloz çözeltisinden aşağıdaki tabloda (Tablo 3.9) verilen şekilde örnekler hazırlanmıştır.

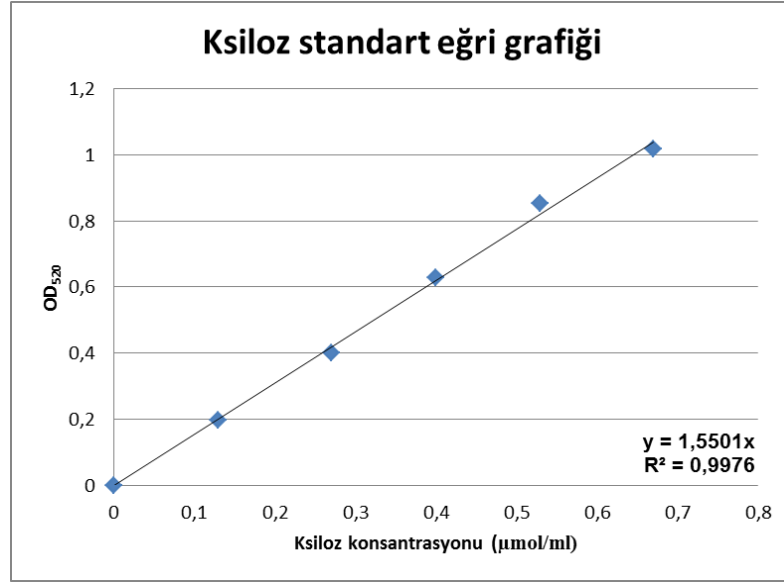
Tablo 3.9: Ksiloz kalibrasyon grafiği için gerekli hacimler.

Tüp	Stok ksilo� çözeltisinden alınan miktar (�l)	100 mM, pH 4.7 sodyum asetat tampondan alınan miktar (�l)	Ksilo� konsantrasyonu (�mol/ml)
1	0	1000	0
2	200	800	0,67
3	400	600	1,33
4	600	400	1,99
5	800	200	2,66
6	1000	0	3,33

Yukarıda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ksilo  çözeltilerinden her bir tüpe 200  l konularak, su banyosunda 40  C’de, 5 dakika  n ısıtmaya bırakılmışlardır. Üzerlerine su banyosunda 40  C’de, 5 dakika  n ısıtmaya bırakılan %1’lik orta viskoz buğday arabinoksilan substratından 500  l alınarak karışırılmıştır. Daha sonra üzerlerine 500  l çözelti D ilave edilmiş ve tekrar karışırılarak kaynar su banyosunda 20 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda örnekler 5 dakika soğumaya bırakılmıştır. Örneklerin  zerine 3 ml çözelti E ilave edilip, tekrar karışırılmıştır. Tüm  rnekler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek, spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Blank olarak 1 numaralı t p kullanılmıştır. Aşağıdaki tabloda (Tablo 3.10) belirtilen ksilo  konsantrasyonuna karşı okunan absorbans değerleri grafiğin x ve y eksenlerine yerleştirilerek standart eğri çizilmiştir ( ekil 3.1). Aktivite çözeltileri yenilendiğinde kalibrasyon grafiği de yenilenmiştir.

Tablo 3.10: Ksilo  kalibrasyon eğrisinde çözelti konsantrasyonları ve OD₅₂₀ değerleri.

Ksilo� konsantrasyonu (�mol/ml)	OD ₅₂₀
0	0
0,13	0,196
0,27	0,4
0,4	0,627
0,53	0,853
0,67	1,018



Şekil 3.1: Ksiloz standart eğri grafiği.

3.2.4.2. *A.niger* Transformantlarının Ksilanaz Üretimi

Transformantların sentetik besiortamındaki enzim üretim performansları indüklemeye bağlı olarak incelenmiştir.

Birincil tarama sonuçlarından seçilen toplam 27 transformant 250 ml'lik erlenlere 50 ml sentetik besiortamı, orta viskoz buğday arabinoksilanı (%0,2), %2'lik spor aşılması ile hazırlanan ortamda 30 °C'de, 200 devir/dk çalkalanarak kültüre edilmiştir. 24 saat sonra glukoamilaz (glaA) promotorunun indüklenmesi için besiortamına %0,2 oranında maltoz eklenmiştir.

3.2.4.3. Yüksek Aktivite Veren *A.niger* Transformantlarında İkinci Ksilanaz Üretimi

İlk tarama sonrası yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen UNEN_{xynB1} 5-1-3, 5-1-5, 5-1-10; UNEN_{xynB2} 12-1-4, 12-2-6 ve 12-1-7 klonları ile erlenlerde tekrar üretim yapılarak aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Belirlenen transformantlar 250 ml'lik erlen içine 50 ml sentetik besiortamı, %0,2 orta viskoz buğday arabinoksilanı ve %2'lik spor aşılansarak hazırlanan ortamda 30 °C'de, 200 devir/dk çalkalanarak kültüre edilmiştir. 24 saat sonra glukoamilaz (glaA) promotorunun indüklenmesi için besiortamına %0,2 oranında maltoz eklenmiştir.

3.2.4.4. K f Yaşının Enzim  retimine Etkisinin İncelenmesi

KsılanazB'nin aktivasyonuna k f yaşınn etkisini belirleyebilmek amacıyla 250 ml'lik erlen içine 50 ml sentetik besiortamı, %0,2 arabinoksilan ve %2'lik farklı yaştaki 5-1-5 sporu aşılanarak 30  C'de, 200 devir/dk çalkalamalı kültür oluşturulmuştur.

Hazırlanan kültürlerde 5, 7, 8 gün boyunca katı PDA petri plaklarında büyütülen 5-1-5 transformantına ait sporlar ile beraber 7 günlük katı besiyerinden toplanan ve +4  C'de 7 gün bekletilen sporlar (14 günlük) kullanılmıştır.

3.2.4.5. Enzim  retiminde Optimum Maltoz Miktarının Belirlenmesi

Kültür ortamlarında kullanılacak optimum maltoz miktarını belirlemek adına aynı koşullarda üretim ortamları oluşturulmuş ve ortama eklenen maltoz miktarlarında değişlik yapılmıştır. Aşılamadan 24 saat sonra 5-1-5 transformantı için farklı erlen ortamlarına % 0,1, 0,2 ve 0,4 oranlarında maltoz eklenirken, 12-1-7 transformantı içinse yine farklı erlen ortamlarında % 0,2 ve 0,6 oranlarında maltoz eklenmiştir.

3.2.4.6. Enzim  retiminde Farklı şekerlerin Etkisinin İncelenmesi

5-1-5 ve 12-1-7 transformantları, sentetik besiortamında derişik maltoz varlığında ve alternatif şekerlerle 50 ml erlen kültürü yapılarak incelenmiştir (şekil 3.2).  nceki kültür ortamlarından farklı olarak kültür ortamına orta viskoz buğday arabinoksilanı bu çalışmada eklenmemiştir.

Kültürler iki tekrarlı olarak, 250 ml'lik erlen içinde 50 ml'lik sentetik besiortamı kullanılarak, %2'lik spor aşılamasıyla, 30  C'de, 200 devir/dk hızda sallanarak 24 saat boyunca çoğaltılmıştır. Ardından farklı erlenlerde ilave şekerleri (%2 sükroz, %2 maltoz, %0,2 maltoz, %1 maltodekstrin) eklenmiştir.



Şekil 3.2: Rekombinant küf transformantlarıyla erlen kültür çalışmaları.

3.2.5. Enzim Üretiminde Besiortamı Optimizasyonu

Sentetik besiortamı temininin zorluğu ve pahalı olması nedeniyle alternatif besiyerleri ile de çalışmalar yapılmıştır.

3.2.5.1. Levasseur Besiortamında Ksilanaz Üretimi

Tablo 3.4’de verilmiş olan kültür ortamı orjinalinden farklı olarak glikoz yerine %5 maltoz eklenerek oluşturulmuş, ortama ek vitaminlerin eklendiği durum da çalışılmıştır. 1000 ml’lik erlende 100 ml levasseur besiortamı olacak şekilde hazırlanan kültüre %2’lik sporu aşılması yapılmıştır. İki tekrarlı çalışılan kültür 30 °C’de, 200 devir/dk ile 6 gün devam etmiştir.

3.2.5.2. Melaslı Besiortamında Ksilanaz Üretimi

Ekonomik besiortamı oluşturmak amacıyla melaslı besi ortamı (Tablo 3.5) tasarlanmıştır. Melas, şeker fabrikalarında şeker pancarı ve şeker kamışı üretiminde fabrikasyon kademesinde şekerin fabrikasyona geri alınamayan son şurubudur. Melasın bileşiminde sakkaroz, invert şeker, rafinoz, pektin ürünleri, laktik asit, azotlu maddeler, pancar melası/şeker kamışı melası, bazı vitaminler, Ca, K, Cu, Fe, Mg, Mn, Se gibi mineraller yer alabilmektedir.

1000 ml'lik erlende 100 ml olacak şekilde hazırlanan melaslı besiortamına %2'lik spor aşılması yapılmıştır. Ortama ek vitaminlerin eklendiği durum da çalışılmıştır. İki tekrarlı çalışılan kültür 30 °C'de, 200 devir/dk'da 9 gün boyunca devam etmiştir.

Bu ortamdan alınan örnekler liyofilize edilerek görsel aktivite testinde de kullanılmıştır. Farklı saatlerde toplanan örnekler spordan ayrılmak için önce 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ardından kaba filtreden ve 0,45 µm'lik filtreden (Macherey-Nagel) geçirilmiştir. Bu spordan ayrılmış haliyle ham enzim falkonda veya cam Petri'de -80 °C'de dondurulduktan sonra liyofilizasyon cihazında 0,14 mbar basınç altında, -50 °C'de liyofilize edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Liyofilize edilmiş ham preparat.

Liyofilize preparatlar 0,1 molar 400 µl pH 4,7 sodyum asetat içinde çözülmüştür. Bu çözünmüş örneğin 100 µl'si kalitatif aktivite testi için hazırlanan plateler içindeki her bir bölmeye emdirilerek 40 °C etüvde bekletilmiştir. Aktiviteye bağlı oluşan renk gözlenmiştir.

3.2.5.3. Malt Çimli Besiortamında Ksilanaz Üretimi

Malt çimi, bira üretimi sırasında arpanın çimlendirilmesi sonrasında ortaya çıkan ve çimlendirme işleminden sonra arpadan ayrılarak genellikle hayvan yemi

olarak değerlendirilen bir tarımsal kaynaktır. Özellikle azot bakımından zengin olan bu tarımsal kaynağın içerisinde arpanın kabuk kısmının parçaları da yer almaktadır.

Enzim üretim ortamına arabinoksilan eklenmesi pahalı olacağından ve arabinoksilan içerikli substratlar besi ortamında bulunmadığında düşük aktiviteler ölçüldüğünden, ksilan içerikli malt çimi kültürleri hazırlanmıştır (Tablo 3.4).

1000 ml'lik erlen içinde, 5 gram malt çimi, 100 ml Vogel tuz çözeltisi eklenmiş, % 0,2 oranında maltoz ve %2'lik spor aşılması yapılmıştır. Kültür 30 °C'de, 200 devir/dk olarak beş gün boyunca devam etmiştir.

3.2.5.4. Malt Çimli Statik Kültür Ortamında Ksilanaz Üretimi

5-1-5 ve 12-1-7 transformantlarında ksilanaz üretimi malt çimli statik kültür ortamında 3 tekrarlı olarak çalışılmıştır. 250 ml'lik erlen içinde 1,25 gram malt çimi, üzerine 25 ml vogel tuz çözeltisi eklenmiştir. %0,4 oranında maltoz ve %2'lik spor aşılması yapılmıştır. Kültür 30 °C'de etüvde sabit olarak (statik) kültüre edilmiş (Şekil 3.4), 4. gün sonunda kültür sonlandırılmıştır.

Aynı malt çimli statik erlen koşulunda 12-1-7 transformantında günlere bağlı olarak değişen aktiviteyi incelemek için, farklı günlerde sonlandırılan erlen kültürleri oluşturulmuştur.



Şekil 3.4: Statik kültür ortamı.

3.2.5.4.1. Malt Çimli Statik Kültürde Optimum Maltoz Yüzdesinin Belirlenmesi

Malt çimli statik kültür besiyortamında 12-1-7 transformantına % 0,2 - 0,4 - 1 - 2 oranlarında maltoz eklenerek, enzim üretimi 3 tekrarlı çalışılmıştır. 250 ml'lik erlen içinde 1,25 gram malt çimi üzerine 25 ml vogel tuz çözeltisi eklenmiştir. Belirlenen oranlarda maltoz eklenerek %2'lik spor aşılama yapılmıştır. Erlenler 30 °C'de etüvde sabit olarak kültüre edilmiş, 4. gün sonunda kültür sonlandırılmıştır.

3.2.5.5. Malt Çimli Katı Kültür Ortamında Ksilanaz Üretimi

Fungusların katı kültür üretiminde yüksek aktivite verme durumları göz önüne alınarak [Heinen et al., 2018] malt çimi içeren katı kültür besiyortamları oluşturulmuştur. Statik erlen kültüründe en iyi enzimin % 0,4 maltoz ile üretildiği tespit edilmiş olduğundan, katı kültüründe de % 0,4 maltoz varlığında üretim denemesi gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneğinde aşağıdaki adımlar takip edilmiştir [Sargın, 2003]:

- Gram substrat başına %0,4'lük maltoz indüklemesi için 0,01 g/ml maltoz çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden erlen başına 2'şer ml ekleneceği için, Vogel çözeltisinin bileşenleri erlen başına eklenecek hacim 8,373 ml olacakmış gibi tartılıp, çözelti hacmi erlen başına 6,373 ml olarak ayarlanmıştır (Derişik Vogel çözeltisi).
- Her erlene 5'er gram malt çimi ve yeterli hacimde (6,373 ml) Vogel çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.5 a). Eklenecek Vogel çözeltisi hacmi, inokülasyon sonunda nem oranı %70 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Malt çiminin nem oranı: %7,76

Malt çiminden gelen nem: 5 gram * 7,76/100 = 0,388 g

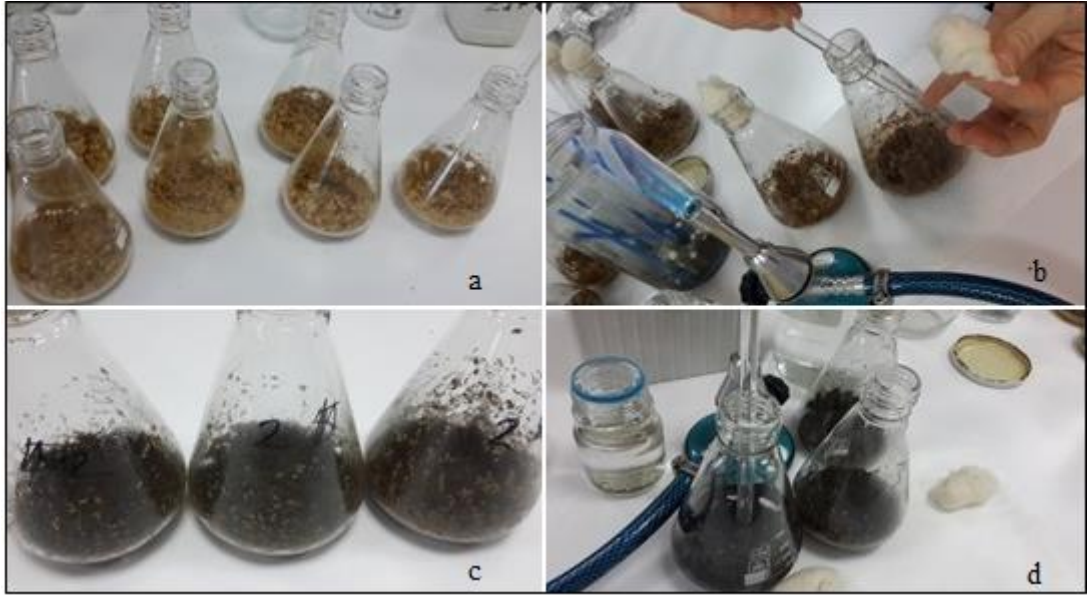
Spor inokülasyonu hacmi: 2 ml

Maltoz hacmi: 2 ml

Eklenecek vogel çözeltisi hacmi = y eşitliğinden:

- $\frac{70}{100} = \frac{\text{Sıvı kütlesi}}{\text{Toplam Kütlev}} = \frac{0,388+2+2+y}{5+2+2+y}$ y=6,373 ml vogel çözeltisi.

- Vogel çözeltisi eklendikten sonra malt çimine iyice yedirilmelidir. Bunun için oluşan bulamaç, bagetle dövülmüştür. Hazırlanan erlenler ve maltoz çözeltisi (ayrı bir şişede) 121 °C’de 15 dk boyunca otoklavlanıp steril hale getirilmiştir (karamelizasyon reaksiyonunu engellemek için, maltoz çözeltisi sterilizasyondan sonra eklenmelidir).
- Her erlene, 2’şer ml maltoz çözeltisi, 2’şer ml de 7 günlük sporların süspansiyonu eklenmiş ve bagetle iyice karıştırılmıştır (Şekil 3.5 b). Erlenler 30 °C’lik etüvde kültüre edilmiştir (Şekil 3.5 c).
- Süresi dolan erlenlere 25’er ml deiyonize su eklenerek bagetle dövülüp, enzim ekstraksiyonu için 25 dk beklenmiştir (2 paralelli çalışmalarda gün başına 2 erlen ekstrakte edilir) (Şekil 3.5 d).
- Ekstraksiyonun ardından kaba filtre kağıdıyla süzme ve santrifüj işlemleri yapılmıştır. Üç tekrarlı olarak 48, 72 ve 96 saatlik sürelerle inkübe edilen erlenlerden, üretim sonunda aktivite analizine geçilmiştir.



Şekil 3.5: Katı kültür ortamında gerçekleştirilen işlemler. a- erlenlere malt çimi ve vogel çözeltisi eklenmiş durum, b- erlenlere eklenen maltoz ve sporun karıştırılma anı, c- kültüre edilmiş erlen görüntüleri, d- erlende ekstraksiyon amaçlı bagetle karıştırılma işlemi.

3.2.5.6. Malt Çimli Kültür Enzimlerinin Liyofilize Edilmesi

Malt çimli besi ortamının statik ve katı kültürlerinin ayrı ayrı liyofilizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Statik kültürde, kültür sonrası enzim örneği santrifüj edilmiş ve kaba filtreden geçirilmiştir. Bu örnekten 10 ml alınmış ve mini plate üzerine yayılmıştır. Örnek donması için -80 °C'e alınmıştır. Örnek donduktan sonra hazır hale getirilen liyofilizasyon cihazında 0,14 mbar basınç altında, -50 °C'de liyofilize edilmiştir. İşlem sonunda toz halde enzim örneği elde edilmiştir. Plate yüzeyinden alınan toz enzimin kuru ağırlığı belirlenmiştir. Ardından 1,5 ml aktivite tamponu olan 0,1 M pH 4,7 sodyum asetat içinde çözülmüş ve örneğin aktivitesine bakılmıştır.

Katı kültür enzim örneği de aynı işlemlerden geçirilmiştir.

3.2.6. Rekombinant Küften Ksilanaz Saflaştırılmasına Yönelik Çalışmalar

Karakterizasyon için 12-1-7'nin malt çimli statik kültüründen elde edilen süpernatant kullanılmıştır. Küf partiküllerinden kurtulmak adına süpernatant önce santrifüj edilmiş (10.000 rpm, 10 dk) ve kaba filtreden geçirilmiştir. Saflaştırma aşamasına geçmeden önce süpernatanttaki proteinlerin konsantre edilmesi amacıyla ayrı ayrı amonyum sülfat çöktürmesi, etanol çöktürmesi ve ultrafiltrasyon yapılarak toplanan proteinlere ve saflaştırma katsayılarına bakılmıştır.

3.2.6.1. Amonyum Sülfat ve Etanol Çöktürmeleri

12-1-7'nin malt çimli statik kültür ortamından elde edilen ham süpernatantın, kromatografi kolonuna verilmeden önce konsantre olması için uygulanan ilk yöntem amonyum sülfat çöktürmesidir. Çöktürmede kullanılacak amonyum sülfatın yüzdesi %80 olarak uygulanmıştır. 30 ml süpernatant için 16,83 gr amonyum sülfat soğukta yavaş yavaş eklenip gece boyunca soğukta karıştırmaya bırakılmıştır. Sonraki gün süpernatant 9000 rpm'de +4 °C'de 20 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant olarak ayrılmıştır. Pelet, amonyum sülfat ile çökmüş proteinleri içermektedir. Pelet

0,1 M sodyum asetat (NaAc) pH 4,7’de çözülmüş, diyaliz membranına alınarak gece boyu soğukta 0,1 M NaAc pH 4,7 tamponu içinde diyaliz edilmiştir. İşlem sonunda örneğin aktivite ve protein miktarı hesaplanmıştır.

İkinci olarak uygulanan etanol çöktürmesinde 30 ml ham süpernatant %100 etanol (120 ml) ile soğukta yavaş yavaş karıştırılmış ve etanolün son konsantrasyonu %80’e getirilmiştir. Gece boyu soğukta karışan ham süpernatant-etanol karışımı sonraki gün 9000 rpm’de +4 °C’de 20 dakika santrifüjlenerek pelet ve süpernatant ayrılmıştır. Amonyum sülfat çöktürmesinde yapıldığı gibi çözülerek, diyaliz edilmiş ardından aktivite ve protein miktarı belirlenmiştir.

3.2.6.1.1. Bradford Metodu İle Protein Tayini

Yöntem, Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm’de absorbansının ölçülmesi ilkesine dayanır [Sedmak et al., 1977]. (Sonraki protein tayini hesaplamalarında da aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.)

10 mg BSA tartılarak, 10 ml distile suda çözülmüştür. Bu çözeltiden 1 ml alınarak üstüne 9 ml distile su eklenmiştir. Böylece BSA çözeltisi elde edilmiştir. Ardından aşağıdaki oranlarda ayrı ependorflarda seyreltmeler yapılmıştır (Tablo 3.11).

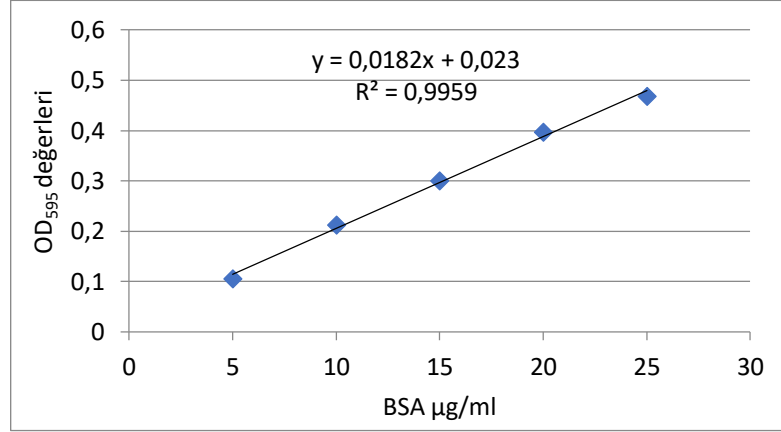
Tablo 3.11: BSA protein standartlarının hazırlanmasında uygulanan miktarlar.

	Blank	1. tüp	2. tüp	3. tüp	4. tüp	5. tüp	6. tüp
dH ₂ O (ml)	2 ml	1,9 ml	1,8 ml	1,7 ml	1,6 ml	1,5 ml	1,4 ml
BSA çözeltisi (ml)	0	0,1 ml	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml	0,5 ml	0,6 ml

Bu seyreltmelerden sırayla 1 ml alınıp üzerine 1 ml Bradford reaktifi eklenmiş ve blanka karşı OD₅₉₅’de spektrofotometrede değerler okutulmuştur. Ardından BSA (µg/ml) oranlarına karşılık okutulan ortalama OD değerlerinden (Tablo 3.12) protein eğim grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.6).

Tablo 3.12: BSA protein standartları ile elde edilen absorbans değerleri.

BSA (µg/ml)	OD ₁	OD ₂	OD ₃	ortalama
5	0,105	0,103	0,106	0,104
10	0,207	0,217	0,214	0,212
15	0,295	0,301	0,305	0,300
20	0,389	0,393	0,408	0,396
25	0,466	0,465	0,475	0,468



Şekil 3.6: BSA kalibrasyon grafiği.

Süpernatanta protein bakılacağında bu eğim kullanılır. Uygun oranda seyreltilen örnek üzerine 1 ml Bradford reaktifi eklenir ve blanka karşı OD₅₉₅'de değerler okutulur.

Protein (ug/ml): $[((\text{ort OD}_{595} - 0,023) / \text{eğim}) * \text{seyreltme oranı}]$ ile protein miktarı bulunur.

3.2.6.2. Ultrafiltrasyon İle Süpernatantın Konsantrasyonu

Protein konsantre etme işlemlerinde uygulanan diğer bir metot ultrafiltrasyon olmuştur. 45 ml ham süpernatant 10 kDa filtre membrana sahip Amicon 8050 ultrafiltrasyon cihazından azot gazı varlığında geçirilerek 15 ml'ye konsantre edilmiştir (Şekil 3.7). Konsantre edilen süpernatanta aktivite ve protein tayini yapılarak saflaştırma tablosu oluşturulmuştur.



Şekil 3.7 Ultrafiltrasyon işlemi.

3.2.6.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Uygun kromatografi yönteminin belirlenmesi için iki kromatografi yöntemi denenmiştir. Konsantre edilen preparata jel filtrasyon ve anyon değişim uygulamaları ile saf protein elde edilmesi için deneyler yapılmıştır.

İlk olarak kolon materyali kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kolon materyali olan Sefadex G-50 matriksi 0,1 M NaAc pH 4,7 ile şişirilmiş ve kolona yüklenmiştir. 150 ml süpernatant ultrafiltre edilerek 10 ml konsantre (yaklaşık 15 kat) edilmiştir. Bu konsantre örneği kolona verilmiş ve 3,5 ml/dk olacak şekilde fraksiyonlar toplanmıştır. Fraksiyonlar toplanırken kolondan 0,1 M NaAc pH 4,7 geçirilmiştir. Elde edilen fraksiyonların ilk olarak 280 nm'deki absorbanı ölçülmüş, sonrasında ise aktivite tayini yapılmıştır. SDS-PAGE ve zimogram jellerinde elde edilen proteinler görüntülenmiştir.

3.2.6.3.1. SDS-PAGE

PCR tüpünde 15 µl örnek ve 5 µl 4x SDS boyası karıştırılmış ve kaynar ısı bloğunda 10 dakika bekletilmiştir. Marker 37 °C'de 5 dakika bekletilmiştir. Tarak kısım içte olacak şekilde tank içine camlar alınmış, ortaya 1X SDS running buffer

doldurulmuştur. Taraklar çıkarıldıktan sonra kuyularda parçalar kalmasın diye kuyu içlerine pipetaj yapılmıştır. Kuyulara 20 µl yükleme yapılmıştır. Üst bölge 40 Volt'da 40 dakika, alt bölge 120 Volt'da 70 dakika yürütülmüştür. Süre sonunda üst jel kısmı atılmış, jel SDS boyasında 1 saat 60 °C'de (bazen gece boyu) bırakılmıştır. Ardından destaning ile jel boyadan gidene kadar yıkanmıştır.

Sonraki SDS Page jel analizlerinde de bu adımlar takip edilmiştir.

3.2.6.3.2. Zimogram

Burada da SDS için hazırlanan jeller kullanılmıştır. SDS'den farkı örneklerle kaynatma yapılmamıştır. PCR tüpünde 15 µl örnek ve 5 µl β-merkaptetanol içermeyen örnek yükleme boyası karıştırılmış ve kuyulara 20 µl örnek yüklenmiştir. Üst bölge 40 Volt'da 40 dakika, alt bölge 120 Volt'da 70 dakika yürütülmüştür. Süre sonunda jel % 0.25'lik Triton X-100 ile 30 dakika olmak üzere iki kez yıkanmıştır. Ardından otoklavlı su ile 30 dakika yıkanmıştır. 100 mM sodyum asetat buffer (pH 4,7) ile de 30 dakika yıkandıktan sonra, jelin üstünü kaplayacak kadar (2 ml) arabinoksilan substrat eklenmiştir. Jel 40 °C'de 20 dakika bekletilmiş, enzim inhibesi için 1 M sodyum asetat eklenmiş ve gece boyu yıkanmaya bırakılmıştır. Ertesi sabah %0,2'lik congo red, jelin üstünü kaplayacak kadar eklenerek 15 dakika boyunca 2 kez yıkanmıştır. Süre sonunda jel 1 M NaCl ile 15 dakika boyunca 2 kez yıkanmış, ardından 1 M 3 ml HCl eklenmiş ve son jel görüntüsü elde edilmiştir [Chang et al., 2017].

Sonraki zimogram jel analizlerinde de bu adımlar takip edilmiştir.

3.2.6.3.3. Gümüş Boyama

SDS jeli üstteki SDS Page bölümündeki gibi yürütüldükten sonra, fix buffer ile 1 saat muamele edilmiş ardından %50'lik etanollü yıkama çözeltisiyle 20 dakikadan 3 kez yıkanmıştır. 1 dakika ön muamele çözeltisinde kaldıktan sonra distile suda 20 saniyeden 3 kez kap içinde çalkalanmıştır. Jel fix çözeltisinde 20 dk bırakılmış ardından tekrar su ile 20 saniyeden 2 kez kap içinde çalkalanmıştır. Geliştirme solüsyonunda 10 dk kadar bekletildikten sonra (bu adımda bant oluşumu gözlenir buna göre bant koyuluklarına dikkat edilir) distile su ile 2 dakika kadar 2 kez yıkanmıştır.

Son olarak jel durdurma çözeltisinde 10 dakika bekletilmiş ve %50'lik metanol ile yıkanmıştır. Bundan sonra jel 1 ay +4 °C'de saklanabilir.

Sonraki gümüş boyamalı jel analizlerinde de bu adımlar takip edilmiştir.

3.2.6.4. HiTrap DEAE Sepharose FF Kromatografisi

Küçük ölçekli (1ml) hacme sahip anyon değiştirici olan HiTrap DEAE-Sepharose FF kolonu (17-5055-01, GE Healthcare) kullanılarak ksilanazın saflaştırılmasına çalışılmıştır.

Kolona vermek üzere 12-1-7 rekombinant suşunun malt çimli statik kültüründen elde edilmiş 45 ml ham süpernatant 10 kDa ultrafiltrasyon membranından geçirilerek 15 ml'ye konsantre edilmiştir. Elde edilen 15 ml'lik örneğe 1:1 oranda olacak şekilde Amicon'un iyon pH değiştirme falkonunda 20 mM Tris pH 8 tamponu eklenmiş, 22 °C'de 4000 G'de son hacim 15 ml olacak şekilde santrifüj edilmiştir. Bu işlem örneğin pH değeri 8'e yaklaşıncaya kadar tekrar edilmiş ardından kolona akış hızı 0,3 ml/dk olacak şekilde verilmiştir. Bağlanma tamponu olarak 20 mM Tris pH 8 tamponu, elüsyon tamponu olarak 20 mM Tris pH 8 + 1 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır.

Kolona enjeksiyon yapıldıktan sonra adsorpsiyonun daha iyi olması amacıyla kolondan 10 kolon hacmi bağlanma tamponu geçirilmiş ve şu sıra takip edilmiştir:

- 5 kolon hacminde % 5'lik elüsyon tamponu,
- 30 kolon hacmi % 5'den % 15'e (% 0,3 artmalı) elüsyon tamponu,
- 15 kolon hacmi % 15'den % 30'a (% 1 artmalı) elüsyon tamponu,
- 5 kolon hacmi % 100'lük elüsyon tamponu geçirilmiştir.

Elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein analizleri yapılmıştır.

3.2.6.5. Diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-selüloz) Kromatografisi

Ultrafiltrasyonla elde edilen konsantre protein karışımı Diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-selüloz) matriksi (D0909, Sigma) kullanılarak ayrılmaya çalışılmıştır.

Bu amaçla ilk olarak toz DEAE-selüloz matriksi suda şişirilmiştir. 0,5 Molar NaOH ile bir saat muamele edildikten sonra bol su ile yıkanarak pH 7'ye getirilmiştir. Daha sonra 0,5 Molar HCl ile bir saat muamele edilmiş ve bol su ile yıkanarak kolon matriksi hazır hale getirilmiştir. Kromatografi kolonuna yerleştirilen DEAE-selüloz matriksinden 0,1 M NaAc pH 4,7 tamponu geçirilerek ayırım öncesi ortam dengeye getirilmiştir. DEAE-selüloz kolona vermek üzere statik kültürden elde edilmiş 150 ml ham süpernatant 10 kDa ultrafiltrasyon membranından geçirilerek 50 ml'ye konsantre edilmiştir. Ultrafiltrasyonla elde edilen konsantre protein karışımı kolona verilmiş ve 6 ml/dk olacak şekilde fraksiyonlar toplanmıştır. Bağlanma ve elüsyon tamponu olarak 0,1 M NaAc pH 4,7 tamponu kullanılmıştır. Elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein analizi yapılmıştır.

3.2.6.6. HiScreen Capto DEAE Kromatografisi

Hazır olarak satın alınmış HiScreen Capto DEAE rejenere kolon materyali (GE Healthcare – Life Sciences) ile kolon hazırlığı yapılmıştır. Kullanılan kolon yaklaşık 20 santimetre olup hacmi 141,3 birim³tür. Kolon 800 ml su ve hacminin 10 katı kadar (1,5 - 2 litre) 20 mM Tris pH 8 ile yıkanmış, böylece kolon pH'ı şartlanarak 8'e gelmiştir. Kolon sisteminde gradyan yapılamadığından (Şekil 3.8) belirlenen yüzdelerde elüsyon tamponları ayrı ayrı hazırlanıp kolona verilmiştir.



Şekil 3.8: Kromatografide kullanılan sistem.

Kolona vermek üzere 12-1-7 rekombinant suşunun malt çimli statik kültüründen elde edilmiş 45 ml ham süpernatant 10 kDa ultrafiltrasyon membranından geçirilerek 15 ml'ye konsantre edilmiştir. Elde edilen 15 ml'lik örneğe 1:1 oranda olacak şekilde Amicon'un iyon pH değiştirme falkonunda 20 mM Tris pH 8 tamponu eklenmiş, 22 °C'de 4000 G'de son hacim 15 ml olacak şekilde santrifüj edilmiştir. Bu işlem örneğin pH değeri 8'e yaklaştıkça kadar tekrar edilmiştir. Böylece protein karışımı kromatografi uygulamasına hazır hale gelmiştir. Bağlanma tamponu olarak pH 8 - 20 mM Tris Tamponu, elüsyon tamponu olarak 20 mM Tris pH 8 + 1 M NaCl çözeltisi kullanılmıştır.

İlk olarak 12 ml örnek kolona enjekte edilmiş, ardından adsorpsiyonun daha iyi olması amacıyla kolondan 100 ml bağlanma tamponu geçirilmiş ve şu sıra takip edilmiştir:

- 150 ml % 5'lik elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla,
- 150 ml % 7'lik elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla,
- 150 ml % 10'luk elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla,
- 150 ml % 13'lük elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla,
- 150 ml % 15'lik elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla,
- 150 ml % 20'lik elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla,
- 150 ml % 25'lik elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla,
- 150 ml % 30'luk elüsyon tamponu 8 ml/dk hızla verilmiş ve fraksiyonlar toplanmıştır. Elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein analizi yapılmıştır.

Kolonun rejenerasyonuna 500 ml % 100'lük elüsyon tamponun kolondan geçirilmesiyle başlanmış, 500 ml iki kat distile su verilerek devam edilmiş, 500 ml % 20 etanol geçirilerek tamamlanmıştır. Kolon materyali kapalı halde % 20'lik etanol içinde, kuruması önlenerek saklanmıştır. Böylece kolon bir sonraki kullanıma hazır hale gelmiştir.

Verileri doğrulamak üzere saflaştırma adımları aynı koşullarda rejenere edilmiş kolonda tekrar edilmiştir. Bu tekrar işleminde, ultrafiltrasyon sonucu daha yüksek enzim geri kazanım yüzdesi ve spesifik aktivitesi elde edilerek HiScreen Capto DEAE kolona verilmiştir.

3.2.6.7. Ham 12-1-7'den Saflaştırılmış rE1 ve rE2'nin Moleküler Ağırlıklarının Belirlenmesi

HiScreen Capto DEAE kolonundan elde edilen fraksiyonlara SDS page jelinde gümüş boyama yapılmıştır. 20 kDa civarında bant verene kısmi saf rE2, 35 kDa civarında bant verene saf rE1 denilmiştir. rE1 ve rE2'nin moleküler ağırlıkları ayrı ayrı yürütülmüş jel fotoğraflarının ImageLab (Bio-Rad) programında marker ile karşılaştırılmasıyla yaklaşık olarak hesaplanmıştır.

3.2.7. Rekombinant Ksilanazın Biyokimyasal Analizleri

İlk olarak 12-1-7 ve 5-1-5'in malt çimli statik kültürlerinden elde edilen ham enzimin özellikleri incelenmiştir.

İkinci olarak da HiScreen Capto DEAE'den elde edilen saf rE1 ve kısmi saf rE2 enziminin özellikleri çalışılmıştır.

3.2.7.1. Ham Rekombinant Ksilanazın Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

Ham rekombinant enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi için 200 µl uygun oranlarda 100 mM pH 3-10 aralığındaki farklı pH'lardaki tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisi, yine aynı aralıktaki pH tamponlarda çözünmüş substrat çözeltisinin 500 µl'si ile karıştırılmış ve ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır. Ham rekombinant enzim aktivitesi üzerine pH etkisini belirlemek için pH 3'den pH 10'a kadar geniş bir aralıkta çalışılmıştır.

3.2.7.2. Ham Rekombinant Ksilanazın Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Ham rekombinant enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için 200 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponu ile seyreltilmiş enzim çözeltisi, substrat çözeltisinin 500 µl'si ile karıştırılmış ve 30-80 °C aralığında inkübe

edilerek ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır. Ham enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 30 °C'den 80 °C'ye kadar geniş bir aralıkta çalışılmıştır.

3.2.7.3. Ham Rekombinant Ksilanazın Termal Stabilitesinin Belirlenmesi

Rekombinant ham enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi için 500 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisi, 30-80 °C aralığında 30 dakika süre ile inkübe edilmiş ve süre bitiminde inkübasyondan alınan örnekler buz banyosunda yaklaşık 3 dakika bekletilmiştir. Bu örneklerden uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilerek 200 µl alınmış ve ardından ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.7.4. Ham Rekombinant Ksilanazın pH Kararlılığının Belirlenmesi

Rekombinant ham enzimin pH kararlılığının belirlenmesi için 500 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4.7 sodyum asetat tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisi, pH 3-10 aralığında 30 dakika süre ile 40 °C'de inkübe edilmiş ve süre bitiminde inkübasyondan alınan örnekler buz banyosunda yaklaşık 3 dakika bekletilmiştir. Bu örneklerden uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilerek 200 µl alınmış ve ardından ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.7.5. Ham Rekombinant Ksilanazın Substrat Spesifitesinin Belirlenmesi

Ham rekombinant enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi için 200 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisine bu tamponda çözünmüş ksilanlar, substrat olarak kullanılarak ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır. Substrat olarak piyasada satışı olan, wheat arabinoxylan (buğday arabinoksilanı), beechwood xylan (kayın ağacı ksilanı, sigma ve serva markaları) ve birchwood xylan (huş ağacı ksilanı) kullanılmıştır.

3.2.7.6. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1) Optimum pH Değerinin Belirlenmesi

HiScreen Capto DEAE kolonundan elde edilen saf rE1 (33,1 kDa) enzimi ve kısmi olarak saflaştırılmış olan rE2 (21,6 kDa) enzimlerinin temel biyokimyasal özellikleri çalışılmıştır.

Rekombinant enzimin optimum pH değerinin belirlenmesi için 200 µl uygun oranlarda 100 mM pH 3-10 aralığındaki farklı pH'lardaki tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisi, yine aynı aralıktaki pH tamponlarda çözünmüş substrat çözeltisinin 500 µl'si ile karıştırılarak ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır. Rekombinant enzimin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek için pH 3'den pH 10'a kadar geniş bir aralıkta çalışılmıştır.

3.2.7.7. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1) Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi

Rekombinant enzimin optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi için 200 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponu ile seyreltilmiş enzim çözeltisi, substrat çözeltisinin 500 µl'si ile karıştırılmış ve 30-80 °C aralığında inkübe edilerek ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır. Rekombinant enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için 30 °C'den 80 °C'ye kadar geniş bir aralıkta çalışılmıştır.

3.2.7.8. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1) Termal Stabilitesinin Belirlenmesi

Rekombinant enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi için 500 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisi, 30-70 °C aralığında 30 dakika süre ile inkübe edilmiş ve süre bitiminde inkübasyondan alınan örnekler buz banyosunda yaklaşık 3 dakika bekletilmiştir. Bu örneklerden uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilerek 200 µl alınmış ve ardından ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır.

3.2.7.9. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1) pH Kararlılığının Belirlenmesi

Rekombinant enzimin pH kararlılığının belirlenmesi için 500 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisi, pH 3-10 aralığında 30 dakika süre ile 40 °C’de inkübe edilmiş ve süre bitiminde inkübasyondan alınan örnekler buz banyosunda yaklaşık 3 dakika bekletilmiştir. Bu örneklerden uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilerek 200 µl alınmış ve ardından ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır.

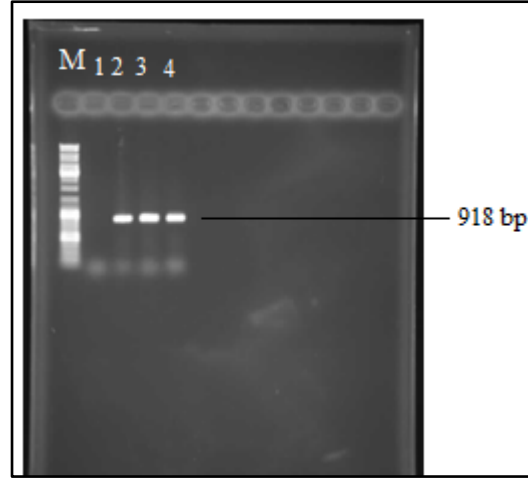
3.2.7.10. Kısmi Saf (rE2) ve Saf Rekombinant Ksilanazın (rE1) Substrat Stabilitesinin Belirlenmesi

Rekombinant enzimin substrat spesifitesinin belirlenmesi için 200 µl uygun oranlarda 100 mM pH 4,7 sodyum asetat tamponla seyreltilmiş enzim çözeltisine bu tamponda çözünmüş ksilanlar, substrat olarak kullanılarak ksilanaz aktivite tayini yapılmıştır. Substrat olarak piyasada satışı olan wheat arabinoxylan (buğday arabinoksilanı), beechwood xylan (kayın ağacı ksilani, sigma ve serva markaları) ve birchwood xylan (huş ağacı ksilani) kullanılmıştır.

4.BULGULAR

4.1. Aday Transformantların PCR Sonuçları

A.niger UNENxynB1 ve UNENxynB2 transformantlarında ksilanazB geninin kontrolü PCR ile yapılmıştır. Kuyularda sırayla: (M) marker, (1) *A.niger* N593 alıcısı, (2) 5-1-5, (3) 12-1-7 ve (4) 5-1-10 nolu transformantlar bulunmaktadır. PCR sonucunda alıcıda (*A.niger* N593) bir bant gözlenmemiş, ksilanazB genini alan transformantlar ise 918 bp'lik bantlar vermiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: PCR analiz sonucu.

PCR analizi yapılan toplam 23 UNENxynB1 transformantından 5 tanesi ve toplam 17 UNENxynB2 transformantından 2 tanesi negatif çıkmıştır. 33 adet transformantın ksilanaz üretim potansiyellerini belirlemek amacıyla birincil tarama protokolü ile taramalar yapılmıştır. PCR'da negatif çıkan adaylar sonraki taramalara alınmamıştır.

4.2. Birincil Tarama Sonuçları

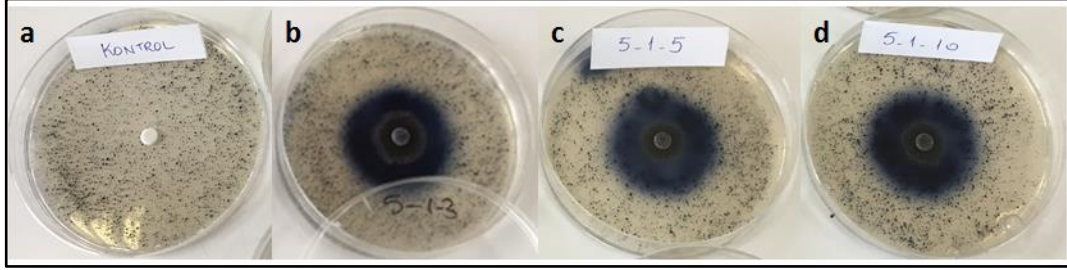
PCR analizi sonrası ikincil taramalara geçmeden önce, azo boyalı tabletlerle (ksilan substratı taşımaktadır) hazırlanan birincil tarama ortamlarında çalışılmıştır. 72 saat sonunda transformantların substratı olan azo boyalı tabletleri parçalama etkisine bakılmıştır, ksilani parçalama kapasitesi petriye yayılan zon çapı ile doğru orantılıdır. Aşağıda aday transformantların PCR analiz sonucu ve birincil tarama sonucunda petride verdikleri ortalama zon çapları birlikte verilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Aday transformantların PCR ve birincil tarama sonuçları.

<i>A. niger</i> UNEN_{xynB1} transformant- ları	PCR analiz sonucu	Ortalama zon çapları (mm)	<i>A. niger</i> UNEN_{xynB2} transformant- ları	PCR analiz sonucu	Ortalama zon çapları (mm)
5-1-1	+	36	12-1-1	+	32
5-1-2	-		12-1-2	+	33,5
5-1-3	+	36,5	12-1-4	+	33,5
5-1-4	-		12-1-5	+	34
5-1-5	+	40	12-1-6	+	33,5
5-1-6	+	33	12-1-7	+	32,5
5-1-7	+	33,5	12-1-8	+	35
5-1-8	+	32	12-2-1	+	35
5-1-9	+	31	12-2-2	+	32
5-1-10	+	39,5	12-2-4	+	31,5
5-1-11	+	37	12-2-5	+	34,5
5-1-12	+	32	12-2-6	+	35,5
5-1-13	+	33,5	12-2-7	+	33,5
5-1-14	+	38,5	12-2-8	+	28,5
5-2-1	+	35,5	12-2-9	+	33
5-2-2	+	33	12-1-3	-	
5-2-3	+	34	12-2-3	-	
5-2-4	+	35			
5-2-5	+	37			
5-2-6	+	35,5			
5-2-7	-				
5-2-8	-				
5-2-9	-				

Aşağıda birincil taramaya ait 72 saat sonundaki petri görüntülerinden dört tanesi verilmiştir (Şekil 4.2). Tüm transformantlar benzer görüntülere sahip olmakla beraber, verdikleri zon çapları farklılık göstermiştir. Subsrate etki gücü yüksek olan

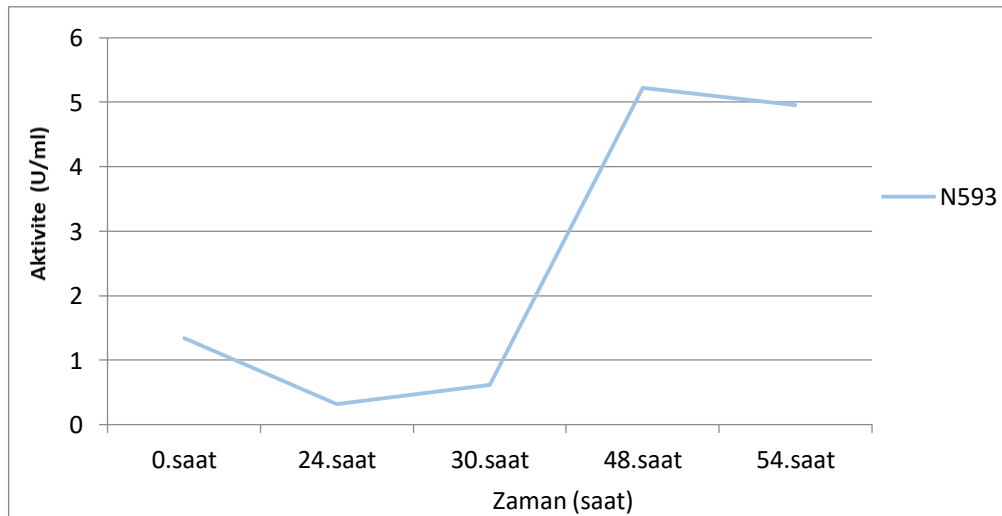
transformantlar daha geniş bir zon çapı oluşturmuştur. Ortalama difüzyon çapı 32 mm'den düşük adaylar ikincil taramalara alınmamıştır.



Şekil 4.2: Fungal transformantların birincil tarama petri görüntüleri.
a) kontrol, b) 5-1-3 transformantı, c) 5-1-5 transformantı, d-) 5-1-10 transformantı.

4.3. *A.niger* N593'te Ksilanaz Aktivitesi Sonuçları

Deneyssel olarak xynB negatif olduğu PCR ile de tespit edilmiş olan *A.niger* N593'te ksilanaz aktivitesi sentetik besi ortamında, arabinoksilan varlığında takip edilmiştir (Şekil 4.3). Aktivite grafiğine bakıldığında *A.niger* N593'de 30. saat sonrası xynB harici ksilanazların varlığı suşun verdiği aktiviteden görülmüştür [Takahashi et al., 2013] [Pel et al., 2007]. Suşun 48. saatteki ksilanaz aktivitesi 5 U/ml civarında olup, aktivitesini zamana bağlı olarak yitirmektedir. Bu 5 U/ml transformantlar için de bir karşılaştırma değeri olmaktadır.



Şekil 4.3: Alıcı *A.niger* N593'te ölçülen ksilanaz aktivitesi (U/ml).

4.4. *A.niger* Transformantlarında Ksilanaz Aktivite Sonuçları

Aşağıda 15 adet UNEN $\times$ y n B1 transformantının 50 ml'lik sentetik besiortamındaki aktiviteleri ölçülmüştür (Tablo 4.2). Spor aşılama sonrası 24 saat büyüyen küflere % 0,2 maltoz eklemesi yapılmış, hem 24. saatte hem de şekerin eklendiği anda (0. saat olarak belirtilmiştir) erlenden örnek alınmış ve örnek almaya şeker eklendikten 54 saat sonraya kadar devam edilmiştir. Ölçülen değerler arasından üç transformantta (5-1-3, 5-1-5, 5-1-10) maltozla indüklenme sonrası 24. saatte diğerlerine kıyasla daha yüksek aktivite artışı olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2: *A.niger xynB1* transformantlarında indüklemeye bağlı aktivite (U/ml).

			Maltozla indüklenme sonrası ksilanaz aktivitesi (U/ml)					
<i>A. niger</i> UNEN $\times$ y n B1 transformant no	Spor aşılama	24. saat	0. saat	24. saat	30. saat	48. saat	54. saat	24.saatten indüklenme anına göre farkı
5-1-1	1,50	1,49	2,24	3,05	3,90	5,11	5,22	
5-1-3	1,45	1,58	2,86	8,81	7,85	8,35	8,36	5,95
5-1-10	1,39	1,66	2,05	9,56	7,45	7,41	6,40	7,51
5-2-4	1,38	0,39	1,72	6,38	7,96	6,52	6,10	
5-2-1	1,33	0,37	3,17	6,28	7,05	7,79	6,92	
5-2-2	1,41	2,47	3,21	2,26	2,72	2,30	2,48	
5-1-6	1,25	1,90	3,02	6,57	7,04	6,78	5,19	
5-1-7	1,34	0,43	1,75	8,76	7,21	7,14	6,20	
5-1-11	1,34	0,50	1,92	9,01	8,38	8,23	7,05	
5-1-13	1,13	1,34	2,84	8,26	8,02	7,65	7,26	
5-1-14	1,38	1,29	2,61	7,83	7,44	6,03	5,15	
5-2-6	1,43	0,43	2,02	2,73	6,38	7,22	3,37	
5-1-5	1,42	1,30	3,06	13,2	10,6	9,67	9,42	10,14

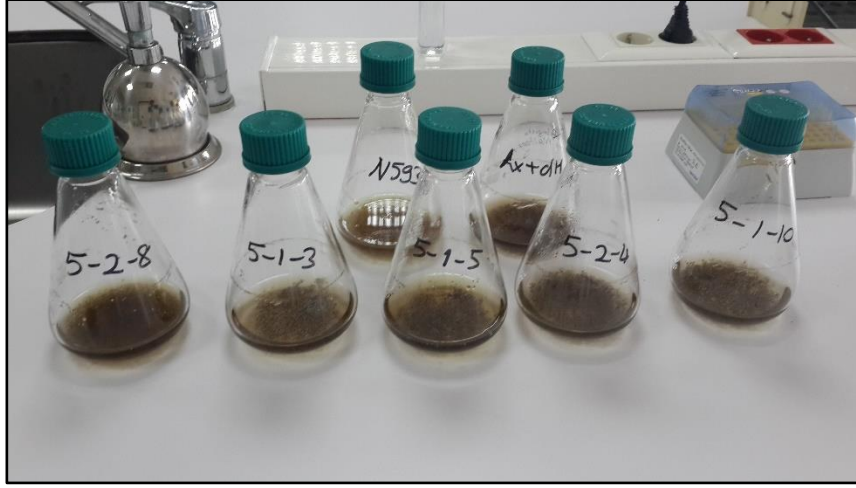
Aşağıda 12 adet UNEN $xynB2$ transformantının 50 ml'lik sentetik besiortamındaki aktiviteleri ölçülmüştür (Tablo 4.3). Spor aşılması sonrası 24 saat büyüyen küflere maltoz eklemesi yapılmış, hem 24. saatte hem de şekerin eklendiği anda (0. saat olarak belirtilmiştir) erlenden örnek alınmış ve örnek almaya şeker eklendikten 54 saat sonraya kadar devam edilmiştir. Maltozla indüklendikten sonraki 48. saatte 12-1-4, 12-1-7 ve 12-2-6 nolu transformantların diğerlerine göre daha iyi aktiviteye ulaştığı görülmüştür.

Tablo 4.3: *A.niger xynB2* transformantlarında indüklemeye bağlı aktivite (U/ml).

			Maltozla indüklenme sonrası ksilanaz aktivitesi (U/ml)					
<i>A.niger</i> UNEN _{xynB2} transformant no	Spor aşılama	24. saat	0. saat	24. saat	30. saat	48. saat	54. saat	48.saatten indüklenme anına göre farkı
12-1-2	1,30	0,30	1,65	5,24	7,47	6,12	5,89	
12-1-4	1,21	0,00	2,79	7,64	8,36	9,64	7,27	6,85
12-1-5	1,47	0,74	2,11	5,69	8,12	7,46	6,47	
12-1-6	1,59	0,29	1,67	7,22	7,04	7,13	6,48	
12-1-7	1,23	0,11	3,22	9,57	10,0	11,3	9,36	8,17
12-1-8	1,50	0,68	2,95	5,61	5,82	5,87	5,26	
12-2-1	1,51	0,10	1,81	4,97	5,59	6,04	2,20	
12-2-5	1,41	0,47	1,24	3,61	4,31	4,35	2,30	
12-2-6	1,44	0,43	2,89	7,54	8,57	9,28	8,59	6,39
12-2-7	1,44	1,64	2,33	3,42	4,68	5,20	4,44	
12-2-9	0,97	0,63	1,88	5,27	5,73	5,46	4,26	

Sonuçlara göre fungal transformantlar, UNEN $xynB$ aktarılmamış *A.niger* N593'e göre daha yüksek aktivite göstermiştir. UNEN $xynB1$ ve UNEN $xynB2$ klonları arasında ise aktivite bazında fark görülmüştür.

Sentetik besiortamında kültür sonrası erlen kültürleri görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.4).

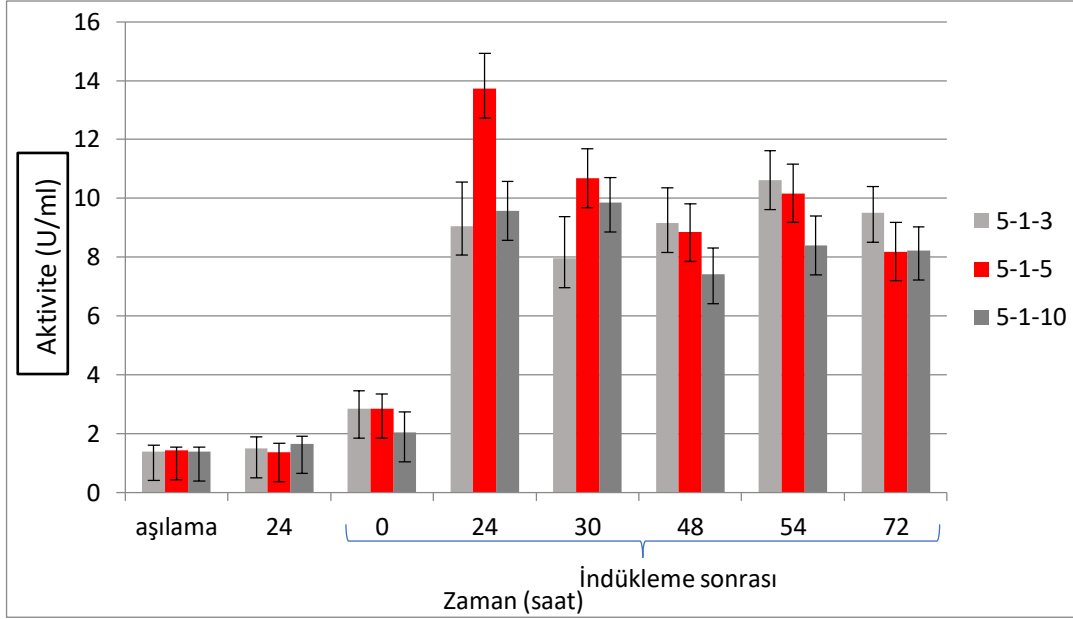


Şekil 4.4: Sentetik besi ortamında üretim sonrası erlen görüntüleri.

4.5. Seçilen *A.niger* Transformantlarında İkinci Ksilanaz Aktivite Sonuçları

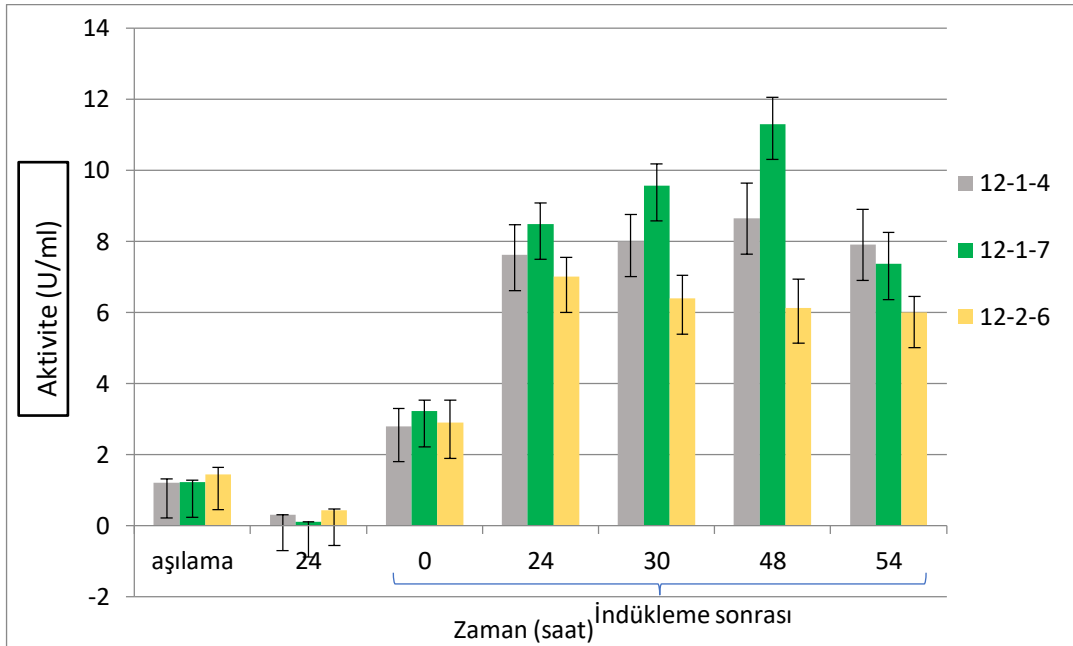
İlk olarak yapılan çalışmalarda yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenen UNEN $xynB1$ 5-1-3, 5-1-5, 5-1-10; UNEN $xynB2$ 12-1-4, 12-2-6 ve 12-1-7 klonlarından aralarında en iyi olanı kesinleştirmek için ikinci kez aynı koşullarda erlen kültürleri hazırlanmış ve aktiviteleri karşılaştırılmıştır.

Aşağıda verilen şekilde aşılama spor eklendiği anı, ilk 24. saat değeri maltoz eklenmeden önceki anı, 0. saat %0,2 maltoz indüklemesi yapıldığı anı göstermektedir. 0. saat sonrası gelen saatler de maltoz indüklemesi yapıldıktan sonraki devam eden kültür saatlerini belirtmektedir. (Sonraki şekillerde de ifadeler bu anlamlara gelmektedir.) 5-1-5 transformantı maltoz indüklemesinden sonra 24. saatte diğerlerine kıyasla ikinci kez daha iyi aktivite vermiş ve böylece UNEN $xynB1$ transformantları arasında sonraki optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Seçilen UNENxynB1 transformantları ikinci ksilanaz aktiviteleri.

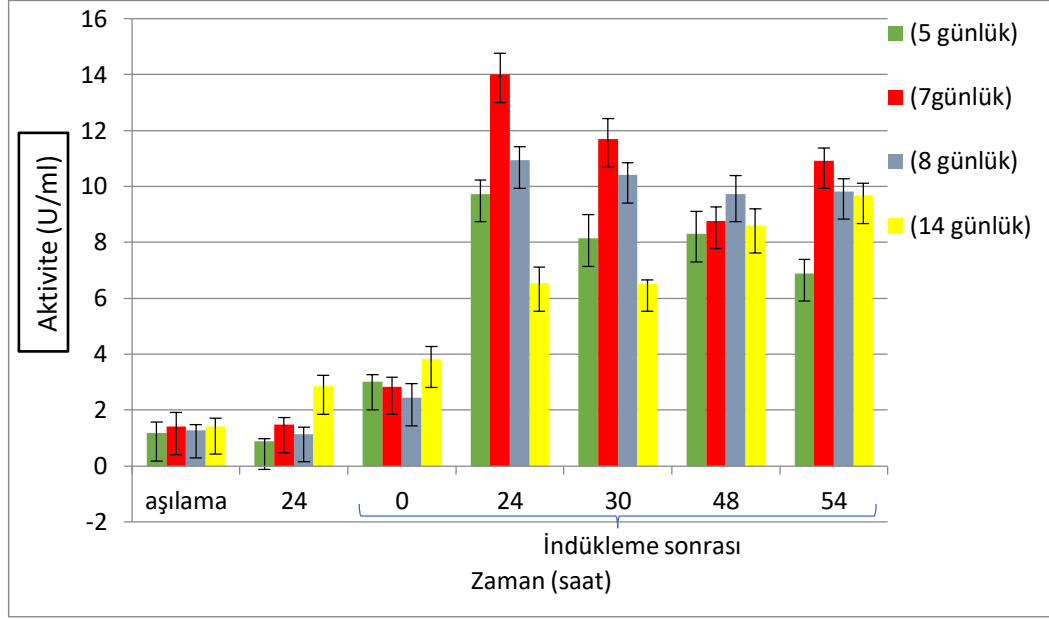
Aşağıda verilen şekilde maltozla indükleme sonrası UNENxynB2'ye ait klonlardan 12-1-7'nin daha iyi ksilanaz ürettiği ikinci kez belirlenmiş ve böylece sonraki optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: Seçilen UNENxynB2 transformantları ikinci ksilanaz aktiviteleri.

4.6. Enzim Üretiminde Küf Yaşına Bağlı Aktivite Sonuçları

xynB'nin aktivasyonunda küf yaşının etkisini belirleyebilmek amacıyla 250 ml'lik erlen içine 50 ml sentetik besiortamı, %0,2 arabinoksilan ve %2'lik farklı yaştaki 5-1-5 sporundan aşılansarak 30 °C'de, 200 devir/dk çalkalamalı inkübe edilmiştir. Kültür ortamından alınan örneklerle aktivite takibi yapılmıştır (Şekil 4.7).



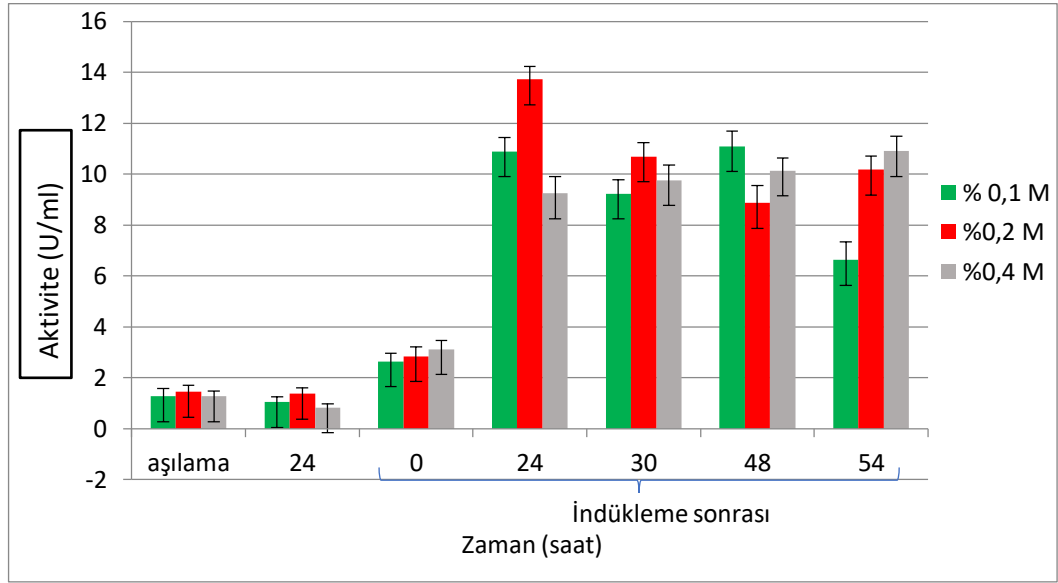
Şekil 4.7: Küf yaşına bağlı ksilanaz aktiviteleri.

Şekle göre 7 günlük kültürün sporları kullanılarak hazırlanan sıvıda ksilanaz aktivitesinin, maltoz indüklemesinden sonraki 24. saatte diğerlerine kıyasla yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle sonraki kültürlerde de 7 günlük PDA plateden alınan küf transformantları kullanılmıştır.

4.7. Enzim Üretiminde Maltoz Miktarına Bağlı Aktivite Sonuçları

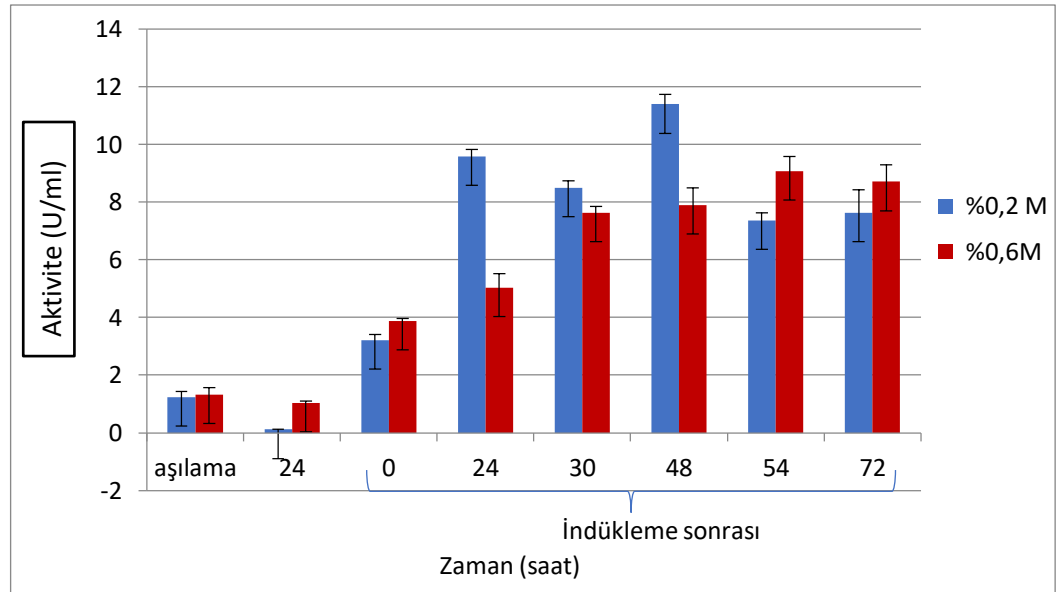
glaA promotorunun indüklenmesinde kullanılacak olan maltoz miktarının optimizasyonunu sağlamak amacıyla seçilen 5-1-5 ve 12-1-7 transformantları kullanılarak farklı maltoz yüzdelerine sahip besiyerlerinde aktivite takip edilmiştir.

Aşağıda 5-1-5 için farklı maltoz yüzdelere dayalı aktivite sonuçları verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: 5-1-5 transformantında optimum maltoz miktarının belirlenmesi.

Aşağıda 12-1-7 için farklı maltoz yüzdelere dayalı aktivite sonuçları verilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: 12-1-7 transformantında optimum maltoz miktarının belirlenmesi.

Her iki şekle göre de, bu üretim koşullarında transformantlar için glaA promotorunun indüklenmesi %0.2 maltoz içerdiğinde optimum seviyede olmuştur.

4.8. Enzim Üretiminde Farklı Şekerlere Bağlı Ksilanaz Aktivite Sonuçları

Sentetik besiortamında farklı şekerlerin enzim üretimine etkisi kültür ortamına arabinoksilan eklenmeden incelenmiştir. Belirli aralıklarla enzim örnekleri alınıp aktivitelere bakılmıştır (Tablo 4.4). Parantez içlerindeki saatler, o kültürlerle ait en yüksek aktivitenin alındığı saatleri göstermektedir.

Tablo 4.4: Küf transformantların farklı şekerlere bağlı ksilanaz aktivitesi (U/ml).

Transformant numarası	%2 sükroz	%2 maltoz	%0.2 maltoz	%1 maltodekstrin
5-1-5	2,55 U/ml (34.saat)	0,85 U/ml (34.saat)	0,49 U/ml (27.saat)	0
12-1-7	2,36 U/ml (32.saat)	1,35 U/ml (34.saat)	0,05 U/ml (51.saat)	0

Sonuçlara göre kültür ortamında arabinoksilan olmadığı bu yeni durumda ölçülen aktiviteler düşük kalmıştır. Bu koşullarda %2 sükroz içeren durumda daha iyi aktivite alınmıştır.

4.9. Enzim Üretiminde Besiortamı Optimizasyonu

Bu bölümde sentetik besiortamından başka alternatif besi ortamları ile çalışılmıştır. Sentetik besiortamın temininin zorluğu ve pahalı olması nedeniyle projenin farklı kurumlarında gerçekleştirilecek fermentör üretimlerine yeterince uygun olmadığı görülmüştür.

4.9.1. Levasseur Besiortamı Aktivite Sonuçları

Farklı besiortamlarında alınan aktiviteyi görmek amaçlı ilk olarak levasseur besiortamından alınan aktiviteler takip edilmiştir. Aşağıda bu ortamdan alınan aktiviteler 6. güne ait olmak üzere, 100 ml'den alınan toplam ünite şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Levasseur besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi.

Transformantlar ve alıcı	100 ml'deki Toplam U
5-1-5	15,8
5-1-5 + vitamin	21,5
12-1-7	12,5
N593	7,5

Tabloya göre 5-1-5 ve 12-1-7'de alıcı *A.niger* N593'den daha yüksek aktivite alınmıştır. 5-1-5'de elde edilen aktivite kültür ortamına ek vitamin eklendiğinde bir miktar yükselse de aktiviteler sayısal olarak düşük kalmıştır.

4.9.2. Melaslı Besiortamı Aktivite Sonuçları

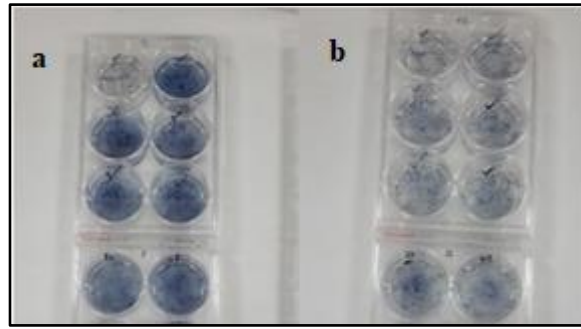
Farklı besiortamı denemelerine ikinci olarak melaslı besiortamı ile devam edilmiştir. Tabloda bu ortamdan alınan aktiviteler 9.güne ait olmak üzere, 100 ml'den alınan toplam ünite şeklinde gösterilmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Melaslı besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi.

Transformantlar ve alıcı	100 ml'deki Toplam U
5-1-5	68
12-1-7	59
12-1-7 + vitamin	74
N593	27

Tabloya göre 5-1-5 ve 12-1-7’de yakın aktivite değerleri ölçülmüş ve bu alıcı N593’den daha yüksek olmuştur. 12-1-7’de ek vitamin aktiviteyi bir miktar arttırsa da yine de sayısal olarak düşük aktivite değerleri alınmıştır.

Bu besiortamındaki aktivitelerin düşük olması nedeniyle, alınan örnekler liyofilize edilip görsel aktivite testinde gözlenmiştir. Şekilde sırayla (a) 5-1-5 transformantını, (b) *A.niger* N593’ü göstermektedir. Sol üst bölme kültür başlangıç anını, yanındaki 1. günü, takip eden bölmeler de 8. güne kadar diğer günlerin örneklerini göstermektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: Enzim aktivitesine bağlı renk değişimi.
a) 5-1-5 transformantı b) *A.niger* N593.

Şekle göre 5-1-5 transformantı alıcı N593’den daha iyi şekilde tablet parçalarına etki etmiş, bunun sonucunda da daha yüksek aktivite vermesine paralel olarak daha koyu renk vermiştir.

4.9.3. Malt Çimli Çalkalamalı Kültür Aktivite Sonuçları

Farklı besiortamı denemelerine son olarak ksilan içerikli malt çimi (ucuz substrat) kullanılarak devam edilmiştir. Aşağıda malt çimli çalkalamalı besiortamından elde edilen aktiviteler gösterilmektedir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7: Malt çimli çalkalamalı besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi (U/ml).

Transformantlar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
5-1-5	8,20 U/ml	10,47 U/ml	12,54 U/ml	8,05 U/ml	2,84 U/ml
12-1-7	7,91 U/ml	20,69 U/ml	20,12 U/ml	15,41 U/ml	10,69 U/ml

Ksilanaz aktivitesi kültürde malt çimi olduğunda yükselmiştir. Aktivite 12-1-7 transformantında 5-1-5'den daha iyi olmakla beraber, 2.günde en yüksek değerinde ölçülmüştür.

4.9.4. Malt Çimli Statik Kültür Aktivite Sonuçları

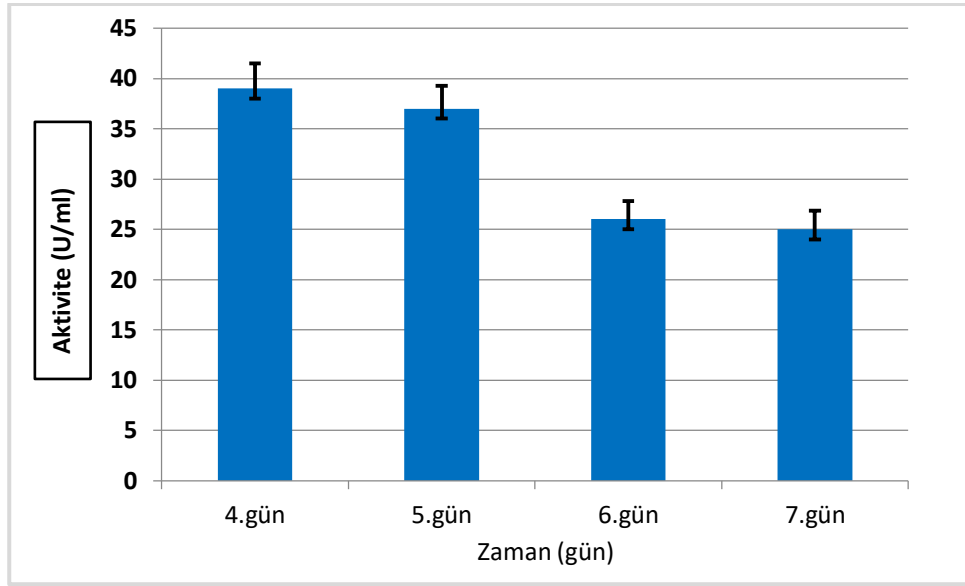
Malt çimli besiortamında kültür etme şekli değiştirilerek, statik (hareketsiz) olarak kültüre edilmiştir. 4.gün sonunda kültürden alınan aktivite tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Malt çimli statik besiortamından alınan ksilanaz aktivitesi (U/ml).

Transformantlar ve alıcı	Aktivite (U/ml)
12-1-7	39,00
5-1-5	31,00
N593	25,00

Sonuçlara göre 12-1-7, malt çimli çalkalamalı kültüründen yaklaşık iki kat yüksek aktivite vermiştir. 12-1-7 bu ortamda 5-1-5'den daha yüksek aktivite verdiği için, sonraki çalışmalarda ve saflaştırma adımlarında 12-1-7 ile çalışmaya karar verilmiştir.

12-1-7'de malt çimli statik kültürde günlere bağlı değişen aktiviteyi görmek için malt çimli statik kültür oluşturulmuş ve aşağıdaki sonuçlar alınmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: 12-1-7 malt çimli statik kültürde günlere bağlı aktivite değişimi.

12-1-7'nin malt çimli statik kültüründe aktivite 4. günde en iyi değerine ulaşmaktadır. Bu nedenle kültür süresinden kazanç sağlamak adına, aynı ortamdaki sonraki denemeler 4. günde sonlandırılacak şekilde çalışılmıştır.

4.9.4.1. Malt Çimli Statik Kültürde Optimum Maltoz Yüzdesinin Belirlenmesi

Malt çimli statik kültür ortamına eklenecek optimum maltoz miktarını bulmak amacıyla, farklı oranlardaki maltozların etkisine bakılmıştır. Aktivite sonuçları Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9: Malt çimli statik kültürde maltoza bağlı değişen ksilanaz aktivitesi (U/ml).

Transformant	Maltoz yüzdesi (%)	Aktivite (U/ml)
12-1-7	0,2	32
	0,4	39
	1	9
	2	14

Malt çimli statik besi ortamında 12-1-7 en iyi aktiviteyi %0,4 maltoz eklendiğinde vermiştir.

4.9.5. Malt Çimli Katı Kültür Aktivite Sonuçları

Malt çimi içeren kültür ortamında kültür etme şekli değiştirilerek katı kültür ortamı denemesi gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bu ortamda 12-1-7'den alınan günlere göre değişen aktivite değerleri gösterilmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Malt çimli katı kültürde günlere bağlı değişen ksilanaz aktivitesi (U/ml).

12-1-7	Aktivite (U/ml)
2.gün	81,5
3.gün	75,7
4.gün	70,4

Malt çimli katı kültür ortamında, malt çimli statik kültüre göre daha kısa sürede daha iyi enzim aktivitesi alınmıştır. Ancak malt çimli statik kültürde elde edilen enzim miktarı hacimsel olarak daha yüksek olduğundan saflaştırma çalışmaları 12-1-7'nin statik kültüründen elde edilen enzim ile yapılmıştır.

4.10. Malt Çimli Kültür Enzimlerinin Liyofilizasyon Sonuçları

Malt çimli statik ve katı kültürlerden elde edilen enzimin liyofilizasyon sonrası kayıp ve kazanç durumlarına bakılmıştır.

Statik kültür ham süpernatantın liyofilizasyonu sonucunda enzimin %96'lık bir kısmının geri kazanıldığı görülmüştür. Gram başına 2530 U/gr hesaplanmıştır. Katı kültürün ham süpernatantının liyofilizasyonu sonucunda ise enzimin %94'lük bir kısmının geri kazanıldığı görülmüş, gram başına 4225 U/gr elde edilmiştir.

4.11. Saflaştırma ve Karakterizasyon Sonuçları

Üretim denemelerinin ardından çalışmalar enzimin saflaştırma ve karakterizasyon çalışmaları ile devam etmiştir.

4.11.1. Amonyum Sülfat ve Etanol Çöktürmeleri Sonucu

12-1-7'nin malt çimli statik kültür ortamından elde edilen ham süpernatantın, kromatografi kolonuna verilmeden önce konsantre olması için ayrı ayrı amonyum sülfat ve etanol çöktürmeleri yapılmıştır. İşlemler sonunda elde edilen geri kazanım ve saflaştırma katsayıları Tablo 4.11'de verilmiştir.

Tablo 4.11: Amonyum sülfat ve etanol çöktürmesi saflaştırma tablosu.

12-1-7	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Geri kazanım (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham süpernatant	922,80	22,33	41,33	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi	347,87	9,74	35,72	37,70	0,86
Etanol çöktürmesi	458,01	14,61	31,35	49,63	0,76

Amonyum sülfat ve etanol çöktürmesi sonucunda elde edilen saflaştırma katsayıları yeterli görülmemiştir.

4.11.2. Ultrafiltrasyon Sonucu

Protein konsantre etme işlemlerinde uygulanan diğer bir metot ultrafiltrasyon olmuştur. Ultrafiltrasyon sonucunda elde edilen geri kazanım ve saflaştırma katsayıları Tablo 4.12'de verilmiştir.

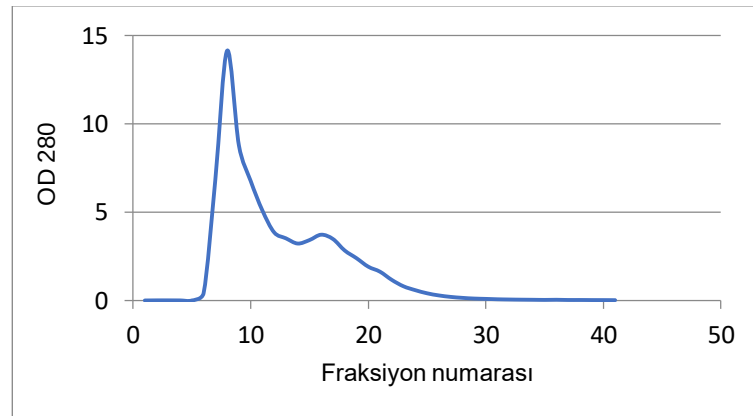
Tablo 4.12: Ultrafiltrasyon saflaştırma tablosu.

12-1-7	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Geri kazanım (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham süpernatant	908,91	38,4	23,67	100	1
Ultrafiltre (üstfaz: retantat)	891,22	31,9	27,94	98,05	1,18

Yapılan konsantre etme işlemleri sonucunda ultrafiltrasyon yönteminde diğer iki konsantrasyon yöntemine kıyasla geri kazanımın ve saflaştırma katsayısının daha iyi olduğu görülmüştür. Bu yöntem zaman açısından da avantaj sağlamaktadır. Bu sonuçlarla protein çöktürme işleminin ultrafiltrasyonla yapılmasına karar verilmiştir.

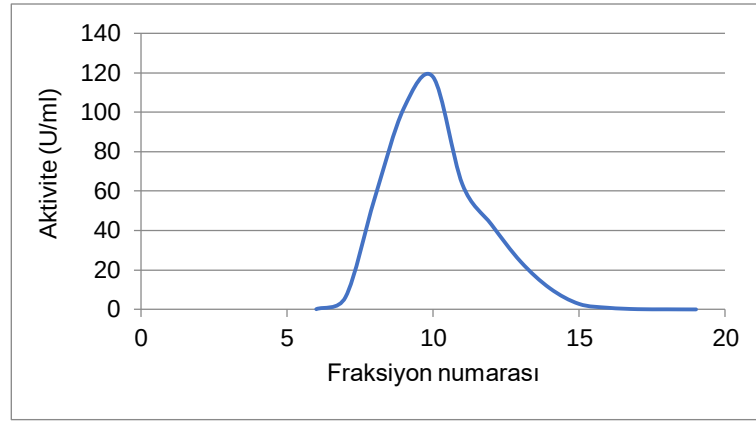
4.11.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi Sonucu

Uygun kromatografi yönteminin belirlenmesi çalışmalarında ilk olarak jel filtrasyon kromatografisi denenmiştir. Aşağıda jel filtrasyon kolonundan alınan fraksiyonların 280 nm’de verdiği absorbanslar görülmektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Jel filtrasyon kolonu fraksiyonlarının 280 nm’deki absorbansları.

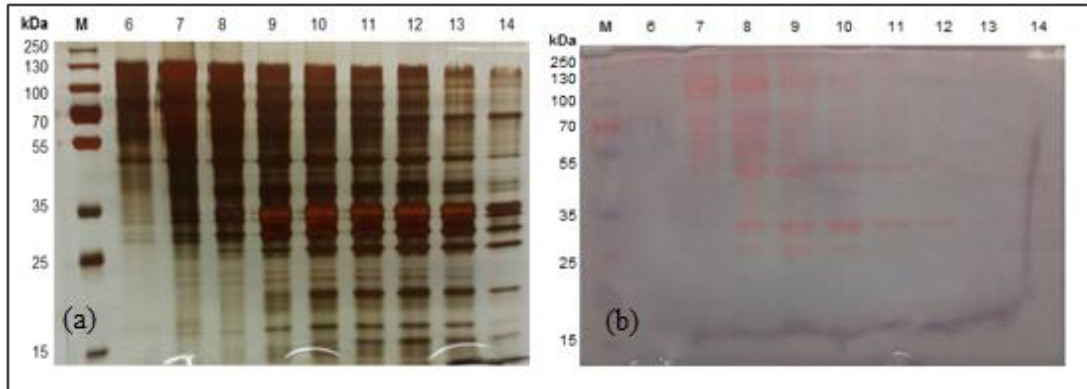
Aşağıda jel filtrasyon kolonundan elde edilen fraksiyonların verdiği aktivite değerleri görülmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Jel filtrasyon kolonu fraksiyonlarının ksilanaz aktiviteleri.

Bu sonuçlara göre 280 nm absorbanslarının yüksek olduğu fraksiyonlar daha yüksek aktivite göstermiştir.

Jel filtrasyon kolonundan elde edilen fraksiyonların aktivite verenleri SDS Page (gümüş boyamalı) (Şekil 4.14 a) ve zimogram jellerine (Şekil 4.14 b) yüklenerek görüntülenmiştir (Şekil 4.14). Kuyularda sırayla marker ile kolondan elde edilen altıdan on dörde kadar olan fraksiyon örnekleri bulunmaktadır.



Şekil 4.14: Jel filtrasyon kolonu fraksiyonlarının SDS Page ve zimogram görüntüsü. a) SDS Page jeli, b) zimogram jeli.

Bu jel görüntülerinden hareketle, 35 kDa büyüklüğünde olan proteinler bir miktar daha belirgin olsa da çok fazla bant görüldüğü için sağlıklı bir saflaştırma yakalanamamıştır.

Jel filtrasyon kolonundan elde edilen en iyi saflaştırma katsayısını veren fraksiyonun geri kazanım ve saflaştırma katsayıları Tablo 4.13'de verilmiştir.

Tablo 4.13 Jel filtrasyon kolonu saflaştırma tablosu.

12-1-7	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Geri kazanım (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham süpernatant	3981,2	127,08	31,3	100	1
Ultrafiltre hal	1574,3	40,11	39,2	39,54	1,25
Fraksiyon	150,43	1,14	131,48	3,78	4,20

Sonuç olarak fraksiyonlardan gelen proteinlerin saflaştırma katsayısı düşük kalmış, jel görüntülerinde istenen büyüklükteki ve saflıktaki protein bandı elde edilememiştir.

4.11.4. HiTrap DEAE Sepharose FF Kromatografi Sonucu

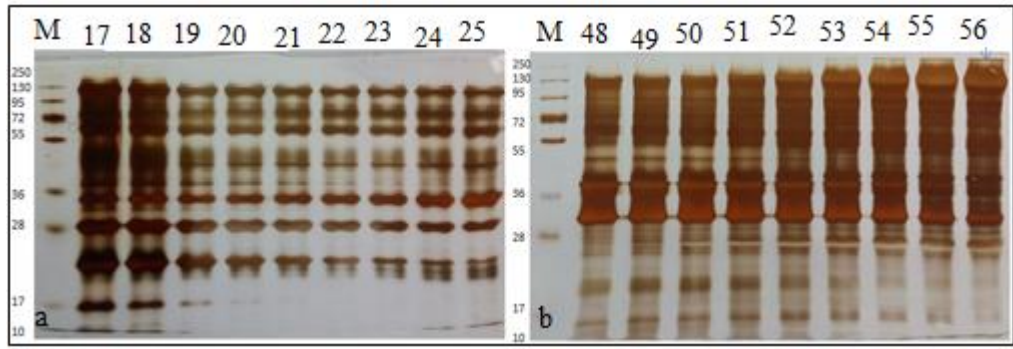
Uygun kromatografi yönteminin belirlenmesi çalışmalarında ikinci olarak anyon değişim kromatografisi, farklı özelliklere sahip olan kolonlar ile denenmiştir.

HiTrap DEAE Sepharose FF kolonundan iki ayrı bölgede, yani iki farklı büyüklükte proteine sahip fraksiyonlar elde edilmiştir. Aşağıda elde edilen fraksiyonlardan yüksek aktivite veren iki tanesinin geri kazanım ve toplam aktiviteleri verilmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: HiTrap DEAE Sepharose FF kolon fraksiyonları aktivite tablosu.

Fraksiyon numara	Toplam Aktivite (U)	Geri kazanım (%)
20	52,65	4,23
52	11,94	0,96

HiTrap DEAE Sepharose FF kolonundan elde edilen fraksiyonlar SDS Page jeline gümüş boyaması yapılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.15). Soldaki jelde marker sonrası sırayla 17-25 arasındaki, sağdaki jelde ise marker sonrası sırayla 48-56 arasındaki fraksiyonlar yer almaktadır.



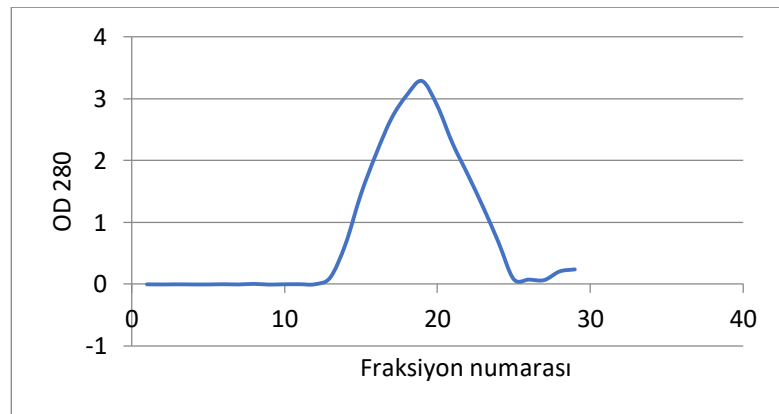
Şekil 4.15: HiTrap DEAE-FF kolonu fraksiyonlarının SDS Page görüntüsü. a) Marker ve 17-25 arası fraksiyonlar, b) Marker ve 48-56 arası fraksiyonlar.

Tablo ve jel verilerinden hareketle, fraksiyon geri kazanımları düşük olduğundan ve de çok farklı noktalarda protein bantları alındığından saflaştırmanın yeterli olmadığı görülmüştür.

Farklı özellikteki DEAE kolonu ile saflaştırma çalışmasına devam edilmiştir.

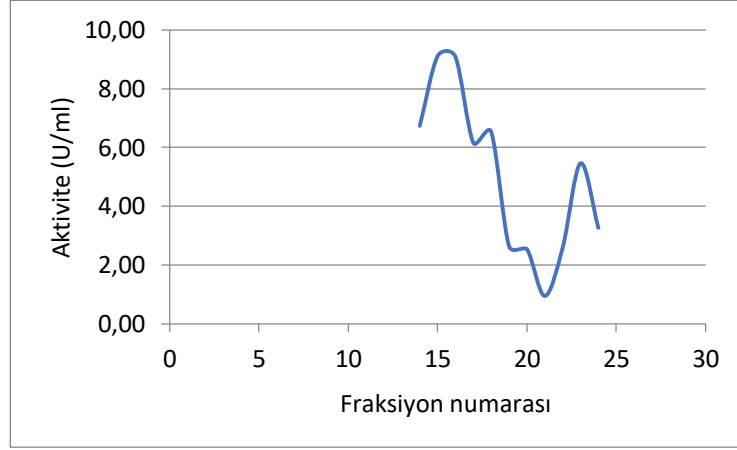
4.11.5. Diethylaminoethyl-cellulose (DEAE-selüloz) Kromatografi Sonucu

Anyon değişim kromatografi çalışmalarına DEAE-selüloz materyaliyle devam edilmiştir. Aşağıda DEAE-selüloz kolonundan elde edilen fraksiyonların 280 nm'deki absorbansları verilmiştir (Şekil 4.16).



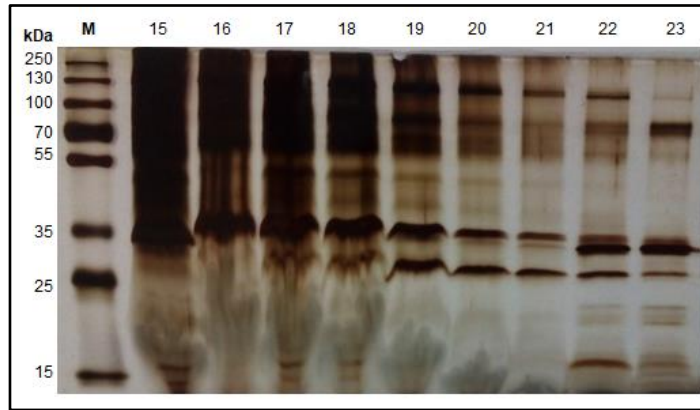
Şekil 4.16: DEAE-selüloz kolonu fraksiyonlarının 280 nm'deki absorbansları.

DEAE-selüloz kolonundan elde edilip 280 nm’de yüksek absorbans veren fraksiyonların aktivitelerine bakılmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: DEAE-selüloz kolonu fraksiyonlarının ksilanaz aktiviteleri.

DEAE-selüloz kolonundan elde edilen ve aktivite veren fraksiyonlar SDS Page jelinde gümüş boyaması yapılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.18). Jelde marker sonrası sırayla 15-23 arasındaki fraksiyonlar yer almaktadır.



Şekil 4.18: DEAE-selüloz kolonu fraksiyonlarının SDS Page görüntüsü.

Farklı noktalarda protein bantları alındığından saflaştırmanın yeterli olmadığı görülmüştür.

DEAE-selüloz kolonundan elde edilen en iyi saflaştırma katsayısını veren fraksiyonun geri kazanım ve saflaştırma katsayıları Tablo 4.15’de verilmiştir.

Tablo 4.15: DEAE-selüloz kolonu saflaştırma tablosu.

12-1-7	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Geri kazanım (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham süpernatant	3651,7	126,2	28,9	100	1
Ultrafiltre hal	2259,2	74,8	30,2	61,9	1,04
Fraksiyon	43,70	2,5	17,5	1,2	0,6

Saflaştırma tablosuna bakıldığında geri kazanımın oldukça düşük olduğu saflaştırma katsayısının ise karakterizasyon için yeterli olmadığı görülmüştür.

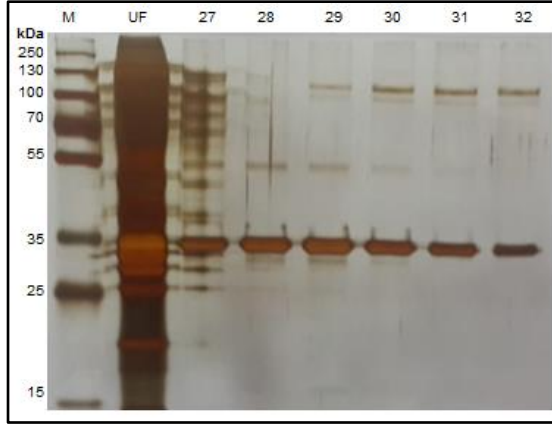
Kolon matriksinin içinde bulunduğu tampon pH'sının düşük olduğu da dikkate alınmış ve HiScreen Capto DEAE kolon matriksi ile yeni bir kromatografi işlemi yapılmıştır.

4.11.6. HiScreen Capto DEAE Kromatografi Sonuçları

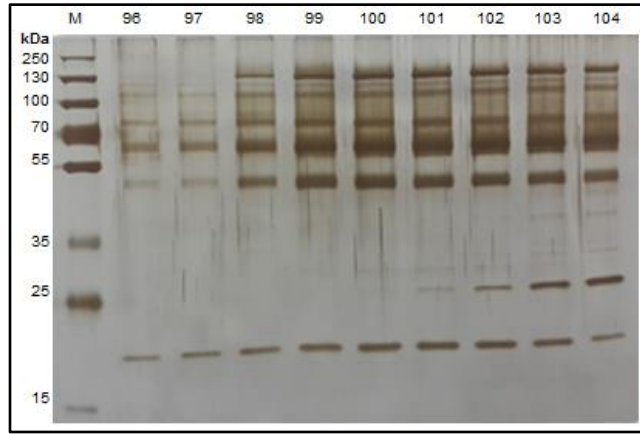
Anyon değişim kromatografi çalışmalarına HiScreen Capto DEAE ile devam edilmiştir. Kolondan elde edilen fraksiyonlar SDS-page jelinde gümüş boyaması yapılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.19) (Şekil 4.20).

Şekil 4.19'da jelde marker sonrası sırayla, ultrafiltre edilen örnek (UF) ile 27-32 arasındaki fraksiyonlar yer almaktadır. 27- 32 numaralı fraksiyonlar %7'lik NaCl-Tris konsantrasyonundan elde edilmiştir.

Şekil 4.20'deki jelde marker sonrası sırayla 96-104 arasındaki fraksiyonlar yer almaktadır. 96-104 numaralı fraksiyonlar %13'lük NaCl-Tris konsantrasyonundan elde edilmiştir.



Şekil 4.19: HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 1. SDS Page görüntüsü.



Şekil 4.20: HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 2. SDS Page görüntüsü.

Yaklaşık 35 kDa büyüklüğündeki proteinler 27-32 numaralı fraksiyonlarda (Şekil 4.19) ve yaklaşık 20 kDa büyüklüğündeki proteinler 96-104 numaralı fraksiyonlarda (Şekil 4.20) görülmüştür.

Elde edilen fraksiyonlardan en iyi geri kazanım ve saflaştırma katsayılarını verenleri Tablo 4.16'da HiScreen Capto DEAE 1. kolon saflaştırma tablosunda verilmektedir. SDS-Page jellerinde iki farklı protein büyüklüğü görüldüğünden; kolondan ilk elde edilen 35 kDa civarı ağırlıktaki fraksiyonlara rE1, sonradan elde edilen 20 kDa civarı ağırlıktaki fraksiyonlara rE2 denmiştir.

Tablo 4.16: HiScreen Capto DEAE 1. kolon saflaştırma tablosu.

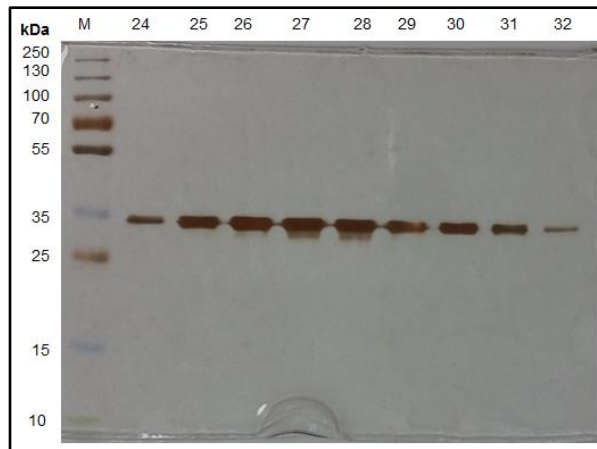
12-1-7	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Geri kazanım (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham süpernatant	1106,0	29,2	37,9	100	1
Ultrafiltre hal	531,0	13,4	39,6	48,01	1,04
rE2 (97. fraksiyon)	43,7	0,01	449,3	3,95	11,86
rE1 (29. fraksiyon)	51,4	0,19	272,3	4,65	7,18

Saflaştırma tablosuna bakıldığında geri kazanım düşük olsa bile spesifik aktivitenin ve saflaştırma katsayısının arttığı görölmektedir.

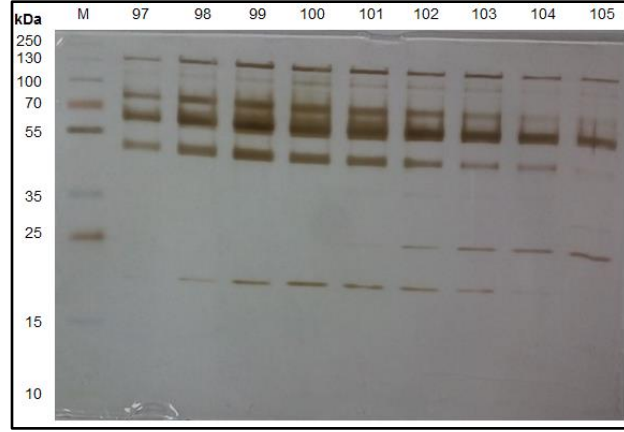
HiScreen Capto DEAE kolonunda 2. kez fraksiyon eldesi işlemi daha yüksek geri kazanımlı ultrafiltrasyon örneği ile tekrar edilmiştir. Elde edilen fraksiyonlar SDS-Page jelinde gümüş boyaması yapılarak görüntölenmiştir (Şekil 4.21) (Şekil 4.22).

Şekil 4.21’de jelde marker sonrası sırayla, 24-32 arasındaki fraksiyonlar yer almaktadır. 24- 32 numaralı fraksiyonlar %7’lik NaCl-Tris konsantrasyonundan elde edilmiştir.

Şekil 4.22’deki jelde marker sonrası sırayla 97-105 arasındaki fraksiyonlar yer almaktadır. 97-105 numaralı fraksiyonlar %13’lük NaCl-Tris konsantrasyonundan elde edilmiştir.



Şekil 4.21: HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 3. SDS Page görüntüsü.



Şekil 4.22: HiScreen Capto DEAE kolonu fraksiyonları 4. SDS Page görüntüsü.

Elde edilen fraksiyonlardan en iyi geri kazanım ve saflaştırma katsayılarını verenleri Tablo 4.17’de HiScreen Capto DEAE 2. kolon saflaştırma tablosunda verilmektedir.

Tablo 4.17: HiScreen Capto DEAE 2. kolon saflaştırma tablosu.

12-1-7	Toplam aktivite (U)	Toplam protein (mg)	Spesifik aktivite (U/mg)	Geri kazanım (%)	Saflaştırma katsayısı
Ham süpernatant	908,9	38,4	23,7	100	1
Ultrafiltre hal	708,7	13,3	53,3	77,97	2,25
rE2 (100. fraksiyon)	33,4	0,07	472,6	3,7	19,97
rE1 (27. fraksiyon)	47,75	0,13	355,6	5,25	15,02

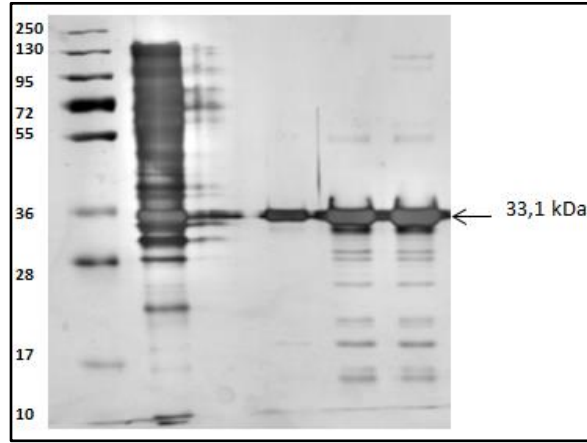
Yüksek geri kazanımlı ultrafiltrasyon örneği ile başlayan kromatografi sonucunda daha yüksek saflaştırma katsayılarına ulaşılmıştır.

HiScreen Capto DEAE kolonu ikinci kez tekrar edildiğinde rE1 enzimi tek bant olarak görüldüğünden saf rE1 olarak adlandırılmıştır. rE2 enziminde ise tek bant görülmediğinden ona kısmi saf rE2 denmiştir. rE1 ve rE2 enzimlerin temel biyokimyasal özelliklerini ortaya koymak için kullanılmıştır. Karakterizasyon işlemine yetecek saf enzimi toplamak amacıyla iki ayrı kolondan daha aynı

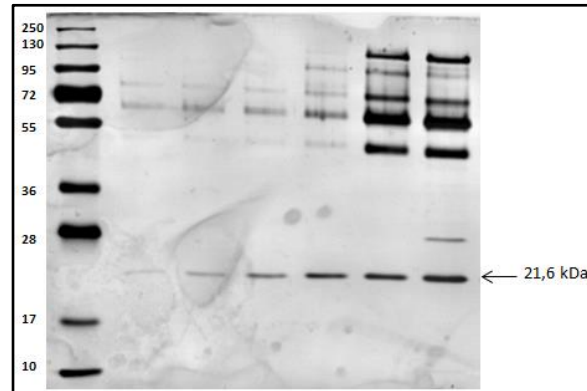
koşullarda fraksiyon toplanmış, spesifik aktiviteleri yüksek olan fraksiyonlar birleştirilerek karakterizasyona geçilmiştir.

4.11.7. Ham 12-1-7'den Saflaştırılmış rE1 ve rE2'nin Moleküler Ağırlıkları

HiScreen Capto DEAE kolonundan elde edilen fraksiyonlara SDS PAGE jelinde gümüş boyama yapılmıştır. rE1 ve rE2'nin moleküler ağırlıkları ayrı ayrı yürütülmüş jel fotoğraflarının ImageLab (Bio-Rad) programında marker ile karşılaştırılmasıyla yaklaşık olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.23) (Şekil 4.24).



Şekil 4.23: 12-1-7 rE1'in moleküler ağırlığı.



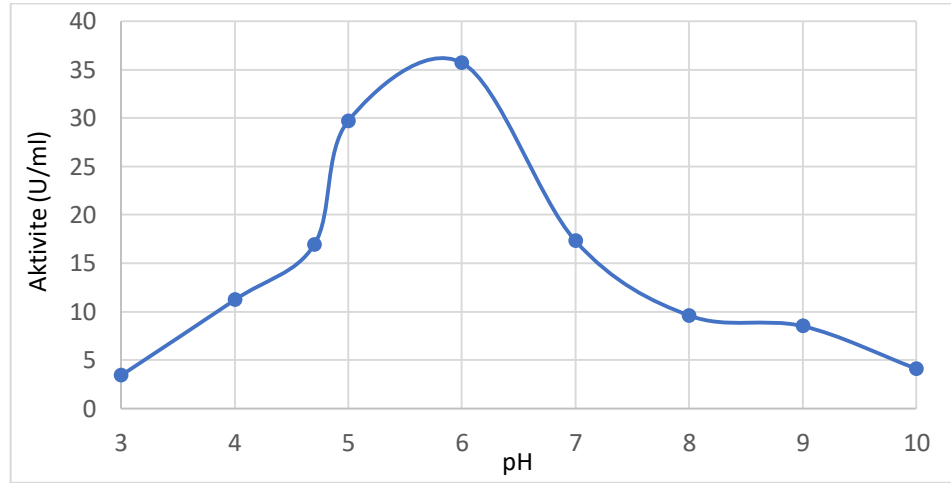
Şekil 4.24: 12-1-7 rE2'nin moleküler ağırlığı.

Saf rE1'in moleküler ağırlığı 33,1 kDa, kısmi saf rE2'nin moleküler ağırlığı 21,6 kDa olarak bulunmuştur. UNENxynB2'nin aminoasit dizisinden hesaplanmış moleküler büyüklüğü (22,24 kDa) ile buradaki rE2 enziminin büyüklüğü uyuşmaktadır [Bayrak, 2019]. Alıcıdan da diğer bir ksilanaz rE1 salgılanmaktadır.

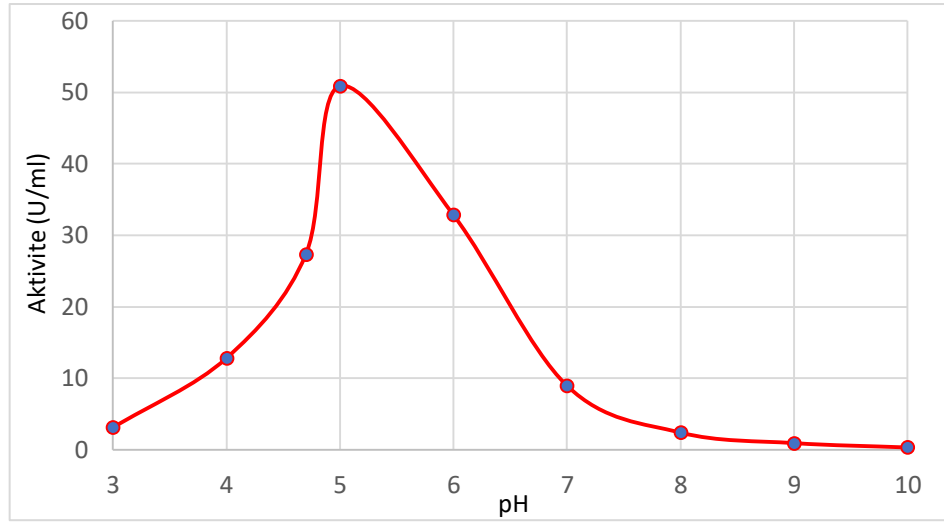
4.11.8. Rekombinant Ksilanazın Biyokimyasal Analizleri

4.11.8.1. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin Optimum pH Sonuçları

Ham rekombinant ksilanazın optimum pH değeri 12-1-7 ve 5-1-5 için belirlenmiştir (Şekil 4.25) (Şekil 4.26).



Şekil 4.25: 12-1-7 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum pH profili.

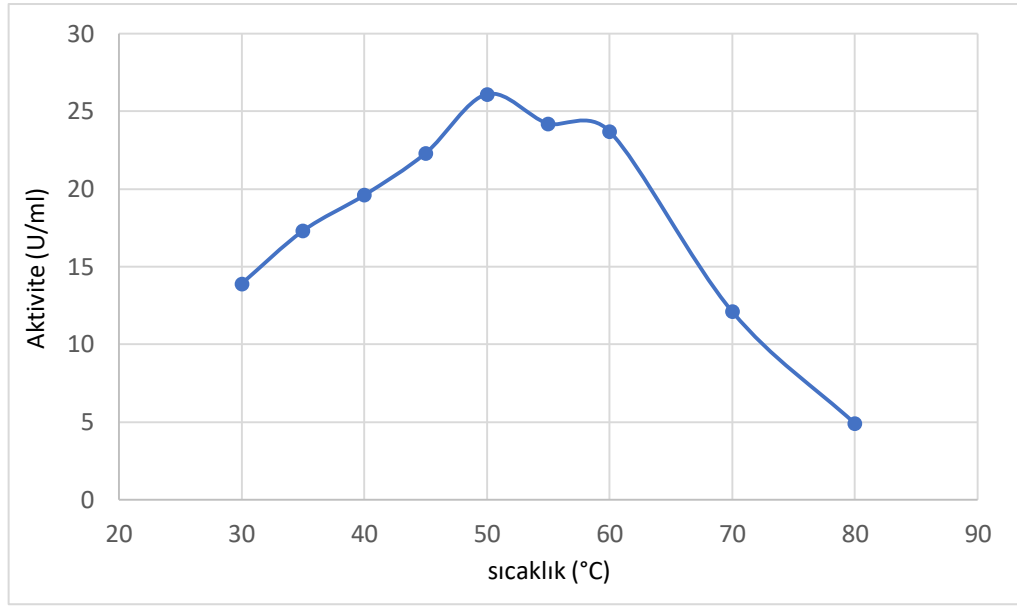


Şekil 4.26: 5-1-5 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum pH profili.

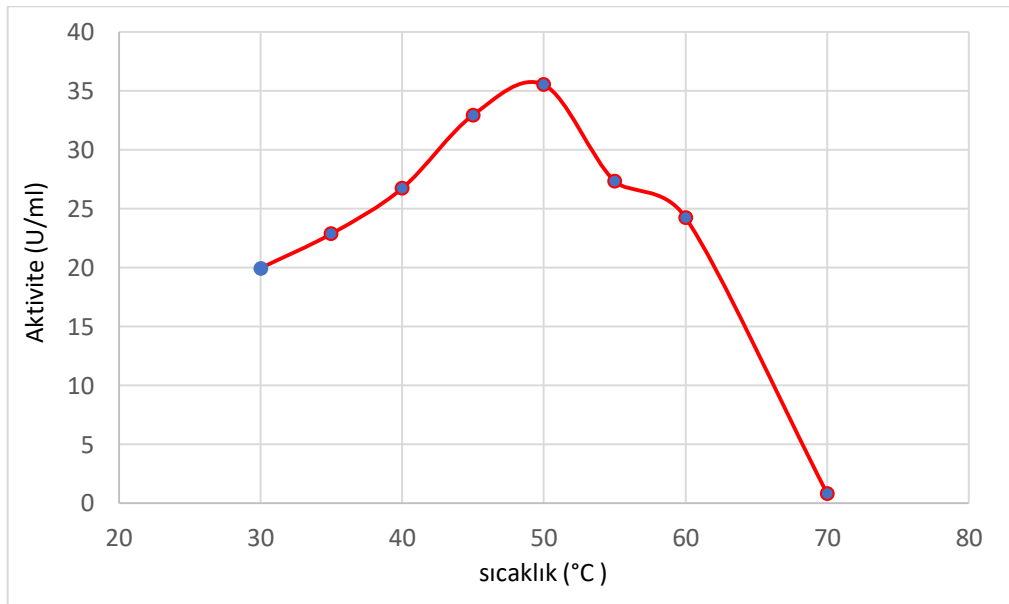
12-1-7 no'lu suştan elde edilen ham rekombinant enzimin optimum pH'sı 6, 5-1-5 no'lu suştan elde edilen ham rekombinant enzimin optimum pH'sı 5 olarak belirlenmiştir.

4.11.8.2. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları

Ham rekombinant ksilanazın optimum sıcaklık değeri 12-1-7 ve 5-1-5 için belirlenmiştir (Şekil 4.27) (Şekil 4.28).



Şekil 4.27: 12-1-7 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum sıcaklık profili.



Şekil 4.28: 5-1-5 no'lu suştan üretilen ham ksilanazın optimum sıcaklık profili.

12-1-7 ve 5-1-5 no'lu suşlardan elde edilen ham rekombinant enzimlerinin optimum sıcaklıkları 50 °C olarak belirlenmiştir.

4.11.8.3. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin Termal Stabilite Sonuçları

Ham rekombinant ksilanazın termal stabilitesi 12-1-7 ve 5-1-5 için belirlenmiştir (Tablo 4.18) (Tablo 4.19).

Tablo 4.18: Ham rekombinant 12-1-7'nin farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.

Örnek adı	Sıcaklık (°C)	Kalan aktivite (%)
12-1-7 nolu suştan üretilen rekombinant ham ksilanaz	30	100
	40	100
	50	81
	60	25
	70	0

Tablo 4.19: Ham rekombinant 5-1-5'in farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.

Örnek adı	Sıcaklık (°C)	Kalan aktivite (%)
5-1-5 nolu suştan üretilen rekombinant ham ksilanaz	30	100
	40	100
	50	67
	60	22
	70	0

70 °C'de her iki suş için de 30 dakika sonunda ham rekombinant ksilanaz enzimi aktivitesinin tamamını kaybetmektedir.

4.11.8.4. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin pH Kararlılığı Sonuçları

Ham rekombinant ksilanazın pH stabilitesi 12-1-7 ve 5-1-5 için belirlenmiştir (Tablo 4.20) (Tablo 4.21).

Tablo 4.20: Ham rekombinant 12-1-7'nin farklı pH'lardaki kararlılığı.

Örnek adı	pH	Kalan aktivite (%)
12-1-7 nolu suştan üretilen rekombinant ham ksilanaz	3	1,1
	4	65,33
	4,7	100,00
	5	119,47
	6	129,42
	7	82,76
	8	14,93
	9	13,07
	10	5,33

Tablo 4.21: Ham rekombinant 5-1-5'in farklı pH'lardaki kararlılığı..

Örnek adı	pH	Kalan aktivite (%)
5-1-5 nolu suştan üretilen rekombinant ham ksilanaz	3	8,8
	4	30,3
	4,7	100,00
	5	161,00
	6	73,2
	7	25,5
	8	9,5
	9	2,9
	10	0,5

12-1-7 nolu suştan üretilen ham rekombinant ksilanazın pH 6'da 30 dakika inkübasyonu sonunda en yüksek stabilite değerine ulaştığı tespit edilmiştir. 5-1-5 nolu ham rekombinant ksilanaz için bu durum pH 5'de 30 dakika inkübasyon sonunda en yüksek stabilite değerine ulaşmıştır.

4.11.8.5. Ham Rekombinant Ksilanaz Enziminin Substrat Özgüllüğü Sonuçları

Ham rekombinant ksilanazın substrat özgüllüğü 12-1-7 ve 5-1-5 için belirlenmiştir (Tablo 4.22) (Tablo 4.23).

Tablo 4.22: Ham rekombinant 12-1-7'nin farklı substratlara özgü aktivitesi.

Substrat	Aktivite (U/ml)
Wheat arabinoxylan (Megazyme-medium viscosity)	29,53
Birchwood xylan (Sigma)	29,81
Beechwood xylan (Serva)	28,97
Beechwood xylan (Sigma)	30,37

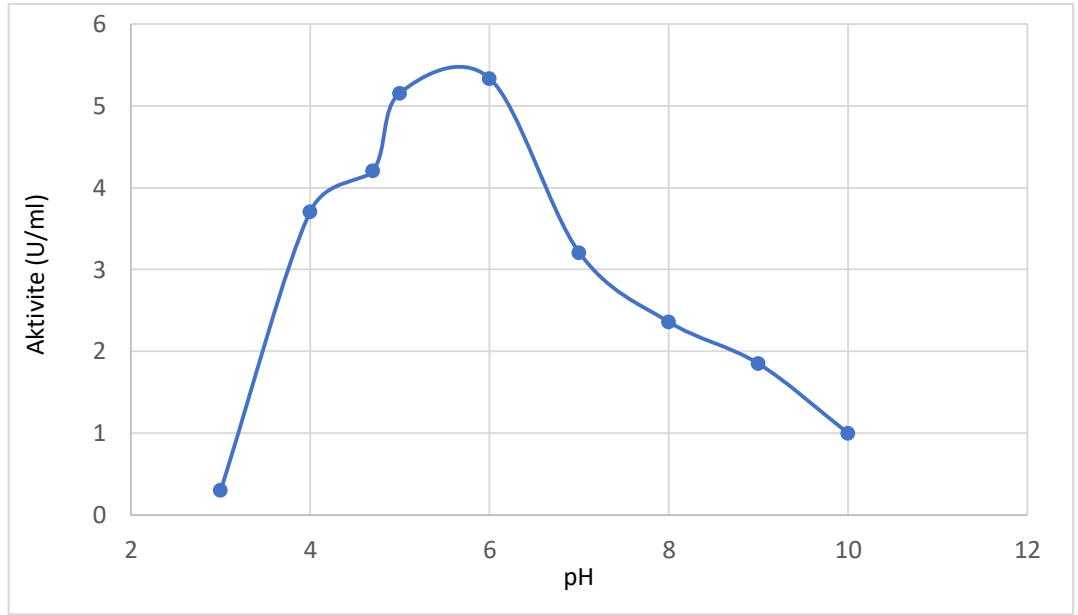
Tablo 4.23: Ham rekombinant 5-1-5'in farklı substratlara özgü aktivitesi.

Substrat	Aktivite (U/ml)
Wheat arabinoxylan (Megazyme-medium viscosity)	26,71
Birchwood xylan (Sigma)	29,05
Beechwood xylan (Serva)	30,66
Beechwood xylan (Sigma)	32,85

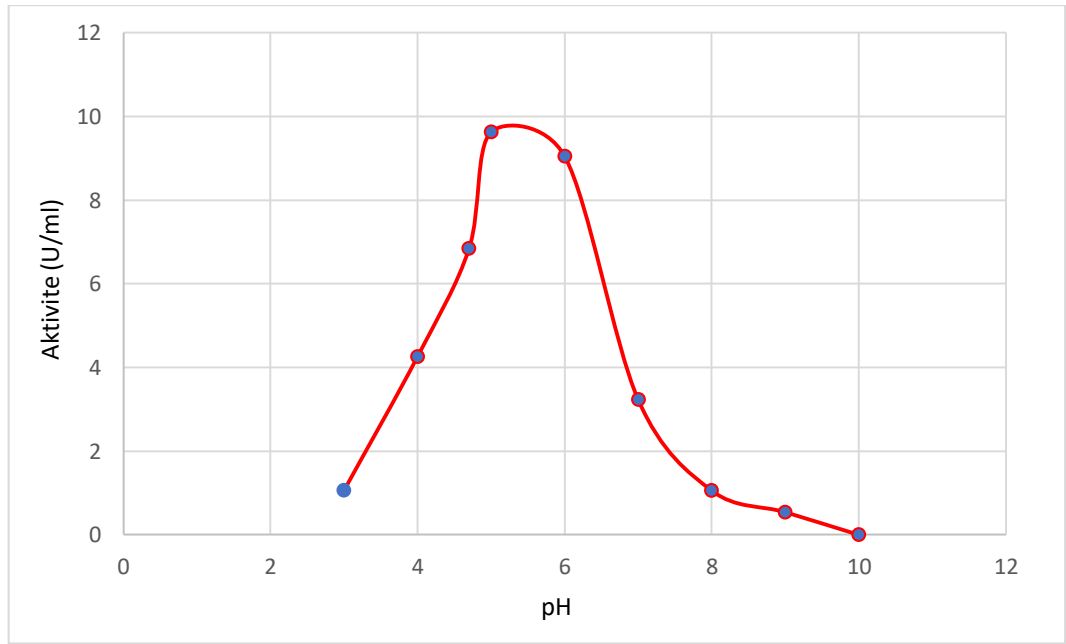
Her iki ham enzimin de beechwood xylana (Sigma) spesifisitesi diğerlerine göre bir miktar yüksek olmuştur.

4.11.8.6. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant Ksilanaz Enziminin Optimum pH Sonuçları

Kısmi saf rE2 ve saf rE1 rekombinant ksilanazlarının optimum pH değeri belirlenmiştir (Şekil 4.29) (Şekil 4.30).



Şekil 4.29: Kısmi saf (rE2) ksilanazın optimum pH profili.

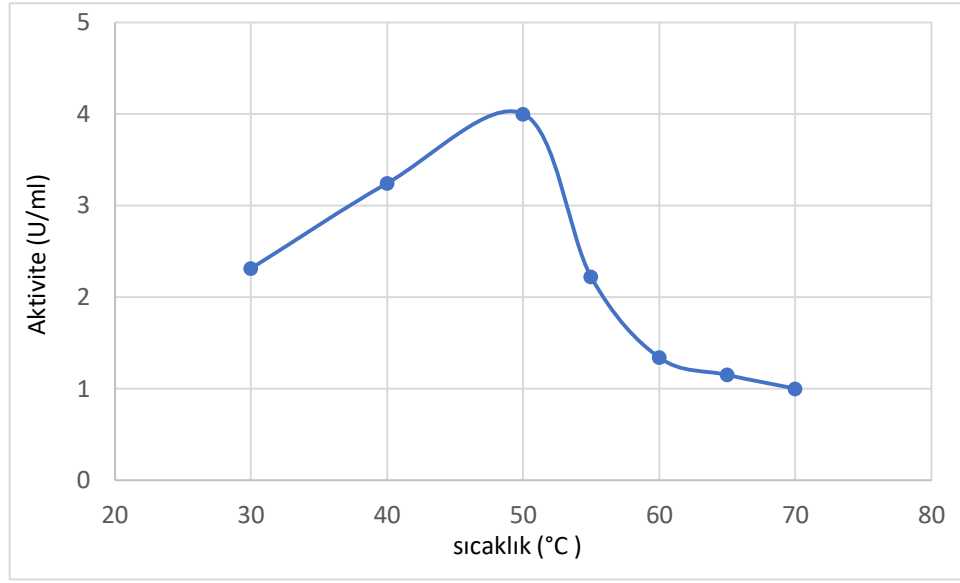


Şekil 4.30: Saf (rE1) ksilanazın optimum pH profili.

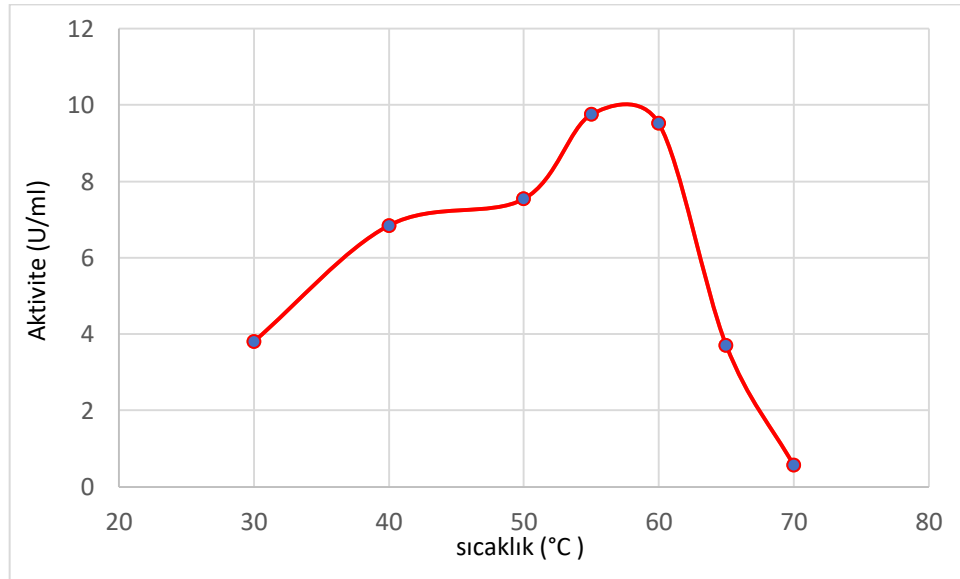
Kısmi saf (rE2) rekombinant enzimin optimum pH'ı 6, saf (rE1) rekombinant enzimin optimum pH'ı 5 olarak belirlenmiştir.

4.11.8.7. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant Ksilanaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları

Kısmi saf rE2 ve saf rE1 rekombinant ksilanazlarının optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir (Şekil 4.31) (Şekil 4.32).



Şekil 4.31: Kısmi saf (rE2) ksilanazın optimum sıcaklık profili.



Şekil 4.32: Saf (rE1) ksilanazın optimum sıcaklık profili.

Kısmi saf (rE2) rekombinant enzimin optimum sıcaklığı 50 °C, saf (rE1) rekombinant enzimin optimum sıcaklığı 55 °C olarak belirlenmiştir.

4.11.8.8. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant Ksilanaz Enziminin Termal Stabilite Sonuçları

Kısmi saf rE2 ve saf rE1 rekombinant ksilanazlarının termal stabilite değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.24) (Tablo 4.25).

Tablo 4.24: Kısmi saf (rE2) ksilanazın farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.

Örnek adı	Sıcaklık (°C)	Kalan aktivite (%)
Kısmi saf (rE2) rekombinant ksilanaz	30	100
	40	100
	50	34
	60	1
	70	0

Tablo 4.25: Saf (rE1) ksilanazın farklı sıcaklıklardaki kararlılığı.

Örnek adı	Sıcaklık (°C)	Kalan aktivite (%)
Saf (rE1) rekombinant ksilanaz	30	100
	40	100
	50	96
	60	0,7
	70	0

Kısmi saf (rE2) rekombinant ksilanaz 50 °C’de aktivitesinin yarıdan çoğunu yitirmekte ve bu aktivite 60 °C’de neredeyse tamamen kaybolmaktadır. Saf (rE1)

rekombinant ksilanaz ise 50 °C’de aktivitesi neredeyse tamamen korumakta ama o da kısmi saf rE2 gibi 60 °C’de aktivitesinin neredeyse tamamını kaybetmektedir.

4.11.8.9. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant Ksilanaz Enziminin pH Kararlılığı Sonuçları

Kısmi saf rE2 ve saf rE1 rekombinant ksilanazlarının pH stabilite değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.26) (Tablo 4.27).

Tablo 4.26: Kısmi saf (rE2) ksilanazın farklı pH’lardaki kararlılığı.

Örnek adı	pH	Kalan aktivite (%)
Kısmi saf (rE2) rekombinant ksilanaz	3	7
	4	20
	4,7	100
	5	149
	6	58
	7	17
	8	8,5
	9	0
	10	0

Tablo 4.27: Saf (rE1) ksilanazın farklı pH’lardaki kararlılığı.

Örnek adı	pH	Kalan aktivite (%)
Saf (rE1) rekombinant ksilanaz	3	7
	4	38
	4,7	100
	5	144
	6	127
	7	42
	8	16
	9	6
	10	0

Her iki enzimin de pH 5’de 30 dakika inkübasyon sonunda en yüksek stabilite değerine ulaştığı tespit edilmiştir.

4.11.8.10. Kısmi Saf (rE2) ve Saf (rE1) Rekombinant Ksilanaz Enziminin Substrat Spesifite Sonuçları

Kısmi saf rE2 ve saf rE1 rekombinant ksilanazlarının substrat spesifite değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.28) (Tablo 4.29).

Tablo 4.28: Kısmi saf (rE2) ksilanazın farklı substratlara özgü aktivitesi.

Substrat	Aktivite (U/ml)
Wheat arabinoxylan (Megazyme-medium viscosity)	4,94
Birchwood xylan (Sigma)	4,45
Beechwood xylan (Serva)	4,66
Beechwood xylan (Sigma)	5,25

Tablo 4.29: Saf (rE1) ksilanazın farklı substratlara özgül aktivitesi.

Substrat	Aktivite (U/ml)
Wheat arabinoxylan (Megazyme-medium viscosity)	6,84
Birchwood xylan (Sigma)	5,89
Beechwood xylan (Serva)	6,59
Beechwood xylan (Sigma)	6,51

Kısmi saf rE2'nin en yüksek aktivite verdiği substrat beechwood xylan (Sigma), saf rE1'in en yüksek aktivite verdiği substrat wheat arabinoxylan (Megazyme-medium viscosity) olmuştur.

5. SONUÇ

Enzimler yaşayan organizmalar için hayati derecede öneme sahiptir. Çok fazla çeşidi olan enzimler farklı sektörlerde kullanılmaktadır. Endüstriyel enzimlerden biri olan ksilanaz, tahıllardan gelen olumsuz etkileri ortadan kaldırmak ve daha kaliteli bir ürün elde etmek için gıda sektöründe (ekmek yapımında) kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak ksilanaz üretimi için mikrobiyal kaynaklı üretimler yapılmaktadır. Mikrobiyal kaynaklardan olan *A. niger*'in ürettiği ksilanazın miktarı, hücrenin bozulması gerçekleşmeden ksilanazı ortama doğrudan salgıladığı için, bakterilerde, mayalarda ve aktinomisetlerde bulunanlardan daha yüksektir. Bu sebeple *Aspergillus* ticari ksilanaz üretimi için tercih edilen bir konakçıdır. Ksilanazı daha çok üretmek ve endüstriyel anlamda geliştirebilmek için küf kökenli genlerin klonlanıp çalışması sağlanmaktadır. Fungal ksilanazlara ait genlerin homolog ve heterolog sistemlere aktarılmasıyla elde edilen rekombinant ksilanazlar endüstriyel üretim için önemlidir. Enzimlerin endüstride kullanılabilirliğinin önemli bir etkeni de enzimin maliyeti ve üretim koşullarıdır. Enzim üretimi yüksek maliyetten olumsuz olarak etkilenmektedir. Ksilanaz gibi enzimler satın alınabilmekte ama bu yüksek bir maliyete sebep olmaktadır. Ayrıca kullanılacak enzim farklı koşullarda (sıcaklık, pH vs.) optimum şekilde aktiflik göstermektedir.

ARDEB 1003 destekli 115O052 numaralı (Alt proje numarası 115O053) proje kapsamında ekmekçilikte kullanıma yönelik bir ksilanaz geliştirebilmek ve uygun verimle kontrollü olarak üretebilmek üzere rekombinant suş geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasında rekombinant suş kullanılarak laboratuvar ölçeğinde üretilen enzimin düşük maliyetli olması ve yüksek seviyede üretilmesi için enzimin optimizasyonu ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Eldeki transformantların öncelikle ksilanazB genini taşıyıp taşımadığı kontrol edilmiştir. KsilanazB geni taşımayan transformantlar taramalara alınmamıştır. Birincil taramalar kapsamında transformantların, ksilanaz substratı olan arabinoksilanı içeren azo boyalı tabletlere verdiği tepkiler gözlenmiştir. Plate içinde transformantın substratı parçalamasına bağlı olarak oluşan renkli difüzyonun çapı ölçülmüştür. Belirli büyüklüğün (32 mm) altında kalan transformantlar ikincil taramalara alınmamıştır. İkincil taramalar ise alıcı suşun sentetik besiortamında aktivitesinin belirlenmesiyle başlamıştır. Ardından transformantların verdiği aktiviteye arabinoksilan içeren sentetik besiortamında bakılmış ve alıcının verdiği aktiviteden yüksek olan

transformantlar içinden ikinci bir seçmeyle en iyi transformantlar olarak 5-1-5 ve 12-1-7 seçilmiştir. Sentetik besiortamı çalışmalarında arabinoksilan varlığında, 7 günlük transformantta % 0,2 maltoz içeren ortamda en yüksek aktivite alınmıştır. Şeker optimizasyonu amaçlı sentetik besiortamında, arabinoksilan eklenmediği durumda, sükroz, maltodekstrin, maltoz ve yüksek yüzdede maltoz denemeleri gerçekleştirilmiş ancak yeterli aktivite alınamamıştır. Besiortamı optimizasyonu kapsamında ise Levasseur ve melaslı besiortamı denemelerinde düşük aktiviteler alınmış, malt çimli besiortamında ise en yüksek aktiviteye ulaşılmıştır. Buradan hareketle arabinoksilan ya da ksilan içeren substratlı ortamda aktivitenin arttığı görülmüştür. Sentetik besiortamı ile masraflı olması ve büyük ölçekli çalışmalar için uygun olmaması nedeniyle devam edilmemiştir. Bunun yerine daha ucuz bir substrat olan ve daha yüksek aktiviteye ulaşılan malt çimli besiortamlarında çalışılmıştır. Malt çimli besiortamında sırayla çalkalamalı, statik ve katı kültür üretimleri yapılmıştır. Malt çimli çalkalamalı ortamda 2. günde 20 U/ml, malt çimli statik kültürde 4. günde 39 U/ml alınırken, malt çimli katı kültürde 2. günde 81 U/ml aktivite alınmıştır. Malt çimli ortamda %0,4 maltoz eklendiğinde ve katı kültür fermentasyonu yapıldığında en yüksek aktivite alınmıştır. Enzimin ekmeğe toz girmesinde oluşabilecek kaybı görmek için malt çimli statik ve katı kültür üretimlerinde elde edilen enzimin liyofilizasyonu yapılmış ve enzimin büyük oranda (% 94, % 96) etkinliğini koruduğu görülmüştür. Enzimin saflaştırma adımlarında uygulanan optimizasyon sonucunda HiScreen Capto DEAE uygun kromatografi yöntemi olarak belirlenmiştir. Burada kolona verilen konsantre ham rekombinant enzimden iki farklı boyutta ksilanaz elde edilmiştir. 33,1 kDa boyutunda olan saflaştırılmış enzim rE1, 21,6 kDa boyutunda olan kısmi saflaştırılmış enzim rE2 olarak adlandırılmıştır.

Rekombinant ksilanazın karakterizasyon işlemleri önce ham 5-1-5 ve 12-1-7 ile gerçekleştirilmiştir. Ham enzimin karakterizasyonunda 12-1-7 için optimum pH 6, optimum sıcaklık 50 °C; 5-1-5 için optimum pH 5, optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir. Termal stabilite açısından incelendiğinde her iki enzimde de 70 °C'de 30 dakika inkübasayonda enzim aktivitesi kaybolmaktadır. Ham enzimlerin pH stabilitelerine bakıldığında sonuçlar optimum pH değerleriyle uyumlu olmakla beraber 12-1-7'de pH 6'da 30 dakika inkübasyon sonrası, 5-1-5'de pH 5'de 30 dakika inkübasyon sonrası en yüksek stabilite değerine ulaşmıştır. Substrat spesifitesine bakıldığında ise her iki enzimde de spesifite beechwood ksilan (Sigma)'dan sonra arabinoksilanda daha yüksek hale gelmiştir. Substrat spesifite sonuçlarında da

görüldüğü gibi wheat arabinoksilandaki daha düşük aktivite değerleri literatürde de mevcuttur [McCleary et al., 2015]. Beechwood xylanın ksiloz içeriği wheat arabinoksilandan daha fazla olması nedeniyle kısmen daha iyi enzim aktivite değeri vermektedir. Bununla beraber ekmekçilikte hammaddeden gelen ksilanlar dikkate alındığından, buğday ksilanına özgünlüğünün çalışma sınırları içinde yeterli olduğu kabul edilmiştir.

Rekombinant ksilanazın karakterizasyon işlemleri elde edilen saf rE1 ve kısmi saf rE2 ile devam etmiştir. Saf rE1 için optimum pH 5, optimum sıcaklık 55 °C; kısmi saf rE2 için optimum pH 6, optimum sıcaklık 50 °C olarak belirlenmiştir. Termal stabilite açısından incelendiğinde her iki enzimde de 60 °C’de 30 dakika inkübasyon sonucunda aktivite neredeyse tamamen kaybolmaktadır. pH stabilite değerlerine bakıldığında her iki saf enzim için de pH 5’da 30 dk inkübasyon sonrası en yüksek stabilite değerine ulaşılmıştır. Saf rE1’in wheat arabinoksilana spesifitesi, kısmi saf rE2’nin ise beechwood ksilana (Sigma) spesifitesi daha yüksek olmuştur.

Üretim denemeleri sonucunda ksilanaz enzimi başarılı bir şekilde üretilmiş, optimum üretim koşulları belirlenmiş ve enzimin kısmi saflaştırılması yapılmıştır. Buradan elde edilen sonuçlar büyük ölçekli üretim denemelerinde kullanılacaktır.

Diğer çalışmalara bakıldığında Fowler ve arkadaşları glaA geninin ksiloz varlığında represe olduğunu, ortamda tek karbon kaynağı maltoz olduğunda ise yüksek bir indüklemeye olduğunu gösterdiler [Fowler et al., 1990]. Verdoes ve arkadaşları *A.niger*’de glaA geninin yüksek ekspresyonu için iki homolog bölge olduğunu ve maltozun iyi bir indükleyici olduğunu gösterdiler [Verdoes et al., 1994]. Ganzlin ve arkadaşları glaA promotörü üzerinde maltoz ve maltodekstrininin pozitif etkilerini göstermiştir [Ganzlin et al., 2008]. Levasseur ve arkadaşları *A.niger* BRFM281 suşunda xynB genini 23 kDa büyüklüğünde bulup, optimum pH’sı 5,5 ve optimum sıcaklığı 50 °C olarak göstermiştir [Levasseur et al., 2005].

A.niger B03 suşundan alınan *Xln-2* geninden elde edilen 21 kDa büyüklüğündeki enzimin biyokimyasal özellikleri de rapor edilmiştir. Elde edilen ksilanazın optimum sıcaklığı 55 °C, optimum pH değeri 5 olarak gösterilmiştir [Dobrev et al., 2012].

Liu ve arkadaşları *A.niger* ATCC 1015’den elde edilen ksilanazB genini *Komagataella phaffii*’e klonlamış, ekspresyon sonucu üretilen enzimin optimum sıcaklığını 55 °C, optimum pH değerini 5 olarak göstermiştir [Liu et al., 2018].

Kısacası aynı ya da benzer genlerden elde edilen ksilanaz enzimlerinin çalışıldığı amaçlara göre farklı parametreler için gösterdiği özellikler farklıdır. Bu tez çalışması sonucunda yerel kültür kaynağından elde edilen ksilanazB geni taşıyan rekombinantların, optimum üretim koşulları belirlenmiş, kısmi saflaştırma sonunda da enzimin bazı özellikleri tespit edilerek literatürde yer alan diğer ksilanaz üreticilerden farkları ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

- Ahmad Z., Butt M. S., Ahmed A., Riaz M., Sabir S. M., Farooq U., Rehman F. U., (2014), "Effect of *Aspergillus niger* xylanase on dough characteristics and bread quality attributes", *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2445–2453.
- Ahmed S., Riaz S., Jamil A., (2009), "Molecular cloning of fungal xylanases: an overview", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 19–35.
- Altınel B., Tuluk K., (2018), "Ksılanaz İnhibitörleri ve Ekmek Üretimindeki Etkileri", *Tralleis Elektronik Dergisi*, 2, 66–79.
- An X., Ding C., Zhang H., Liu T., Li J., (2019), "Overexpression of amyA and glaA substantially increases glucoamylase activity in *Aspergillus niger*", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 00, 1–7.
- Aslam N., Latif F., Ahmed S., Jamil A., (2009), "Molecular Cloning of β -glucosidase Gene from *Trichoderma harzianum*", *Biotechnology(Faisalabad)*, 3, 63–66.
- Barton L. L., Georgi C. E., Lineback D. R., (1972), "Effect of maltose on glucoamylase formation by *Aspergillus niger*", *Journal of Bacteriology*, 111, 771–777.
- Bayrak K., (2019), "Cloning, Expression and Characterization of the *Aspergillus niger* xynB Gene", *Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi*.
- Beaugrand J., Chambat G., Wong V. W. K., Goubet F., Rémond C., Paës G., Benamrouche S., Debeire P., O'Donohue M., Chabbert B., (2004), "Impact and efficiency of GH10 and GH11 thermostable endoxylanases on wheat bran and alkali-extractable arabinoxylans", *Carbohydrate Research*, 339, 2529–2540.
- Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S., (2017), "Microbial xylanases and their industrial applications: a review", *Biochemical and Cellular Archives*, 17, 353–360.
- Borsa B. A., Özgün G., Houbraken J., Ökmen F., (2015), "The First Case of Persistent Vaginitis Due to *Aspergillus protuberus* in an Immunocompetent Patient", *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49pp. 130–134.
- Butt M. S., Tahir-Nadeem M., Ahmad Z., Sultan M. T., (2008), "Xylanases and their applications in baking industry", *Food Technology and Biotechnology*, 46, 22–31.
- Chang S., Guo Y., Wu B., He B., (2017), "Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E.coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste", *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 249–256.
- Collins T., Gerday C., Feller G., (2005), "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases", *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3–23.
- Courtin C. M., Delcour J. A., (2002), "Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making", *Journal of Cereal Science*, 35, 225–243.
- Crepin V. F., Faulds C. B., Connerton I. F., (2004), "Functional classification of the microbial feruloyl esterases", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63, 647–652.
- Cunha D. Q. B., C. C., Gama A. R., Cintra L. C., Bataus L. A. M., Ulhoa C. J., (2018), "Improvement of bread making quality by supplementation with a recombinant

xylanase produced by *Pichia pastoris*" Plos One, 13, 1–14.

De Vries R. P., Kester H. C. M., Poulsen C. H., Benen J. A. E., Visser J., (2000), "Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides", Carbohydrate Research, 327, 401–410.

Decelle B., Tsang A., Storms R. K., (2004), "Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4- β -xylanases", Current Genetics, 46, 166–175.

Dobrev G., Zhekova B., (2012), "Purification and characterization of endoxylanase xln-2 from *aspergillus niger* B03", Turkish Journal of Biology, 36, 7–13.

Fleiner A., Dersch P., (2010), "Expression and export: Recombinant protein production systems for *Aspergillus*", Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 1255–1270.

Fowler T., Berka R. M., Ward M., (1990), "Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*", Current Genetics, 18, 537–545.

Ganzlin M., Rinas U., (2008), "In-depth analysis of the *Aspergillus niger* glucoamylase (*glaA*) promoter performance using high-throughput screening and controlled bioreactor cultivation techniques", Journal of Biotechnology, 135, 266–271.

Ghosh A., Chatterjee B., Das A., (1990), "Induction and catabolite repression of high-affinity glucoamylase in *Aspergillus terreus* strain 4", Journal of General Microbiology, 136, 1307–1311.

Gouka R. J., Hessing J. G. M., Punt P. J., Stam H., Musters W., Van Den Hondel C., (1996), "An expression system based on the promoter region of the *Aspergillus awamori* 1,4- β -endoxylanase A gene", Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 28–35.

Graaff L. H., (1989), "The structure and expression of the pyruvatekinase gene of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*", Doktora Tezi, Bibliotheek van Wageningen University.

Güner K., Dağlıoğlu O., (2008), "Ksılanaz Enziminin Ekmek Yapımında Kullanımı", Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23/05/2008, Erzurum, pp. 227–228.

Hata Y., Kitamoto K., Gomi K., Kumagai C., Tamura G., (1992), "Functional elements of the promoter region of the *Aspergillus oryzae glaA* gene encoding glucoamylase", Current Genetics, 22, 85–91.

Heinen P. R., Bauermeister A., Ribeiro L. F., Messias J. M., Almeida P. Z., Moraes L. A. B., Vargas-Rechia C. G., Oliveira A. H. C., Ward R. J., Filho E. X. F., Kadowaki M. K., Jorge J. A., Polizeli M. L. T. M., (2018), "GH11 xylanase from *Aspergillus tamarii* Kita: Purification by one-step chromatography and xylooligosaccharides hydrolysis monitored in real-time by mass spectrometry", International Journal of Biological Macromolecules, 108, 291–299.

Izidoro S. C., Knob A., (2014), "Production of xylanases by an *Aspergillus niger* strain in wastes grain", Acta Scientiarum Biological Sciences, 36, 313.

Izydorczyk M. S., Biliaderis C. G., (1995), "Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties", Carbohydrate Polymers, 28, 33–48.

İnce E., (2006), "Ksılanaz Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin İzolasyonları ve Enzimlerinin Özelliklerinin Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi,

Ankara Üniversitesi.

James J. A., Lee H. B., (1997), "Glucoamylases: Microbial Sources, Industrial Applications and Molecular Biology - A Review", *Journal of Food Biochemistry*, 21, 1–52.

Jaybhaye M. M., Bhalerao S. A., (2016), "Role of Bioinoculants in the Biodegradation of Lingo-Cellulosic Waste (Bagasse)", *Asian Journal of Science and Technology*, pp.2830-2833.

Kaneko S., Shimasaki T., Kusakabe I., (1993), "Purification and Some Properties of Intracellular α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16", *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 2091.

Kanimozhi K., Nagalakshmi P. K., (2014) "Xylanase production from *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation using Agricultural waste as substrate", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 437–446.

Kıran Ö. E., Çömlekçioğlu U., Dostbil N., (2006), "Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları", *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9, 12–19.

Korona B., Korona D., Bielecki S., (2006), "Efficient expression and secretion of two co-produced xylanases from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* directed by their native signal peptides and the *Saccharomyces cerevisiae* α -mating factor", *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 683–689.

Levasseur A., Asther M., Record E., (2005), "Overproduction and characterization of xylanase B from *Aspergillus niger*", *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 177–183.

Liu T., Zhang J., (2018), "High-level expression and characterization of *Aspergillus niger* ATCC 1015 xylanase B in *Komagataella phaffii*", *Applied Biological Chemistry*, 61, 373–381.

Lu X., Sun J., Nimtz M., Wissing J., Zeng A. P., Rinas U., (2010), "The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate", *Microbial Cell Factories*, 9, 1–13.

Maciel G. M., Porto L., Vandenberghe D. S., Windson C., Haminiuk I., Fendrich R. C., Eli B., Bianca D., Quintella T., Pandey A., Soccol C. R., (2008), "Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State Fermentation Using Statistical Experimental Designs", *Food Technology and Biotechnology*, 46, 183–189.

McCleary B. V., McGeough P., (2015), "A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177, 1152–1163.

Minetoki T., Gomi K., Kitamoto K., Kumagai C., Tamura G., (1995), "Characteristic Expression of Three Amylase-encoding Genes, *agdA*, *amyB*, and *glaA* in *Aspergillus oryzae* Transformants Containing Multiple Copies of the *agdA* Gene", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 2251–2254.

Motta F. L., Andrade P., Santana M. H. A., (2016), "A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications", *Intech*, i, 13.

Özberk F., Karagöz A., Özberk İ., Atlı A., (2016), "Buğday Genetik Kaynaklarından Yerel ve Kültür Çeşitlerine; Türkiye’de Buğday ve Ekmek", *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25, 218–233.

- Paës G., Berrin J. G., Beaugrand J., (2012), "GH11 xylanases: Structure function properties relationships and applications", *Biotechnology Advances*, 30, 564–592.
- Parameswaran B., Varjani S., Raveendran S., (2019), "Enzymes in Industrial Food Processing", *Green Bio-processes*.
- Pedersen H., Beyer M., Nielsen J., (2000), "Glucoamylase production in batch, chemostat and fed-batch cultivations by an industrial strain of *Aspergillus niger*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 272–277.
- Pel H. J., de Winde J. H., Archer D. B., Dyer P. S., Hofmann G., Schaap P. J., Turner G., de Vries R. P., Albang R., Albermann K., Andersen M. R., Bendtsen J. D., Benen J. A. E., van den Berg M., Breestraat S., Caddick M. X., Contreras R., Cornell M., Coutinho P. M., (2007), "Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88", *Nature biotechnology*, 25, 221–231.
- Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S., (2005), "Xylanases from fungi: Properties and industrial applications", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 577–591.
- Rajoka M. I., Yasmeen A., (2005), "Induction, and production studies of a novel glucoamylase of *Aspergillus niger*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 179–187.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V., (1998), "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62, 597–635.
- Ruanglek V., Sriprang R., Ratanaphan N., Tirawongsaroj P., Chantasigh D., Tanapongpipat S., Pootanakit K., Eurwilaichitr L., (2007), "Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*", *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 19–25.
- Ruijter G. J. G., Visser J., (1997), "Carbon repression in *Aspergilli* MiniReview", *FEMS microbiology letters*, 151, 103–114.
- Sargin S., (2003), "Katı Kültür Fermantasyonu İle Ksilanaz Enzim Üretiminin Optimum Koşullarının Belirlenmesi", *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J., Van Dijck P., (2002), "On the safety of *Aspergillus niger* - A review", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 426–435.
- Sedmak J. J., Grossberg S. E., (1977), "A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250", *Analytical Biochemistry*, 79, 544–552.
- Simoës M. L. G., Tauk-Tornisielo S. M., Tapia D. M. T., (2016), "Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi", *African Journal of Biotechnology*, 8, 6317–6326.
- Singh S., Mishra S., Yadav A. N., (2019), "Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi", Chapter 12, "Fungal Xylanases: Sources, Types, and Biotechnological Applications", Springer.
- Somogyi M., (1952), "Notes on Sugar Determination", *J. Biol. Chem.* 195(1): 19–23.

- Sweden U., N. J. P., (2018), "Gel filtration: principles and methods", 18-1022-18 Edition, Amersham Pharmacia Biotech.
- Takahashi Y., Kawabata H., Murakami S., (2013), "Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII", SpringerPlus, 2, 1–11.
- Tamayo Ramos J. A., Barends S., Verhaert R. M., de Graaff L. H., (2011), "The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes", Microbial Cell Factories, 10, 78.
- Tuncer M., (2008), "Protein Saflaştırma - Kramatografik Teknikler 1", Mersin Üniversitesi.
- Uffen R. L., (1997), "Xylan degradation: A glimpse at microbial diversity", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19, 1–6.
- van Munster J. M., Daly P., Delmas S., Pullan S. T., Blythe M. J., Malla S., Kokolski M., Noltorp, E. C. M., Wennberg K., Fetherston R., Beniston R., Yu X., Dupree P., Archer D. B., (2014), "The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*". Fungal Genetics and Biology, 72, 34–47.
- Verdoes J. C., Punt P. J., Stouthamer A. H., van den Hondel C. A. M. J. J., (1994), "The effect of multiple copies of the upstream region on expression of the *Aspergillus niger* glucoamylase-encoding gene", Gene, 145, 179–187.
- Web 1, (2018), <https://www.gidahatti.com/2018de-de-cok-ekmek-tuketecegiz-92540/>, (Erişim Tarihi: 26/08/2018).
- Williamson G., Faulds C. B., Kroon P. A., (1998), "Specificity of Ferulic Acid (feruloyl) esterases", Biochem Soc Trans, 26(2):205-9.
- Wilson K., Walker J., (2010), "Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology", 7th Edition, Cambridge University Press.
- Withers J. M., Swift R. J., Wiebe M. G., Robson G. D., Punt P. J., van den Hondel C. A. M. J. J., Trinci A. P. J., (1998), "Optimization and stability of glucoamylase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* in chemostat culture", Biotechnology and Bioengineering, 59, 407–418.
- Zanoelo F. F., Polizeli M. D. L. T. D. M., Terenzi H. F., Jorge J. A., (2004), "Purification and biochemical properties of a thermostable xylose-tolerant β -D-xylosidase from *Scytalidium thermophilum*", Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 31, 170–176.

ÖZGEÇMİŞ

Cüneyt AKDENİZ 1992 yılında Denizli’de doğdu. 2011 yılında başladığı Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü 2016 yılında tamamlayarak aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. 2017 Mayıs ayında UNEN projesine katılmış ve 22 ay boyunca çalışmalarda yer almıştır.