



# Topraktan Ksilanaz Üreten Mikroorganizmaların Taranması ve Ksilanazın Kısmi Karakterizasyonu

*Screening of Xylanase Producing Microorganisms from Soil And Partial Characterization of the Xylanase*

Aytaç Kocabaş<sup>\*</sup>, Nermin Gümüştas, Serap Gönek

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye

## Öz

Dünya üzerindeki bitki kaynaklı lignoselülozik biyokütle miktarı  $10^{12}$  ton kadar olup, sadece yenilenebilir değil çok miktarda bulunan da bir kaynaktır. Ksilan, doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci polisakkarittir ve parçalanmasından ksilanaz sorumludur. Ksilanazın endüstriyel kullanım alanı gıda endüstrisinden tekstil endüstrisine, kağıt endüstrisinden biyoyakıt üretimine kadar geniş bir yelpazeye yayılmıştır. Her geçen gün farklı özelliklere sahip ksilanazların bulunmasıyla ticari kapasitesi de artmaktadır. Bu sebepten dolayı bu çalışmada topraktan ksilanaz pozitif mikroorganizmaların taranması, lignoselülozik materyaller üzerinde denenmesi ve seçilen mikroorganizmaya ait ksilanazın kısmi karakterizasyonu amaçlanmıştır. Tarama işlemi kongo kırmızısı boyama metoduyla gerçekleştirilmiştir. Tarama sonrası 11 mikroorganizma ksilan içeren sıvı kültür ortamına ekilmiş ve en yüksek ksilanaz aktivitesine (73 IU/mL) sahip mikroorganizma *Bacillus spp.* olarak tanımlanmıştır. Lignoselülozik materyaller olarak ot, mısır koçanı, ayçiçek sapı ve buğday samanı arasında en yüksek aktiviteyi buğday samanı üzerinde 37 IU/mL olarak göstermiştir. Biyokimyasal karakterizasyon sonrası, ksilanazın yüksek derecede alkali koşullara dayanıklı olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, özellikle kağıt endüstrisi için aranan bir özelliğe sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** Alkali dayanıklı, *Bacillus*, Biyokimyasal karakterizasyon, Ksilanaz, Lignoselüloz, Metal etkileşimi

## Abstract

Plant related lignocellulosic biomass amount is about  $10^{12}$  ton in all over the world, which is a not only renewable but also abundant resource. Xylan is the second most plentiful polysaccharide after cellulose and xylanase is responsible for its degradation. Industrial application of xylanase is widely distributed from food industry to textile industry, from paper and pulp industry to biofuel production. Nowadays, its commercial potential is increasing by finding new xylanases having different features. Therefore, this study was aimed screening of xylanase positive microorganisms from soil, testing on lignocellulosic materials and partial characterization of xylanase from chosen microorganism. Screening process was performed by congo red staining methods. After screening, 11 microorganisms were incubated in the liquid culture medium including xylan and the microorganism having highest xylanase activity (73 IU/mL) was identified as *Bacillus spp.*. The highest activity was determined as 37 IU/mL on wheat straw among grass, corn cob, sunflower stalk as lignocellulosic materials. After biochemical characterization, the xylanase is found as highly alkali stable. Thus, it has the feature especially qualifiable for pulp and paper industry.

**Keywords:** Alkali stable, *Bacillus*, Biochemical characterization, Xylanase, Lignocellulose, Metal interaction

## 1. Giriş

Hemiselüloz düşük moleküler ağırlığa sahip dünyada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci heteropolisakkarit olarak lignoselülozik biyokütlenin %30 – 35'ini oluşturmaktadır (Sargın ve Öngen 2003, Sutay Kocabas vd. 2015). Hemi-

selüloz bitkilerde bulunan yapısal bir materyal olup ligninle birlikte bitkilerin sert yapısını oluşturur (Kallel vd. 2015, Zhang ve Viikari 2014). Hemiselülozun en temel bileşenini ksilan meydana getirir. Ksilan, 100- 200 adet beş karbonlu ksiloz monosakkaritinin birbirine  $\beta$ -1,4 glikozidik bağla bağlanmasıyla oluşmuş bir polisakkarittir (Alves-Prado vd. 2010, Neves vd. 2011). Bu polisakkaritin doğada parçalanmasından sorumlu ana enzim ksilanazdır (1,4- $\beta$ -D-ksilan hidrolaz, E.C.3.2.1.8). Ksilanaz doğada bakterilerden basilluslar başta olmak üzere ve küfler arasında hemen hemen tüm safrofitler tarafından üretilmektedir (Robl vd. 2013,

\*Sorumlu yazarın e-posta adresi: [aytackocabas@gmail.com](mailto:aytackocabas@gmail.com)

Aytaç Kocabaş <sup>\*</sup> [orcid.org/0100-0001-7622-1932](https://orcid.org/0100-0001-7622-1932)  
Nermin Gümüştas <sup>\*</sup> [orcid.org/0000-0002-0380-9492](https://orcid.org/0000-0002-0380-9492)  
Serap Gönek <sup>\*</sup> [orcid.org/0000-0003-0344-5171](https://orcid.org/0000-0003-0344-5171)

Sutay Kocabaş ve Ozben 2014). Ksilanazlar genel olarak iki glikozidik hidroliz aile grubunda toplanmıştır, Grup 10 (Grup F) ve Grup 11 (Grup G). Bunlar haricinde 5, 8 ve 43 gruplarında da ksilanazlar bulunmaktadır. Grup 10'a ait olanların genel özellikleri 30kDa'dan daha büyük moleküler ağırlığa ve düşük izoelektrik noktaya (İN) sahip olmalarıdır. Grup 11 ksilanazlarının özellikleri ise yüksek İN ve 19 ila 25 kDa moleküler ağırlığa sahip olmalarıdır (Kallel vd. 2015, Sutay Kocabaş vd. 2015, Wu vd. 2013).

Ksilanaz hücre dışı salgılanan ve indüklenebilen bir enzimdir ve bir çok canlı grubu tarafından sentezlenmektedir (Robl vd. 2013). Bu canlıların başını bakteriler ve küfler çekmekle birlikte protozoalar, böcekler, omurgasızlar ve hatta bitkilerin tohumları tarafından da çimlenme aşamasında sentezlenmektedir (Gowdhaman vd. 2014). Ksilanazlar günümüzde biyoteknolojik uygulama alanlarının çok geniş olması sebebiyle özellikle biyo-yakıt üretimi üzerine yapılan çalışmalarda odak noktası haline gelmiş bir enzimdir. Ksilanazlar dünya çapında yaklaşık 200 milyon dolarlık bir ticari kapasiteye sahiptirler (Kallel vd. 2015).

Ksilanazlar sahip oldukları özelliklere göre yem endüstrisinden tekstil endüstrisine, gıda endüstrisinden kağıt endüstrisine kadar geniş bir alanda uygulama kapasitesine sahiptir (Alves-Prado vd. 2010, Abdullah vd. 2015, Gowdhaman vd. 2014, Kocabaş vd. 2011, Wu vd. 2013). Kağıt endüstrisinde biyo-beyazlatmada görev alarak çevresel kirliliği azaltmakta bunun yanında kimyasal madde kullanımına göre daha ucuz bir maliyet gerektirmektedir. Yem sanayiinde, hayvanların sindirimini kolaylaştırarak yemleme verimini artırmaktadır. Ksilanazın kullanıldığı bir diğer endüstriyel alan fırıncılıktır. Bu alanda ksilanaz, hamurun su tutma kapasitesini ve glutenin elastikiyeti ve yapısını geliştirerek ekmeğin kalitesini artırmaktadır. Meyve suyu sanayiinde ise pektinaz ile birlikte berraklaştırma sürecinde görev almaktadır. Dolayısıyla farklı alanlarda farklı amaçlar için kullanılmakta ve her bir alan için farklı özellikler aranmaktadır. Bu sebepten dolayı, farklı endüstriyel alanlarda farklı özelliklere sahip ksilanaz arayışları sürmektedir (Wu vd. 2013). Kağıt endüstrisi için düşük moleküler ağırlığa sahip ve alkali ksilanazlar aranırken biyo-yakıt üretimi için asidik ve yüksek sıcaklığa dayanıklı ksilanazlar aranmaktadır (Jiang vd. 2011).

Farklı özelliklere sahip ksilanazların arayışı yanında, üretim aşamasında maliyeti düşürmek amacıyla çalışmalarda sürmektedir. Endüstriyel enzim üretimlerinde en önemli faktör kullanılan substrat olmaktadır (Alves-Prado vd. 2010). Bu sebeple ucuz, bol, sürdürülebilir ve yenilenebilir bir kaynak olan tarımsal atıkların kullanımı alternatif bir

çözüm olmuştur (Okeke 2014, Sutay Kocabaş ve Ozben 2014). Tarımsal atıkların kullanılması ayrıca hem tarım ekonomisine ek gelir getirecek hem de tarımsal atıkların imhası sürecinde oluşan çevre kirliliğinin ortadan kaldırılmasında etkili bir yöntem olacaktır (Chapla vd. 2012, Zhang ve Viikari 2014).

Günümüzde lignoselülozik materyallerin yararlı kimyasallara dönüştürülmesi, özellikle biyo-yakıt üretimi noktasında dikkatleri üzerine çekmiştir (Jiang vd. 2011). İlk zamanlarda biyo-yakıt üretiminde tamamen nişasta bazlı materyaller kullanılmıştır. Bu materyallerin aynı zamanda gıda maddesi olması sebebiyle araştırmalarda, özellikle selülozdan glikoz ve biyo-yakıt üretimi üzerine yoğunlaşmış ve desteklenmiştir (Kocabaş vd. 2014, Okeke 2014). Ancak direkt olarak selülozun eldesi ya da lignoselülozik materyallerden verimli bir şekilde parçalanması istenilen verimi sağlayamamıştır çünkü lignoselülozik materyallerin tam olarak parçalanabilmesi için bitki hücre duvarı yapısında bulunan ve koruyucu bir tabaka olan lignin-hemiselüloz bariyerinin aşılması gerekmektedir. Lignoselülozlardan biyo-yakıt üretiminde selülozun tamamen parçalanması ksilanazın varlığı sebebiyle sınırlı olmaktadır. Bu sınırlama ortama ksilanaz eklenmesi ile aşılabilmektedir (Kim vd. 2014, Tarayre vd. 2015, Zhang ve Viikari 2014). Ayrıca oluşan ksilozların kullanımıyla da verim ve üretim artmaktadır (Kim vd. 2014, Tarayre vd. 2015). Bu sebepten ötürü, yeni ve farklı ksilanaz enzimleri ve bu enzim grubunu üreten mikroorganizmalar bilimsel araştırmaların odak noktası olmuştur.

Bu çalışma lignoselülozik materyaller üzerinde ksilanaz üretimi için topraktan mikroorganizma izolasyonunu amaçlamaktadır. Türkiye bir tarım ülkesi olarak tarımsal atıklar açısından büyük bir potansiyele sahiptir ve bu ürünler sürdürülebilir ve yenilenebilir kaynaklar olarak endüstriyel alanda kullanılarak yararlı ürünlere dönüştürülebilir. Türkiye'de tarımsal atıkların çoğu değerlendirilemeden gelişigüzel yok edilmeye çalışılmaktadır. Tarımsal atıkların değerlendirilmesi hem çevresel katkı sağlayacaktır hem de çiftçiler için yeni bir ekonomik kapı açacaktır.

## 2. Gereç ve Yöntem

### 2.1. İzolasyon ve Tarama

Yerleşke alanında özellikle bitki atıklarının toplandığı yerlerden rastgele alınan toprak örnekleri izotonik solüsyonda topraktan ve kirlilerden arındırıldıktan sonra %1 kayın ksilanı, %1 pepton, %1 maya özütü, %1.5 agar, %0.5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve %0.05 MgSO<sub>4</sub> içeren besi ortamında inkübe

edilmiştir. Örnekler 30, 35 ve 40 °C'lik inkübatörlerde 2-3 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası üzerine %0.1 (a/h) kongo kırmızısı solüsyonu dökülmüş ve 5 dakika beklenmiştir. Daha sonra 1M NaCl solüsyonu ile yıkama yapılarak temiz alan oluşturan mikroorganizmalar ksilanaz pozitif olarak belirlenmiş ve seçilen mikroorganizma morfolojik olarak incelenmiş ve sonrasında gram ve endospor boyamalar gerçekleştirilerek tanımlanmıştır.

## 2.2. Ksilanaz Üretimi ve Aktivite Ölçümü

Ksilanaz pozitif mikroorganizmaların ksilanaz aktivite profilleri öncelikle %1 kayın ksilanı, %1 pepton, %1 maya özütü, %0.5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve %0.05 MgSO<sub>4</sub> içeren besi yerinde sıvı ortamda 35 °C 160 rpm çalkalama hızında kontrol grubu olarak elde edilmiş ve daha sonra en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip organizma ot, mısır koçanı ve ayçiçek sapının ksilan kaynağı olarak kullanıldığı besi yerlerinde karşılaştırılmıştır. Lignoselülozik atıklar, kullanılmadan önce 2mm çapında olacak şekilde parçalanmış, saf su ile yıkanmış ve sonrasında fırında 50 °C'de kurutulmuştur. Atık içeren besi yerleri arasından en yüksek ksilanaz aktivitesine sahip mikroorganizmanın ksilanazı kısmi olarak karakterize edilmiştir.

Besi yerinden 24 saatte bir alınan örnek 5000xg de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler ve besi yerindeki çözünmeyen parçacıklar ayrılmıştır. Elde edilen süpenatant ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzim aktivitesi için substrat olarak %1'lik kayın ağacı ksilanının 50mM pH 7.0 fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Ksilanın çözünürlüğünün az olması sebebiyle 1g kayın ağacı ksilanı 80ml tampon çözeltisinde manyetik karıştırıcı üzerinde kaynayınca kadar karıştırılmış ve 3 dakikalık kaynama sonrası ısıtma işlemi durdurulup karıştırmaya gece boyunca oda sıcaklığında devam edilmiştir. Daha sonra hazırlanan solüsyon aynı tampon çözeltiyle 100ml'ye tamamlanmış, 5000xg' de 20 dakika santrifüj edilerek çözünmeyen ksilan parçacıkları uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan substrat çözeltisi gerektiğinde en fazla bir hafta sürmek üzere 4-6 °C'de saklanmıştır ve kullanım öncesi ölçüm sıcaklığına dengelenmiştir (Bailey vd. 1992).

Ksilanaz enzim aktivitesi enzimatik reaksiyon sırasında serbest kalan indirgen şeker miktarı ölçülerek tayin edilmiştir. Bu reaksiyon bir birim uygun şekilde seyreltilmiş enzim çözeltisi ile 10 birim substrat çözeltisinin uygun sıcaklıkta karıştırılmasıyla yapılmıştır. Reaksiyon çözeltisinden 15-20 saniyelik aralıklarla alınan 1ml'lik örnek üzerine 1.5 ml dinitrosalisilik asit çözeltisi (DNSA) eklenerek reaksiyon hemen durdurulmuş ve renk oluşumu için örnek tüpleri

kaynayan suya yerleştirilerek 5 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnek tüpleri buz üzerinde hemen soğutulmuş ve 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Ksilanaz aktivitesi oluşturulan ksiloz standart grafiği ve elde edilen absorbans değerleri kullanılarak hesaplanmıştır (Miller 1959). Bir birim ksilanaz aktivitesi (IU) 40 °C'de reaksiyon şartlarında 1 dakikada 1 µmole ksiloz üretebilen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

## 2.3. Ksilanazın Karakterizasyonu

Ham enzim üzerinde sıcaklığın ve pH'nın etkisine bakılmıştır ve bunun için sıcaklık değerleri olarak 20-80°C aralığı 10°C artışlarla; pH için ise 4-11 aralığında 1 birimlik artışlar olarak ayarlanmıştır. Ksilanazın sıcaklık ve pH dayanıklılığında aynı aralık ve birim artışlarıyla bakılmıştır.

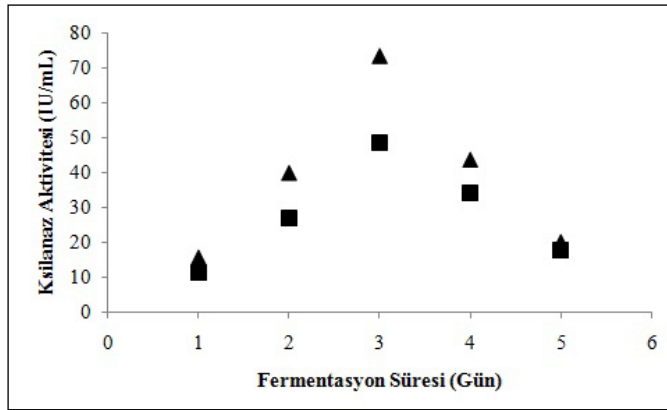
Metal iyonlarının etkisini tespit etmek için metallerin tuzlarının (KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>) 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonları kullanılmıştır. Metaller ek olarak SDS ve EDTA'nında aynı konsantrasyonlarda etkileri denenmiştir.

## 3. Bulgular

Toplanan toprak örnekleri karbon kaynağı olarak sadece ksilan içeren besi yerlerine ekilmiş ve 27°C'de inkübe edilmişlerdir. Etrafında şeffaf zon oluşturan mikroorganizmalar seri çizme ekim metoduyla saflaştırılmıştır. Bu aşamada toplam 40 bakteri izole edilmiştir ve X-1 den X-40'a kadar kodlanmışlardır. İzole edilen mikroorganizmalar ksilan besi yerine tekrar ekilmiştir. En geniş zon alanına sahip 11 bakteri kolonisi sıvı kültüre alınarak ksilanaz aktiviteyi takip edilmiştir.

Bunlar arasından en yüksek aktiviteye sahip X-7 ve X-8' ait aktivite profilleri Şekil 1'de verilmiştir. X-7 ve X-8 in maksimum aktiviteyi sırasıyla 73 ve 48 IU/mL olarak 3. günlerinde gösterdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 1). Buradan elde edilen veriler sonucunda X-7 ile lignoselülozik atıklar üzerinde denemeler yapılmıştır. Seçilen X-7, öncelikle morfolojik olarak incelenerek hücre yapısının çubuk şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra Gram boyaması yapılarak G(+) ve endospor boyaması yapılarak endospor ürettiği tespit edilmiş ve *Bacillus spp.* olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak ksilan kullanılırken lignoselülozik atık olarak ot (*Lolium spp.*), mısır koçanı, ayçiçek sapı ve buğday samanı kullanılmıştır (Çizelge 2). X-7, denenilen atıklar arasında 3 günlük inkübasyon sonunda en yüksek aktiviteyi (37 IU/mL) buğday samanı üzerinde göstermiştir. Bunun yanında ot üzerinde 36, ayçiçek sapı üzerinde 33 ve mısır koçanı üzerinde 25 IU/mL aktivite göstermiştir.

Enzim karakterizasyon çalışmalarına X-7 ile devam edilmiştir (Şekil 2 ve 3). Enzim en yüksek aktiviteyi 40 °C'de göstermiştir. Sıcaklığın 50°C'ye yükseltilmesi aktivitede %60'lık bir kayba sebep olmuştur. Bunun yanında enzim 80°C'de bile aktivitesinin %30'unu göstermektedir. Enzim aktivitesiyle ilgili olarak 4 °C'de 6 saat sonunda hiç bir aktivite kaybı olmazken yükselen sıcaklık değerleriyle birlikte dayanıklılığı düşmektedir. 20-40 °C aralığında enzim, aktivitesinin %60'ını korumaktadır. Fakat 50 °C ve üzerindeki sıcaklık değerlerinde 6 saat sonunda sadece %10'luk bir enzim aktivitesi gözlemlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 1. Seçilen mikroorganizmaların ksilanaz aktivite profilleri (▲: X-7 kodlu mikroorganizma ■: X-8 kodlu mikroorganizma).

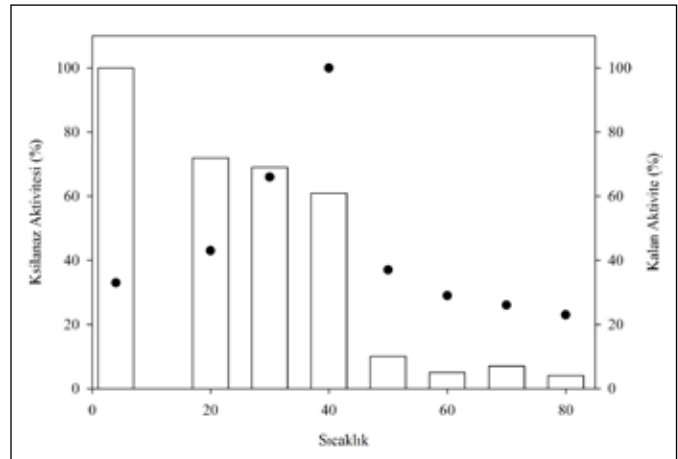
Çizelge 1. Ksilanaz pozitif toprak izolatlarının maksimum ksilanaz aktivite ve süreleri.

Bakteri	Maksimum Ksilanaz Aktivitesi (IU/mL)	Aktivitenin Gözlemlendiği Gün
X-1	1	4
X-2	10	2
X-3	8	2
X-7	73	3
X-8	48	3
X-12	4	3
X-13	5	3
X-14	7	3
X-15	6	3
X-21	5	5
X-25	6	3

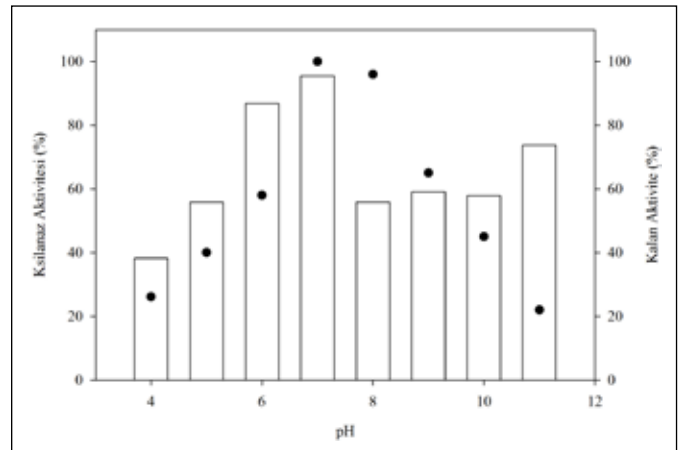
Çizelge 2. X-7'nin tarımsal atıklar üzerinde ksilanaz aktivite değerleri.

	Kontrol	Lignoselülozik Atıklar			
	Ksilan	Ot	Mısır Koçanı	Ayçiçek Sapı	Saman
X-7 Ksilanaz Aktivitesi (IU/mL)	73	36	25	33	37

Enzime pH'nın etkisine bakıldığında, pH 8'de elde edilen aktivite başlangıç aktivitesine en yakın değeri vermiştir (%96) (Şekil 3). Bu değerlerin altındaki ve üstündeki pH değerlerinde benzer bir eğim ile aktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir. Enzim pH 5 ile 10 aralığında aktivitesinin %40'ından fazlasını korumuştur. Üç saatlik durabilite deneyinin sonucunda, pH 6 ve 7'de enzimin yapısını daha iyi koruyabildiği gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesi 3 saat sonunda pH 8 ve üzerinde %60'lara kadar düşmüş olmasına rağmen pH 11'de bile bu kararlılığını korumuştur. Düşük pH değerlerinde ise aktivitenin %40'ların altına düştüğü



Şekil 2. Sıcaklığın ksilanaz üzerine etkisi. (●: optimum sıcaklık profili ve bar: sıcaklık durabilite (6saat sonra % kalan aktivite)).



Şekil 3. pH'nın ksilanaz üzerine etkisi (●: optimum pH profili ve bar: pH durabilite (3 saat sonra % kalan aktivite)).

**Çizelge 3.** Metallerin ve diğer kimyasalların ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi (%)\*.

Konsantrasyon (mM)	Kontrol	K	Ca	Mg	Zn	Fe	Cu	SDS	EDTA	NaCl
1	100	132	134	137	166	168	174	156	93	92
5	100	132	121	136	162	235	144	186	94	95
10	100	141	133	133	145	362	108	217	84	91

\*Aktivite değerleri yüzde olarak belirtilmiştir ve kontrol aktivitesi 100 olarak kabul edilmiştir.

gözlemlenmiştir. Genel olarak, enzim pH 5-11 aralığında 3 saat sonunda bile aktivitesinin %60'ını korumuştur (Şekil 3).

Ksilanaz aktivitesi üzerine test edilen metaller ve kimyasallar arasında NaCl ve EDTA hariç hepsi pozitif etki göstermiştir (Çizelge 3). Zn ve Cu bileşikleri için, konsantrasyon arttıkça pozitif etki azalmıştır. Bunun yanında Fe konsantrasyonu arttıkça ksilanaz aktivitesinin 3.5 katına kadar arttığı gözlemlenmiştir. Benzer bir şekilde SDS'in artan konsantrasyonu ksilanaz aktivitesi 2 katına kadar artmıştır.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Hücre dışına salgılanan enzimler arasında ksilanaz endüstriyel öneme sahip enzimlerden birisidir. Bakteriler, çeşitlilikleride göz önüne alındığında farklı özelliklere sahip enzimler için sayısız kaynak sunmaktadır (Gowdhaman vd. 2014). Ksilanaz pozitif mikroorganizma taramasında öncelikle katı besi yerinde ksilan karbon kaynağı üzerinde koloni etrafında şeffaf zon oluşturan mikroorganizmalar seçilmektedir. Hatta, oluşan temiz alanın çapına göre kısmi optimizasyon çalışmalarında katı agar besi yeri üzerinde yapılabilmektedir (Aygan ve Arıkan, 2008). Genellikle katı besiyerinde mikroorganizma seçiminden sonra mikroorganizma sıvı ortamda çoğaltılarak ksilanaz aktivitesi belirlenir. Bu çalışmada toplam 47 mikroorganizma öncelikli olarak seçilmiştir ve katı besiyerine tekrar ekimleri sonrası 11 bakteri sıvı kültüre aktarılmak üzere belirlenmiştir. Genel olarak bu ilk aşamada mikroorganizmalardan elde edilen ksilanazlara ait toplam enzim aktiviteleri düşük olmaktadır. Haddar vd. (2012) izole ettikleri bir basillustan optimize ettikleri koşullarda ksilanaz aktivitesini 7.23 IU/mL olarak belirtmişlerdir. Bunun yanında Irbe vd. (2014) izole ettikleri bir küften en yüksek ksilanaz aktivitesini 9.4 IU/mL olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada sıvı kültürden elde edilen ksilanaz aktivitesi 73 IU/mL olarak tespit edilmiştir ve optimizasyon öncesi için yüksek bir aktivitedir. Ön çalışmalar sonrası besi yeri optimizasyonu ve enzimin biyokimyasal karakterizasyonu yapılarak hem enzim üretimi artırılmakta hem de enzim aktivitesi optimize edilmektedir.

Besi yerinde lignoselülozik materyaller kullanıldığında, ksilanaz aktivitesi kontrole (besi yeri ortamında ksilan kullanılan besi yeri) göre daha düşük bulunmuştur. Bunun sebebi atıkların sadece ksilan zincirinden oluşmayıp lignoselülozik olarak tanımlanan selüloz, hemiselüloz ve lignin karışımlarından oluşmalarıdır (Chapla vd. 2012, Kim vd. 2014). Dolayısıyla aynı oranda kullanıldıklarında hem ksilan oranı daha düşük olmakta hem de selüloz ve özellikle lignin gibi diğer materyallerden dolayı enzimin ksilana ulaşması daha zor olmaktadır. İzole edilen mikroorganizma denenen tarımsal atıklar üzerinde en düşük aktiviteyi mısır koçanı üzerinde 25 IU/mL olarak göstermiştir. Bunun yanında diğer tarımsal atıklarla 33-37 IU/mL aralığında ksilanaz aktivitesine sahiptir. Mısır koçanında düşük aktivite göstermesinin sebebi, diğer atıkların içeriklerinin besin değerlerinin daha yüksek olmasıdır. Dolayısıyla sonraki çalışmalar için kaynak olabilecek nitelikte bir sonuç elde edilmiştir. Bunun yanında enzim 50 °C'ye kadar dayanabilmekte hatta 4 °C'de saklandığında hiç bir kayıp yaşanmamaktadır. Bunlara ek olarak en yüksek aktiviteyi pH7-8 aralığında göstermiştir ve pH5 ile 11 arasında %60 durabilite göstermiştir. Dolayısıyla enzim özellikle pH değişimlerinde olmak üzere sıcaklık değişimlerinde de geniş bir aralıkta dayanıklılık göstermektedir. Bu yönüyle üretilen ksilanaz özellikle kağıt endüstrisine uygun düşmektedir çünkü kağıt endüstrisinde ksilanazın istenilen özelliklerinden bir tanesi alkali pH'larda dayanıklılığının olmasıdır. Bunun sebebi klorinasyon işlevine girerken hammaddelerin pH'ı alkalidir ve hammaddeleri nötrleştirmek ek işlemler ve ek maliyet gerektirmektedir (Kocabaş vd. 2014).

Bu çalışmada topraktan ksilanaz pozitif bakterilerin izolasyonu ve lignoselülozik materyaller üzerinde ksilanaz üretimi araştırılmıştır. Bu çalışma çok ve ucuz bulunabilen ot, mısır koçanı, saman ve ayçiçek sapı gibi tarımsal atıklar üzerinde yüksek miktarda ksilanaz üretebilen yeni bir bakterinin izolasyonunu vurgulamaktadır. Maksimum ksilanaz aktivitesini ticari ksilan kaynağı üzerinde göstermesine rağmen lignoselülozik atıklar üzerinde de optimizasyon öncesi yüksek aktivite göstermiştir. Kullanılan ot, saman, mısır koçanı ve ayçiçek sapı gibi lignoselülozik

atıkların hepsinde ksilanaz aktivitesi göstermiş olup 50 °C'ye kadar %60 oranında aktivitesini korumakta ve geniş bir pH spektrumunda (pH 5 ile pH 11) dayanıklılığa sahiptir. Bu özellikleri bakımından endüstriyel kullanım potansiyeline sahip bir enzimdir.

## 5. Teşekkür

42-M-12 proje kapsamında çalışmamızı destekleyen Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederiz.

## 6. Kaynaklar

- Abdullah, R., Nisar, K., Aslam, A., Iqtedar, M., Naz, S. 2015.** Enhanced production of xylanase from locally isolated fungal strain using agro-industrial residues under solid-state fermentation. *Nat Prod Res.* 29(11):1006-1011.
- Alves-Prado, HFC., Pavezzi, FC., Leite, RS., de Oliveira, VM., Sette, LD., Dasilva, R. 2010.** Screening and production study of microbial xylanase producers from Brazilian Cerrado. *Appl Biochem Biotechnol.* 161(1-8):333-346.
- Aygan, A., Arıkan, B. 2008.** Amilaz selülaz ve ksilanaz üretebilen orta düzeyde halofil *Bacillus sp.* izolasyonu ve optimum üreme ve enzim sentezlerinin belirlenmesi. *Ç.Ü Fen Bil. Enst.*, 18(2):1-11.
- Bailey, MJ., Biely, P., Poutanen, K. 1992.** Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol.* 23(3):257-270.
- Chapla, D., Pandit, P., Shah, A. 2012.** Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresour Technol.*, 115:215-221.
- Gowdhaman, D., Jeyalakshmi, G., Sugumaran, K., Subramanian, NS., Santhosh, RS., Ponnusami, V. 2014.** Optimization of the xylanase production with the newly isolated *Bacillus aerophilus* KGJ2. *Türk Biyokim Derg.* 39(1):70-77.
- Haddar, A., Driss, D., Frikha, F., Ellous-Chaabouni, S., Nasrj, M. 2012.** Alkaline xylanases from *Bacillus mojavensis* A21: production and generation of xylooligosaccharides. *Int J Biol Macromol.* 51(4):647-656.
- Irbe, I., Elisashvili, V., Asatiani, MD., Janberga, A., Andersone, I., Andersons, B., Biziks, V., Grinins, J. 2014.** Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *Inter Biodet Biodeg.* 86(B):71-78.
- Jiang, X., Geng, A., He, N., Li, Q. 2011.** New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *J Biosci Bioeng.* 111(2):121-127.
- Kallel, F., Driss, D., Bouaziz, F., Neifer, M., Ghorbel, R., Chaabouni, SE. 2015.** Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their *in vitro* evaluation as prebiotics. *Food Bioprod Process.* 94:536-546.
- Kim, DY., Shin, D Jung, S., Kim ,H., Lee , JS., Cho , H., Bae, KS., Sung, C., Rhee, YH., Son, K., Park, H. 2014.** Novel alkali-tolerant GH10 Endo-β-1,4-Xylanase with broad substrate specificity from *Microbacterium trichothecenolyticum* HY-17, a gut bacterium of the mole cricket *Gryllotalpa orientalis*. *J Microb Biotech.* 24(7): 943-953.
- Kocabas, A., Sutay Kocabas, D., Bakir Bolukbasi, U. 2011.** One step purification and characterization of a low molecular weight xylanase from *Aspergillus terreus* NRRL 1960. *JABS.* 5(2):61-65.
- Kocabas, A., Ogel, ZB., Bakir, U. 2014.** Xylanase and itaconic acid production by *Aspergillus terreus* NRRL1960 within a biorefinery concept. *AnnMicrobiol.* 64:75-84.
- Miller, GL. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31: 426-428.
- Neves, ML., da Silva, MF., Souza-Motta, CM., Spier, MR., Soccol, CR., Porto, TS., Moreira, KA., Porto, AL.. 2011.** *Lichtheimia blakesleeana* as a new potential producer of phytase and xylanase. *Mol.* 16:4807-4817.
- Okeke, BC. 2014.** Cellulolytic and xylanolytic potential of high β-glucosidase-producing *Trichoderma* from decaying biomass. *Appl Biochem Biotechnol.* 174:1581-1598.
- Robl, D., Delabona, PS., Mergel, CM., Rojas, JD., Costa, PS., Pimentel, IC., Vicente, VA., Pradella, JGC., Padilla, G. 2013.** The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes, *BMCBiotech.* 13:94-106.
- Sargin, S., Öngen, G. 2003.** Kanatlı yemi katkısı olarak kullanılan ksilanaz enziminin katı kültür fermantasyon yöntemi ile üretiminde ölçek büyütme çalışmaları. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 40(3):145-152.
- Sutay Kocabas, D., Ozben, N. 2014.** Co-production of xylanase and xylooligosaccharides from lignocellulosic agricultural wastes. *RSC Adv.* 4:26129-26139.
- Sutay Kocabas, D., Guder, S., Ozben, N. 2015.** Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. *J Mol Cat B* 115:66-75.
- Tarayre, C., Bauwens, J., Brasseur, C., Mattéotti, C., Millet, C., Guiot, PA., Destain, J., Vandebol, M., Portetelle, D., De Pauw, E., Haubruge, E., Francis, F., Thonart, P. 2015.** Isolation and cultivation of xylanolytic and cellulolytic *Sarocladium kiliense* and *Trichoderma virens* from the gut of the termite *Reticulitermes santonensis*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(6):4369-4382.
- Wu, Q., Li, Y., Li, Y., Gao, S., Wang, M., Zhang, T., Chen, J. 2013.** Identification of a novel fungus, *Leptosphaerulina chartarum* SJTU59 and characterization of its xylanolytic enzymes. *PLoS ONE.* 8(9): e73729.
- Zhang, J., Viikari, L. 2014.** Impact of xylan on synergistic effects of xylanases and cellulases in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Appl Biochem Biotechnol.* 174(4):1393-1402.