



Streptomyces Suşlarında Farklı Genetik Manipulasyonların Ksilinaz Enzim Üretimi Üzerine Etkisi ^[*]

Fatma Esen SARIGÜLLÜ ÖNALAN*

Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Yusuf Şerefoğlu Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Kilis

Geliş/Received: 24.01.2020

Kabul/Accepted: 12.06.2020

Atıf yapmak için: Sarigüllü Önalın, F.E. (2020). Streptomyces Suşlarında Farklı Genetik Manipulasyonların Ksilinaz Enzim Üretimi Üzerine Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(2), 224-230.

How to cite: Sarigüllü Önalın, F.E. (2020). Effect of Different Genetic Manipulations on the Production of Xylanase Enzyme in *Streptomyces* Strains. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(2), 224-230.

*ID: <https://orcid.org/0000-0002-1374-4338>

***Sorumlu yazarın:**

Fatma Esen SARIGÜLLÜ ÖNALAN
Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Yusuf Şerefoğlu
Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik
Bölümü, Kilis, Türkiye.
✉: esenonalan@kilis.edu.tr
Cep telefonu : +90 (535) 892 48 88

Öz: Çukurova Üniversitesi'nin beş farklı bölgesinden alınan toprak örneklerinden üç Streptomyces suşu izole edildi. S40, S47, S48 suşlarının yedi gün sonundaki ksilinaz aktivitesi sırasıyla 50,92 U/mL, 49,51 U/mL, 47,79 U/mL tespit edilmiştir. Yüksek ksilinaz aktivitesi gösteren bu suşlar arasında gerçekleştirilen protoplast füzyon çalışması sonucu farklı koloni morfolojisi gösteren dokuz suş seçilmiştir. (40-48) R2 ve (47-48) R3 suşlarının ksilinaz aktivitesi ebeveyn suşlara göre sırasıyla %25,9 ve %31,9 oranında arttığı tespit edilmiştir. S47-S48'den elde edilen R3 füzyonu ebeveyn tiplerine göre enzim aktivitesi ve protein miktarı açısından %131'lik artışla en verimli suş olduğu ortaya konmuştur. Protoplast füzyon tekniğiyle enzim aktivitesinin geliştirilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca protoplast füzyonuyla bakterilerin hücre duvarlarının parçalanmasıyla oluşan rekombinant türlerde selüloz ve ksilinaz gibi enzimleri kodlayan genlerin aktivitesi geliştirilebilir.

Anahtar kelimeler: ksilinaz, protoplast füzyonu, *Streptomyces*.

Effect of Different Genetic Manipulations on the Production of Xylanase Enzyme in *Streptomyces* Strains

Abstract: Three *Streptomyces* strains were isolated from soil samples collected from five different areas of Cukurova University. Strains were named as S40, S47, S48. After 7 days incubation, xylanase activities of S40, S47 and S48 strains were calculated as 50.92 U/mL, 49.51 U/mL and 47.79 U/mL respectively. The protoplast fusion among these strains showing the high enzyme activity was carried out. The nine strains were selected having the different colony morphologies following this the fusion. The xylanase activities of (40-48) R2 and (47-48) R3 strains were observed the increase of 25.9 and 31.9% according to parents respectively. R3 fusion strain was revealed to be the most efficient strain with 131% increase in terms of enzyme activity and protein amount of (47-48) R3 recombinant, compared to S47-S48 wild type. Our studies indicated to improve the enzyme activity of *Streptomyces* strains by protoplast fusion technique. Also, the activity of genes coded enzymes such as xylanase and cellulase in recombinant species formed lyzing cell wall by this technique can be developed.

Keywords: Protoplast fusion, *Streptomyces*, xylanase.

***Corresponding author's:**

Fatma Esen SARIGÜLLÜ ÖNALAN
Kilis 7 Aralık University, Yusuf
Şerefoğlu Faculty of Health Sciences,
Department of Nursing, Kilis, Türkiye.
✉: esenonalan@kilis.edu.tr
Mobile telephone : +90 (535) 892 48 88

GİRİŞ

Saprofit bakteriler olarak bilinen aktinomisetlerden özellikle Streptomyces cinsi organik maddeleri özellikle lignoselüloz, nişasta ve kitin gibi polimerleri ayrıştırırlar (Crawford vd., 1993). Extraselüler hidrolitik enzimler, aktinomisetlerin doğal habitatındaki besin rekabetine olanak sağlar. Aktinomisetler gelişimleri için toprakta en bol miktarda bulunan karbon kaynağı olarak bilinen

lignoselülozları kullanırlar (Trigo ve Ball, 1994). Aktinomisetler gibi biyomas parçalayıcı mikroorganizmalar diğer mikroorganizmalarla sinerjik çalışarak topraktaki lignoselülozlara saldıracak farklı enzimler üretirler. Aktinomisetlerden Streptomyces generu endüstride kullanılan birçok hidrolitik enzimlerin üreticileri oldukları bilinmektedir. *S. scopiformis* (Li vd., 2002), *S. yunnanensis*

^[*] ,Bu çalışma, doktora tezinden üretilmiştir.

This study was produced from the doctora thesis.

(Zhang vd., 2003), *S. grievus* (Vigal vd., 1994) suşlarından alfaamilaz; *S. galbus* (Kansoh ve Nagieb, 2004), *S. albus* (Antonopoulos vd., 2001), *S. speibonae* (Meyers vd., 2003) suşlarından ksilanaz; *S.cinnamoneus* (Sommer vd., 1997), *S. rimosus* (Vujaklija vd., 2002), *S. seoulensis* (Chun vd., 1997) suşlarından lipaz; *S. lividans* TK 24 (Aretz vd., 1989) proteaz ; *S. murinus* (Bandlish vd., 2002), *S. olivaceoviridis* E-86 (Kaneko vd., 2001), *S. thermovulgaris* 127 (Raykovska vd., 2001) suşlarından ksiloizomeraz enzimlerin üretildiği rapor edilmiştir. Streptomyces cinsinin ürettiği enzimlerden ksilanazlar; lignoselülozların parçalanmasında rol oynayan önemli endüstriyel enzim olduğundan litaratürlerde yaygın bir şekilde bahsedilmektedir (Nascimento vd., 2002). Lignosellülozik biyokütle en büyük yenilenebilir kaynaklardan biri olduğundan bunların dönüşümünü sağladıklarından hem çevre kirliliğini önler (Bajaj vd., 2010; Wang vd., 2003) hem de kağıt, kağıt hamuru, tekstil endüstrisi gibi birçok alanda kullanılırlar. Buna ek olarak ksilanolitik enzimler yemek, kek ve diğer besinlerin (hamurdaki polisakaritleri yıkarak) pişirilmesini hızlandırır. Hayvan besinlerine ksilanaz eklendiğinde yem viskozitesini azaltarak, kümes hayvanlar tarafından buğdayın sindirilmesine yardım ederler. Böylece yemden etkin yararlanma dolayısıyla kilo artışı sağlarlar (Nascimento vd., 2002). Ksilanaz enziminin endüstriyel kullanımlarda uygulanabilirliğini genetik ilerlemelerle artırılabilir. Genetik manipülasyonlar ve mutasyonlar kullanılarak enzim aktivitesinin artırıldığı etkili suşlar oluşturulabilir. (Kieser vd., 2000).

MATERYAL VE METOT

Streptomyces Suşlarının İzolasyonu: Çukurova Üniversitesi 5 farklı bölgesinden toprak örnekleri alınmıştır. 10 mL toprak süspansiyonu 20 dk 1000 rpm'de santifüj edilmiştir. Süpernatanttan 1 mL alınıp steril dH₂O ile 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ konsantrasyonlarda sulandırılarak her birinden 100 µL alınıp streptomisetler için selektif besiyeri olan Bennet's Agar, Nişasta Kazein Agar, Gliserol Maya Agar besiyerlerine yayılıp 30°C de 2-4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu üst yüzeyleri girintili çıkıntılı, derimsi koloniler şeklinde görülen koloniler seçilmiştir. Elde edilen koloniler spor zincir morfolojileri mikroskopta incelendi. Streptomyces cinsine özgü spor zincir morfolojisi gösteren suşlar seçilmiştir. Seçilen suşlar sporülasyon besiyerinde 30°C de spor meydana getiren kadar 14 gün inkübe edildi. Besiyerindeki sporlar alınarak %50 gliserol çözeltisinde resüspanse edilip -20°C de saklanmıştır.

Ksilanaz Aktivitesinin Katı Besiyerinde Belirlenmesi: Ksilanlı agar besiyerine ekilen Streptomyces suşları 7 gün 30°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda besiyerine %0,1 lik Kongo kırmızısı çözeltisinden dökülerek 15 dk boyama işlemi

gerçekleştirilmiştir. Boyamadan fazla boyanın ortamdaki uzaklaştırılması için besiyerine 1M NaCl çözeltisi ilave edilmiş 15 dk inkübasyon yapılmıştır. Etrafında sarı hidroliz zonu bulunan suşlar ksilanaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Aygan, 2008).

Ksilanaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması: Katı besiyerinde ksilanaz aktivitesi gösterdiği saptanan Streptomyces suşlarından hazırlanan 100 µL spor süspansiyonu ksilanlı sıvı besiyerine ekilerek 30°C'de 7 gün süreyle 150 devir/dk da ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonrasında 100 mL'lik ksilanlı besiyerlerine aktarılıp 7 gün 30°C'de inkübe edildikten sonra suşlar +4°C de 8000 rpm'de 30 dk santifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant temiz bir tüpe alınıp üzerine hacminin %70'i kadar %96'lık alkol ilave edildi. Örnekler bir gece -30°C'de bekletilmiştir. Çöken örnek +4°C de 8000 rpm'de santifüj edilerek enzim sıvı fazdan geri kazanılmıştır. Çökelti pH'sı 7 olan fosfat tamponunda çözüldü ve -30°C de muhafaza edilmiştir (Aygan, 2008).

Ksilanaz Aktivitesinin Belirlenmesi: Katı besiyerinde ksilanaz aktivitesi gösterdiği saptanan Streptomyces suşlarından hazırlanan 100 µL spor süspansiyonu ksilanlı sıvı besiyerine ekilerek 30°C'de 7 gün süreyle 150 devir/dk da ön inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonrasında 100 mL ksilanlı besiyerlerine aktarılıp 7 gün 30°C'de inkübe edilmiştir. 7 gün boyunca ksilanaz enzim aktivitesini belirlemek için sıvı kültür inkübasyonundan 24 saat aralıklarla aseptik koşullar altında 1 mL örnek alınmıştır. Örnek 10000 rpm'de 5 dk santifüj edilip biyomas ve diğer partiküllerden arındırılan süpernatant sıvısı ham enzim preparatı olarak kullanılmıştır. Çalışmalar sırasında 0,2 mL enzim preparatı, 1,8 mL %1 lik ksilan (50 mM pH:5,3 sitrat tamponuyla hazırlanmış) süspansiyonu 50°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda 3 mL DNS çözeltisi eklenerek 15 dakika kaynar suda bekletilmiş ve buzda soğutulan örnekler 540 nm'deki optik densiteleri spektrofotometreyle ölçülerek aktivite hesaplanmıştır. Bir ünite (U) ksilanaz aktivitesi, analiz koşulları altında, milimetre başına 1 dakikada 1 mikromol indirgenmiş şeker salınımına neden olan enzim miktarı olarak hesaplanmıştır (Bailey vd., 1992).

Protein Miktarının Tayini ve SDS-PAGE Elektroforezi: Örneklerdeki total protein miktarı 750 nm'de Lowry metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Lowry vd., 1951). Enzimlerin moleküler ağırlıklarını belirlemek için SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır. Jel gümüş boyama tekniği kullanılarak boyanmıştır (Lelong vd., 2009).

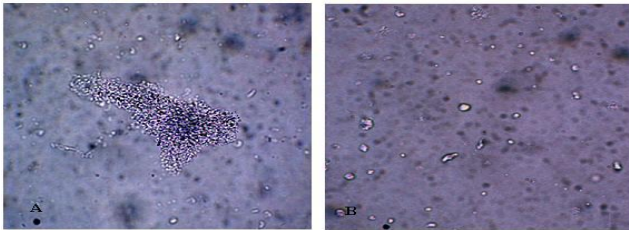
Protoplast Oluşumu: Protoplast oluşumu için Streptomyces suşlarının sporlarından YMB besiyerine ekim yapılmıştır. 24 saat 30°C' de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda Streptomyces kültürü 8000 rpm de 15 dk santifüj edilip pellet %10,3'lük sakkaroz çözeltisiyle 2

kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra pellet mililitresinde 4 mg lizozim bulunan 20 mL P3 tamponunda 30 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre içinde belirli aralıklarla küçük örnekler alınıp mikroskopta protoplast oluşumu izlenmiştir. Protoplast oluşumundan sonra süspansiyon 1500 rpm'de 5 dk santifüj edilmiştir. Pellete 20 mL PWP tamponu eklenerek protoplastlaşma durdurulmuştur. Protoplast süspansiyonunda kalan misel parçaları cam yününden süzlmüştür. Misel parçalarından arındırılmış protoplast süspansiyonu elde edilmiştir (Shirahama vd., 1981; Lampel ve Strohl, 1986)'dan modifiye edilmiştir.

Protoplast Füzyonu: S40, S47, S48 suşlarından elde edilen protoplastlar arasında protoplast fusyon denemeleri yapılmıştır. İki suştan elde edilen protoplast süspansiyonlarından 50 şer µL alındı ve 900 µL PWP tamponuyla hazırlanmış %40'lık polyethylene glycol 6000 (PEG) karıştırılmıştır. 5 dk sonra PEG 6000 ile işlenmiş protoplastlar sıvı CRM besiyelerinde seri sulandırmalar yapılarak katı CRM, R5 ve S27M besiyelerine aktarıldı 30°C'de 15-18 gün inkübasyona bırakılmıştır (Gold vd., 1983; Baltz, 1978)'den modifiye edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda protoplast oluşumu gerçekleştirilecek organizmalar (S40, S47 ve S48) %1 glisin içeren YMB besiyerinde 24 saat geliştirilmiştir. Bu besiyerinde *Streptomyces* suşlarının zayıf hif oluşumu gösterdiği gözlemlenmiştir. Santifüj edilip çöktürülen hifler protoplast oluşumu için 4mg/mL lizozim içeren 20 mL P3 tamponunda 30 °C 2 h inkübe edilip mikroskopta 40X'de incelendiğinde Şekil 1. A'daki görünüm elde edilmiştir. Şekil 1. A'da görüldüğü gibi lizozimle işlenen hiflerden protoplast oluşumu başlamıştır.

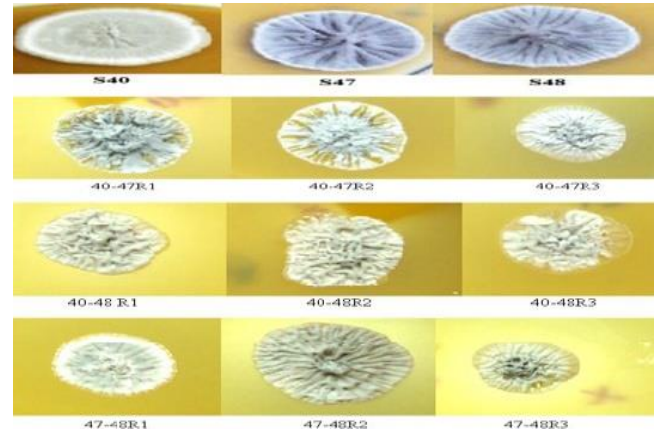


Şekil 1. A: 24 saat YMB besiyerinde inkübe edilen *Streptomyces* suşlarının 2h lizozimle işlenmesi sonucu oluşan protoplastların görüntüsü, B: Cam yününden geçirilerek hiflerden arındırılmış protoplast görüntüsü.

Figure 1. A: Protoplast image occurred after with treating lysozyme for 2 h of *Streptomyces* strains incubated in YMB for 24 hours, B: Protoplast image free from hyphae through glass wool.

Pigac ve Schrempf (1995) yaptıkları çalışmada *Streptomyces* suşları glisin içeren besiyerinde geliştirildiğinde lizozimin (hücre duvarını parçalayan ajan) etkinliğini artırdığını belirtmişlerdir. Protoplast oluşumu gerçekleştikten sonra protoplast süspansiyonundan hifleri uzaklaştırmak için cam yününden süzme işlemi

gerçekleştirilmiştir. Şekil 1.B'de gösterildiği gibi cam yününden süzldüğünde hiflerin ortamdan uzaklaştığı sadece protoplastların kaldığı gözlemlenmiştir. Protoplast oluşumdaki tüm aşamaların aseptik koşullarda gerçekleştirilmesi gereklidir. S40 ve S47, S40 ve S48, S47 ve S48 suşları arasında gerçekleştirilen protoplast füzyon çalışması için bu suşlardan oluşturulan protoplastlar PEG solüsyonuyla karıştırılmıştır. Protoplast oluşumu için 5 dk beklenmiştir. Sonra regenerasyon besiyelerine aktarılmıştır. Rejenerasyon besiyerinden ana suşlardan farklı koloni morfolojileri gösteren (Şekil 2) suşlar seçilmiş ve bu suşların ksilanaz aktiviteleri değerlendirilmiştir.



Şekil 2. Ebeveyn ve rekombinat suşların koloni morfolojileri.

Figure 2. Colony morphology of parent and recombinant strains.

S40, S47, S48 Suşunun Günlük Ksilanaz Enzim

Aktivite Sonuçları: S40, S47, S48 suşlarının 7.gün sonundaki ksilanaz aktivitesi sırasıyla 50,92 U/mL, 49,51 U/mL, 47,79 U/mL olarak bulunmuştur (Tablo 1) En aktif suş 40S suşudur. Rıfaat vd., (2006) substrat olarak pirinç samanı hamuru kullandığında *Streptomyces albus* suşunda ksilanaz aktivitesi 13,25 U/mL *Streptomyces chromofuscus* suşunda 19,31 U/mL olduğu bulunmuştur. Pirinç samanı hamuru TiO₂ ile işlendiğinde ise bu suşların ksilanaz aktivitesi sırasıyla 32,53 U/mL ve 43,01 U/mL olarak hesaplanmıştır. Nascimento vd., (2002) en yüksek ksilanaz aktivitesini (70 U/mL) substrat olarak larchwood ksilan kullandığında elde etmiştir. Substrat olarak buğday kepeği kullandığında ise aynı suşun ksilanaz aktivitesi 28,4 U/mL olarak saptamışlardır. Bhosale vd., (2011) *Streptomyces rameus* suşunun substrat olarak şeker kamışı kullandığında ksilanaz aktivitesi 185 U/mL, mısır koçanı kullanıldığında ise 64 U/mL olduğunu bulunmuştur. Techapun vd., (2003) ise *Streptomyces lividans* suşunun maximum ksilanaz aktivitesi 41.6 U/mL olduğunu saptamıştır. Ding vd., (2004) tarafından *Streptomyces olivaceoviridis* suşunun %1,5 Tween-80 eklenmiş ksilanlı besi ortamındaki en yüksek ksilanaz aktivitesinin 1653 U/mL olduğu saptanmıştır. Nadia vd., (2010) *Streptomyces lividans* (NRC) suşunun substrat olarak domates posası kullanıldığında maximum ksilanaz aktivitesinin 1447 U/mL olduğunu saptamışlardır.

Tablo 1. S40, S47, S48 suşlarının günlük ksilanaz aktivite sonuçları.

Günlük ksilanaz aktivitesi(U/mL)	S40	S47	S48
1.gün	9,27	8,39	7,51
2. gün	18,93	18,39	16,36
3.gün	27,01	26,50	24,09
4.gün	33,67	33,07	34,37
5.gün	42,51	42,08	44,58
6.gün	47,37	46,06	45,36
7.gün	50,92	49,51	47,79

Protoplast Füzyonu Sonucu Oluşan Rekombinant Suşlarının Günlük Ksilanaz Aktivite Sonuçları: S40, S47, S48 ebeveyn suşlarının 7. gün sonundaki ksilanaz aktivitesi sırasıyla 50,92 U/mL, 49,51 U/mL, 47,79 U/mL olarak bulunmuştur. Yüksek ksilanaz aktivitesi gösteren bu suşlar arasında denenen füzyon çalışması sonucu farklı koloni

morfolojisi gösteren 9 suşdan 7 gün sonunda Tablo 2.'de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek ksilanaz aktivitesi (47-48) R3 rekombinant suşu göstermektedir. Teeradakorn vd., (1998) *Streptomyces cyaneus* 190-1 ve *Streptomyces griseoruber* 42-9 suşları arasındaki protoplast füzyon sonucu oluşan *Streptomyces* D3 rekombinat suşunun ksilanaz aktiviteleri incelenmiş 1200 U/L ksilanaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Abdel-Aziz vd., (2011) yaptıkları çalışmada *Streptomyces pseudogriseolus* suşların sporlarına farklı zaman aralıklarında U.V ışığına maruz bıraktığında oluşan mutant suşlar seçmiş ve mutantların ebeveyn türe göre ksilanaz aktivitelerindeki değişim incelenmiştir. 121 nolu mutantın ebeveyn suşa göre %62,5 daha yüksek ksilanaz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur.

Tablo 2. Protoplast füzyonu sonucu oluşan rekombinantların günlük ksilanaz aktivite sonuçları.

Günlük ksilanaz Aktivitesi (U/mL)	(40-47)R1	(40-47)R2	(40-47)R3	(40-48)R1	(40-48)R2	(40-48)R3	(47-48)R1	(47-48)R2	(47-48)R3
1.gün	9,02	10,90	11,03	9,68	12,84	11,27	7,15	7,08	14,05
2.gün	17,65	20,66	20,41	15,17	24,23	21,64	12,84	13,49	27,44
3.gün	26,71	29,17	28,61	23,56	34,51	29,58	17,25	21,06	38,07
4.gün	32,69	39,75	38,98	33,67	44,30	39,23	24,63	27,79	47,06
5.gün	38,91	44,84	43,77	40,20	50,15	48,91	32,67	34,09	54,65
6.gün	42,01	49,12	49,66	43,49	56,39	52,20	35,83	37,58	60,29
7.gün	46,67	53,23	54,40	46,31	60,20	56,36	36,46	39,17	63,04

Tablo 3. S40 ve S47 ebeveyn suşlarla protoplast füzyon sonucu oluşan rekombinat suşların, ksilanaz aktiviteleri ve yüzde verimliliklerinin karşılaştırılması.**Table 3.** Comparison of S40 and S47 parental strains with xylanase activities and percent efficiency of recombinant strains resulting from protoplast fusion.

Ebeveyn ve rekombinant suşlar	Protein konsantrasyonu	7 gün sonundaki ksilanaz aktivitesi (U/mL)	Yüzde verimlilik
S40	5,60833	50,92	102,8
S47	5,11818	49,51	100
R1(40-47)	5,97273	46,67	94,2
R2(40-47)	7,88182	53,23	107,5
R3(40-47)	4,46364	54,40	109,8

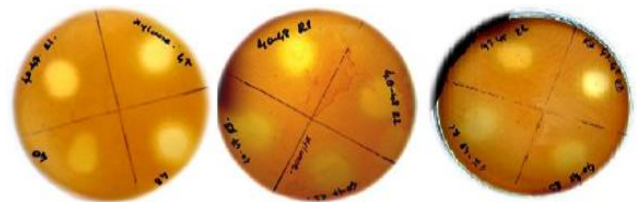
Tablo 4. S40 ve S48 ebeveyn suşlarla protoplast füzyon sonucu oluşan rekombinat suşların, ksilanaz aktiviteleri ve yüzde verimliliklerinin karşılaştırılması.**Table 4.** Comparison of xylanase activities and percent efficiency of S40 and S48 parent strains and recombinant strains resulting from protoplast fusion.

Ebeveyn ve rekombinant suşlar	Protein konsantrasyonu	7 gün sonundaki ksilanaz aktivitesi (U/mL)	Yüzde verimlilik
S40	5,60833	50,92	106,5
S48	5,22272	47,79	100
R1(40-48)	5,46364	46,31	94,2
R2(40-48)	7,01818	60,20	125,9
R3(40-48)	6,72727	56,36	117,9

Tablo 5. S47 ve S48 ebeveyn suşlarla protoplast füzyon sonucu oluşan rekombinat suşların, ksilanaz aktiviteleri ve yüzde verimliliklerinin karşılaştırılması.**Table 5.** Comparison of xylanase activities and percent efficiency of S47 and S48 parent strains and recombinant strains resulting from protoplast fusion.

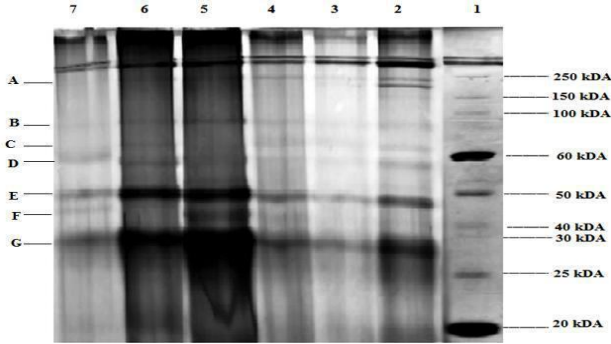
Ebeveyn ve rekombinant suşlar	Protein konsantrasyonu	7 gün sonundaki ksilanaz aktivitesi (U/mL)	Yüzde verimlilik
S47	5,11818	49,51	103,5
S48	5,22272	47,79	100
R1(47-48)	2,70000	36,46	76,2
R2(47-48)	2,83636	39,17	81,9
R3(47-48)	7,35455	56,36	131,9

Ebeveyn ve Rekombinat Suşlardan Kısmi Saflaştırılmış Ksilanaz Enziminin Katı Besiyerindeki Aktivite Sonucu: S40, S47, S48 ebeveyn suşlarından ve protoplast füzyon denemesi sonucu elde edilen 40-47R1, 40-47R2, 40-47R3, 40-48R1, 40-48R2, 40-48R3, 47-48R1, 47-48R2, 47-48R3 suşlarından kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilen ksilanaz enziminin ksilan içeren katı besiyerindeki aktivite sonucu şekil 3'de görülmektedir. 100 µL ksilanaz enziminin 1 saatlik inkübasyon sonucu oluşturduğu aktivite parlak ve sarı renkte görülürken, parçalanmamış ksilanlı bölgeler kırmızı renkte görülmektedir.

**Şekil 3.** Kısmi saflaştırma yöntemiyle elde edilen ksilanaz enziminin katı besiyerinde aktivite görünümü.**Figure 3.** Activity view of xylanase enzyme obtained by partial purification method on solid medium.

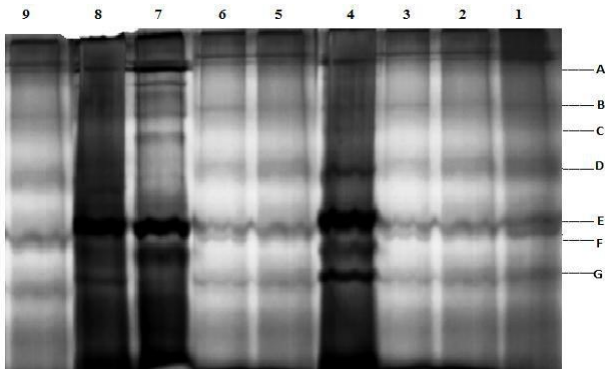
Ebeveyn ve Rekombinant Suşlardan Kısmi Saflaştırılmış Ksilanaz Enziminin SDS-PAGE Analiz Bulguları: Elektroferez çalışması sonucu Şekil 4'de A,B,C,D,E,F,G olarak gösterilen bantların moleküler ağırlıkları sırasıyla 220,5 kDA, 84,8 kDA, 64,5 kDA, 56 kDA, 48,2 kDA, 41,2 kDA, 28, 76 kDA olarak saptanmıştır. S40, S47 ve S48 suşlarından kısmi

saflaştırılan enzimler hem şekil 4. hemde şekil 5'deki jellerde yürütüldüğünden şekil 4'deki bantlar ve şekil 5'deki bantlarla aynıdır. Şekil 5'de A,B,C,D,E,F,G olarak gösterilen bantların moleküler ağırlıkları sırasıyla 220,5 kDA, 84,8 kDA, 64,5 kDA, 56 kDA, 48,2 kDA, 41,2 kDA, 28, 76 kDA ağırlığındadır.



Şekil 4. S40, S47, S48 ve (40-47)R1, (40-47)R2, (40-47) R3 Suşlarından Kısmi Saflaştırılmış Ksilanaz Enziminin SDS-PAGE Analizi (1: Markır, 2: S40, 3: S47, 4: S48, 5: (40-47)R3, 6: (40-47)R2, 7: (40-47)R1).

Figure 4. SDS-PAGE Analysis of Partially Purified Xylanase Enzyme from Strains S40, S47, S48 and (40-47) R1, (40-47) R2, (40-47) R3 (1: Marker, 2: S40, 3: S47, 4: S48, 5: (40-47) R3, 6: (40-47) R2, 7: (40-47) R1).



Şekil 5. S40, S47, S48 ve (47-48)R3, (47-48)R2, (47-48)R1, (40-48)R3, (40-48)R2, (40-48)R1 Suşlarından Kısmi Saflaştırılmış Ksilanaz Enziminin SDS-PAGE Analizi (1: S40, 2: S47, 3: S48, 4: (47-48)R3, 5: (47-48)R2, 6: (47-48)R1, 7: (40-48)R3, 8: (40-48)R2, 9: (40-48)R1).

Figure 5. S40, S47, S48 and (47-48) R3, (47-48) R2, (47-48) R1, (40-48) R3, (40-48) R2, (40-48) R1 SDS-PAGE Analysis of Partially Purified Xylanase Enzyme from Strains (1: S40, 2: S47, 3: S48, 4: (47-48) R3, 5: (47-48) R2, 6: (47-48) R1, 7: (40-48) R3, 8: (40-48) R2, 9: (40-48) R1).

Streptomyces sp. CD3 suşlarından izole edilen ksilanaz enzimlerinin zimogram analizleri sonucu 69,18 kDA, 63,09 kDA, 43,65 kDA moleküler ağırlığında üç bantın varlığı gösterilmiştir. Bu organizmanın farklı moleküler ağırlıklara sahip ksilanaz enzimleri ürettiği bulunmuştur (Sharma ve Bajaj, 2005). *Streptomyces chartreusis* suşundan izole edilen ksilanaz enzimi SDS-PAGE yöntemiyle analiz edildiğinde 31,6 kDA moleküler ağırlığında olduğu saptanmıştır (Li vd., 2011). *Bacillus* sp. X-13 suşundan izole edilen ksilanaz enziminin, moleküler ağırlıkları 180,4 kDA, 95,5 kDA, 80,6 kDA, 68,5 kDA olan

dört alt birimden meydana geldiği zimogram analizi sonucu saptanmıştır (Aygan, 2008). *Streptomyces* sp. AMT-3 suşundan izole edilen ksilanaz enziminin zimogram analizi sonucu 240 kDA, 170 kDA iki bant ve 600 kDa üstünde iki bant olmak üzere 4 bant tespit edilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ksilanaz aktivitesi, araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçların bir araya getirildiği tablo 1 incelendiğinde ebeveyn olarak kullandığımız 3 suştan S40 suşunun en yüksek ksilanaz aktivitesi gösterdiği görülmektedir. Ancak bu suşlar arasında yapılan füzyon uygulamaları sonunda ortaya çıkan suşlardan rastgele seçilmiş olanlar arasında yaptığımız karşılaştırmalı ksilanaz aktivite çalışmalarında 40-48 rekombinantlarından olan R2 suşu ve 47-48 rekombinantlarından R3 suşunun birbirine yakın duracak şekilde en yüksek ksilanaz aktivite gösteren rekombinantlar olduğu görülmüştür (Tablo2). Bu suşlara ait kısmi saflaştırılmış enzimlerin protein içerikleri incelendiğinde 40-47 kombinasyonunun sonucu olarak ortaya çıkan rekombinantlardan R3 suşunun en yüksek ksilanaz verimliliğe sahip olduğu ancak saf protein miktarı bakımından da aynı ebeveynlerin R2 rekombinantlarının en yüksek değer taşıdığı görülmektedir. Bu demektir ki bu suşların ürettikleri enzimler farklı ksilanaz aktivitesi taşımakta ve saf protein miktarı yüksekliğinin aktivite yüksekliği anlamına gelmediği anlaşılmaktadır. Tablo 3 ve tablo 4 birlikte incelendiklerinde 40-48 ebeveyninden elde edilen rekombinant suşlar arasında 40-47 rekombinantlarına kıyasla daha verimli ksilanaz enzim ürettikleri açıkça görülmektedir. Tablo 4 incelendiğinde her ne kadar S48 ebeveyn suşunun tüm testlerin sonucuna bakarak en düşük ksilanaz aktivitesi gösteren bir suş olmasına karşılık ondan bu özellik bakımından hiçte fazla aktivite göstermeyen S40 ebeveyn suşuyla füzyonu sonucu oluşan R2 rekombinasyonunun gerek protein konsantrasyonu gerek ksilanaz aktivitesi ve gereksede verimlilik açısından en üst düzeyde başarılı olduğunu belirledik. S47 ve S48 suşlarının ebeveyn olarak kullanıldığı testlerde tek başlarına birbirlerine yakın ksilanaz aktivitesi göstermelerine karşılık 47-48 füzyonunun rekombinantı olarak seçtiğimiz R3 suşunda tüm kriterlerde ve tüm suşlar arasında yapılan karşılaştırma çerçevesinde en başarılı suş olduğu ve yüzde verimliliğin aktivite ve protein konsantrasyonu dikkate alındığında % 131 gibi en üst düzeyde olduğu açıkça görülmektedir. Sonuç olarak, protoplast füzyonu uygulamasında bakterilerin hücre duvarlarının parçalanmasıyla oluşan protoplastlar kaynaştığında genomlarının rastgele homolog rekombinasyonu sonucu oluşan rekombinant türlerde

selüloz ve ksilanaz gibi enzimleri kodlayan genlerin aktivitesini geliştirebilirler.

TEŞEKKÜRLER

FEF2009D20 proje numarası ile Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

[*]Streptomyces suşlarında farklı genetik manipülasyonların antibiyotik ve enzim üretimi yönünden başarı düzeyinin araştırılması isimli doktora tezinden üretilmiş makaledir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, M.S., Talkhan, F.N., Fadel, M., AbouZied, A.A. & Abdel-Razik, A.S. (2011). Improvement of xylanase production from *Streptomyces pseudogriseolus* via UV mutagenesis. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5), 1045-1050.
- Antonopoulos, V., Hernandez, M., Arias, M., Mavrakos, E. & Ball, A. (2001). The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 92-97. DOI: [10.1007/s002530100740](https://doi.org/10.1007/s002530100740)
- Aretz, W., Koller, K.P. & Riess, G. (1989). Proteolytic enzymes from recombinant *Streptomyces lividans* TK24. *FEMS Microbiology Letters*, 65(1-2), 31-35. DOI: [10.1016/0378-1097\(89\)90361-3](https://doi.org/10.1016/0378-1097(89)90361-3).
- Aygan, A. (2008). Halofilik *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Adana, Türkiye. 186s.
- Bailey, M.J., Biely, P. & Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23(3), 257-270. DOI: [10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J).
- Bajaj, B.K., Razdan, K. & Sharma, A. (2010). Thermoactive alkali-stable xylanase production from a newly isolated *Streptomyces* sp. SU 9. *Indian Journal of Chemical Technology*, 17, 375-380.
- Baltz, R.H. (1978). Genetic recombination in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *Microbiology*, 107(1), 93-102. DOI: [10.1099/00221287-107-1-93](https://doi.org/10.1099/00221287-107-1-93)
- Bandlish, R.K., Michael Hess, J., Epting, K.L., Vieille, C. & Kelly, R.M. (2002). Glucose-to-fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and two hyperthermophilic Thermotoga species. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(2), 185-194. DOI: [10.1002/bit.10362](https://doi.org/10.1002/bit.10362)
- Bhosale, H.J., Sukalkar, S.R., Uzma, S.M.Z. & Kadam, T.A. (2011). Production of xylanase by *Streptomyces rameus* grown on agricultural wastes. *Biotechnol Bioinf Bioeng*, 1(4), 505-512.
- Chun, J., Youn, H.D., Yim, Y.I., Lee, H., Kim, M.Y., Hah, Y.C., & Kang, S.O. (1997). *Streptomyces seoulensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(2), 492-498. DOI: [10.1099/00207713-47-2-492](https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-492)
- Crawford, D.L., Lynch, J.M., Whipps, J.M. & Ousley, M.A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied Environmental Microbiology*. 59(11), 3899-3905. DOI: [10.1128/AEM.59.11.3899-3905.1993](https://doi.org/10.1128/AEM.59.11.3899-3905.1993)
- Ding, C.H., Jiang, Z.Q., Li, X.T., Li, L.T. & Kusakabe, I. (2004). High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 7-10. DOI: [10.1023/B:WIBI.0000013278.24679.ed](https://doi.org/10.1023/B:WIBI.0000013278.24679.ed)
- Gold, M.H., Cheng, T.M. & Alic, M. (1983). Formation, fusion, and regeneration of protoplasts from wild-type and auxotrophic strains of the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 46(1), 260-263. DOI: [10.1128/AEM.46.1.260-263.1983](https://doi.org/10.1128/AEM.46.1.260-263.1983)
- Kaneko, T., Saito, K., Kawamura, Y. & Takahashi, S. (2001). Molecular cloning of acid-stable glucose isomerase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a simple two-step PCR method, and its expression in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(5), 1054-1062. DOI: [10.1271/bbb.65.1054](https://doi.org/10.1271/bbb.65.1054)
- Kansoh, A.L. & Nagieb, Z.A. (2004). Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85(2), 103-114. DOI: [10.1023/B:ANTO.0000020281.73208.62](https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020281.73208.62)
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K F. & Hopwood, D.A. (2000). *Practical streptomyces genetics* (Vol. 291). Norwich: John Innes Foundation. Norwich, UK, 613p.
- Lampel, J.S. & Strohl, W.R. (1986). Transformation and transfection of anthracycline-producing streptomycetes. *Applied Environmental Microbiology*, 51(1), 126-131. DOI: [10.1128/AEM.51.1.126-131.1986](https://doi.org/10.1128/AEM.51.1.126-131.1986)
- Lelong, C., Chevallet, M., Luche, S. & Rabilloud, T. (2009). *Silver staining of proteins in 2DE gels. Two-Dimensional Electrophoresis protocols* (ss. 339-350). Humana Press. DOI: [10.1007/978-1-59745-281-6_21](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-281-6_21)
- Li, W., Lanoot, B., Zhang, Y., Vancanneyt, M., Swings, J. & Liu, Z. (2002). *Streptomyces scopiformis* sp. nov., a novel streptomycete with fastigiate spore chains.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**(5), 1629-1633. DOI: [10.1099/00207713-52-5-1629](https://doi.org/10.1099/00207713-52-5-1629)
- Li, X., Sun, B., Zhao, J., Lv, Y., Song, H., Li, E. & Zhu, Y. (2011).** Production and improved bleaching abilities of a thermostable xylanase from a newly isolated *Streptomyces chartreusis* strain. *African Journal of Biotechnology*, **10**(64), 14132-14142. DOI: [10.5897/AJB10.2360](https://doi.org/10.5897/AJB10.2360)
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Meyers, P. R., Porter, D.S., Omorogie, C., Pule, J.M., & Kwetane, T. (2003).** *Streptomyces speibonae* sp. nov., a novel streptomycete with blue substrate mycelium isolated from South African soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(3), 801-805. DOI: [10.1099/ijs.0.02341-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02341-0)
- Nadia, H., El-Nassar, A., Amal, M.A. & Abeer, A.K. (2010).** Xylanase production by *Streptomyces lividans* (NRC) and its application on waste paper. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **4**(6), 1358-1368.
- Nascimento, R.P., Coelho, R.R.R., Marques, S., Alves, L., Grió, F.M., Bon, E.P.S. & Amaral-Collaco, M.T. (2002).** Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**(4), 549-555. DOI: [10.1016/S0141-0229\(02\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00150-3)
- Pigac, J. & Schrempf, H. (1995).** A Simple and Rapid Method of Transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and Other Streptomycetes by Electroporation. *Applied Environmental Microbiology*, **61**(1), 352-356. DOI: [10.1128/AEM.61.1.352-356.1995](https://doi.org/10.1128/AEM.61.1.352-356.1995)
- Raykovska, V., Dolashka-Angelova, P., Paskaleva, D., Stoeva, S., Abashev, J., Kirkov, L. & Voelter, W. (2001).** Isolation and characterization of a xylose-glucose isomerase from a new strain *Streptomyces thermovulgaris* 127, var. 7-86. *Biochemistry and Cell Biology*, **79**(2), 195-205. DOI: [10.1139/o00-100](https://doi.org/10.1139/o00-100)
- Rifaat, H.M., Nagieb, Z.A., & Ahmed, Y.M., (2006).** Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp. *Applied Ecology and Environmental Research*, **4**(1), 151-160. DOI: [10.15666/aer/0401_151160](https://doi.org/10.15666/aer/0401_151160)
- Sharma, P. & Bajaj, B.K. (2005).** Production and partial characterization of alkali-tolerant xylanase from an alkalophilic *Streptomyces* sp. CD3. *Journal of Scientific & Industrial Research*. **64**, 688-697.
- Shirahama, T., Furumai, T. & Okanishi, M. (1981).** A modified regeneration method for streptomycete protoplasts. *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**(5), 1271-1273. DOI: [10.1080/00021369.1981.10864691](https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864691)
- Sommer, P., Bormann, C. & Götz, F. (1997).** Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied Environmental Microbiology*, **63**(9), 3553-3560. DOI: [10.1128/AEM.63.9.3553-3560.1997](https://doi.org/10.1128/AEM.63.9.3553-3560.1997)
- Teeradakorn, S., Talawanich, Y., Suzuki, I., Pinphanichakarn, P., Fujiyama, K., Sekiand, T. & Yoshida, T. (1998).** Characterization of *Streptomyces* D3 derived from protoplast fusion between *Streptomyces cyaneus* 190-1 and *Streptomyces griseoruber* 42-9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **14**(4), 565-570. DOI: [10.1023/A:1008841626968](https://doi.org/10.1023/A:1008841626968)
- Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M. & Sasaki, K. (2003).** Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochemistry*, **38**(9), 1327-1340. DOI: [10.1016/S0032-9592\(02\)00331-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00331-X)
- Trigo, C. & Ball, A.S. (1994).** Is the solubilized product from the degradation of lignocellulose by actinomycetes a precursor of humic substances. *Microbiology*, **140**(11), 3145-3152. DOI: [10.1099/13500872-140-11-3145](https://doi.org/10.1099/13500872-140-11-3145)
- Wang, S.L., Yen, Y.H., Shih, L., Chang, A.C., Chang, W.T., Wu, W.C. & Chai, Y.D. (2003).** Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**(7), 917-925. DOI: [10.1016/s0141-0229\(03\)00246-1](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(03)00246-1)
- Vigal, T., Martin, J.F. & Gil, J.A. (1994).** Expression of the *Streptomyces griseus* α -amylase gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, **118**(3), 259-263. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1994.tb06838.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06838.x)
- Vujaklija, D., Schröder, W., Abramić, M., Zou, P., Lešćić, I., Franke, P. & Pigac, J. (2002).** A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS (L)-lipase gene. *Archives of Microbiology*, **178**(2), 124-130. DOI: [10.1007/s00203-002-0430-6](https://doi.org/10.1007/s00203-002-0430-6)
- Zhang, Q., Li, W.J., Cui, X.L., Li, M.G., Xu, L.H. & Jiang, C. L., (2003).** *Streptomyces yunnanensis* sp. nov., a mesophile from soils in Yunnan, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(1), 217-221. DOI: [10.1099/ijs.0.01851-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.01851-0)