

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ'NDEN TOPLANAN SU VE SEDİMENT
NUMUNELERİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN LAKKAZ ve
MANNANAZ ENZİMLERİNİ ÜRETME KABİLİYETLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Nevroz ASLAN
DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

VAN -2017

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**VAN GÖLÜ'NDEN TOPLANAN SU VE SEDİMENT
NUMUNELERİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN LAKKAZ ve
MANNANAZ ENZİMLERİNİ ÜRETME KABİLİYETLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Nevroz ASLAN

VAN -2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN danışmanlığında, Nevroz ASLAN tarafından sunulan **“Van Gölü'nden Toplanan Su ve Sediment Numunelerinden İzole Edilen Bakterilerin Lakkaz ve Mannanaz Enzimlerini Üretme Kabiliyetleri”** isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 16/ 08 / 2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Mustafa RÜSTEMOĞLU

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kerem ÖZDEMİR

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..25../..08../2017 tarih ve ..2017/40-I..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nevroz ASLAN



ÖZET

VAN GÖLÜ'NDEN TOPLANAN SU VE SEDİMENT NUMUNELERİNDEN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN LAKKAZ ve MANNANAZ ENZİMLERİNİ ÜRETME KABİLİYETLERİ

ASLAN, Nevroz

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN

Ağustos 2017, 69 Sayfa

Bu araştırmanın materyalini; Van Gölü'nden toplanan su ve sediment numuneleri oluşturdu. Toplam 10 su ve sediment numunesinden izole edilen izolatların lakkaz ve mannanaz üretme kabiliyetlerine bakıldı. İzolatların tümünün lakkaz enzimi yönünden negatif olduğu, mannanaz enzimi yönünden N1 ve N2 izolatlarının pozitif olduğu görüldü. N1 ve N2 izolatları, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal özelliklerine ve 16S rRNA sekans analizine göre teşhis edildi. N1 ve N2 izolatının genomik DNA'sı izole edildikten sonra 16S rRNA gen bölgesinin PCR amplifikasyonu, 27F ve 1492R evrensel primerleri ile gerçekleştirildi. Türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için Maksimum Likelihood filogenetik ağacı oluşturuldu. İzolatların filogenetik ağaçta güçlü bir homoloji ile kümelendiği gözlemlenmiş olup genetik pozisyonları ortaya konuldu. Karşılaştırmalı 16S rRNA gen dizisi analizi sonucunda N1 izolatının *Halomonas stevensii*'ye % 99,6 benzerlik gösterdiği ve N2 izolatının *Bacillus agaradhaerens*'e % 98,5 benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: 16S rRNA, Lakkaz, Mannanaz

ABSTRACT

THE PRODUCTION CAPABILITIES OF LACCASE AND MANNANASE ENZYMES OF THE BACTERIES ISOLATED FROM WATER AND SEDIMENT SAMPLES COLLECTED FROM THE VAN LAKE

ASLAN, Nevroz

M. Sc. Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Erdal ÖĞÜN

August 2017, 69 Page

The material of this research; formed water and sediment samples taken from the Van Lake. Isolates, isolated from a total of 10 water and sediment samples were tested for their ability to produce laccase and mannanase. All of the isolates seen to be negative for the laccase enzyme and N1 and N2 isolates positive for the mannanase enzyme. N1 and N2 isolates were identified according to their morphological, physiological biochemical characteristic and 16S rRNA sequencing analysis. The phylogenetic positions of the isolated two bacteria based on the determination of some hydrolytic extracellular enzyme activities and the sequence analysis of the 16S rRNA gene regions have been determined. After isolating the genomic DNA of the N1 and N2 isolates, PCR amplification of the 16S rRNA gene region was performed with universal primers 27F and 1492R. Maximum Likelihood phylogenetic tree was constructed to determine the genetic distance between species. It was observed that the isolates were clustered with a strong homology in the phylogenetic tree and their genetic positions were revealed. Comparative 16S rRNA gen sequence analysis revealed that the N1 isolate was 99.6% similar to *Halomonas stevensii* and the N2 isolate was 98.5% similar to *Bacillus agaradhaerens*.

Keywords: 16S rRNA, Laccase, Mannanase



ÖN SÖZ

Yüksek lisans çalışmam boyunca bana böyle bir çalışma imkanı veren, araştırma konumun belirlenmesinde beni yönlendiren ve sonuçlanması için her türlü fedakarlığı yapan kıymetli danışmanım Yrd. Doç. Dr. Erdal ÖĞÜN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Başta Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. İsmail ÇELİK olmak üzere değerli arkadaşım Dr. Metin ERTAŞ'a ve tüm Moleküler Biyoloji Bölümü öğretim üyelerine, göstermiş oldukları iyi niyet ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Benim bu aşamalara gelebilmemde her türlü fedakarlığı yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemedi her türlü zorlukta destekçim olan çok değerli ve sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nevroz ASLAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
EKLER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞİ.....	5
2.1. Van Gölü'nün Özellikleri.....	5
2.2. Enzimler.....	5
2.2.1. Lakkaz enzimi.....	6
2.2.1.1. Lakkaz enziminin endüstriyel kullanım alanları.....	9
2.2.1.1.1. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanımı	9
2.2.1.1.2. Tekstilde kullanımı.....	10
2.2.1.1.3. Gıda endüstrisinde kullanımı.....	11
2.2.1.1.4. Çevre teknolojisinde kullanımı.....	12
2.2.1.1.5. Biosensör olarak kullanımı.....	13
2.2.1.1.6. Farmasötik kullanımı.....	13
2.2.1.1.7. Diğer endüstriyel alanlarda kullanımı.....	14
2.2.2. Mannanaz enzimi.....	15
2.2.2.1. Mannanaz enziminin endüstriyel kullanım alanları.....	17
2.2.2.1.1. Kağıt hamurunun ve kağıtların biyolojik olarak temizlenmesindeki kullanımı.....	17
2.2.2.1.2. Deterjan endüstrisinde hidrolitik ajan olarak kullanımı.....	17
2.2.2.1.3. Kahve çekirdeğinin hidrolizinde kullanımı.....	18

Sayfa

2.2.2.1.4. Hayvan yemlerinin iyileştirilmesinde kullanım.....	18
2.2.2.1.5. Balık yemi katkı maddesi olarak kullanımı.....	19
2.2.2.1.6. Biyolojik kontrol ajanları olarak kullanımı.....	19
2.2.2.1.7. Farmasötik uygulamalarda kullanımı.....	19
2.2.2.1.8. Mannanazların diğer uygulamaları.....	20
2.3. <i>Bacillus</i> Cinsi.....	21
2.4. <i>Halomonas</i> Cinsi.....	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Alkalofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyeri	25
3.1.1.1. Alkalofilik agar.....	25
3.1.2. Kullanılan çözelti ve boyalar	26
3.1.2.1. Kristal Viyole boyası	26
3.1.2.2. Safranin boyası.....	26
3.1.2.3. Lügol çözeltisi.....	26
3.1.2.4. Alfa-naftol çözeltisi.....	26
3.1.2.5. Sülfanilik asit çözeltisi.....	26
3.1.2.6. %3'lük H ₂ O ₂ çözeltisi.....	26
3.1.2.7. Rhodamin B boyası	27
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Su ve Sediment örneklerinin toplanması	27
3.2.2. Su ve sediment örneklerinden alkalofilik bakterilerin İzolasyonu.....	27
3.2.3. Alkalofilik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi.....	28
3.2.4. Alkalofilik bakteri suşlarının koloni ve hücre morfolojilerinin incelenmesi.....	28
3.2.5. Bakteri suşlarının gram boyama yöntemi ile boyanması	28
3.2.6. Biyokimyasal testler.....	28
3.2.6.1. İndol testi.....	28
3.2.6.2. Sitrat testi.....	29
3.2.6.3. Voges - Proskauer (VP) testi.....	29

	Sayfa
3.2.6.4. Karbonhidrat oksidasyon/fermentasyon testleri.....	29
3.2.6.5. Nitrat indirgenmesi testi.....	30
3.2.6.6. Beta Galaktosidaz (ONPG) testi (OXOID ONPG DISCS Code: DD0013).....	30
3.2.6.7. Oksidaz testi (Microbact Oxidase Strips MB0266).....	30
3.2.7. Ekstraselüler hidrolitik enzim üretiminin belirlenmesi.....	30
3.2.7.1. Lakkaz enzimi üretme kabiliyetlerinin belirlenmesi	30
3.2.7.2. Mannanaz enzimi üretme kabiliyetlerinin belirlenmesi.....	31
3.2.7.3. Katalaz testi.....	31
3.2.7.4. Nişasta hidroliz testi.....	32
3.2.7.5. Tween 80 hidroliz testi.....	32
3.2.7.6. Kazein hidroliz testi.....	32
3.2.7.7. Ksilan hidrolizi testi.....	32
3.2.8. Moleküler yöntemler.....	33
3.2.8.1. Genomik DNA izolasyonu.....	33
3.2.8.2. 16S rRNA'nın PZR amplifikasyonu.....	35
3.2.8.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Su ve Sediment Örneklerindeki Bakteri Sayısı.....	38
4.2. Alkalofilik Bakterilerin Saf Kültürlerinin Elde Edilmesi.....	38
4.3. Alkalofilik Bakteri Suşlarının Koloni ve Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi.....	39
4.4. Alkalofilik İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	40
4.5. Genomik DNA izolasyonu	44
4.6. 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu.....	44
4.7. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi.....	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR.....	55
EKLER.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	69

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar.....	35
Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları.....	36
Çizelge 4.1. N1 ve N2 izolatlarına uygulanan biyokimyasal testler.....	40
Çizelge 5.1. N1 izolatının BLAST sonucu.....	54
Çizelge 5.2. N2 izolatının BLAST sonucu.....	54





ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Lakkaz enziminin yapısı (Micheal ve ark., 2004).....	7
Şekil 2.2. Mannanaz enziminin yapısı (Hilge ve ark., 1998).....	16
Şekil 3.1. Van Gölü'nün uydudan görüntüsü.....	25
Şekil 3.2. Lakkaz substratları (ABTS ve Guaicol).....	31
Şekil 4.1. N1 ve N2 izolatlarının saflaştırılmış görüntüleri.....	38
Şekil 4.2. N1 izolatına ait gram boyama görüntüsü.....	39
Şekil 4.3. N2 izolatına ait gram boyama görüntüsü.....	39
Şekil 4.4. Microbact Oxidase Strips MB0266 (Oxoid) ile yapılan oksidaz testi görüntüsü.....	41
Şekil 4.5. N1 ve N2 izolatına ait katalaz pozitif test görüntüsü.....	42
Şekil 4.6. N1 izolatının mannanaz pozitif görüntüsü.....	43
Şekil 4.7. N2 izolatının mannanaz pozitif görüntüsü.. ..	43
Şekil 4.8. S1 Lakkaz pozitif kontrol suşu (Sarıkamış).....	43
Şekil 4.9. DNA izolasyonu yapılan izolatların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	44
Şekil 4.10. 16S rRNA gen bölgesinin PZR metodu ile amplifikasyonunun %1,5'lik agaroz jel görüntüsü (M:Marker).....	44
Şekil 4.11. Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre N1 izolatı için 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç.....	46
Şekil 4.12. Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre N2 izolatı için 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç.....	47



EKLER LİSTESİ

Ek	Sayfa
Ek 1. Besiyerleri.....	67
Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar.....	69





SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μ	Mikron
bç	Baz çifti
g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nt	Nükleotit
μ g	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
sp.	Tür (tek)
spp.	Türler
subsp.	Alttür
μ M	Mikromolar
μ l	Mikrolitre
S	Sedimentasyon (çökelme) katsayısı
kDa	Kilo Dalton

Kısaltmalar	Açıklamalar
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo nükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetat
MCBP	Çoklu bakır mavi protein süper ailesi
ABTS	2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devamı)

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
STE	Sodium Chloride-Tris-EDTA
TBE	Tris Boric Asit EDTA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TE	Tris EDTA
ddH₂O	Deionize saf su
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ML	Maksimum Likelihood
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromür
TSA	Triptic Soy Agar
TSB	Triptic Soy Broth

1. GİRİŞ

Medeniyetin oluşmaya başladığı ilk çağlardan beri insanoğlu enzimlerin rol aldığı birçok biyoteknolojik süreci gündelik hayatında kullanmıştır. Ekmek, şarap, peynir, yoğurt yapımı gibi birçok biyoteknolojik olayın uygulanması gözlem yoluyla elde edilen bilgilerin tekrar tekrar uygulanmasıyla gerçekleştirilirken, 19. yy.'ın başında biyoloji ve enzimoloji biliminde gerçekleşen baş döndürücü ilerlemeler sayesinde şu an biyoteknoloji çağımızın getirdiği tüm problemlere çözüm bulmaya aday bir bilim dalı haline gelmiştir (Beg ve ark., 2001).

Enzimler hakkındaki bilgiler eskilere dayanmakla birlikte mikrobiyal yolla üretim yakın geçmişte önem kazanmıştır. Yaşayan hücrelerden aktif enzimin ayrılabilmesi ilk kez 1897 yılında Bunchner tarafından gösterilmiş ve mayanın alkol fermantasyonunun başlangıcında katılması yerine, yaşayan hücre olmadan maya özütünden yararlanılmıştır. Yine küf enzimlerinin ilk kez ticari kullanımları 20. yüzyıl başında, bakteriyel enzimlerin kullanımı ise I. Dünya Savaşı sırasında olmuştur. Hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler artık çok çeşitli amaçlar için kullanılmak üzere günlük hayata girmişlerdir. Günümüzde mikrobiyal kaynaklı endüstriyel enzimlere olan ihtiyaç sürekli artmaktadır. Reaksiyonların gerçekleşmesi için ihtiyaç duyulan pahalı kimyasallar artık yerini enzimlere bırakmaktadır. Enzimler gıda, süt, ilaç, deterjan, tekstil ve kozmetik sanayisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

Mikrobiyal enzimler endüstriyel biyolojik işlemlerin geliştirilmesinde büyük önem taşır. Mevcut uygulamalar kağıt hamuru ve kağıt, deri, deterjan ve tekstil, ilaç, kimya, gıda ve içecek, biyoyakıt, hayvan yemi ve kişisel bakım gibi birçok farklı pazara odaklanmaktadır. Günümüzde daha yeni, sürdürülebilir ve ekonomik olarak rekabetçi üretim süreçleri geliştirmek için yeni, gelişmiş ve çok yönlü enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Mikrobiyal çeşitlilik, metagenomik ve genomik gibi modern moleküler teknikler, katalitik özellikleri rasyonel, yarı rasyonel ve rasgele yönlendirilmiş evrim üzerine kurulu farklı stratejilerle geliştirilebilir yeni mikrobiyal enzimleri keşfetmek için kullanılmaktadır. Çoğu endüstriyel enzim, bakteri ve mantarlarda üretilen rekombinant şekillerdir (Adrio ve Demain, 2014).

Mikrobiyal enzimlerin, çeşitli endüstrilerde ve uygulamalarda kullanımına yol açan metabolik katalizörler olarak önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Endüstri enzimleri için son kullanım pazarı çok sayıda endüstriyel ticari uygulamayla son derece yaygındır (Adrio ve Demain, 2005) Enzimler kullanılarak 500'den fazla endüstriyel ürün üretilmektedir (Kumar ve Singh, 2013). Endüstriyel enzimlere olan talep, sürdürülebilir çözümler için gittikçe artan bir ihtiyaçla sürekli artmaktadır. Mikroorganizmalar birçok enzimin en büyük ve yararlı kaynaklarını sunmuş ve hizmet etmeye devam etmiştir (Adrio ve Demain, 2008). Kimyasal ve ilaç üretimi için kimyasal sentez de dahil olmak üzere pek çok endüstriyel prosesin düşük katalitik verimlilik, şıral sentez için enantiyomerik özgünlük eksikliği, yüksek sıcaklık ihtiyacı, düşük pH ve yüksek basınç gibi birçok dezavantajı vardır. Ayrıca, organik çözücülerin kullanılması organik atıklara ve kirleticilere neden olur. Enzimler hafif tepkime koşullarında (örn. sıcaklık, pH, atmosferik koşullar) çalıştıkları, substrat fonksiyonel gruplarının korunmasına ihtiyaç duymadıkları, uzun yarılanma ömürlü oldukları, stereo-seçiciliğin yüksek olduğu stereo-ve kimyasal olarak tanımlanmış tepkime ürünlerini 105 ila 108 kat hızlandırarak doğal olmayan alt tabakalar üzerinde çalışırlar (Johnson, 2013). Ayrıca, enzimler, temel özelliklerini geliştirmek üzere kararlılık, substrat özgüllüğü ve spesifik aktiviteyi genetik ve kimyasal olarak seçilebilir. Bununla birlikte, enzimlerin kullanımına ilişkin dezavantajlar vardır, örneğin bazı enzimler ko-faktörleri gerektirir. Ayrıca kofaktör geri dönüşümü ve bütün hücrelerin kullanılması gibi çeşitli yaklaşımlar bu sorunu çözebilir. Yaklaşık 150 endüstriyel süreç, enzimler veya tüm mikrobiyal hücre katalizörleri kullanmaktadır.

Enzim kaynağı olarak mikroorganizmaların tercih edilmesinin nedenleri; yan ürün oluşturmalarının az olması, aktivitelerinin yüksek olması, daha ekonomik olması, stabiliteye sahip olması, yüksek oranlarda ve saflıkta üretilibilmeleridir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999). Mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin tüm dünya genelinde yıllık kullanım oranlarına bakıldığında %25 alkalın proteaz, %21 diğer proteazlar, %18 amilaz, %10 renin, %3 tripsin, %3 lipaz ve %10 diğer karbonhidrat parçalayan enzimler (selüloz ve ksilanaz gibi), %10 kadar ise analitik ve farmasötik enzimlerin olduğu şeklinde bir dağılım belirlenmiştir (Rao ve ark., 1998).

Enzimatik oksidasyon teknikleri hamur ve kağıt, tekstil ve gıda endüstrileri gibi çok çeşitli endüstriyel alanlarda potansiyele sahiptir. Moleküler oksijen üzerinde bir elektron alıcısı olarak geri dönüşüm enzimleri en ilginç olanlardır. Dolayısıyla, lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz; EC 1.10.3.2) yukarıda belirtilen amaçlar için özellikle umut verici bir enzimdir. Lakkaz molekülü dimerik veya tetramerik bir glikoproteindir ve genellikle üç redoks alanında dağıtılan monomer başına dört bakır atomu içerir (Gianfreda ve ark., 1999). Bu enzim orto ve paradifenollerin, aminofenollerin, polifenollerin, poliaminlerin, ligninlerin ve aril diaminlerin yanı sıra moleküler dioksijenin suya indirgenmesine bağlı bazı inorganik iyonların oksidasyonunu katalize eder (Yaropolov ve ark., 1994; Solomon ve ark., 1996).

Lakkazlar çok çekirdekli bakır içeren oksidazlara ait oksidoredüktazlardır. Moleküler oksijen pahasına substratların monoelektronik oksidasyonunu katalize eder. Bu esasen 'çevre dostu' enzimlere olan ilgi son yıllarda önemli bir yer kazanmıştır. Hava ile çalışıyor olması ve yalnızca yan ürün olarak su ürettiği olması bu enzimlere olan ilgiyi oldukça arttırmıştır.

Lakkaz birçok canlı tarafından kullanılan bir enzimdir. Canlılar lakkaz ile önemli metabolik faaliyetlerini yerine getirebilmiştir. Lakkaz, hücre dışı sindirim enzimi olarak rekalsitrant polimerlerin depolimerizasyonunda, morfolojik farklılaşmada veya pigmentasyon gibi polimerizasyon işlemlerini gerçekleştirebilir. Canlılar aleminde geniş bir kullanım alanı bulan lakkaz, teknolojik alanda da yine aynı düzeyde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Lakkazın ucuz, zahmetsiz, oksijen ile rejenere olabilen, dayanıklı, çevre dostu doğası geniş bir substrat aralığının olması ve birçok proseste atık olarak açığa çıkan veya birçok biyoteknolojik ürünün temel yapı taşı oluşturulan işlenmesi zor fenolik bileşikler işlenebilir kılması lakkazı vazgeçilmez bir biyokatalist yapmıştır (Duran M., 2011). Bu enzimlerin kullanımları tekstilden kağıt hamuru ve kağıt endüstrisine, gıda uygulamalarından biyolojik giderme süreçlerine kadar uzanıyor.

β -mannanazlar (EC 3.2.1.78), mannanlar, galaktomannanlar, glukomannanlar ve galaktoglukanetnamelerde 1,4-beta-D-mannozidik bağları hidroliz eden hücre dışı enzimlerdir. Mannanlar ve heteromannanlar, sert ağaçlar ve yumuşak ağaçlar, baklagil bitkilerinin tohumları ve fasulyelerde hemiselüloz fraksiyonunun bir parçası olarak doğada yaygın olarak bulunurlar. Mikroorganizmalar mannanazların en güçlü üreticileri olup hızlı büyümeleri, yetiştirme için sınırlı alan ve genetik manipülasyona hazır erişim

açısından tercih edilen enzim kaynaklarını temsil etmektedir. (Dhawan ve Kaur, 2007). Beta-Mannanazlar, gıda, yem ve kağıt endüstrisinde ve kağıt endüstrisinde çok sayıda uygulamaya sahiptir.

Mannanazlar, çeşitli mantar, maya, bakteri ve deniz yosunları ile karasal bitkilerin çimlenmekte olan tohumlarından ve çeşitli omurgasızlardan üretilir. Bu seçenekler arasında, düşük maliyet, yüksek üretim hızı ve kolayca kontrol edilen koşullar nedeniyle beta-mannanazların mikroorganizmalar tarafından üretilmesi daha umut vericidir (Feng ve ark., 2003). Beta-mannanaz, sanayinin birçok alanında kullanılan çok umut verici bir enzim olduğu için, işlemlerden daha yüksek verim elde etmek ve süreçlerin süresini azaltmak için mannanaz üretiminin arttırılması gerekir; böylece, enzimi optimize etmek için ekonomik bir üretim sağlanabilir.

Bu çalışmada, Van Gölü'nden izole edilen bakterilerin ekstraselüler enzimler olan lakkaz ve mannanaz aktivitelerini belirlemek, bu izolatların biyokimyasal testlerini yaparak 16S rRNA gen bölgelerinin dizi analizleriyle moleküler taksonomisinin yapılması hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞİ

2.1. Van Gölü'nün Özellikleri

Van Gölü, 3713 km²'lik alanı ile Türkiye' nin en büyük gölü olması özelliğini taşımasının yanı sıra aynı zamanda yeryüzündeki en büyük soda gölüdür. Kapalı göller arasında da hacim bakımından (607 km³) dördüncü sırayı almaktadır. Van Gölü'nün güneybatı ucundaki Tatvan koyu ile kuzeydoğu ucundaki Erciş körfezi arasındaki uzun eksen 130 km, kuzeybatıdaki Ahlat koyu ile güneydoğudaki Gevaş koyu arasındaki eksen ise 80 km kadardır. Gölün kenarındaki en alçak yer Reşadiye doğusunda bulunmaktadır ve 1800 m yüksekliğindedir. Gölün doğu kısmı batı kısmına göre daha sığdır. En sığ kısmı Van koyu ile Erciş körfezidir. Derinlik bu kesimlerde 50 m civarındadır. Ahlat ile Adilcevaz arasında ise 450 m derinlik ölçülmüştür (Çiftçi ve ark., 2008).

Van Gölü'nün suyu acı, tuzlu ve sodalıdır. Bunun başlıca nedeni, akarsuların taşıdığı tuzlu suların gölde birikmesi ve buharlaşma nedeniyle yoğunlaşmasıdır. Tuz tenörünün yüksek olması, bor ve sodyum karbonatın varlığı, volkanik kayaçların yaygınlığından kaynaklanır. Tuzluluk oranı % 0.224'dür. Sudaki tuz bileşenlerinin kendi aralarındaki oranları ise; % 42 NaCl, % 34 NaCO₃ , %16 Na₂SO₄ , %3 KSO₄ ve %2.5 MgCO₃ şeklinde olup pH değeri 9,8'dir. Bu özelliği ile göl, soda üretim kaynağı olarak da büyük bir potansiyele sahiptir (Çiftçi ve ark., 2008).

2.2. Enzimler

Son yıllarda gerek biyoteknoloji alanındaki gelişmeler, gerekse çevre duyarlılığının artması sonucu, enzimlerin çeşitli endüstri kollarında kullanımı, diğer ülkelerde olduğu gibi Türkiye'de de giderek yaygınlaşmıştır. Endüstriyel enzimler ülkemizde en çok tekstil ve deterjan sanayinde kullanılmakta olup, bunu gıda ve deri endüstrisi izlemektedir (Padley, 2003).

Hücrelerdeki metabolik faaliyetlerin tümünü yöneten özel katalizörlere enzim adı verilmiştir. Organik kimyada kullanılan metotlar ile gerçekleştirilmesi çok güç olan

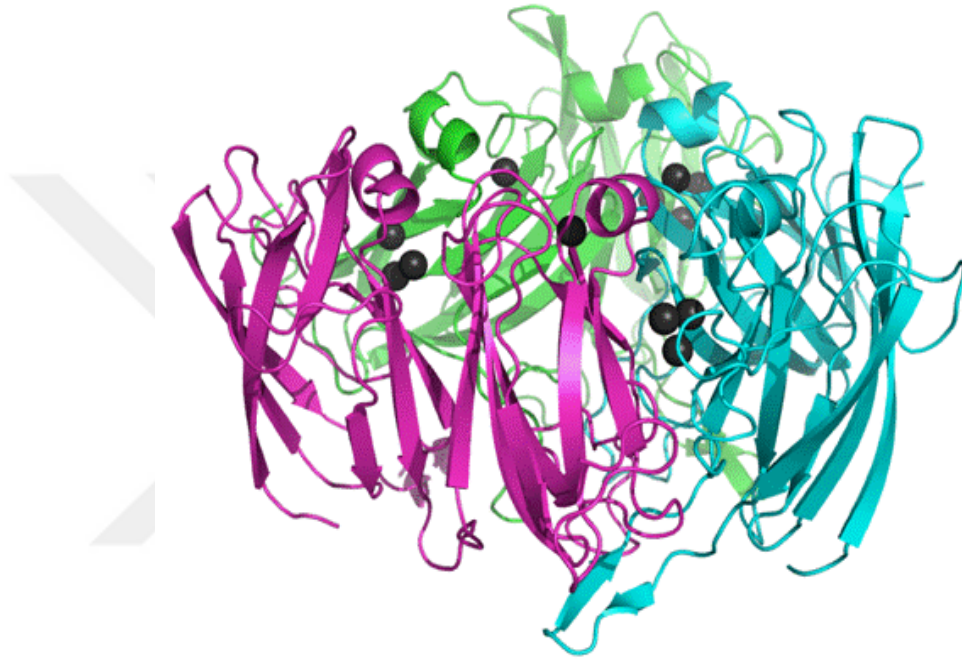
birçok reaksiyonların uygun ve spesifik enzimlerle kolaylıkla gerçekleşmesi, enzimlerin canlı hücrelerden izole edilerek çeşitli amaçlar için kullanılması fikrini doğurmuştur. Enzimatik işlemlerin, geleneksel işlemlere oranla daha az miktarda atık oluşturarak daha az çevre kirliliğine yol açması, uygun ve ekonomik şartlarda gerçekleştirilebilmesi enzim kullanımını daha cazip hale getirmektedir. Mikroorganizma kökenli enzimlerin biyoteknolojik işlemlerle daha ekonomik biçimde üretimi ve suda çözünmeyen matrikslerle immobilize edilerek daha uzun süre kullanılabilmesi, mikrobiyal enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanılmasındaki artış nedenleridir (Gümüsel, 2002). Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler genel olarak mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bununla birlikte çok az bir kısmı da bitkisel ve hayvansal kaynaklı olarak sağlanmaktadır.

2.2.1. Lakkaz enzimi

Lakkazlar (benzendiol oksijen oksidoredüktazlar, EC 1.10.3.2), çeşitli ikame edilmiş fenolik bileşiklerin elektron alıcısı olarak moleküler oksijen kullanarak oksidasyonu katalizleyen polifenol oksidazlardır (PPO). Lakkazın geniş bir yelpazede substratlara etki etme kabiliyeti, onları çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için son derece yararlı biyokatalistler haline getirir. Bugüne dek, lakkazlar çoğunlukla bitkiler ve mantarlardan izole edilmiş ve karakterize edilmiştir ve şu anda biyoteknolojik uygulamalarda mantar lakkazları kullanılmaktadır. Buna karşılık, bakteriyel lakkazlar hakkında çok az şey biliniyor, ancak bütün genom analizinde son zamanlarda kaydedilen hızlı ilerleme, enzimlerin bakterilerde yaygın olduğunu düşündürüyor. Bakteriyel genetik araçlar ve biyoteknolojik süreçler iyi kurulduğundan, gelişmekte olan bakteriyel lakkazlar son derecede önemlidir (Sharma ve ark., 2007)

Lakkaz; tarihte ilk defa Japonya’ da 1883 yılında lacquer ağacından (*Rhus vernicifera*) izole edilmiştir (Reinhammar 1984). İsmi (LAC-CASE) de bu ağaçtan almıştır (Alcalde, 2004). Çoklu bakır mavi protein süper ailesi (MCBP); çoklu protein domain’ lerini içermekte ve bakır iyonlarının sahip olduğu redoks yeteneğini kullanmaktadırlar. Lakkaz, MCO grubuna ait olmasından dolayı, grubun karakteristik özelliklerini taşımaktadır. Monomerinin molekül ağırlığı 50 – 100 kDa arasında değişmektedir (Claus, 2003). Lakkaz, aktivite gösterebildiği geniş bir substrat aralığına

sahiptir. Yükseltgediği substratlardan aldığı elektronları içerisinde depolayan lakkaz, rejenerasyonu için havadaki oksijeni kullanması sayesinde, hem NAD/NADH gibi kofaktörlere ihtiyaç duymamakta, hem de oksijen ile tepkimesi sonunda sadece su açığa çıkmasından dolayı, lakkaz çevre dostu bir oksitleyici ajan haline gelmiştir. Genellikle hücre dışı bir enzim olan lakkazın termal ve pH dayanırlılığının yüksek olması ise lakkazı özel yapan diğer bir özelliğidir (Herrera et al, 2007).



Şekil 2.1. Lakkaz enziminin yapısı (Micheal ve ark., 2004).

Lakkazlar doğada yaygın olan enzimlerdir. Şeftali (Lehman ve ark., 1974), çınar (Bligny ve Douce, 1983), tütün (De Marco ve Roubelakis-Angelakis, 1997) ve kavak (Ranocha ve ark., 1999) gibi sayısız bitkilerde lakkazlar keşfedilmiştir. Bitki lakkazları geniş teşhirlerine rağmen karakterize edilmemiş veya yaygın olarak kullanılmamıştır, zira bunların ham bitki ekstraktları, geniş substrat özgüllükleri ile çok sayıda oksidatif enzim içerdikleri için bunların tespiti ve saflaştırılması genellikle zordur (Ranocha ve ark., 1999). Şimdiye kadar karakterize edilen lakkazların çoğunluğu mantarlardan, özellikle etkili lignin bozucu olan beyaz çürük Basidiomycet'lerden türetilmiştir.

Prokaryotik lakkazların yaygın olarak ortaya çıkmasına ilişkin bilgiye rağmen, şu ana kadar sadece üç bakteriyel lakkazın tam saflaştırılması ve karakterizasyonu sağlanmıştır. Prokaryotik lakkazın ilk raporu, lakkazın katalitik bir altbirim ve bir veya

iki büyük zincirden oluşan multimerik bir enzim olarak ortaya çıktığı rizosferik bakteri *Azospirillum lipoferum*'dan (Givaudan ve ark., 1993) kaynaklanmaktadır. Enzim hücre pigmentasyonunda ve bitki fenolik bileşiklerinin (Faure ve ark., 1994; 1995) ve / veya elektron taşınımında (Alexandre ve ark., 1999) kullanılmasıyla rol oynamaktadır.

Melanogenik bir deniz bakterisi *Marinomonas mediterranea* tarafından, hem tirozinaz hem de lakkazın özelliklerini taşıyan substratları okside edebilen olağandışı çok güçlü bir PPO olan iki farklı polifenol oksidaz (PPO) üreten bir başka lakkaz rapor edilmiştir (Solano ve ark., 1997).

Lakkaz benzeri aktivite, diğer bakterilerde, örneğin *Pseudomonas syringae*'den (Mellano ve Cooksey, 1988) CopA proteini ve *Escherichia coli*'den PcoA proteinde (Brown ve diğ., 1995) bulunmuştur. Bunlar, yapısal olarak standart bakır bağlama yerlerine göre çok-bakır oksidazlara homologdur ve bakteriyel bakır direnci için önemli olduğu gösterilmiştir.

Streptomyces griseus'tan gelen EpoA, lakkaz veya ilgili enzim olarak fizikokimyasal ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Endo ve diğerleri 2003) ve *E. coli*'de rekombinant rEpoA olarak ifade edilmiştir. 114 kDa'lık bir homotrimer olarak gerçekleşir ve bilinen guaicol ve syringaldazine de dahil olmak üzere bir takım substratları oksitlemediğinden, nispeten dar substrat özgüllüğüne sahiptir. Enzim, *Streptomyces* spp. morfogenezinde rol oynamaktadır. (Endo ve ark., 2002).

En iyi incelenen bakteri lakkazı, *Bacillus subtilis*'in endospor tabaka bileşeni CotA'dır. CotA geni, dış spor tabakasına ait 65-kDa'lık bir proteini kodlar. CotA, melanin benzeri bir ürün olduğu düşünülen kahverengi spor pigmentinin biyosentezine katılır (Driks, 2004) ve spor tabakasının UV ışığına ve hidrojen peroksitine karşı sağladığı korumanın çoğundan sorumlu olduğu görülmektedir. CotA proteini, çok bakır oksidazlarla benzerlik sergiler. Bu proteinin 80 °C'de yaklaşık 2 saatlik yarılanma ömrü ve optimum sıcaklığı 75 °C'dir (Martins ve ark., 2002).

Lakkaz benzeri bir enzim aktivitesi *Bacillus sphaericus*'un sporlarında da bulunmuştur (Claus ve Filip, 1997). Bir baraj suyu SG1'in lakkaz benzeri bir spor proteininin Mn (II) 'yi oksitlediği gösterilmiştir.

Son zamanlarda, *Bacillus halodurans* C-125'in ORF bh2082 tarafından kodlanan bir protein (Ruijsenaars ve Hartmans, 2004) genom madenciliği ile potansiyel bir bakteriyel lakkaz olarak tanımlanmıştır. Enzim substrat olarak syringaldazin ile optimum

bir alkalın pH değeri gösterdi ve klorür tarafından inhibe edilmek yerine uyarıldı. Bu bulgu, klasik lakkazların dezavantajlarından bazılarına sahip olmayabilecek olağandışı lekeler kaynağı olarak bakterilerin potansiyelinin altını çizmektedir. Benzer şekilde, endüstriyel atık su boşaltılan topraktan izole edilen bir melanojenik olmayan alkalotolerant c-proteobakteriyumun, tirozinaz aktivitesine sahip olmayan pH'a kararlı bir lakkaz ürettiği gösterilmiştir. Etkinlik spesifik substrat reaksiyonları, spesifik inhibitörlere duyarlılık ve bakır atomlarının varlığı ile gösterildi (Bains ve ark., 2003; Malhotra ve ark., 2004).

2.2.1.1. Lakkaz enziminin endüstriyel kullanım alanları

Lakkazın geniş bir substrat aralığına sahip olması, bu enzimi birçok endüstriyel kuruluşa hitap edebilecek konuma getirmiştir. Lakkazın düşük sıcaklık ve basınçta çalışması ile sağlanan enerji tasarrufu, biyobozunur olması, lakkaz tabanlı biyokatalistlerin yüksek verimde, kabul edilebilir ve doğa dostu bir oksitleyici ajan olması lakkazı vazgeçilmez kılan önemli özellikleridir.

Günümüzde lakkaz başlıca;

- ❖ Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanımı
- ❖ Tekstilde kullanımı
- ❖ Gıda endüstrisinde kullanımı
- ❖ Çevrede kullanımı
- ❖ Biosensör olarak kullanımı
- ❖ Farmasötik kullanımı
- ❖ Diğer endüstriyel alanlarda kullanımı olarak değerlendirilir.

2.2.1.1.1. Kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde kullanımı

Kağıdın hazırlanmasında, ligninin bozunması, klor veya oksijen tabanlı kimyasal oksidanlar aracılığı ile yapılmaktadır. Lakkaz ile yapılan klorüz ağartma işlemi daha beyaz kağıtların eldesinde kullanılmıştır. Odun hamurunun ön işleminden geçirilmesinde kullanılan geleneksel klor tabanlı ağartıcıların aksine lakkaz ile yapılan ağartma işlemleri alternatif kimyasal uygulamalara göre daha yumuşak ve daha temiz bir oksitleme

kaynağıdır. Diğer bir proses ise boya giderimi ve renk giderme işlemlerinde kullanılmasıdır (Duran, M., 2011). Lakkazlar gibi oksidatif enzimleri kullanarak lignin yıkımını gerçekleştirebilirler (Mayer ve Staples, 2002). Kağıt hamurundan lignin gideriminde lakkazlar lignin içerisinde reaktif radikaller oluşturarak odun lifinde değişiklikler oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır (Couto ve Herrera, 2006). Ligninin yıkılması işleminde enzimin aktif bölgesi ile lignin çekirdeği arasında sürekli hareket ederek redoks reaksiyonlarını gerçekleştiren ve lignin giderim verimini artıran küçük aracı moleküller oldukça önemlidir. Lakkaz gibi oksidatif enzimler kağıt hamuru üretiminde maliyeti azaltmada umut verici çözümler sağlamaktadır (Riva, 2006).

2.2.1.1.2. Tekstilde kullanımı

Boyar madde pazarının üçte ikisini tekstil endüstrisi kapsamaktadır. Bu endüstriler büyük hacimlerde su ve kimyasal tüketirler. Kullanılan kimyasal ayırıcılar inorganik bileşiklerden polimerlere ve organik ürünlere kadar çok farklı kimyasal bileşimde olabildiğinden çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedirler. Bu nedenle endüstride kullanılan sentetik boyalar da dahil farklı kimyasal yapıdaki boya maddeleri yıkmaya potansiyeline sahip lakkaz tabanlı işlemlerin gelişimi bu problemlere cazip bir çözüm olabilir (Couto ve Herrera, 2006). Ayrıca, Novozyme (Novo Nordisk, Danimarka) 1996 yılında DeniLite adı altında aracı bir molekül ile biyolojik ağartma yapan ilk endüstriyel lakkaz enzimini kot kumaşları için kullanmıştır (Couto ve Herrera, 2006). Bazı kotların belirli bölgelerinde boyanın renginin açılması için taşlama yapılmaktadır (Nyanhongo ve ark., 2002). Her ne kadar taşlamanın amacı kotun belirli bölgelerinde boyanın renginin açılması olsa da taşlama esnasında sürtünmeden dolayı kumaşta zedelenmeler gerçekleşmekte ve kotun kullanım süresi azalmaktadır. Lakkaz enzimiyle kotun belirli bölgelerinde boyanın enzimatik olarak kısmi yıkımıyla kumaşta sürtünmeden dolayı meydana gelen tahribat ortadan kaldırılmış olacaktır. Bu nedenle kot kumaşlarının ağartılmasında lakkaz enzimi kullanılabilir (Birhanlı, 2003).

2.2.1.1.3. Gıda endüstrisinde kullanımı

Birçok lakkaz substratı olan; karbonhidrat, doymamış yağ asitleri, fenol ve tiol içeren proteinler gıdaların içindeki önemli bileşenlerdir. Bu bileşenlerin lakkaz ile modifikasyonu yeni fonksiyonellik, kalite geliştirilmesi veya maliyetlerin azaltılmasını sağlar. Bazı durumlarda oksijen gıdanın kalitesini bozmaktadır. Sistemdeki oksijenin uzaklaştırılmasında kullanılır. Bitkisel yağlardaki yağ kalitesi keza oksijen giderilmesi ile artmaktadır. Kakaonun işleme sürecinde de oksijensizleştirme lakkaz ile yapılmaktadır.

Lakkazlar besin veya içeceklerin rengini değiştirmek veya artırmak amaçlı yapılan işlemlerde kullanılabilir. Örneğin berrak meyve suyu, bira, şarapta oluşan esmerleşme, pus oluşumu ve bulanıklıktan sorumlu istenmeyen fenoliklerin ortadan kaldırılmasında lakkaz enzimi kullanılabilir. Şıra ve şaraplar etanol, organik asitler, tuzlar ve fenolik bileşikler gibi farklı kimyasal bileşiklerin kompleks karışımlarıdır. Lakkaz enzimi biranın tatsızlaşmasına neden olan bileşiklerin oluşumunu engellemek amacıyla bira yapımında kullanılmakta olup, lakkazın besin endüstrisindeki esas uygulamalarından biri de şarap stabilizasyonudur. Şaraplarda meydana gelen renksizleşme ve tat değişimini önlemek için fenolik grupların ortadan kaldırılmasında PVPP (Polivinilpolipirrolidon) ve oksitleyicileri engellemek için de kükürt dioksit gibi farklı metodlar kullanılmaktadır. Fizikokimyasal adsorbanlara alternatif olarak hedef polifenollere etki eden enzimler kullanılabilir (Minussi ve ark., 2002). Bu polifenoller enzimler tarafından oksitlenebilir, polimerize edilebilir ve daha sonra durultma işlemi ile uzaklaştırılabilir. Bu amaç doğrultusunda lakkaz enzimi kullanılabilir (Larsson ve ark., 2001).

Lakkazlar fırıncılıkta kullanılan hamurda çapraz bağlar oluşturarak hamurun dayanıklılığını artırır (Couto ve Herrera 2006). Özellikle bu amaçla lakkaz kullanımı sonucunda hamurun dayanıklılığı, kararlılığı artarken yapışkanlığı azalır ve böylece hamurun işlenilebilirliği de artar. Yağlarda bulunan çözünmüş oksijenin ilave edilen lakkaz enzimi ile tüketilmesi sonucu yağın lezzeti artmaktadır.

2.2.1.1.4. Çevrede teknolojisinde kullanımı

Lakkaz, biyoremediasyon da birçok işlemi gerçekleştirebilir. Lakkaz, birçok istenmeyen kontaminantları, yan ürünleri veya atılan materyalleri degrade edebilir. Lakkaz, olefin içeren plastik ürünleri de degrade edebilmektedir. LMS (lakkaz mediyatör sistemi) radikal zincir reaksiyonu başlatarak plastiğin parçalanmasını sağlar. LMS sistemi poliüretanlarında parçalanmasını sağlamaktadır. LMS; bifenol ve alkil fenol safhasındaki fenolik bileşiklerin (çevresel hormonların) parçalanmalarını kolaylaştırır (Kunamneni ve ark., 2008).

Lakkazlar pek çok aromatik bileşiği oksitleyerek daha az toksik ürünlerin oluşumunu gerçekleştirirler. Lakkaz enzimi fenollerin, triklorofenollerin, organofosforlu pestisitlerin, karasal ve sucul ortamlarda yaygın olarak dağılım gösteren ve yüksek oranda mutajenik ve karsinojenik ksenobiyotiklerden olan benzo[*a*]pren gibi poliaromatik hidrokarbonların toksisitesini giderebilen bir enzimdir (Alcalde ve ark., 2006). Bu enzimin benzoprenin yanı sıra dioksinler gibi yüksek oranda toksik ksenobiyotiklerin yıkımını gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Lee ve ark., 1999). Diğer ksenobiyotiklerle birlikte doğal petrol yataklarından ve fosil yakıtların kullanımından ortaya çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar toprak kirliliğinin ana sorumlusudur. Bu bileşiklerin yıkımı çevre açısından önemlidir ve lakkaz enziminin katalitik özellikleri bu tip bileşiklerin yıkımı için kullanılabilir (Han ve ark., 2005). Lakkaz enzimi herbisitleri de yapısal değişikliğe uğratarak inaktif analoglarına dönüştürebilmektedir. Reaksiyon ortamına mediatör olarak ABTS eklenmesiyle biyolojik yıkım daha da fazla gerçekleşebilmektedir (Birhanlı, 2003). TNT (2,4,6-trinitrotoluen) sık kullanılan ve çevre kirliliğine neden olan patlayıcı bir maddedir. Bu nedenle TNT'in yıkımı ilgi çekici bir araştırma alanıdır. TNT yüksek toksisite ve mutajenite gösterdiğinden TNT yıkımı çevre güvenliği açısından çok önemlidir. Bakteriler ve funguslar tarafından TNT yıkımı ile ilgili çok sayıda çalışma vardır (Cheong ve ark., 2006).

Tekstil, kağıt, kozmetik, farmasötik ve gıda endüstrilerinde sentetik boyalar gittikçe artan oranda kullanılmakta olup, özellikle boya ve tekstil endüstrileri çevreye endüstriyel boyaları boşaltmaktadır (Kunamneni *et al.* 2008). Kromofor tipine göre boyalar azo, antrakinon, akridin, arilmetan, siyanin, fitalosiyanin, nitro, nitrozo, kinonimin, tiazol veya ksantin boyaları olarak çeşitli sınıflara ayrılır (Kirk *et al.* 2002).

Kimyasal olarak azo, antrakinon, heterosiklik, trifenilmetan veya fitalosiyenin boyaları şeklinde sınıflandırılan bu boyalar ciddi çevre kirliliğine neden olmaktadır. Lakkaz enzimi farklı yapıdaki pek çok boyanın renginin gideriminde kullanılabilir. Bu boyalar arasında; reactive Black 5 (diazo boya), Remazol Brilliant Blue B (indigoid boya), Acid Blue 25 (antrakinonik boya), Acid Green 27 (antrakinonik boya), Methyl Orange (azo boya), Methyl Green (triarylmethane boya), Direct black 168, Acid Red 119, Direct Blue 78, Acid Yellow 166 gibi çeşitli endüstriyel boyalar mevcuttur (Kunamneni *et al.* 2008).

2.2.1.1.5. Biosensör olarak kullanımı

Biyosensör; fizyolojik veya biyokimyasal bir değişim hakkında bilgileri saptayan, nakleden ve kaydeden bir cihazdır. Teknik olarak biyosensör biyolojik bir bileşen ile elektronik bir iletim sisteminin birbirini tamamladığı bir probdur. Bu prob biyokimyasal bir sinyal miktarı ölçülebilir bir elektriksel yanıtı dönüştürür. Enzimler, antikorlar, DNA, reseptörler, organeller, mikroorganizmalar, hayvan ve bitki hücreleri veya dokuları biyosensör yapımında kullanılabilir. Lakkaz enzimi de biyosensör yapımında kullanılabilen enzimlerdendir (Birhanlı ve Yesilada, 2006; Odacı ve ark., 2007). Lakkaz ek kofaktör olmadan elektron transfer reaksiyonlarını katalizleyebildiği için çeşitli aromatik aminlerin ve fenolik bileşiklerin, morfinin, kodeinin, kateşolaminlerin ve bitki flavonoidlerinin saptanmasında biyosensör olarak kullanılabilir (Papkovsky *et al.* 1993; Simkus and Laurinavicius 1995). Buna ilaveten bu enzim immunoprolar ve ilaç geliştirme gibi yeni uygulama alanlarını açacak biyosensör geliştirmede de kullanılmaktadır (Gnanamani ve ark., 2006).

2.2.1.1.6. Farmasötik kullanımı

Anestetikler, anti-inflamatory ilaçlar, antibiyotikler, yatıştırıcılar gibi sağlık alanında kullanılan aktif bileşenlerin sentezinde görev almaktadır. Lakkaz tabanlı uygulamalar iyot'un in situ oluşturulması, ayrıca günümüzdeki en büyük hastalıklardan biri olan AIDS'in nedeni olan HIV'in çoğalmasını engellemek (HIV-1 revers transkriptaz inhibitörü)'tedir. Aceruloplasminemia (seruloplasmin yokluğunda ortaya çıkan sağlık durumu) ile mücadelede ve morfin ve kodeini birbirinden ayırmaya yarayan sensörlerin

geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Kozmetik sektöründe ise lakkaz tabanlı saç boyaları saçları daha az tahriş ederek saçları boyamakta ve kişisel hijyen ürünü olarak kullanılan diş macunu, ağız çalkalama suyu, deterjan, sabun ve pedlerde deodorant olarak kullanılmaktadır (Kunamneni et al., 2008).

2.2.1.1.7. Diğer endüstriyel alanlarda kullanımı

Biyoyakıt pilleri yakıt tüketmeden elektrik enerjisi sağlayan ve böylece daha temiz bir enerji kaynağı oluşturan son derece cazip yapılardır (Couto ve Herrera, 2006). Lakkaz enzimi de küçük iletken sistemler gibi biyoyakıt pillerinin katot bölgesi üzerine tutuklanarak güç kaynağı olarak kullanılabilir (Couto ve Herrera, 2006). Lakkazlar biyoyakıt pillerinin katot bölümünden elektronları alabilen birkaç enzimden biri olup, yapılan çalışmalar lakkazların biyoyakıt pilleri ile birleştirmesine yöneliktir (Alcalde ve ark., 2006).

Lakkazlar temizleyici ajan olarak su saflaştırma sistemlerinde kullanılabildiği gibi, katalizör olarak anti-kanser ilaçlarının üretiminde ve kozmetik ürünlerinde özellikle de saç boyalarında kullanılabilmektedir (Dhawan ve ark., 2005). Lakkaz tabanlı saç boyalarında kullanılan lakkazlar, oksitleyici ajan olarak bulunan H_2O_2 ile yer değiştirdiği için yaygın olarak kullanılan boyalardan daha az tahriş edici olup, bu tür boyaların cilt ile temasında problem oluşturma riski çok daha azdır. Cildin parlatılması için kullanılan kozmetik ve dermatolojik ürünlere lakkaz enziminin ilavesi de geliştirilme aşamasındadır (Couto ve Herrera, 2006).

Mayalara klonlanan lakkaz geni etanol üretiminde, inhibitör olarak açığa çıkan lignoselülozik hidrolizatlara karşı direnç sağlamaktadır. Ayrıca; akrilamid polimerizasyonu, nişastanın oksidasyonunda, selüloz ve diğer polisakkaritlerin kısmi parçalanmasında lakkaz sayesinde gerçekleştirilebilen uygulamalardır. Yapımı geleneksel formaldehit tabanlı kimyasallar kullanılarak üretilen polimerik polifenollerin sentezinde alternatif olarak kullanılmaktadır. Birçok fonksiyonel organik bileşik sentezinde kullanılmaktadır. Örneğin özgül mekanik/ elektriksel/ optik özelliği olan polimerler, tekstil boyaları, kozmetik pigmentler, tatlandırıcılar ve pestisitlerin sentezi gibi birçok organik maddenin sentezinde kullanılırlar (Kunamneni et al., 2008).

2.2.2. Mannanaz enzimi

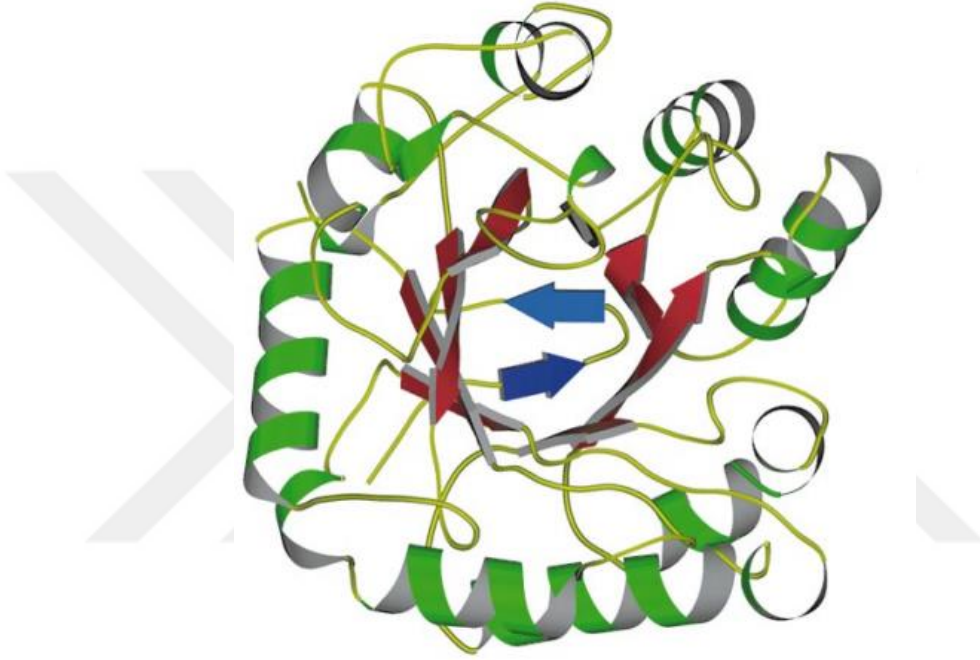
Mannanlar yumuşak odunlardaki hemiselüloz fraksiyonunun başlıca bileşenleri olup bitki dokularında yaygın dağılım gösterirler. Büyük mannan indirgeyici enzimler β -mannanazlar, β -mannosidazlar ve β -glukozidazlardır. Bunlara ek olarak, yan zincir ikame edicilerini çıkarmak için α -galaktosidazlar ve asetil mannan esterazlar gibi diğer enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır. Mannanazların çeşitli bakteriler, mantarlar, aktinomisetler, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretildiği bilinmektedir. Mikrobik mannanazlar çoğunlukla ekstraselülerdir. Kağıt hamuru ve kağıt, ilaç, gıda, yem, yağ ve tekstil endüstrisinde kullanıldıkları için geniş pH ve sıcaklık aralıklarında etki yapabilir. Ksilanazlardan sonra mannanazlar hemiselülozların hidrolizi için en önemli ikinci enzimdir. B-1,4 mannanlardaki β -D-1,4 mannopiranozid bağlantılarını rastgele hidroliz eden mannanazlar hamur ve kağıt, farmasötik, gıda, yem, yağ ve tekstil endüstrisinde uygulamaları bulmuştur (Chauhan ve ark., 2012).

Beta-mannanaz [β -1, 4-D-mannan mannohidrolaz; EC 3.2.1.78], örneğin *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptomyces*, ve *Aspergillus*, β -1,4-mannosidik bağların hidrolizini katalize eder. Bazı tür bitkilerde bulunan çeşitli β -mannanlarda, örneğin kurutulmuş hindistan cevizi çekirdeği ve fildişi palmye fıstığı endospermalarında, guar fasülyesi, keçiboynuzu bitkisi, kahve çekirdeği ve konjak köklerinde bulunur. Bu sakaritlerin çoğu sadece yiyecek , yemlerde ve işleme endüstrilerinde kullanılır. Mikrobiyal β -mannanazların karakterizasyonu hakkında çok çalışma yapılmasına rağmen, bu enzimlerin endüstriyel uygulamaları hakkında çok az bilgi mevcuttur (Akino ve ark., 1988).

Son zamanlarda, mannooligosakkaritlerin *Bifidobacterium* sp. ve *Lactobacillus* sp. için en iyi büyüme faktörlerinden biri olarak yararlı olduğu bildirilmiştir ki bu normal bağırsak durumumuzun korunmasında önemlidir. Bu sakkaritlerin farmasötik maddeler ve gıda maddeleri alanında uygulanması için, bir- β -mannan-hidrolize edici alkalofilik bakteri olan *Bacillus* sp. AM-001, eski bir Japon tatami matinden elde edilmiştir. Bu suş, bir karbon kaynağı olarak konjak tozu veya kopra unu içeren alkalın pH ortamında kültürlendiğinde, önemli miktarda üç hücre dışı β -mannanaz ve bir hücre ilişkili β -mannosidaz üretmiştir(Akino ve ark., 1988).

Doğrusal mannanların (saf mannan ve glukomannan) hidrolizinde yer alan başlıca enzimler 1,4- β -D mannan hidrolazlar (β -mananazlar, EC 3.2.1.78 olarak da adlandırılır),

1,4- β -D manopiranosid hidrolazlar (β -manosidazlar , EC 3.2.1.25) ve 1,4- β -D glukozid glukohidrolazlar (β -glukosidazlar, EC 3.2.1.21) olarak adlandırılır. B-mannanazlar, mannanın omurga zincirinin iç glikosidik bağlarına saldıran, kısa β -1,4-manno-oligosakaritleri salan hidrogenazı gösteren endoaktörlerdir. B-mannosidazlar, indirgeyici olmayan son uçlara saldırmak ve ayrıca mannobiozu mannoz birimlerine bölmek suretiyle, mannozu oligosakaritlerden salgılayan ekzoaktör hidrolazlardır (Chauhan ve ark., 2012).



Şekil 2.2. Mannanaz enziminin yapısı (Hilge ve ark., 1998).

B-mannanaz, substratlarını çift yer değiştirme reaksiyonu yoluyla oluşan bir tutma mekanizması ile hidroliz eder. Bu mekanizmada, glikozidik bağın hidrolizi aktif bölgede konumlandırılan iki karboksilatı (glutamat veya aspartat) içeren genel asit / baz katalizörü yoluyla ilerlemektedir. Çifte yer değiştirme reaksiyonu, bir anomerik karbon üzerindeki bir nükleofilik karboksilatın saldırısını ve aglikonun birlikte serbest bırakılmasını içeren bir kovalent enzim-glikosidaz ara maddesiyle sonuçlanan bir birinci basamağı içerir. İkinci aşamada, kovalent ara ürün glikozidi enzimden serbest bırakan nükleofilik bir suyla saldırıya uğrar (Withers 2001).

Mannanolizin varlığı, mikrobik dünyada yaygındır. Bakteriler arasında mannan bozunumu çoğunlukla gram pozitif, çoğunlukla çeşitli *Bacillus* türleri ile sınırlıdır (Meenakshi ve ark., 2010). Bununla birlikte, *Klebsiella oxytoca* gibi bazı gram negatif

bakterilerin de mannanaz ürettiği bildirilmiştir (Titapoka ve ark., 2008). Mantarlar arasında en yaygın mannanolitic grubu *Aspergillus* cinsine aittir (Norita'nın ve ark., 2010), ayrıca *Penicillium* sp. (Blibech ve ark., 2010) ve *Trichoderma* sp. (Eneyskaya ve ark., 2009) da mannanaz ürettiği bildirilmiştir. Bunun yanında, bazı Aktinomycetes, *Streptomyces* sp. mannanaz üreticileri olduğu da gösterilmiştir (Bhoria ve ark., 2009).

2.2.2.1. Mannanaz enziminin endüstriyel kullanım alanları

2.2.2.1.1. Kağıt hamurunun ve kağıtların biyolojik olarak temizlenmesindeki kullanımı

Selülozun ağartılmasının enzimatik muamelesinde, β -mannanaz ve onun yardımcı enzimleri selülozu etkilemeksizin kağıt hamurundaki mannan bileşenini seçici olarak parçalayabilirler. Odun liflerinden lignin ekstre edilmesi pulpaların ağartılmasında önemli bir adımdır. Alkalın koşullar altında selüloz ön işleme, lignine kovalent bağlı hemiselülozları hidrolize eder ve böylece ligninin daha sonra uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Alkalın tedavinin en büyük dezavantajı, klorlu bileşiklerin salınmasına bağlı olarak çevre kirliliği problemi oluşturmastır. Alternatif olarak, mannanazların ksilanazlar gibi diğer enzimlerle birlikte kullanımı, pulp ağartmada lignin giderilmesini kolaylaştırabilir ve alkalın ön-muameleye benzeyen sonuçlar verebilir (Dhawan ve Kaur 2007).

Pulpaların çoğunluğunun türetildiği yumuşak ağaçlar, galaktomannan formunda % 15-20 kadar hemiselüloz içerir. Galaktomannan bileşenleri için substrata özgü özelliklere sahip olan mannanazlar, yumuşak ağaç pulpalarının enzimatik ağartılmasında mükemmel adaylar yapar (Gubitz ve ark., 1997; Benech ve ark., 2007). Ayrıca, yüksek sıcaklık ve pH'da aktif olan mannanazlar daha faydalıdır, çünkü hamur haline getirme bu koşullar altında gerçekleştirilir (He ve ark., 2008; Pan ve ark., 2011).

2.2.2.1.2. Deterjan endüstrisinde hidrolitik ajan olarak kullanımı

Son zamanlarda, deterjanlarda stabil olan alkalın mannanazlar, leke kaldırma takviye maddeleri olarak çamaşır yıkama bölümlerinde uygulama bulmuştur. Mannanlar

genellikle soslar, saç jöleleri, şampuanlar, kremler ve diş macunlarında bulunur veya dondurmalarda koyulaştırma maddeleri olarak kullanılır. Mannanlar selüloz elyafa adsorbe etme eğiliminde olduğundan, mannan içeren lekelerin çıkarılması zordur. Mannanazlar, sakız polimerini daha küçük karbonhidratlara parçalayarak guardaki mannoz birimleri arasındaki β -1,4 bağımlı parçalayıp yeniden renk veren leke sürecini azaltmaktadır. Bu daha küçük parçalar daha fazla suda çözünebilir ve kumaşlardan uzak kalır ve yıkama sırasında çıkarılır. Bu bileşimler ayrıca sağlık ve güzellik bakımı ürünleri, sanitasyon ürünleri, kontakt lens temizleyicileri ve sert yüzey temizleyicileri olarak formüle edilebilir (Bettiol ve ark., 2000)

2.2.2.1.3. Kahve çekirdeğinin hidrolizinde kullanımı

Kahve çekirdeğindeki mannanlar mannanaz ile etkili bir şekilde hidrolize olur ve bu da önemli viskozite azalmasına neden olur (Nicolas ve ark., 1998). Yukarıdaki enzimatik eylemin bir sonucu olarak, kahve çekirdeği ekstraktları buharlaştırma gibi düşük bir prosedürle konsantre edilebilir. Harcanmış kahve yerinin yaklaşık pH 5 değerine sahip olduğu için mantar β -mannanazlar bu uygulama için çok uygundur (Van Zyl ark., 2010). Kısmen saflaştırılmış ve ham mannanaz preparasyonlarının her ikisi de kahve mannanının bozunması için başarıyla kullanılmıştır (Nunes ve ark. 2006).

2.2.2.1.4. Hayvan yemlerinin iyileştirilmesinde kullanım

β -Mannan, soya fasülyesi unu, guar unu, hindistan cevizi unu, hurma çekirdeği unu) ve susam unu gibi yem maddelerinde yaygın olarak bulunan bir polisakkarittir. Bütün bu yemeklerin, yüksek lif içeriği, düşük tat katılabilirlik, birkaç esansiyel amino asit eksikliği ve mannan, galaktomannan, ksilan ve arabinoksilan gibi birtakım anti beslenme faktörleri ile birleşmiş yüksek viskozite gibi bazı ortak özellikleri vardır. Bu nedenle bağırsakta kullanımı sınırlıdır. Diyetlerine β -mannanaz eklenmesi, hücre duvarı içindeki β -mannan parçalanması ve kapsüllenmiş besin maddelerinin salınması, oniki parmak bağırsağında ve ince bağırsağın üst kısmında artmış villus yüksekliği, yüzey alanındaki artışa ve adsorpsiyona ve azalmış sindirme viskozitesine neden olan çeşitli şekillerde yardımcı olur (Adibmoradi ve Mehri 2007).

Pepsin ve tripsin gibi proteazlara karşı dirençli, geniş bir pH aralığında aktif olan mannanazlar, hayvan yemlerinde kullanılmak için iyi adaylar olarak yararlıdır (Mussini ve ark., 2011). Simüle edilmiş gastrik koşullar altında aktif olan mannanazların hayvan yemi içindeki rolü Li ve ark., (2008) ve Cai ve ark.,(2011) tarafından gösterilmiştir. ChemGen tarafından sağlanan Hemicell USA, yemde β -mannanı parçalayan yüksek miktarda β -mannanazlar içeren *Bacillus lentus*'un fermentasyon ürünüdür (Daskiran ve ark., 2004).

2.2.2.1.5. Balık yemi katkı maddesi olarak kullanımı

Cyprinoidler ve çimen sazanı gibi belirli taze su balıkları karına sahip değildir ve bu nedenle tripsin ve pepsin direkt olarak nötr bir pH'a sahip gastrointestinal yola salınırlar. Son zamanlarda, nötr pH aralığında aktif ve stabil mannanazların rolü ve proteolizi, özellikle de pepsine dirençli olması, bir balık yemi katkı maddesi olarak önerilmiştir (Li ve ark.2008; Yang ve ark., 2009).

2.2.2.1.6. Biyolojik kontrol ajanları olarak kullanımı

Mannanazlar, su arıtma sistemi, vakum kanalizasyon sistemleri, atıksu arıtma ve soğutma suyu arıtma sistemlerinde sümüksü kontrol maddesi olarak önemli rol oynayabilir. Pee ve ark. (2002), hem mannanaz içeren bir bileşimin hem bakterilerin yapışmasını büyük ölçüde kontrol ederek hem de su taşıyan sistemlerin yüzeylerinde biyofilm çıkarmak için kullanılabileceğini bildirmiştir. Ayrıca, sümüksünün çıkarılması ve biyofilm oluşumunun önlenmesi ile ilgili sinerjik bir etkinin, mannanaz(lar)ı, alkalın proteaz(lar)ı ile birleştirilmesiyle elde edilebileceği bulunmuştur. Primalco Ltd.'den temin edilebilen Primalco mannanaz M-100, Biotec'in % 75 kadar biyofilmi inhibe etmiştir (Pee ve ark., 2002).

2.2.2.1.7. Farmasötik uygulamalarda kullanımı

Tıp alanında mannoz kullanımı her geçen gün artmaktadır. Çünkü tabletler için hızlı çözülme ve yapı oluşturmayı sağlar (Fu ve ark., 2006). Mannozun rolü idrar yolu

enfeksiyonu için bir çare olarak da görülmektedir (Van Zyl ve ark., 2010). Dolayısıyla, mannoza önemli bir talep vardır. Mannanaz diğer enzimlerle birlikte, hurma çekirdeği pastası ve kopra unu gibi mannanca zengin düşük maliyetli substratlardan mannoz üretimi için kullanılabilir.

2.2.2.1.8. Mannanazların diğer uygulamaları

Yukarıdaki uygulamaların yanı sıra, mannanazlar bir dizi başka işlemde de kullanılabilir. Petrol ve gaz endüstrileri, sondaj işlemlerinde petrol ve gaz akışını artırmak için galaktomannanın enzimatik hidrolizi kullanır. Yağ kuyularındaki ($> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) aşırı sıcaklığa bağlı olarak, termostabil mannanazlar bu amaç için kullanışlıdır. (Comfort ve ark., 2004).

Hindistan cevizi etlerinin yapısal hücre duvarının ana bileşenleri mannan ve galaktomanandır. Mannanazlar, hindistan cevizi etinin enzimatik yağ ekstraksiyonunda kullanılabilir. Enzimatik süreç, ürünlerin aflatoksin kontaminasyonu ve oksidatif kokusu sorunlarını ortadan kaldırır (Chen ve Diosady, 2003).

Biyoetanol üretimi için, lignoselülozik biyokütle fermente edilebilir şekerlere kadar hidrolize edilmek zorundadır; bu enzim esas olarak selülozlar ve ksilanazlar ve mannanazlar gibi diğer enzimleri içeren bir enzim kokteyli ile etkili bir şekilde elde edilebilir (Varnai ve diğerleri 2011). Mannan ya da galaktomannan şeklinde bulunan % 50 fermente edilebilir heksoz şekerleri içeren palmye yağı ekstraksiyonundan elde edilen bir kalıntı olan yukarıdaki enzimlerin bir kokteyli kullanılarak herhangi bir ön-muamele yapılmaksızın hidrolize edildiği gösterilmiştir (Jørgensen ve ark., 2010).

Guar zımkı ve keçiyoynuzu zımkı gibi galaktomannan, tekstil baskı için baskı macununda koyulaştırma maddeleri olarak yaygın şekilde kullanılır. Mannanazlar baskı macununun viskozitesini düşürmek için yararlıdır, böylece tekstil baskılarından sonra fazlalık baskı macununun yıkanmasını kolaylaştırır (Adenmark ve ark., 1998). Gıda endüstrisinde, mannan indirgeyici enzimler meyve ve sebze maddelerinin ıslanıp yumuşaması ve meyve sularının temizlenmesi için diğer glikozil hidrolazlar ile birlikte kullanılabilir (Moreira ve Filho, 2008).

2.3. *Bacillus* Cinsi

Çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Çoğu kötü şartlara dirençlidir. Genelde gram pozitifler. Peritrik flagellalı ve flagellaları hareketlidir. Aerobik ve fakültatif anaerobtur. Çoğunda oksijen terminal elektron alıcısıdır. Endospor oluştururlar. Vejetatif hücreler $0.5 \times 1.2 \mu\text{m}$ ile $2.5 \times 10 \mu\text{m}$ çapındadır. *Bacillus* genusunun koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır. *B. mycoides* 'in kolonileri ise rizoid şekilde agarlı besiyortamı üzerine yayılır (Buchanan ve Gibbons, 1974).

Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle $35-37^\circ\text{C}$ da ve pH 7 civarında ürerler. Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren ; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Taubman, 1992).

Bacillus genusu uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğu endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral yada subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus*'ların hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamiyle örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus*'lar genellikle karbonhidrat kapsülü bulundururlar. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden hava su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilebilirler (Robinson, 1985).

Bacillus türleri toprakta bol miktarda yayılım gösterebilir de denizlerden, tatlı sulardan ve bunların sedimentlerinden de elde edilebilirler. Üre içeren, yüksek pH değeri olan, asitli ve/veya yüksek sıcaklığa sahip ortamlardan izole edilebilen *Bacillus*'ların bazıları ekstrem koşullarda gelişebilir (Ediz ve Beyatlı, 2005). Termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri olan *Bacillus* cinsi bakterilerin genel üreme aktiviteleri $35-37^\circ\text{C}$ ve pH 7 civarında olsa da bazıları çok yüksek sıcaklıkta bile canlılığını sürdürebilirler. Organik asit, şeker, alkol içeren (karbon kaynağı) ve amonyum bulunduran (nitrojen kaynağı) sentetik ortamlarda çok iyi gelişim göstermektedirler. *Bacillus*'ların endüstri alanında

tercih edilmelerinin sebepleri; heterojen olmamaları, kolay kültüre alınabilmeleri, büyük bölümünün kemoototrof olduğu için besin isteklerinin az olmasıdır.

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır (Rosovitz ve ark., 1998; Wipat ve Harwood, 1999). Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizmal faaliyetlerinin çeşitliliğinin, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağladığı da belirtilmektedir (Rosovitz ve ark., 1998). Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus*'lar ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler. *Bacillus*'ların ürettiği endüstriyel enzimlerden olan subtilisin, 2 selüloz ve amilazlar deterjan endüstrisinde; nötral proteazlar süt endüstrisinde; farklı amilaz ve pullulanazlar besin ve meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır. Bazı *Bacillus* türleri ise proteolitik sakkarolitik ve lipolitik enzimleri nedeniyle besin endüstrisinde önem taşımaktadır. Birçok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi de ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır. Bazı *Bacillus* türleri bacitracin (*B. licheniformis*), polymyxin (*B. polymyxa*), gramicidin (*B. brevis*), tyrocidine (*B. brevis*), subtilin (*B. subtilis*) ve bacilycin (*B. subtilis*) gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler. Bunların yanı sıra siklik lipoproteinlerden olan iturin (*B. subtilis*) birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır. Zwittermicin (*B. cereus*) ve antibiotik (*B. cereus*) tarafından üretilen antibiyotiklerin mantarların neden olduğu bazı bitki hastalıklarında etkili olduğu bilinmektedir. *Bacillus*'ların bir diğer özelliği de çeşitli böceklerle karşı etkin bakteriyel kontrol ajanı olmalarıdır. *B. thuringiensis*, *B. larvae* ve *B. popilliae* *Lepidoptera* larvalarına patojenik etki gösterirler (Rosovitz ve ark., 1998).

2.4. *Halomonas* Cinsi

Vreeland ve ark. (1980), Bonaire Antilleri Uluslararası Tuz Şirketi tesisindeki Güneş Kondenserleri'nden dokuz sıradaki olağan dışı bir bakteri izole etti (Neandlands Antilleri, Vreeland ve diğerleri, 1980). Birtakım fenotipik testler yaptılar ve suşlarını diğer tuz gerektiren bakterilerle karşılaştırdılar. Suşları ve diğer halofil bakteriler arasındaki farklılıklara dayanarak, yeni bir cins olan *Halomonas*'ı önerdiler (Vreeland ve diğerleri, 1980). *Halomonas*'ın tek bir türü olan *Halomonas elongata* vardı ve

Vibrionaceae familyasında sınıflandırıldı. *Halomonas*'ın orijinal tanımı, oksitlenmiş şekerlerden ve diğer karbonhidratlardan ziyade fermente edildiğini gösterdi. Bununla birlikte, daha sonra, *Halomonas*'ın bir fermentörden ziyade bir feragatçı olduğu tespit edildi (Alt Komite, 1986). Vreeland (1984) daha sonra *Halomonas*'ı Vibrionaceae familyasından çıkardı ve gram-negatif aerobik çubuklar ve koklarla belirli bir ailenin üyesi olmayan belirsiz bir tür olarak sınıflandırdı.

Amilazlar, proteazlar, lipazlar, DNazlar, pullulanazlar ve ksilanazlar gibi ekstraselüler hidrolitik enzimler, gıda endüstrisi, yem katkı maddeleri, biyomedikal bilimler ve kimya endüstrileri gibi farklı alanlarda potansiyel kullanım seçeneklerinden farklı değildir (Rao ve ark., 1998; Pandey ve ark., 2000).

Endüstriyel prosesler, mevcut enzimlerin aktivitesi için gereken optimum değere her zaman ayarlanamayan belirli fiziksel ve kimyasal koşullar altında yürütülür. Bu nedenle, farklı tuz konsantrasyonları ve sıcaklık değerlerinde en uygun etkinlikleri gösteren mevcut enzimlere sahip olmak büyük bir öneme sahip olacaktır.

Halofiller bu tür enzimlerin en önemli kaynağıdır, çünkü sadece enzimleri tuza dayanıklı değildir, aynı zamanda birçoğu ısıya dayanıklıdır. Hücre dışı enzim üretebilen ılımlı halofillerin izolasyonu, farklı tuz konsantrasyonlarında optimum aktivitelere sahip olma imkânı sağlayacaktır.

Dahası, polimer içeren atıkların saflaştırılması için halofilik mikroorganizmaların uygulanması belirgin avantajlara sahiptir. Orta derecede halo-filik bakteriler, geniş bir NaCl konsantrasyonları (% 3-15 NaCl) içeren ortamda optimum şekilde geçiş yapabilen bir grup halofilik mikroorganizma türüdür. Çok çeşitli bakterileri içeren filogenetik olarak çok heterojen bir grup oluştururlar (Ventosa ve ark., 1998). Hiperalkalik ortamların ekolojisindeki önemli rollerinin yanı sıra, bu prokaryotlar, biyoteknolojide kullanım potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi gördü. Bu nedenle, enzimlerin ve tüm hücrelerin koruyucu ajanları olarak kullanılabilen uyumlu çözünen maddeler için iyi bir kaynaktırlar (Galinski, 1993). Gelişmiş yağ kurtarma proseslerinde veya hiperparalin habitatlarını kirletebilecek endüstriyel kalıntıların ve toksik kimyasalların bozunmasında kullanılmaları da iddia edilmiştir (Ventosa ve ark., 1998). Buna ek olarak, bazı orta derecede halofiller, amilazlar, proteazlar ve potansiyel ticari değere sahip nükleazlar gibi halofilik ekzoenzimler üretmektedir (Ventosa ve ark., 1998; Onishi, 1972; Khire, 1994).

Aşırı koşullarda optimal aktiviteler göstermesi beklenen ekstremofiller tarafından üretilen enzimlere olan ilgi son zamanlarda büyük ölçüde artmıştır (Adams ve Kelly, 1995).

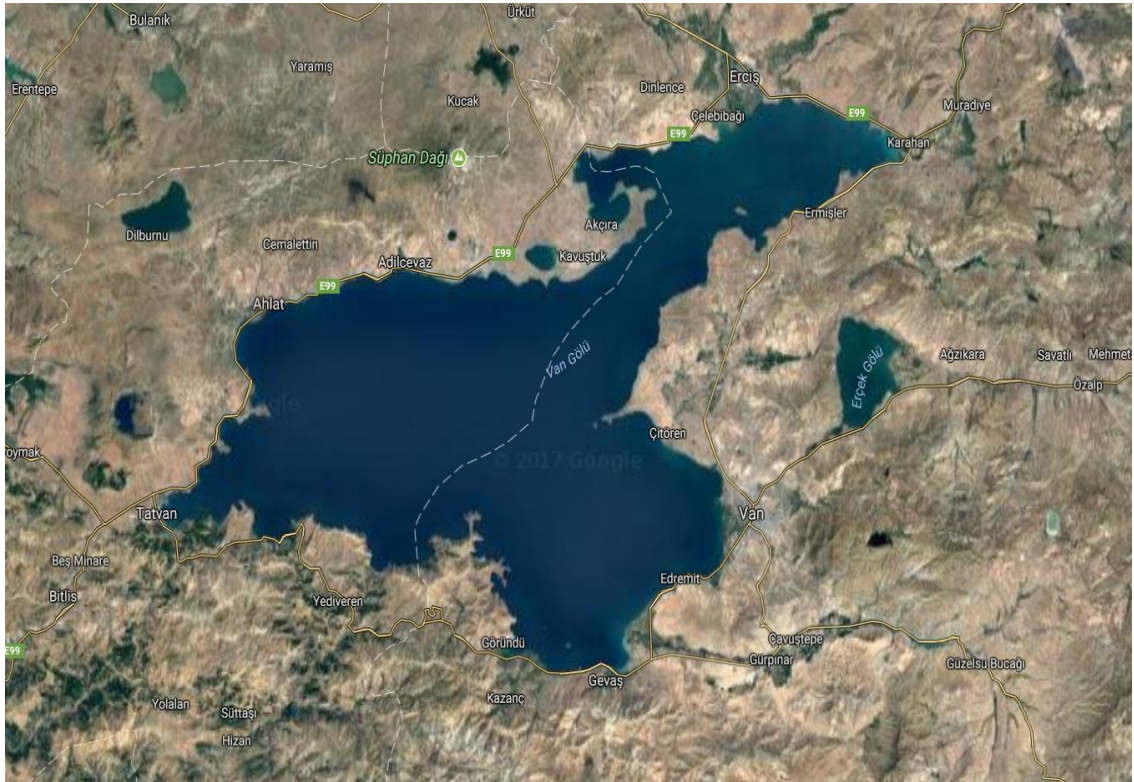
Günümüzde *Halomonas* cinsi, çoğu salin ortamlarından izole edilmiş olan ait 96 türe sahiptir (<http://www.bacterio.net/halomonas.html>). Taksonomik olarak *Halomonas* türleri heterojen bir bakteri cinsini oluşturur. Arahal ve ark., (2002) 16S ve 23S rRNA gen dizileri ve Antonie van Leeuwenhoek fenotipik çalışmalarına dayanarak, çeşitli filogenetik gruplar oluşturmuşlardır (Mata ve ark., 2002).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmanın materyalini; Van Gölü'nden 25.07.2016 alınan sediment ve su örneklerinde izole edilen lakkaz ve mannanaz üretme kabiliyetlerine göre seçilen suşlar oluşturdu.



Şekil 3.1. Van Gölü'nün uydudan görüntüsü.

3.1.1. Alkalofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyeri

3.1.1.1. Alkalofil agar

Besiyeri içeriği distile suda çözüldü. Otoklavda 121°C'de 15 dk süre ile sterilize edildi. Bu besiyeri alkalofilik bakterilerin izolasyonunda kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan çözelti ve boyalar

3.1.2.1. Kristal Viyole boyası

Kristal Viyole boyası havanda dövüldü. Üzerine 10ml % 96'lık Fenol kristali ve distile su ilave edildi. 24 saat bekletildi ve filtre kağıdından geçirilerek gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.2. Safranin boyası

Safranin etil alkolde çözüldü, distile su ilave edilip iyice karıştırılarak hazırlandı. Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.3. Lügol çözeltisi

Bu çözelti gram boyama yönteminde kullanıldı (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.4. Alfa-naftol çözeltisi

Alfa-Naftol Çözeltisi; Alfa-Naftolün etanolde çözülmesi ile hazırlandı. Bu çözelti nitrat indirgenmesi testinde kullanıldı (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.5. Sülfanilik asit çözeltisi

Nitrat indirgenmesi testinde kullanıldı (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.6. %3'lük H₂O₂ çözeltisi

%3'lük H₂O₂ Çözeltisi katalaz testi için kullanıldı (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.7. Rhodamin B boyası

Rhodamin B(%0.001'lik) boyası lipaz testinin belirlenmesinde kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Su ve Sediment örneklerinin toplanması

Van Gölü'nden alınan sediment örnekleri 1000ml'lik steril polietilen torbalar içerisinde, su örnekleri ise steril 300 ml'lik cam şişelere bırakılarak toplandı ve 12 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

3.2.2. Su ve sediment örneklerinden alkalifilik bakterilerin izolasyonu

Bu çalışmada alkalofilik bakterilerinin izolasyonu için klasik dilüsyon ve yüzeye yayma yöntemi kullanıldı. Daha sonra, her sediment örneğinden 25 gr tartılarak içerisinde 250 ml ringer çözeltisi bulunan 500 ml'lik steril erlen mayerlere konuldu. Bu şekilde, her bir sediment örneği için hazırlanmış olan 10^{-1} solüsyonlar, sediment kolloidlerine tutunmuş olan mikroorganizmaları ayırmak için 30 dakika süre ile çalkalandı. Her bir sediment örneği, karıştırılarak homojen hale getirildi ve otomatik pipet ile aseptik şartlarda 1 ml alınarak içerisinde 9 ml ringer çözeltisi bulunan steril cam tüplere konuldu. Bu şekilde, 10^{-2} lik toprak solüsyonu elde edildi ve aynı işlemler 10^{-3} , 10^{-4} , dilüsyonları elde etmek için de tekrarlandı. Bu şekilde dilüsyon serileri 10^{-4} seyreltmeye kadar devam edildi. 10^{-3} ve 10^{-4} dilüsyonların her birinden otomatik pipet ile 0.1 ml alınan çözeltiler alkalofil besiyeri yüzeyine steril L seklindeki cam baget kullanılarak yayma plak yöntemiyle ekim yapıldı. Her bir dilüsyon için 4 petri kutusuna ekim yapıldı ve 30 °C'de 24-72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Su örneklerinden izolasyon için yüzeye yayma metodu kullanılarak izolasyon yapıldı. Ekim yapılan petri kutularında gelişen koloniler hem çıplak gözle hem de 100x10 ışık mikroskopunda incelendi ve sayımı yapıldı. İnkübasyon sonrası besiyeri üzerinde gelişen bakterilerin koloni morfolojileri dikkate alınarak seçildi. İzolatların Tryptic Soy Agar'da (TSA) nötr ortamda ürediği belirlendi.

3.2.3. Alkalofilik bakterilerin saf kültürlerinin elde edilmesi

Alkalofil agar besiyerinde gelişen kültürden steril alkalofil agar besiyerlerine öze yardımıyla çizgi plak yöntemi ile ekimler yapılarak saf kültürler elde edildi. İlave olarak saf kültürlerin yatık besiyeri içerisinde stokları hazırlandı ve saf kültürler içerisinde steril %20'lik gliserol bulunan kriyojenik tüplere bırakılarak -20 °C'de muhafaza edildi (MacFaddin, 2000).

3.2.4. Alkalofilik bakteri suşlarının koloni ve hücre morfolojilerinin incelenmesi

İzole edilen suşların koloni morfolojisi özellikleri binoküler mikroskop yardımı ile belirlendi. Hücre morfolojisinin belirlenmesi için gram boyama yöntemi uygulandı (MacFaddin, 2000).

3.2.5. Bakteri suşlarının gram boyama yöntemi ile boyanması

Gram boyama yapılacak saf kültürlerden fizyolojik tuzlu su ile yayma preparat hazırlandı. Preparat havada kurutulup alevde fikse edildi.. Fiksasyon işleminden sonra preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatıldı. İki dakika beklendi. Fazla boya dökülerek lügol çözeltisi ilave edilip 1 dakika beklendi. Preparat %96'lık etil alkol ile 6-10 sn dekolorize edildi. Saf su ile yıkandı. Son olarak Safranin boyası ilave edildi. 30 sn kadar beklenip preparat saf su ile yıkandı. Kurutma kağıdı kullanılarak preparat kurutuldu. Kuruduktan sonra preparatın üzerine 1 damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelendi mor-menekşe görülenler gram pozitif, kırmızı-pembe görülenler gram negatif olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.2.6. Biyokimyasal testler

3.2.6.1. İndol testi

İncelenecek bakteri kolonisinden özeyle alınarak temiz bir tüp içinde bulunan triptofan bulunan TSB besiyerine ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 30 °C'de 2-4 gün

inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşça akıtmak suretiyle 0,5 ml kovaks ayırıcı ilave edildi ve tüp çalkalandı. 1-2 dakika içinde besiyerinin üst kısmında parlak kırmızı bir halka oluşması testin pozitif olduğunu (indol formasyonunu), sarımsı halka ise testin negatif olduğunu (indol oluşmadığını) gösterir (York ve ark., 2007).

3.2.6.2. Sitrat testi

İncelenecek bakteri kolonisinden iğne öze ile alınarak tüpteki Simon's Sitrat Yatık Agar besiyerinin yüzeyine ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 30 °C'de 2-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda orijinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak % 0,2'lik Bromo timol mavisi kullanılan besiyerinde besiyeri renginin maviye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilir (Benson, 2002).

3.2.6.3. Voges - Proskauer (VP) testi

İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile alınarak tüpteki TSB besiyerine ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 30 °C'de 2-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üzerine 1 ml %40'lık KOH, daha sonra 3 ml %5'lik alfa naftol ilave edildi ve karıştırıldı. Besiyerinin hava ile temas etmesi için kuvvetli çalkalandıktan sonra 2-5 dakika içinde pembe-kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir (York ve ark., 2007).

3.2.6.4. Karbonhidrat oksidasyon/fermentasyon testleri

İzolatlar, içerisinde % 1 oranında test edilecek şeker ve fenol red bulunan Tryptic Soy Agar tüplerine ekildi. Tüpler 30 °C'de 24/72 saat inkübasyona bırakıldı. Bakterinin şekeri kullanıp kullanmadığı inkübasyon sonucunda besiyeri içerisinde bulunan indikatör boyanın renk değiştirmesi ile anlaşıldı (Benson, 2002).

3.2.6.5. Nitrat indirgenmesi testi

İçerisinde %1 oranında KNO_3 ve Durham tüpü bulunan alkalifilik broth tüplerine test edilecek kültürlerden ekim yapıldı. Tüpler $37^\circ C$ 'de bir hafta süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip tüplere %1'lik sulfanilik asit ve %0.6'lık Alfa-naftol ayraçlarından birer mililitre ilave edildi. Kalıcı kiremit kırmızısı rengin oluşması nitrat indirgenmesi pozitif olarak değerlendirildi (Çotuk ve Küçüker, 1992; MacFaddin, 2000).

3.2.6.6. Beta Galaktosidaz (ONPG) testi (OXOID ONPG DISCS Code: DD0013)

Oxoid firmasının üretmiş olduğu fosfat tamponu ile emprenye edilmiş O-nitrophenyl-b -D-galacto-pyranoside'diskler kullanıldı. Bir disk steril bir tüpe yerleştirildi ve 0.1 ml steril fizyolojik su ilave edildi. Steril koşullarda öze ile alınan koloni bu tüp içerisine iyice emülsifiye edildi ve $30^\circ C$ 'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresince 6 saatte bir kontrol edildi. Tüp içersinde sarı renk oluşumu pozitif sonuç ve renksiz olması negatif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.6.7. Oksidaz testi (Microbact Oxidase Strips MB0266)

Bu test için Oxoid firmasının üretmiş olduğu Microbact Oxidase Strips MB0266 kiti kullanıldı. Bu kitte bulunan şeritler, bakteri sitokrom oksidaz enziminin tespiti için NNN'N 'tetrametil-p-fenilen-diamin dihidroklorür ile emprenye edilmiştir. Bakteri içeren solüsyona bırakıldığı zaman mavi renk oluşumu oksidaz pozitif olduğunu göstermektedir.

3.2.7. Ekstraselüler hidrolitik enzim üretiminin belirlenmesi

3.2.7.1. Lakkaz enzimi üretme kabiliyetlerinin belirlenmesi

Triptic Soy agara izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları $37^\circ C$ 'de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Bu test için ABTS ve Guaicol kullanıldı.

İnkübasyonu müteakip bakteri kolonisinin üzerine 0,2 mM ABTS ve 0,1 mM CuSO₄ damlatıldı. Koloni etrafın yeşil-kahverengi renk oluşumu lakkaz üretiminin varlığını göstermektedir (Soden ve ark., 2002).

Triptic Soy agara % 0.01'lik guaicol ilave edildi ve otoklavlandı. Bu besiyerine inoküle edilen bakterilerin kolonilerinin etrafındaki turuncu/kahverengi varlığı lakkaz üretiminin varlığını gösterecektir.



Şekil 3.2. Lakkaz substratları (ABTS ve Guaicol).

3.2.7.2. Mannanaz enzimi üretme kabiliyetlerinin belirlenmesi

Mannanaz enziminin üretimi için, TSA içerisine %1 mannoz ve fenol red ilave edildi. İzolatlar öze yardımı ile besiyerine yoğun şekilde ekildi. Petri kapları 37°C'de 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra incelendi. Üreme bölgelerinin etrafındaki sarı zonlar mannanaz üretimi yönünden pozitif olarak değerlendirildi (Benson 2002).

3.2.7.3. Katalaz testi

Öze ile alınan izolatlar lam üzerine yayıldı ve üzerlerine 100µl %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı. Alkalofilik agar üzerinde geliştirilen kolonilerden öze ile bir miktar alınarak lam üzerine yayıldı ve 100µl %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) muamele

edildi. Koloniler üzerinde köpük oluşması pozitif katalaz reaksiyonu, köpük gözlenmemesi ise negatif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirildi (Çotuk ve Küçüker, 1992; MacFaddin, 2000).

3.2.7.4. Nişasta hidroliz testi

İçerisinde %1 oranında çözünür nişasta bulunan TSA, izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip besiyerinin üzerini kaplayacak şekilde lügol çözeltisi ilave edildi. Nişastanın hirolize olduğu bölgelerde koloni etrafındaki seffaf bölgeler pozitif nişasta sindirimi, mor bölgeler ise negatif nişasta sindirimi olarak değerlendirildi (Aygan ve ark., 2008).

3.2.7.5. Tween 80 hidroliz testi

İçerisinde %3 oranında Tween 80 bulunan TSA izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, petrilerin yüzeyini kapatacak şekilde %0,001'lik Rhodamin B ilave edildi. Kolonilerin etrafında oluşan zonlar lipaz aktivitesi için pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Karnetova ve ark., 1984).

3.2.7.6. Kazein hidrolizi testi

İçerisinde %1 oranında skim milk powder bulunan TSA, izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu müteakip besiyerinde koloni etrafında oluşan şeffaf zon proteaz varlığını gösterecektir (Nayab, 2015).

3.2.7.7. Ksilan hidrolizi testi

İçerisinde %1 oranında Ksilan bulunan alkalifilik agara, izolatlar öze yardımı ile yoğun bir çizgi şeklinde ekildi. Petri kapları 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonu müteakip besiyerinde koloni etrafında oluşan şeffaf zon ksilanaz varlığını gösterecektir.

3.2.8. Moleküler yöntemler

3.2.8.1. Genomik DNA izolasyonu

Bakterilerden genomik DNA izolasyonu için Ausubel ve ark. (1994), metodu modifiye edilerek kullanıldı (Ertaş, 2016).

Metodun uygulanışı aşağıdaki gibidir.

1. Steril, ağzı kapaklı ependorflara 800 µl STE tamponu konularak içerisine 4-5 öze dolusu daha önceden alkalifilik agar besiyerinde geliştirilmiş bakteri biyoması ilave edildi.
2. Tüpler 2700 rpm’de vortekslenerek homojenizasyon sağlandı.
3. Vortekslenen tüpler 10000 rpm’de 10 dk. santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alındı ve pellet üzerine tekrar 800 µl STE tamponu eklenerek 10 dk. 10000 rpm’de santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonrası oluşan üst faz atılıp pellet üzerine 400 µl STE tamponu ilave edildi. Tamponun pelletle tamamen karışması sağlandı.
5. Tüpler 75°C’ye ayarlı su banyosunda 30 dk. inkübe edildi.
6. Su banyosundan çıkartılarak 50 µl % 10’luk SDS ve 2 µl proteinaz K eklenen tüpler 40°C’ye ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildi.
7. İnkübasyon sonrası tüplere ortamdaki tuz konsantrasyonu 0.75 - 0.8 olacak şekilde 5M NaCl ve 0.1 hacim %10 CTAB / 0.7 M NaCl eklendi.
8. Tüpler 65°C’ye ayarlı su banyosunda 10 dk. inkübe edildi.
9. Eşit hacimde 24:1 kloroform : izoamilalkol ilave edilen tüpler 10 dk. oda sıcaklığında hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldı.
10. Tüpler 16000 rpm’de 15 dk. santrifüjlendikten sonra üst faz yeni steril ependorf tüplere aktarıldı. Her bir tüpe 0.1 hacim %10 CTAB / 0.7 M NaCl ilave edildi.
11. 65°C’ye ayarlı su banyosunda tüpler 10 dk. bekletildi.
12. Tüplere eşit hacimde 25 : 24 : 1 fenol : kloroform : izoamilalkol eklendi ve tüpler 10 – 20 dk. oda sıcaklığında, hematoloji çalkalayıcısında çalkalandı.

13. Tüpler 16000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Oluşan üst faz yeni steril bir ependorfa alındı ve üzerine eşit hacimde 24 : 1 kloroform : izoamilalkol eklendi.
14. Hafif şekilde tüpler 10 dk. karıştırıldı.
15. Üst faz tekrar yeni steril bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 0.8 hacim isopropanol (– 20°C) ilave edilerek tüpler – 20°C'de bir gece bekletildi.
16. Daha sonra tüpler 16000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
17. Her bir suş için steril ependorf tüplerine %70'lik etil alkolden 100 µl konuldu. Pipetin yardımıyla DNA bu tüplerde yıkandı.
18. Tekrar 16000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
19. Kalan etil alkolün uçması ve DNA'nın kuruması için DNA'lar şeffaf bir görünüm alana kadar oda sıcaklığında bekletildi.
20. Elde edilen DNA miktarına göre steril ependorf tüplerine 30 -100 µl TE çözeltisi konuldu.
21. DNA iyice çözündükten sonra tüplere 2 µl RNAz ilave edildi.
22. 2-3 sn. santrifüj edilen tüpler 37°C'de 30 dk. bekletildi.
23. Sonra tüpler etiketlenerek +4°C'de muhafaza edildi.

DNA numuneleri, izolasyon işleminin sonunda agaroz jel elektroforeze koşturularak kontrol edildi. İzole edilen DNA numunelerinin agaroz jelde görünür hale gelmesi için jel içerisine floresans özellik gösteren etidyum bromid boyası ilave edildi. Etidyum bromid çift zincirli DNA'nın baz çiftlerine bağlanarak 254 veya 312 nm dalga boyunda UV transillüminatörde kırmızı floresans yayma özelliği gösterir. Bu özellik DNA izole edilmiş ise UV translillüminatör üzerinde agaroz jelde bantların görünmesini sağlar. Bunun için 0,4 gr (%1) agaroz 40 ml 1X TBE tamponu bulunan 100 ml'lik erlene ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra mikro dalga fırın yardımıyla tamamen agarozun erimesi sağlandı ve ortalama 60°C'ye soğuyunca içerisine 6 µl etidyum bromid (10mg/ml) ilave edildi. Erlen hava kabarcığı oluşmayacak şekilde hafifçe karıştırıldı.

Elektroforez tablası düz bir zemine yerleştirildikten sonra jel solüsyonu hava kabarcığı oluşturulmadan döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Agarozun donmasından sonra tarak çıkarıldı (15-20 dk) ve içinde 1X TBE pH 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tarağın oluşturduğu boşluklara her bir DNA numunesinden 10 µl ve 8 µl yükleme boyası (Brom Fenol Mavis) ile birlikte toplam 18

μ l olarak yüklendi. Agaroz jel 100 voltta ortalama 20 dk elektroforez edildi ve UV transillüminatör’de gözlemlendi. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

3.2.8.2. 16S rRNA’nın PZR amplifikasyonu

16S rRNA’nın polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0,2 ml’lik PZR tüplerinde Thermal Cycler (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea)’da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primerler (27f : 5’-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3’ ve 1492R: 5’ TACGGYTACCTTGTTACGACTT) kullanıldı. PZR reaksiyonu için hazırlanan bütün stok solüsyonlar steril ddH₂O ile hazırlandı. Stok solüsyonlar kontaminasyon riskine karşılık küçük miktarlarda (25-100 μ l) steril ependorf tüplere bölündü kullanıma kadar -20 °C’de saklandı.

Hazırlık:

1. Primer stoklar (10 μ M)
 27f (forward primer: 16S rDNA’nın başlangıç bölgesine bağlanan evrensel primer, 5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’)
 1492R (reverse primer: 16S rDNA’nın son bölgesine bağlanan evrensel primer, 5’-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3’)
2. ThermoScientific PCR Master Mix (2X) (Katalog No:0172)
3. DNA (50-100 ng)
4. ddH₂O

Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar

ThermoScientific PCR Master Mix (2X)	25 μ l
27f	6 μ l
1492R	6 μ l
DNA	6 μ l
ddH ₂ O	7 μ l
Toplam Hacim	50 μ l

Uygulama:

1. Reaksiyon karışımı 1,5 ml’lik PZR tüplerinde her bir örnek için toplam hacim 25 μ l olacak şekilde hazırlandı ve daha sonra 0,2 ml’lik PZR tüplerine buz üzerinde 22 μ l transfer edildi.

2. Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DNA örnekleri 3µl olacak şekilde steril 0,2 ml'lik PZR tüplerinin içerisine transfer edildi. DNA örneklerinin eklenen miktarı toplam hacimi 25 µl yaptı.
3. Transfer işleminden hemen sonra PZR reaksiyonu (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea) Çizelge 3.5'deki şartlarda başlatıldı.
4. 3 µl PZR ürünü, % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları

Denatürasyon		Amplifikasyon		Bitiş	Soğuma
	Denatürasyon	Bağlanma	Uzama	Uzama	
95 °C	95 °C	50 °C	72 °C	72 °C	4 °C
10 dk	00:25 dk	00:25 dk	1 dk	5 dk	----
1 döngü	30 döngü		1 Döngü		

Purifikasyon kiti ile PCR sonrası saflaştırma işlemi (ROCHE'un High Pure PCR Product)

1. 50 µl.lik PCR ürününün üzerine 250 µl "Binding Buffer" koyulur, iyice karıştırılır.
2. Filtreli tüp toplama tüpünün içine yerleştirilir.
3. Örnek filtreli tüpe koyulur.
4. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
5. Aşağıya geçen sıvı atılır.
6. 500 µl "Wash Buffer" eklenir.
7. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
8. Aşağıya geçen sıvıyı atılır
9. 200 µl "Wash Buffer" eklenir.
10. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.
11. Toplam tüpü atılır ve filtreli tüp 1.5 ml.lik temiz bir tüpe yerleştirilir.
12. 30 µl "Elution Buffer" eklenir.
13. 12.500 rpm.de 1:30 dakika santrifüjlenir.

14. Aşağıya geçen DNA örneğimizdir.

Dizileme Reaksiyonu

Örnekleriniz ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazı ile ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizileme işlemi BMLabosis firmasına hizmet alımı olarak yaptırılmıştır.

3.2.8.3. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi

16S rRNA bölgesi dizileme işleminden sonra gelen ab1 dosyaları alınarak Codon Code Aligner V.6.0.2 programı ile her suş için kromatogramlar tek tek incelendi ve zayıf nitelikli baz dizilerinin (belirsiz yani ‘N’ kodlu birkaç baz) genellikle sekans başları ve sonlarındaki bölgelerinde kesilerek uzaklaştırıldı ve contigler oluşturuldu. Tüm izolatların 16S rDNA nükleotid baz dizileri filogenetik dendogramların oluşturulması için kullanıldı. NCBI’da blast yapılarak her suşa yakın türlerin access kodları alındı. Hem veri tabanındaki yakın türlerle hem de kendi aralarında analiz edildi. Mega7 programı ile bu dizilemesi yapılan suşlar ve Gen Banktaki suşların fasta formatları programa çağrıldı. Daha sonra Clustal W yapılarak korunmuş bölgeler kıyaslandı. Bu işlemin ardından Mega7 programındaki bu dosya fasta şeklinde kaydedildi. Bu işlemten sonra Mega 7.0.18 paket programı ile Maksimum Olabilirlik algoritması seçilerek Jukes ve Cantor’un uzaklık matrisi ile filogenik ağaçlar oluşturuldu.

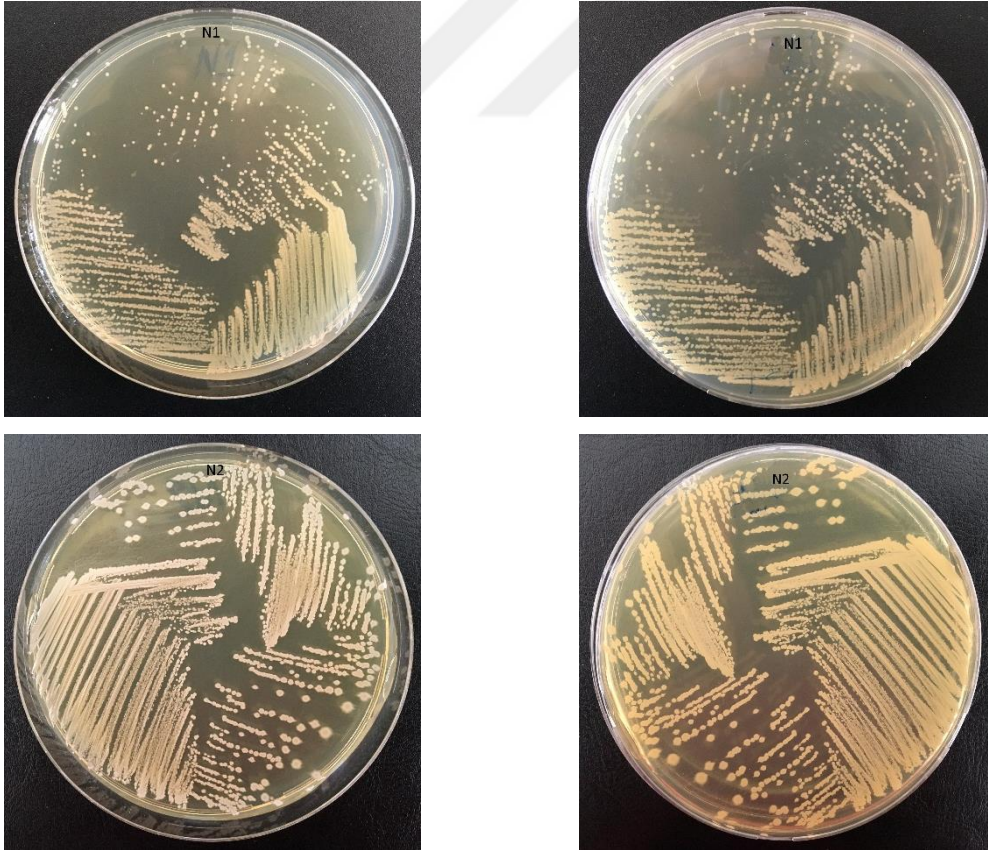
4. BULGULAR

4.1. Su ve Sediment Örneklerindeki Bakteri Sayısı

Seyreltme plaka yöntemi ile yapılan sayımlarda su örneklerindeki alkalofilik bakteri sayısı $5 \times 10^{-2}/\text{ml}$ ve sediment örneklerindeki alkalifilik bakteri sayısı 2×10^{-4} kob/gr olarak belirlendi.

4.2. Alkalofilik Bakterilerin Saf Kültürlerinin Elde Edilmesi

İzolasyon işleminden sonra saf kültürler elde edilinceye kadar saflaştırma işlemi devam etmiştir. Saf kültürler daha sonra % 20'lik gliserol solüsyonunda -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Şekil 4.1'de saf kültürler gösterilmiştir.



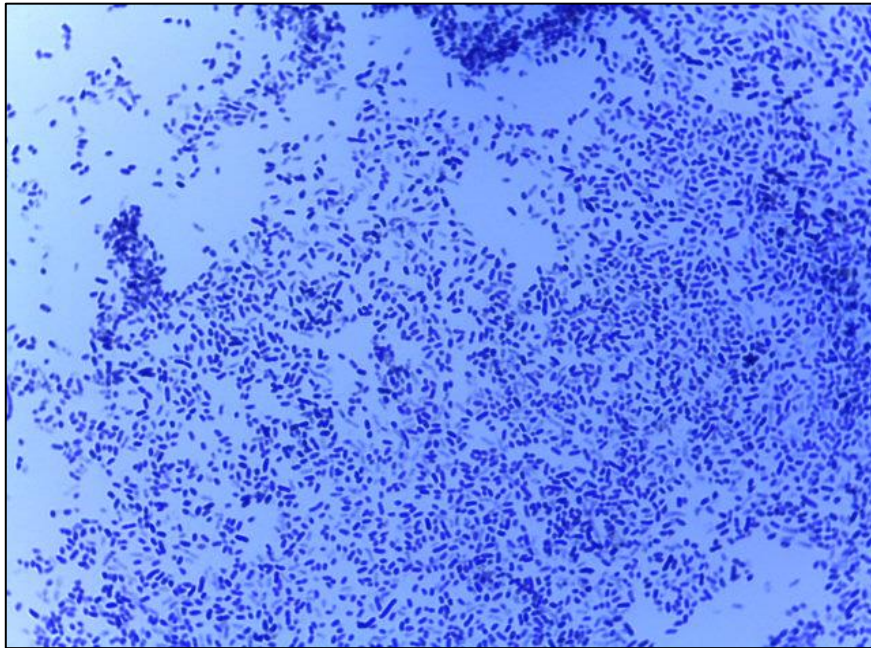
Şekil 4.1. N1 ve N2 izolatlarının saflaştırılmış görüntüleri.

4.3. Alkalifilik Bakteri Suşlarının Koloni ve Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi

N1 ve N2 izolatlarının hücre morfolojisinin belirlenmesi için gram boyama yöntemi uygulandı (Şekil 4.2 ve 4.3).



Şekil 4.2. N1 izolatına ait gram boyama görüntüsü.



Şekil 4.3. N2 izolatına ait gram boyama görüntüsü.

4.4. Alkalofilik İzolatların Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Van Gölü’den toplanan su ve sediment örneklerinden, yapılan izolasyon çalışmalarında lakkaz ve mannanaz üretme kabiliyetine göre seçilen iki farklı koloni morfolojisine sahip izolatlardan biri gram negatif, diğerinin ise gram pozitif bakteri olduğu belirlendi.

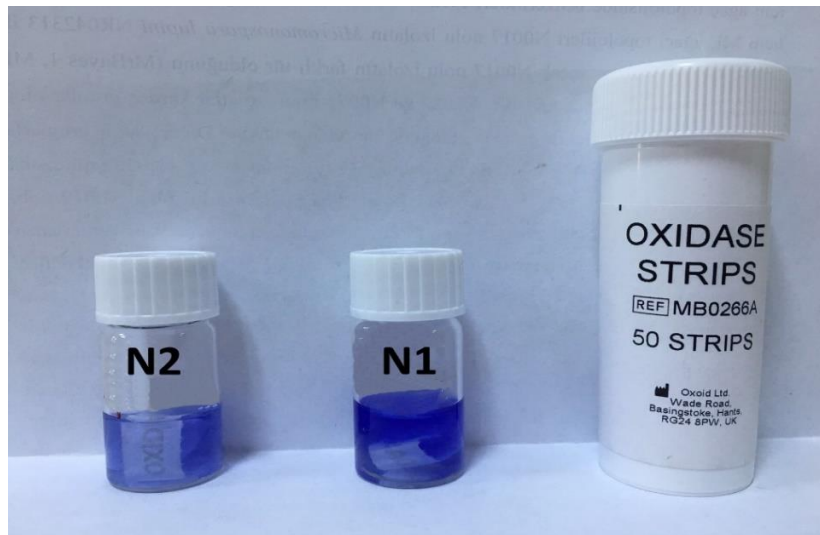
İzole edilen izolatlar N1 (Nevroz 1) ve N2 (Nevroz 2) olarak numaralandırıldı. Bu izolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi. İndol, oksidaz (Bkz Şekil 4.4.), katalaz (Bkz Şekil 4.5.), kazein hidrolizi (Proteaz), tween 80 hidrolizi (lipaz), nişasta hidrolizi (amilaz), ksilan hidrolizi (Ksilanaz), nitrat redüksiyonu, sitrat kullanımı, Voges Proskauer (VP), beta galaktosidaz, lakkaz üretme kabiliyeti, mannanaz üretme kabiliyeti (Bkz Şekil 4.6; Şekil 4.7) ve bazı şekerlerin kullanımı ile ilgili biyokimyasal özellikleri tespit edildi (Çizelge 4. 1).

Çizelge 4.1. N1 ve N2 izolatlarına uygulanan biyokimyasal testler

No	Testler	N1	N2
1	Koloni çapı	2 mm	2mm
2	Pigmentasyon	Krem	Krem
3	Hücre şekli	Basil	Basil
4	Gram reaksiyonu	-	+
5	İndol testi	-	-
6	Sitrat testi	+	+
7	Voges-Proskauer (VP)	-	-
8	Arabinoz	-	-
9	Mannitol	-	-
10	Sükroz	+	-
11	Adonitol	-	-
12	Metil_D-Glikozit	-	-
13	Selobiyoz	-	-
14	Mannoz	+	+
15	Salicin	-	-
16	Trahelez	+	-

Çizelge 4.1. N1 ve N2 izolatlarına uygulanan biyokimyasal testler (Devamı)

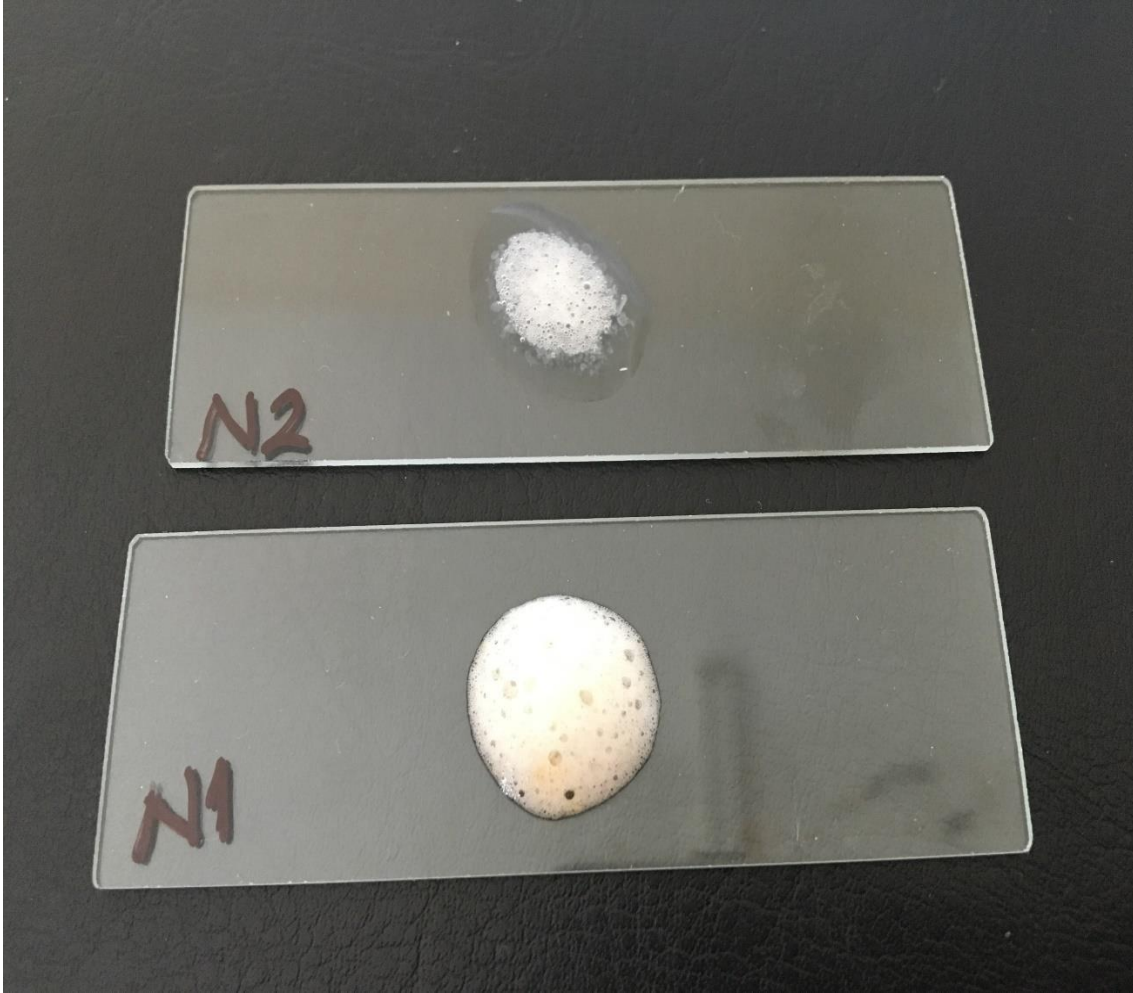
No	Testler	N1	N2
17	Galaktoz	-	-
18	İnositol	-	-
19	Rafinoz	-	-
20	İnulin	-	-
21	Sorbitol	-	-
22	Ksiloz	-	-
23	Melesitoz	-	-
24	Glikoz	+	+
25	Katalaz	+	+
26	Nitrat Redüksiyonu	+	+
27	Beta galaktosidaz	+	+
28	Oksidaz	+	+
29	Lakkaz üretme kabiliyeti	-	-
30	Mannanaz üretme kabiliyeti	+	+
31	Nişasta hidrolizi	-	-
32	Tween 80 hidrolizi	-	-
33	Kazein hidrolizi	-	-
34	Ksilan Hidrolizi	-	-



Şekil 4.4. Microbact Oxidase Strips MB0266 (Oxoid) ile yapılan oksidaz testi görüntüsü.

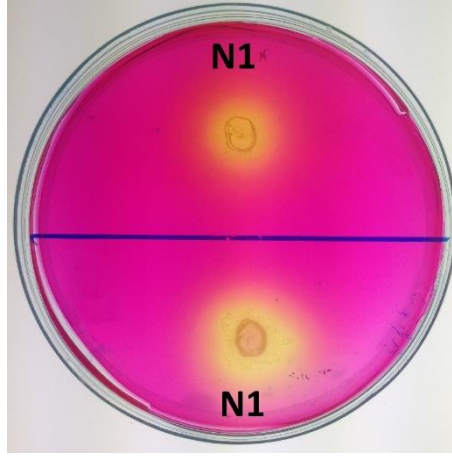
Her iki izolatların nitrat indirgemesi yönünden pozitif olduğu görüldü. N1 ve N2 izolatlarının oksidaz ve katalaz pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.4; Şekil 4.5).

N1 ve N2 izolatlarının Arabinoz, Mannitol, Adonitol, Metil_D-Glikozit, Selobiyoz, Salicin, Galaktoz, İnulin, İnositol, Rafinoz, Sorbitol, Ksiloz şekerlerini karbon kaynağı olarak kullanamadıkları, Glikoz ve Mannoz kullandıkları belirlendi. N1 izolatı Sükroz ve Trahelozu karbon kaynağı olarak kullanırken N2 izolatının kullanmadığı belirlendi.

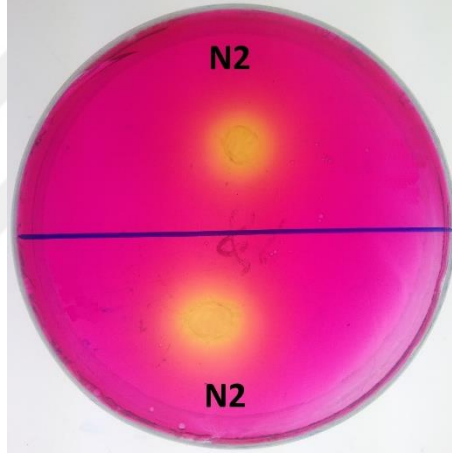


Şekil 4.5. N1 ve N2 izolatına ait katalaz pozitif test görüntüsü.

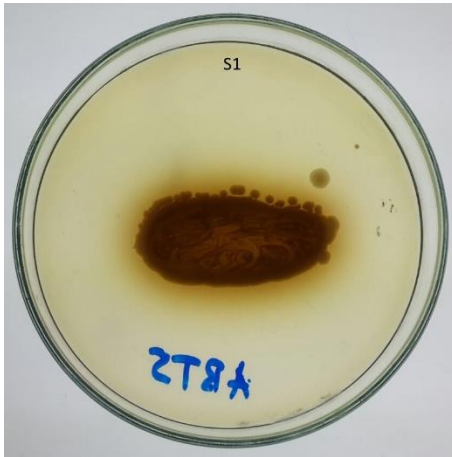
N1 ve N2 izolatlarının mannanaz üretme kabiliyetlerinin pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.5; Şekil 4.6; Şekil 4.7). Ancak tüm izolatların lakkaz enzimi üretme kabiliyetinin negatif olduğu belirlendi. Lakkaz pozitif kontrol suşu Şekil 4.8’de gösterildi.



Şekil 4.6. N1 izolatının mannanaz pozitif görüntüsü.



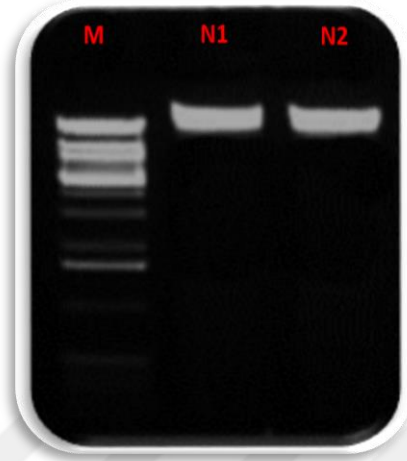
Şekil 4.7. N2 izolatının mannanaz pozitif görüntüsü.



Şekil 4.8. S1 Lakkaz pozitif kontrol suşu (Sarıkamış).

4.5. Genomik DNA izolasyonu

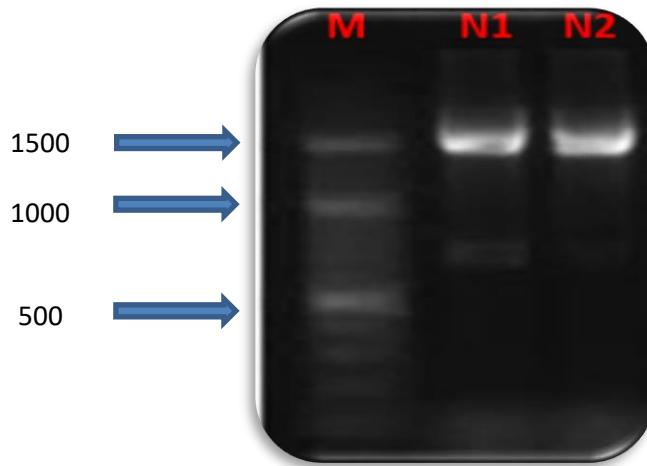
Bakterilerden genomik DNA izolasyonu için Ausubel ve ark. (1994), metodu modifiye edilerek kullanıldı.



Şekil 4.9. DNA izolasyonu yapılan izolatların %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

4.6. 16S rRNA'nın PZR Amplifikasyonu

Genomik DNA'sı izole edilen izolatların 16S rRNA gen bölgesi 27f ve 1492r evrensel primerleri ile Gradient PZR'da çoğaltıldı. PZR sonrası çoğaltılan ortalama 1500 baz çifti büyüklüğündeki DNA bölgesi agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.



Şekil 4.10. 16S rRNA gen bölgesinin PZR metodu ile amplifikasyonunun %1,5'lik agaroz jel görüntüsü (M:Marker).

4.7. 16S rRNA Gen Bölgesinin Analizi

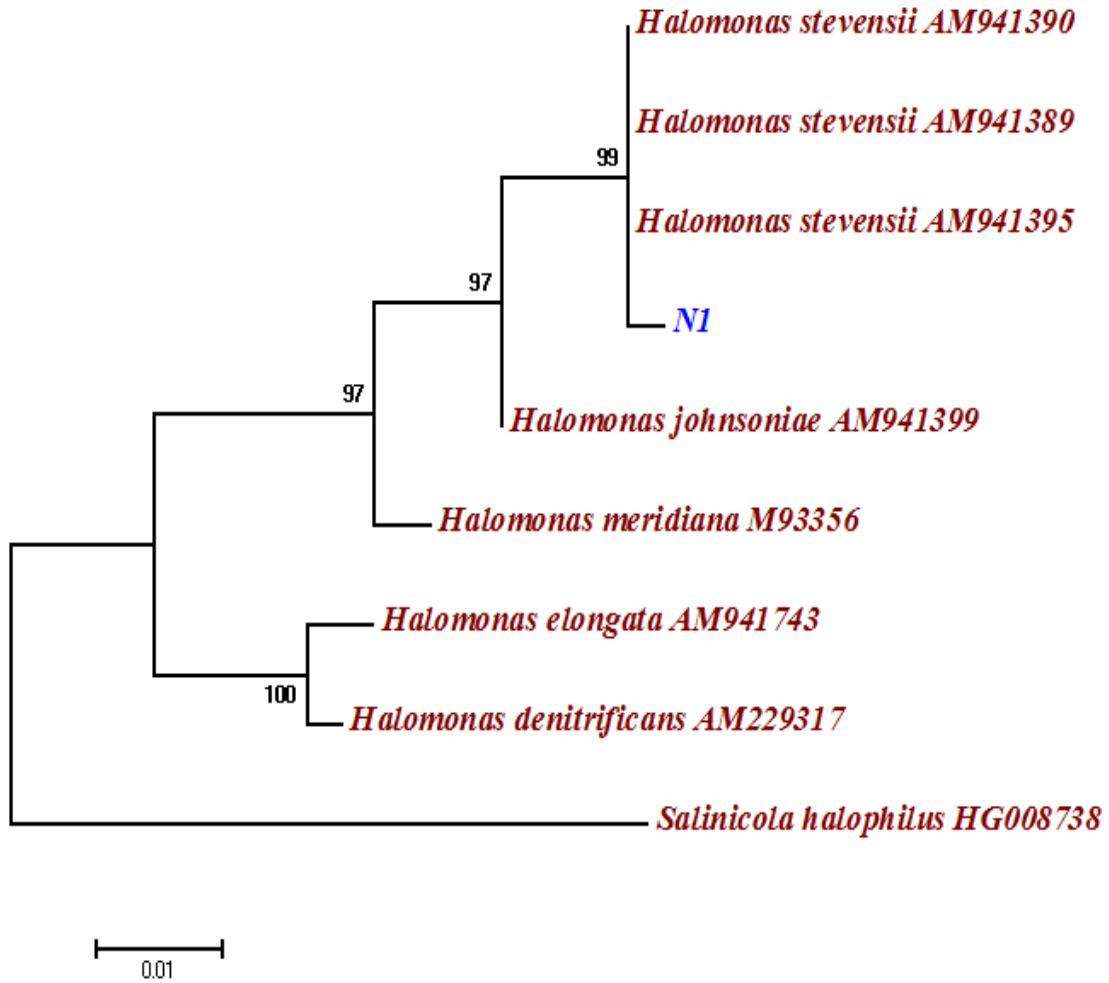
N1 ve N2 test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneklerinin 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primer (27F and 1492R; Lane, 1991) kullanılarak Thermal Cycler (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea)' da PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifiye ürünler %1,5'lik kontrol agaroz jelde (40 ml 1xTBE tampon, 0,4 g agaroz) 100 Voltta 45 dakika DNA markör ile birlikte yürütüldükten sonra görüntüleme sisteminde fotograflanarak kaydedildi. Test izolatlarının 16S PCR amplifikasyon ürünlerinin %1,5'lik kontrol agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.9'de verilmiştir.

2 test izolatının 16S rDNA gen sekanslarını taksonomik hiyerarşiye sokabilmek için BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) kullanılarak Gen Bankasındaki veritabanı ile karşılaştırılmıştır.

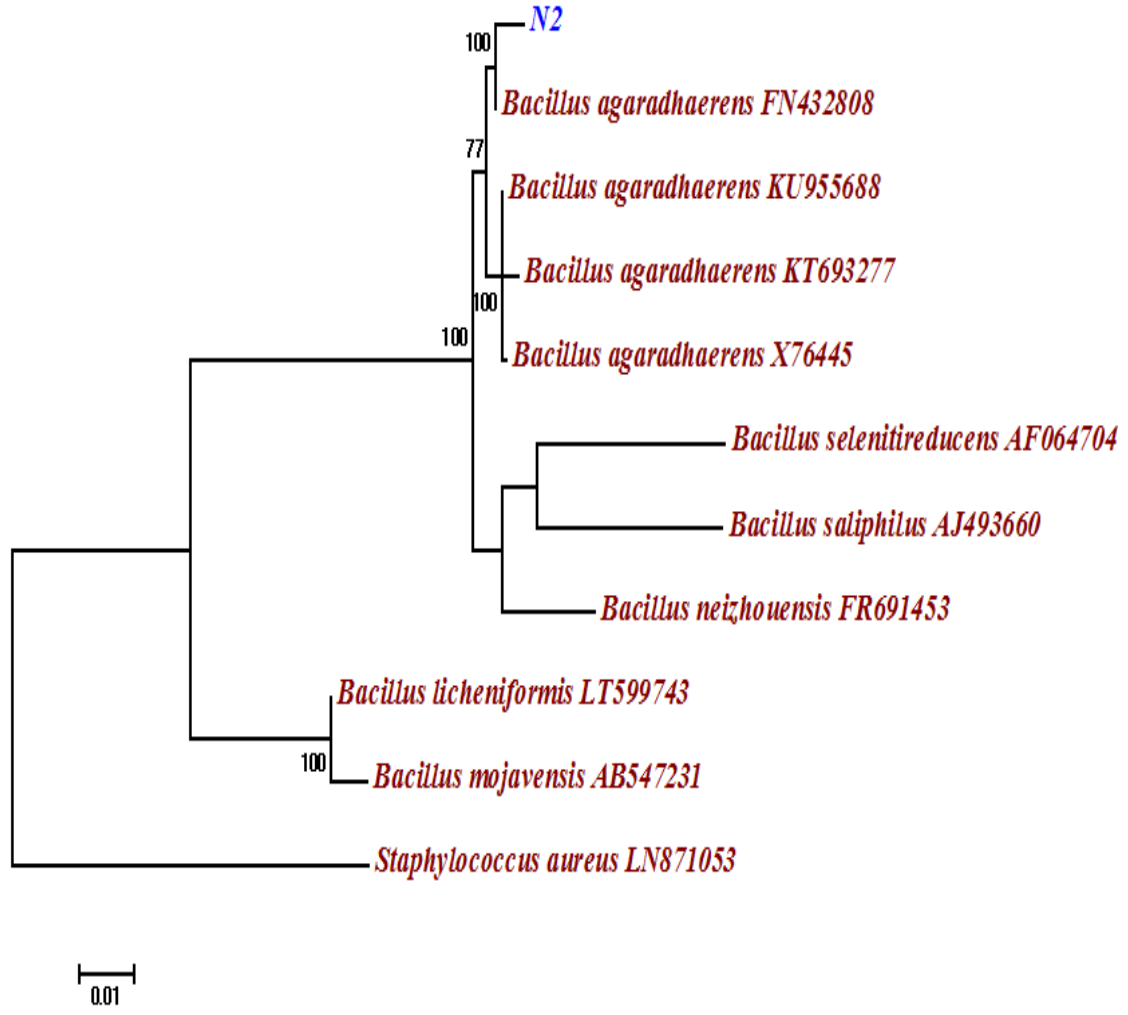
Test organizmaları ve ilgili cinslerin tip türlerinin dizi analizine bağlı filogenetik dendrogramları Maximum Likelihood algoritması kullanılarak oluşturuldu. Maximum Likelihood algoritması için filogenetik uzaklık matriksi Jukes-Cantor metodu izlenerek gerçekleştirildi (Jukes ve Cantor, 1969). Filogenetik analizler için oluşturulan filogenetik ağaçların bootstrap analizleri 1000 tekrarlı olarak MEGA 7 (Kumar ve ark., 2008) paket programında gerçekleştirildi. Evrimsel açıdan korunmuş nükleotid baz dizilerinde ki polimorfizm oranları yardımı ile türler arası uzaklık-yakınlık analizlerinin yapılabilmesi için bootstrap değeri hesaplanmıştır. Şekil 4.10. ve Şekil 4.11'de 16S rDNA dizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen ML analizinde her iki izolat için oluşturulan filogenetik ağaçta dış gruplar tamamen farklı bir dal oluşturarak kümelenmiştir.

N1 izolatını filogenetik dendrogramında Halomonadaceae familyasının bir üyesi olan *Salinicola halophilus* suşu dış grup olarak kullanıldı. *Halomonas* grubunu temsil eden çalışma izolatı ve ilgili tip türlerinin 16S rRNA nükleotit dizileme analizleri sonucu Maximum Likelihood matriksiyle oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.10'da verilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçta *Halomonas* cinsi üyeleri ve N1 izolatı kendi aralarında güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. N1 izolatı, Gen Bankası'nda kayıtlı *Halomonas stevensii* türleri ile sıkı bir şekilde kümelenme göstermiştir.

N2 izolatını filogenetik dendrogramında *Staphylococcus aureus* suşu dış grup olarak kullanıldı. *Bacillus* grubunu temsil eden çalışma izolatı ve ilgili tip türlerinin 16S rRNA nükleotit dizileme analizleri sonucu Maximum Likelihood matrisiyle oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4.11’de verilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçta *Bacillus* cinsi üyeleri ve N2 izolatı kendi aralarında güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. N2 izolatı, Gen Bankası’nda kayıtlı *Bacillus agaradhaerens* türleri ile güçlü bir homoloji kümelenmiştir. *Bacillus*’ların oluşturduğu kümelenmede izolatlar kendi aralarında 2 farklı alt gruba ayrılmıştır. Bu alt grupların birincisinde *Bacillus agaradhaerens* üyeleri ve N2 izolatı kendi aralarında kümelenirken *Bacillus selenitireducens*, *Bacillus saliphilus* ve *Bacillus neizhouensis* suşları kendi aralarında kümelenmiştir.



Şekil 4.11. Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre N1 izolatı için 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç.



Şekil 4.12. Maksimum Likelihood (ML) yöntemine göre N2 izolatu için 16S rRNA gen dizilerine dayanan filogenetik ağaç.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışma 2016 Temmuz ayında yapılan arazi çalışmalarında Van Gölü'nden toplanan su ve sediment numunelerinden izole edilen bakterilerin morfolojik, biyokimyasal özellikleri, mannanaz enzimi üretme kabiliyeti, lakkaz enzimi retme kabiliyeti ve 16S rDNA analizine dayalı teşhis çalışmalarını içermektedir. İzolasyonu yapılan 2 bakteriye 34 farklı fenotipik ve biyokimyasal test uygulanarak, 16S rDNA dizi analizleri yapılarak karakterize edildi ve son olarak elde edilen 16S rDNA genlerinin nükleotid dizileri belirlenerek analiz edilen türlerin filogenetik dendogramları oluşturuldu.

Soda gölleri tuz göllerinin özel bir türünü temsil eder. Diğer iç bölgelerde olduğu gibi tuz gölleri, soda gölleri, kuru iklimli tuzları kolaylaştıran alanlarda bulunmaktadır. Soda gölleri son derece alkalin bir su ortamıdır. Genellikle doğası gereği kalıcı değildir, karasal eşdeğerleri, çamur çölleri, kurutulmuş kalıntıları temsil eder. Soda gölleri dünya çapında bir dağılıma sahip olmakla birlikte, çoğunlukla kıtasal iç kısımlarında (alt tropikal enlemlerde) ya da yağmurun az olduğu dağlık bölgelerde kalmaktadırlar. Şimdiye kadar soda gölleri ile karakterize edilen mikroorganizmaların çoğunun tuzlu göllerde akrabaları vardır, bunun dışında hepsi alkalofiliktir veya en azından yüksek oranda alkali toleranslıdır. Bununla birlikte, tuzluluk da alkali göllerde önemli bir belirleyici faktördür (Jones ve ark., 1994).

Soda gölleri, özellikle de daha seyrek soda gölleri, dünyadaki en verimli su ortamları olup, ortalama olarak, karlı su ortamları için ortalamanın üzerinde bir verimlilik derecesine sahiptir (Grant ve ark.,1990). Alkalofilik ve organotrofik bakterilerin yoğun popülasyonları birincil üretkenlik tarafından desteklenmektedir ve göllerde aktif sülfür ve azot döngüsü bulunmaktadır (Jones ve Grant, 2000).

Van Gölü, Dünya üzerindeki dördüncü en büyük su kütesidir (hacim 607 km³, alan 3570 km², maksimum derinlik 450 m, göl seviyesi deniz seviyesinden 1648 m yüksekliktedir). pH oranı 9.7-9.8 ve tuzluluk oranı ‰ 21.7 olan yeryüzündeki en büyük soda gölü olarak da bilinir (Berber ve Yenidünya, 2005). Van Gölü, dünyadaki bilinen en büyük mikrobiyalitleri barındırır (Kepme ve ark., 1991). Kış konveksiyonundan dolayı, göl suyunun kimyasal bileşimi gölde homojendir. Farklı kompozisyonlardaki suları

getirmelerine rağmen, nehirler alkalın toprak metalllerinden daha büyük miktarda bikarbonat tüketirler. Bu soda kimyası postvolkanik CO₂ aktivitesine atfedilebilir (Degen ve ark.,1984). Van Gölü ile yapılan bu tür çalışmalar neredeyse yok denecek kadar azdır.

Bu bakterilerin izolasyonu için tavsiye edilen besi ortamları kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda Alkalofil besi ortamı tercih edildi. Bu çalışmada, sediment örnekleri, içerisinde Ringer çözeltisi bulunan şişelere konularak, toprak partiküllerine tutunmuş vejetatif hücrelerin serbest kalmasını sağlamak amacıyla, 1 gün süreyle çalkalanmıştı. 30 °C’de 48 saat süreyle inkübe edilen izolasyon plaklarında gelişen koloniler hem çıplak gözle hemde Leica 100X10 ışık mikroskopunda incelendi. Yapılan çalışmalar doğrultusunda bu bakterilerin bazik pH’larda iyi gelişme göstermelerine rağmen nötral pH’larda da gelişim gösterdiği tespit edildi. Saflaştırma işlemi yine alkalofil besi ortamında gerçekleştirilerek %20’lik gliserol çözeltisinde muhafaza edildi.

Bakteriler, Spirilla (spiraller), Cocci (küreler) ve Bacilli (çubuklar) olmak üzere üç temel morfolojik şekildedir (Bailey ve Ollis, 1986). Bakteriyel şekil, hücre duvarlarında peptidoglikanın biyokimyasal ve biyofiziksel özelliklerinin bir sonucudur (Siefert ve Fox, 1998). Öte yandan, bakterilerin morfolojisi katı bir hücre duvarı tarafından korunur ve hücre duvar yapısı ve biyokimyasal bileşimdeki farklılıklar, Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere iki tür bakteri ayırt etmeyi sağlar. Bakterilerin fizyolojik, tıbbi ve ekolojik özellikleri ile ilgili değerli bilgiler Gram boyama (Pacarynuk ve Danyk, 2004) tarafından elde edilebilir.

Çalışmamızda izolatlar Gram boyama metoduna göre, N1 izolatı Gram negatif basil ve N2 izolatı Gram pozitif basil olarak belirlendi (Bkz. Şekil 4.2; Şekil 4.3).

Mevcut enzimlerin çoğunluğu mikroorganizmalardan üretilmektedir. Mikroorganizmaların enzim ürünleri üretmek için kullanmasının iki temel avantajı, mikroorganizmaların hızlı bir şekilde büyüme yeteneği ve büyük, sabit bir enzim tedarik etme yeteneğidir ve mikrobiyal enzimlerin bitki ve hayvan kaynaklarının karşılık gelen karıştlarına göre daha kararlı olması gerçeğidir (Headon ve Walsh, 1994).

Aşırı pH’da hayatta kalabilen mikroorganizmalardan gelen enzimler, örneğin deterjanlar üretiminde, oldukça asidik veya yüksek derecede alkalın reaksiyon koşulları altında uygulamalar için özellikle yararlı olabilir. Bununla birlikte, asidofilik ve alkalofilik mikroorganizmaların çarpıcı özelliklerinden biri dahili olarak nötr bir pH

değerini koruma yeteneğidir ve bu nedenle bu mikroorganizmalardan hücre içi enzimlerin aşırı büyüme koşullarına adapte edilmesi gerekmez. Modern deterjanlardaki yüksek pH ve yüksek kenetleyici konsantrasyonlarına dirençli ve aktif olan proteinazlar, amilazlar, lipazlar ve diğer enzimler arzu edilir. Bu durum alkalifilik bakterilerin ve arkeaların ürünlerinin bu enzimleri üretme yetenekleri açısından taranmasını sağlamıştır (Van den Burg, 2003).

Mezofilik organizmalardan izole edilen enzimler, esasen dar bir pH, sıcaklık ve iyonik güç aralığında işlev görür ve bu da endüstriyel koşulları zorlayan teknolojik uygulamalarını zorlaştırır. Bu nedenle, asidite, alkalinite, tuzluluk, sıcaklık veya basınç aşırılıkları gibi zorlu çevresel koşullarda başarılı olabilen mikroorganizma aramak için kayda değer çabalar sarf edilmiştir. Ekstremofiller olarak adlandırılan bu mikroorganizmalar, aşırı koşullar altında işlev gören ve bu nedenle de büyük bir biyoteknolojik vaatte bulunan yeni enzimlerin değerli bir kaynağıdır (Van den Burg, 2003). Enzimin değerinin yaklaşık % 75'i deterjan, gıda ve nişasta işleme sanayileri tarafından hesaplanmaktadır. Bunlar çoğunlukla proteazlar, amilazlar, lipazlar ve selülozlar gibi hidrolitik enzimlerdir. Özel enzimler, enzim pazarının yaklaşık % 10'unu oluşturur ve yeni ilaçların geliştirilmesi, tıbbi teşhisler ve sayısız analitik kullanımın artan kullanımlarını bulmaktadır. Ticari olarak kullanılan enzimlerin yaklaşık % 60'ı modern biyoteknolojinin ürünüdür. Artan teşhis ve analitik uygulamalarına ilaveten, kimyasallar, gıdalar ve yemlerin, tarımsal ürünlerin ve tekstil ürünlerinin üretimi, bozunumu ve biyotransformasyonu için enzimler için yeni kullanımlar geliştirilmektedir (Chisti ve Gavrilescu, 2005).

Mikroorganizma veya mikroorganizma gruplarının kendilerine has bir biyokimyasal özelliği vardır. Bakteriler için örnek verecek olursak; her bakteri kendine özgü enzimlere sahip olup, belirli maddeleri yine kendine özgü bir biçimde metabolize ederek, çeşitli yıkım ve yapım ürünleri meydana getirmektedir. Bakterilerin bu özelliklerinin tek tek veya listeler halinde çeşitli kaynaklarda (kitap, araştırma makalesi, derleme vb.) bulmak mümkündür. Ancak bu konu başvurulacak temel kaynak *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* dir. Bergey's Manual, doğadaki bilinen bakterilerinin tümünü, belli taksanomik gruplar halinde inceleyerek, biyokimyasal özellikleri de dahil olmak üzere, pek çok özelliğini tek tek ve liste halinde açıklamaktadır.

Çalışmamızda izolatların ikisi de mannanaz enzimi üretme kabiliyeti gösterdiğinden endüstriyel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir. Yine N1 ve N2 izolatının nitrati indirgemesi pozitif olması yönüyle önemli bulundu. Bu durum alkali habitatlarda azot döngüsünün gerçekleştiğinin göstergesidir.

N1 izolatının BLAST sonucu %99 *Halomonas stewensii* olması ve bu türün yeni olması nedeniyle daha önceki çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Bu suş için Kim ve arkadaşlarının (2010) yapmış olduğu çalışmadaki sonuçlar ile bizim çalışmamızdaki sonuçlar büyük oranda paralellik göstermiştir. Ancak çalışmamızdaki Tween 80 hidroliz testi ve inositol testi Kim ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmanın aksine negatif sonuç göstermiştir.

N2 izolatının BLAST sonucu %99 *Bacillus agaradhaerens* olması nedeniyle daha önceki çalışmalarla karşılaştırılmıştır. Bu suş için İbrahim ve arkadaşlarının (2016) yapmış olduğu çalışmada bu suş proteaz aktivitesi yönünden pozitif sonuç gösterirken çalışmamızda ise sonuç negatif olarak belirlenmiştir.

Bakteriyel sistematikte polifazik yaklaşımın gündeme gelmesiyle bir arada kullanılan nümerik, kimyasal ve moleküler veriler, taksonlar arasındaki ilişkilerin daha objektif olarak tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Gün geçtikçe gelişen moleküler teknikler, önceleri oldukça masraflı ve zaman alıcı olan genom analizinin uygulanabilirliğini oldukça arttırmış ve bir organizmanın tüm genomunun dizilenmesinin yirmi dört saat kadar kısa bir sürede tamamlanabilmesine olanak sağlamıştır. Bu gelişmenin sonucu, 2009 yılının son aylarında bininci prokaryotik genomun sekanslanmasının tamamlandığının rapor edilmesiyle bilim dünyasına duyurulmuştur. Her yıl daha fazla organizmanın genom sekansının tamamlanması yakın gelecekte bu yöntemin mikroorganizmalar için evrensel bir taksonomik kriter olabileceğinin göstergesidir (Coenye ve ark., 2005).

Bakterilerin teşhisinde moleküler çalışmaların doğruluğu ve geçerliliği tartışılmaz bir gerçektir (Laurent ve ark., 1999). Bu moleküler çalışmalar içerisinde de ribozomal moleküllerin analizi özellikle cins seviyesinde ve cinslerin türleri arasındaki filogenetik benzerliğin ortaya konmasında göz ardı edilemeyecek kadar yararlı tekniklerdir (Cook ve Meyers, 2003). Ribozomal RNA genleri, universal ve fonksiyonel olarak yüksek derecede korunmuş yapıya sahip olduğu için filogenetik çalışmalarda en iyi sonuç veren hedef yapılardandır (Woese, 1987).

Moleküler yöntemlerden biri olan 16S rRNA gen dizileme bakteriler arasındaki filogenetik ilişkilerin açıklanmasında, herhangi bir ortamdan izole edilen bakterilerin tanımlanmasında kullanılan güçlü bir tekniktir (Busse ve ark., 1996). 2000’li yıllardan itibaren PCR kullanımının ve DNA dizilemenin yaygınlaşmasının sonucu olarak 16S rRNA gen bölgesinin dizilenmesi bakteriyal izolatların doğru şekilde tanımlanmasında ve yeni bakteriyal izolatların literatüre kazandırılmasında büyük öneme sahip olmuştur. 16S rRNA gen bölgesi tüm türlerin tanımlanmasında oldukça faydalı ve korunmuş bölgelerin ise tür için spesifik bilgi verici özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Brown-Elliott, 2006). Korunmuş bölgeler yavaş evrimleştikleri için cins, tür ve alt tür seviyesinde filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. 16S rRNA sekans verileri gen bankalarına deposit edilmekte ve ihtiyaç duyulduğunda bu veri bankalarından kolaylıkla elde edilebilmektedir. Veri bankalarında deposit edilmiş olan sekans dizilerinin kalitesi yapılan moleküler çalışmaların güvenilirliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Son yirmi yılda 1,3 milyon bakterilere ait, 54 bin arkealere ait 16S rRNA gen dizisi RDP’de arşivlenmiştir (Brown-Elliott, 2006; Kim ve ark., 2011).

Türler arasındaki filogenetik akrabalığın değerlendirilmesinde tüm genom sekans analizine doğru bir eğilim olsa da günümüzde hala bakterilerin taksonomik pozisyonlarının belirlenmesinde 16S rRNA sekans verileri temel oluşturmaktadır. Ad-Hoc komitesi 2005 raporuna göre, yeni bir prokaryotik taksonun tanımlanmasında çalışılan organizmanın en az 1300 nt’den oluşan 16S rRNA gen dizisi temel alınıp en yakın akraba taksonlar belirlenmesi gerektiğini belirtmiştir.

Bu çalışmada, N1 ve N2 izolatının 16S rRNA gen bölgesi 27F ve 1492R primerleri ile çoğaltılmıştır. Bu gen bölgesinin sekans analizi sonuçları alınarak Codon Code Aligner V.6.0.2 programında tüm nükleotitler elektroferogramlara bakılarak tek tek kontrol edilmiştir. 16S rRNA gen dizileri NCBI’den elde edilmiş ve izolatların gen dizileriyle birlikte hizalanmıştır. Boşluklar çıkarıldıktan sonra elde edilen dizi filogenetik analizlere tabi tutulmuştur. Bu çalışmada, türler arasındaki genetik uzaklığı belirlemek için filogenetik analizlere uygun formatlara getirilmiş 16S rDNA dizileri, Maksimum Olabilirlik algoritması seçilerek Jukes ve Cantor’un uzaklık matrisi ile filogenik ağaçlar

oluşturulmuştur. N1 ve N2 izolatlarının BLAST sonuçları Tablo 5.1 ve Tablo 5.2’de verilmiştir.

N1 izolatu için oluşturulan filogenetik ağaçta *Halomonas* bakterileri güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. Dış grup olarak *Salinicola halophilus* seçilmiştir. N1 izolatına ait gen dizisi ve NCBI’den alınan izolatların gen dizileri 16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizinde; N1 suşunun filogenetik konumunu belirlemek için 16S rDNA sekansı analizi yapıldı. Toplam 1406 nükleotidlik 16S rRNA geni belirlenmiştir. N1 nolu izolatın karşılaştırılan 1406 nt’lik bölgede 8 nükleotit farklılığı ve % 99,6 benzerlik ile *Halomonas stevensii* AM941395, *Halomonas stevensii* AM941390 ve *Halomonas stevensii* AM941389 suşları ile sıkı bir homoloji ile kümelenmiştir.

N2 izolatu için oluşturulan filogenetik ağaçta *Bacillus* bakterileri genel olarak güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. Birinci dalda N2 izolatu, *Bacillus agaradhaerens*, *Bacillus selenitireducens*, *Bacillus saliphilus* ve *Bacillus neizhouensis* kümelenmiştir. N2 izolatu, *Bacillus agaradhaerens* suşları ile çok güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. Özellikle *Bacillus agaradhaerens* FN432808 suşu ile % 100’lük bir ayrımla diğer *Bacillus agaradhaerens* suşlarından ayrı bir dal oluşturarak kümelenmiştir. Dış grup olarak seçilen *Staphylococcus aureus* ise ayrı bir dal oluşturmuştur. N2 izolatına ait gen dizisi ve NCBI’den alınan izolatların gen dizileri 16S rRNA gen bölgesi filogenetik analizinde; N2 suşunun filogenetik konumunu belirlemek için 16S rDNA sekansı analizi yapıldı. Toplam 1449 nükleotidlik 16S rRNA geni belirlenmiştir. N2 nolu izolatın karşılaştırılan 1449 nt’lik bölgede 21 nükleotit farklılığı ve % 98,5 benzerlik ile *Bacillus agaradhaerens* FN432808 suşu ile sıkı bir homoloji ile kümelenmiştir.

Sonuç olarak;

Bu tezde, N1 izolatu *Halomonas stevensii*, N2 izolatu ise *Bacillus agaradhaerens* olarak teşhis edilip ekstraselüler hidrolitik enzim aktivitelerine bakılmıştır. Bu tezde elde edilen ilk sonuçlar ile bakterilerden endüstriyel kullanım potansiyeli olan enzimler elde edilmiştir. N1 ve N2 izolatu mannanaz ve katalaz aktivitesi göstermiştir. Gelecekteki çalışmalar, bu enzimlerin bir diğer karakterizasyonu, termostabilite, raf ömrü ve bu özelliklerin iyileştirilmesi konularında araştırmalar yapılarak, endüstriyel ölçekte önemli enzimlerin daha büyük ölçeklerde üretilmesinde kullanılabilir. Buna ek olarak, bu tezde belirtildiği gibi, bu çalışmada izole edilen bakteri türlerinde (varsayılan genler) bazı enzim genleri bulunmamaktadır. Dolayısıyla, bu varsayılan enzimler için yapılabilen

klonlama çalışmaları ile yeni enzimleri keşfetmek ve ülkemiz için patent almak için bir fırsat vardır. Bu tür çalışmalar ülkemizin enzime olan dışa bağımlılığından kurtaracak ve ekonomimize ciddi bir değer katacaktır.

Çizelge 5.1. N1 izolatının BLAST sonucu

Strain	Benzerlik
<i>Halomonas stevensii</i> strain S18214 16S ribosomal RNA gene	%99
<i>Halomonas stevensii</i> partial 16S rRNA gene, strain T68679	%99
<i>Halomonas stevensii</i> partial 16S rRNA gene, strain F22157	%99
<i>Halomonas stevensii</i> partial 16S rRNA gene, strain F22171	%99
<i>Halomonas stevensii</i> partial 16S rRNA gene, strain H35115	%99

Çizelge 5.2. N2 izolatının BLAST sonucu

Strain	Benzerlik
<i>Bacillus agaradhaerens</i> partial 16S rRNA gene, strain IB-S7	%99
<i>Bacillus agaradhaerens</i> strain GSP78 16S ribosomal RNA gene	%99
<i>Bacillus</i> sp. ZBAW6 16S ribosomal RNA, partial sequence	%99
[<i>Bacillus</i>] <i>agaradhaerens</i> strain NPST-R 16S ribosomal RNA gene	%99
[<i>Bacillus</i>] <i>agaradhaerens</i> strain DSM 8721 16S ribosomal RNA gene	%99

KAYNAKLAR

- Abdelnasser S. S. Ibrahim, Ali A. Al-Salamah, Yahya B. Elbadawi, Mohamed A. El-Tayeb, Khalid Almaary, Atif A. Elagib, 2016. Alkaline Protease From A New Halotolerant Alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* strain AK-R Isolated From Egyptian Soda Lakes. *Biosci. J., Uberlândia*, **32**(6): 1604-1618.
- Adams, M. W. W., Kelly, R. M., 1995. Enzymes from microorganisms in extreme environments. *Chem. Eng. News* **73**: 32-42.
- Adenmark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpaa, V., Drakenberg, T., Terneld, F., Stalbrand, H., 1998. Softwood hemicelluloses-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a β -mannanase. *J Biotechnol* **63**: 199–210
- Adibmoradi, M., Mehri, M., 2007. Effects of β -mannanase on broiler performance and gut morphology. *16th European Symposium on Poultry Nutrition, Stasbourg, France*, pp 471–47
- Adrio, J. L., Demain, A. L., 2005. Microbial Cells and Enzymes—A Century of Progress. *In Methods in Biotechnology. Microbial Enzymes and Biotransformations*; Barredo, J.L., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, Volume 17, pp. 1–27
- Adrio, J. L., Demain, A. L., 2014. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules* **4**: 117-139
- Akino, T., Nakamura, N., Horikoshi, K., 1988. Characterization of Three-Mannanases of an Alkalophilic *Bacillus* sp., *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**(3):773-779
- Alcalde, M., 2007, Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications, *Industrial Enzymes*, 461-476.
- Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J. and Ballesteros A., 2006. Environmental biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes. *Trends Biotechnol*, **24**(6): 281–287.
- Alexandre, G., Bally, R., Taylor, B. L., Zhulin, I. B., 1999. Loss of cytochrome oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* **181**: 6730–6738
- Arahal D.R., Ludwig W., Schleifer K.H. and Ventosa A. 2002. Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 241–249
- Bailey, J. E., ve Ollis, D. F., 1977. *Biochemical Engineering Fundamentals*. International student edition, McGraw Hill, Tokyo.
- Bains, J., Capalash, N., Sharma, P., 2003. Laccase from a nonmelanogenic, alkalotolerant c-proteobacterium JB isolated from industrial waste water drained soil. *Biotechnol Lett.* **25**: 1155–1159
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**: 326-338.
- Benech R. O., Li, X., Patton, D., Powlowski, J., Storms, R., Bourbonnais, R., Paice, M., Tsang, A., 2007. Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo- β -1,4-mannanase. *Enzyme Microb Technol* **41**: 740–747

- Benson, J. K., 2002. **Microbiological Application: Laboratory Manual in General Microbiol.** 8th Edition: 471-478
- Berber, I., Yenidünya, E., 2005. Identification of Alkaliphilic *Bacillus* Species Isolated from Lake Van and Its Surroundings by Computerized Analysis of Extracellular Protein Profiles. **Turk J. Biol.**, **29**: 181-188.
- Bettiol J. L. P., Boutique, J. P., Gualco, L. M. P., Johnston, J. P., 2000. **Nonaqueous Liquid Detergent Compositions Comprising A Borate Releasing Compound and A Mannanase. Patent EP1059351**
- Bhoria, P., Singh, G., Hoondal, G. S., 2009. Optimization of mannanase production from *Streptomyces* sp. PG-08-03 in submerged fermentation. **Bioresources** **4**(3): 1130–1138
- Birhanlı, E., 2003. **Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi** (Yüksek Lisans Tezi, Basılmış). Fen Bilimleri Enstitüsü, İnönü Üniversitesi.
- Birhanlı, E. and Yesilada, O., 2006. Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* 200801 in repeated-batch mode. **Enzyme Microbial Technol**, **39**: 1286–1293.
- Blibech, M., Ghorbel, R. E., Fakhfakh, I., Ntarima, P., Piens, K., Bacha, A. B., Chaabouni, S. E., 2010. Purification and characterization of a low molecular weight of β -mannanases from *Penicillium occitanis* Pol6. **App. Biochem. Biotechnol.** **160**: 1227–1240
- Bligny, R., Douce, R., 1983. Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. Purification and properties of the enzyme. **J. Biochem** **204**: 489–496
- Brown-Elliott, B. A., Brown, J. M., Conville, P. S., Wallace, R. J., 2006. Clinical and Laboratory features of the *Nocardia* spp. Based on current molecular taxonomy. **Clin. Microbiol. Rev.**, **19**: 259-282.
- Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., 1974, **Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology, 8th edition**, The Williams and Wilkins Company, 1246 p. Baltimore.
- Busse, H. J., Denner, E.B.M., Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **J. Biotech.**, **47**: 3-38.
- Cai H., Shi, P., Luo, H., Bai, Y., Huang, H., Yang, P., Yao, B., 2011. Acidic β - mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. **J. Biosci. Bioeng.** **112**: 551–557
- Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P., Gupta N., 2012. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **93**: 1817–1830
- Chen B. K., Diosady, L. L., 2003. Enzymatic aqueous processing of coconuts. **Int Appl. Sci Eng.** **1**: 55–61
- Cheong, S., Yeo, S., Song, H. G. ve Choi, H. T., 2006. Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor*. **Microbiol. Res.** **161**: 316–320.
- Claus, H., 2003. Laccases: Structure, reactions, distribution. **Micron**, **35**: 93-96.
- Claus, H., Filip, Z., 1997. The evidence of a laccase-like activity in a *Bacillus sphaericus* strain. **Microbiol. Res.** **152**: 209–215
- Coenye, T., Gevers, D., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Swings, J., 2005. Towards a

- Cook A. E., Meyers P. R., 2003. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus specific 16S-rRNA gene restriction fragment patterns. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** **53**: 1907-1915.
- Couto, S. R. and Herrera, J. L. T., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotech. Adv.** **24**: 500–513.
- Çiftçi, Y., Işık, M. A., Alkeveli, T., Yeşilova, Ç., 2008. Van Gölü Havzasının Çevre Jeolojisi. **Jeoloji Mühendisliği Dergisi** **32** (2).
- Çotuk, A., Anğ Küçüker, M., 1992. **Biyologlar için Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu**, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 129 sayfa.
- Daskiran, M. R. G., Teeter, D. W., Fodge, D., Hsiao, H. Y., 2004. An evaluation of endo- β -D-mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in β -mannan content. **Poult. Sci.** **83**: 662–668
- De Marco, A., Roubelakis-Angelakis, K. A., 1997. Laccase activity could contribute to cell-wall reconstitution in regenerating protoplasts. **Phytochemistry** **46**: 421–425
- Demain, A. L., Adrio, J. L., 2008. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol. Biotechnol.** **38**: 41–45.
- Dhawan, S., Kaur, J., 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. **Crit. Rev. Biotechnol.** **27**(4): 197–216
- Dhawan, S., Kaur, J., 2007. Microbial Mannanases: An Overview of Production and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology.** **27**: 197–216.
- Driks, A., 2004. The *Bacillus subtilis* spore coat. **Phytopathology** **94**: 1249–1251
- Duran, M., 2011. **Lakkaz Üreticisi Streptomyces Türlerinin Katı Kültür Performanslarının Karşılaştırılması** (Yüksek Lisans Tezi, Basılmış). Fen Bilimleri Enstitüsü, Ege Üniversitesi.
- Ediz, N., Beyatlı, Y., 2005. *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından biyoplastik üretimi. **Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi**, **3**(5): 1-22.
- Endo, K., Hosono, K., Beppu, T., Ueda, K., 2002. A novel extracytoplasmic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. **Microbiology** **148**: 1767–1776
- Eneyskaya, E. V., Sundqvist, G., Golubev, A. M., Ibatullin, F. M., Ivanen, D. R., Shabalin, K. A., Brumer, H., Kulminskaya, A. A., 2009. Transglycosylating and hydrolytic activities of the β -mannosidase from *Trichoderma reesei*. **Biochimie** **9**: 632–638
- Ertaş, M., 2016. **Van Gölü Havzası Micromonospora Cinsi Bakterilerin İzolasyonu, Teşhisi ve Karakterizasyonu** (Doktora Tezi, Basılmamış). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Faure, D., Bouillant, M., Bally, R., 1994. Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. **Appl. Environ. Microbiol.** **60**: 3413–3415
- Faure, D., Bouillant, M., Bally, R., 1995. Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases. **Appl Environ Microbiol** **61**: 1144–1146
- Feng, Y., He, Z., Ong, S.L., Hu, J., Zhang, Z., Ng, W.J., 2003. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum beta-mannanase production. **Enzyme and Microbial Technology.** **32**: 282–289.
- Fu, Y., Jeong, S. H., Kim, J., Callihan, J. A., Park, K., Pai, C. M., 2006. **Mannose Based Fast Dissolving Tablets. Patent US20060134195A1**

- Galinski, E. A., 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. **Experientia** **49**: 487-496.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J. M., 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediat J.** **3**: 125.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M. L., Bally, R., 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. **FEMS Microbiol Lett.** **108**:205–210
- Gnanamani, A., Jayaprakashvel, M., Arulmani, M. and Sadulla, S., 2006. Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. **Enzyme Microbial Technol.** **38**: 1017–1021.
- Grant, W. D., Jones, B. E. Ve Mwatha, W.E., 1990. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. **FEMS Microbiol.**, **75**: 255–270.
- Grant, W. D., Jones, B. E., 2000. Alkaline environments. **In: Lederberg J (Ed), Encyclopaedia of Microbiology , 2nd Edition, Volume 1**, Academic Press 126 - 133.
- Gümüşel, F., 2002. **Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü**. Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi. s. 73-135.
- Han, M. J., Choi, H. T. ve Song, H.G., 2005. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. **The Journal of Microbiology**, 555–560.
- He, X., Liu, N., Zhang, Z., Zhang, B., Ma, Y., 2008. Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline β -mannanase from alkalophilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Enzyme Microb Technol** **43**: 13–18.
- Headon, D. R., Walsh, G., 1994. The Industrial Production of Enzymes. **Biotechnol Adv.**, **12**: 635-646.
- Herrera, J. L. T., Osma, J. F., Couto, S.R., 2007. Potential of solid-state fermentation for laccase production. **Communication Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, 391-400.
- Hilge M., Gloor, S. M., Rypniewski, W., Sauer O., Heightman, T. D., Zimmermann, W., Winterhalter, K., Piontek, K., 1998. High-resolution native and complex structures of thermostable beta-mannanase from *Thermomonospora fusca* - substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. **Structure** **6**(11): 1433-44.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some Applications Of Their Products For Biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **63**:735-750.
- Johnson, E. A., 2013. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts- the ascomycetes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **97**: 503–517.
- Jones, B. E., Grant, W. D., 2000. Microbial Diversity and Ecology of Soda Lakes. Seckbach J (Ed). **Journeys to Diverse Microbial Worlds, Kluwer**. Academic Publishers 177-190.
- Jones, B. E., Grant, W. D., Collins, N. C., Mwatha, W. E., 1994. Alkaliphiles: diversity and identification. In: Priest FG, Ramos-Cormenzana A, Tindall BJ (eds) **Bacterial Diversity And Systematics, Plenum Press**, New York, pp 195-229
- Jørgensen, H., Sanadi, A. R., Felby, C., Lange, N. E. K., Fischer, M., Ernst, S., 2010. Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. **Appl. Biochem. Biotechnol.** **161**: 318–332

- Jukes, T. H., Cantor, C. R., 1969. Evolution of protein molecules. **In Mammalian protein metabolism, vol. 3**, Edited by H.N. Munro. New York: Academic Press., 21-132.
- Kempe, S., Kazmierczak, J., Landmann, G., 1991. Largest known Microbialites discovered in Lake Van Turkey. **Macmillan Magazines**, **349**: 605-608.
- Khire, J. M., 1994. Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt pan. **Lett. Appl. Microbiol.** **19**: 210-212.
- Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. **Journal of Microbiological Methods**, **84**: 81-87.
- Kirk, O., Borchert, T. V. and Fuglsang, C. C., 2002. Industrial enzyme applications. **Curr. Opin. Biotechnol.**, **13**: 345-351.
- Kumar, A., Singh, S., 2013. Directed evolution: Tailoring biocatalysis for industrial application. **Crit. Rev. Biotechnol.** **33**: 365-378.
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefing in Bioinformatics**, **9**(4): 299-306.
- Kunamneni, A., Plou, F. J., Ballesteros, A and Alcalde, M., 2008. Laccases and their applications: A patent review. **Recent Pat. Biotechnol.**, **2**(1):10-24
- Kushner, D. and Kamekura, M., 1988. Physiology of halophilic eubacteria. **In: Halophilic Bacteria (Rodriguez-Valera, F., Ed.)**, pp. 109-138. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kwang Kyu Kim, Keun Chul Lee, Hee-Mock Oh and Jung-Sook Lee, 2010. *Halomonas stevensii* sp. nov., *Halomonas hamiltonii* sp. nov. and *Halomonas johnsoniae* sp. nov., isolated from a renal care centre. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. **60**: 369-377
- Larsson, S., Cassland, P. and Jonsson L. J., 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. **Appl. Environ. Microbiol.**, **67**: 1163-1170.
- Laurent, F. J., F. Provost, ve P. Boiron., 1999. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 99-102.
- Lee, I. Y., Jung, K. H., Lee, C. H. ve Park, Y. H., 1999. Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. **Biotech. Lett.**, **21**: 965-968.
- Lehman, E., Harel, E., Mayer, A. M., 1974. Copper content and other characteristics of purified peach laccase. **Phytochemistry** **13**: 1713-1717
- Li, Y., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Luo, H., Wu, N., Fan, Y., Yao, B., 2008. Gene, cloning, expression and characterization of a novel β -mannanase from *Bacillus circulans* CGMCC 1416. **J. Microbiol. Biotechnol.** **18**: 160-166
- MacFaddin, J. F., 2000. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd edition**. Williams & Wilkins.
- Malhotra, K., Sharma, P., Capalash, N., 2004. Copper and dyes enhance laccase production in α -proteobacterium JB. **Biotechnol Lett** **26**: 1047-1050
- Martins, L. O., Soares, C. M., Pereira, M. M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G. H., Henriques, A. O., 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. **J. Biol. Chem.** **277**: 18849-18859

- Mata J.A., Martı́nez-Ca´novas M.J., Quesada E. and Be´jar V. 2002. A detailed phenotypic characterization of the type strains of Halomonas species. **Syst. Appl. Microbiol.** **25**: 360–375.
- Mayer, A.M. and Staples, R.C., 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, **60**: 551–565.
- Meenakshi, Singh G., Bhalla, A., Hoondal, G. S., 2010. Solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from *Bacillus* sp. MG-33. **Bioresources** **5**(3): 1689–1701
- Mellano, M. A., Cooksey, D. A., 1988. Nucleotide sequence and organization of copper resistance genes from *Pseudomonas syringae* pv.tomato. **J. Bacteriol.** **170**: 2879–2883
- Michael, C., Machczynski, Erik Vijgenboom, Bart Samyn, and Gerard W. Canters., 2004. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. **Protein Sci.** **13**(9): 2388–2397.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. and Duran, N., 2002. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends Food Sci. Technol**, **13**: 205–216.
- Moreira, L. R. S., Filho, E. X. F., 2008. An overview of mannan structure and mannan degrading enzyme systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **79**(2): 165–178
- Mussini, F. J., Coto, C. A., Goodgame, S. D., Lu, C., Karimi, A. J., Lee, J. H., Waldroup, 2011. Effect of β -mannanase on broiler performance and dry mater output using corn-soyabean meal based diets. **Int. J. Pou. Sci.** **10**(10): 778–781
- Nicolas, P., Raetz, E., Reymond, S., Sauvegeat, J. L., 1998. **Hydrolysis Of The Galactomannans Of Coffee Extract With Immobilized B-Mannanase. Patent US5714183**
- Norita, S., Rosfarizan, M., Ariff, A. B., 2010. Evaluation of the activities of concentrated crude mannan-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger*. **Mal. J. Microbiol.** **6**(2): 171–180
- Nunes, F. M., Reis, A., Domingues, M. R., Coimbra, M. A., 2006. Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. **J. Agric. Food Chem.** **54**(9): 3428–3439
- Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvuya, R., Read, J., Steiner, W., 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, **36**: 1449-1456.
- Odaci, D., Timur, S., Pazarlioglu, N., Montereali, M. R., Vastarella, W., Pilloton, R. Ve Telefoncu, A., 2007. Determination of phenolic acids using *Trametes versicolor* laccase. **Talanta**, **71**: 312–317.
- Onishi, H., 1972. Halophilic amylase from a moderately halophilic Micrococcus. **J. Bacteriol.** **109**: 570-574.
- P. Sharma, R. Goel, N. Capalash, 2007. Bacreial laccases. **World J. Microbiol. Biotechnol.** **23**: 823–832
- Pacarynuk, L. A., Danyk, H. C., 2004. **Principles of Microbiology**. Laboratory Manual
- Pan, X., Zhou, J., Tian, A., Le, K., Yuan, H., Xue, Y., Ma, Y., Lu, H., 2011. High level expression of a truncated β -mannanase from alkalophilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Kluyveromyces cicerisporus*. **Biotechnol. Lett.** **33**:565–570
- Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D. and Mohan, R. (2000) Advances in microbial amylases. **Biotechnology and Applied Biochemistry** **31**: 135–152.

- Pee, V., Ignatius, K. L., Speybroeck, V., Michel, M. P., Jozef, V. P., 2002. Use Of Mannanases As A Slime Control Agents. Patent EP0871596 Application Number: EP19960916095 prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, **29**: 147–167.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M., Goffner, D., 1999. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family in poplar. **Eur. J. Biochem.** **259**: 485–495
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V., 1998. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**: 597–635
- Reinhammar, B., 1984. Laccase. *In: Lontie R (ed.) Copper Proteins And Copper Enzymes, vol 3.* CRC Press, Boca Raton, pp 1–35
- Riva, S., 2006, Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, **24**(5): 220-225.
- Robinson, R. K., 1985. **Dairy Microbiol.**, 258p.
- Rosovitz, M., J., Voskuil, M., I., Chambliss, G., H., 1998. **Bacillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, Ninth Edition, Volume 2**, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman, Oxford University Pres, New York, 1152-1162.
- Ruijsenaars, H. J., Hartmans, S., 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **65**: 177–182
- Siefert, J. L., Fox, G. E., 1998. Phylogenetic Mapping of Bacterial Morphology. **Microbiology**, **144**: 2803–2808.
- Soden, D. M., J. O'Callaghan, J., Dobson A. D. W., 2002. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. **Microbiology** **148**: 4003–4014
- Solano, F., Garcia, E., Perez de Egea, E., Sanchez-Amat, A., 1997. Isolation and characterization of strain MMB-1 a novel melanogenic marine bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** **63**: 3499–3506
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., Machonkin, T. E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chem. Rev.** **96**: 2563–605.
- Subcommittee on Taxonomy of Vibrios., 1986. Minutes of the Meetings 8 and 11 September 1986. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **39**: 210–212.
- Taubman, S., 1992, Genus *Bacillus*. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**, 355-356.
- Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D., Nitisinprasert, S., 2008. Selection and characterization of mannanase producing bacteria useful for the formation of pre biotic manno oligosaccharides from copra meal. **World J. Microbiol. Biotechnol.** **24**: 1425–1433
- Van den Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzyme. **Curr. Opin. Microbiol.**, **6**: 213–218.
- Van Zyl W. H., Rose, S. H., Trollope, K., Gorgens, J. F., 2010. Fungal β - mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Pro Biochem** **45**: 203–1213
- Ventosa, A., Nieto, J. J., Oren, A., 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** **62**: 504-544.

- Vreeland, R. H., 1984. Genus *Halomonas* Vreeland, Litchfield, Martin, and Elliot 1980, 494VP. 340–343. N. R. Krieg, and J. G. Holt (ed.) ***Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, vol. 1***. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Vreeland, R. H., C. D. Litchfield, E. L. Martin, E. Elliot., 1980. *Halomonas elongata*, a new genus and species of extremely salt-tolerant bacteria. ***Int. J. Syst. Bacteriol.* 30**: 485–495.
- Wipat, A. and Harwood, C. R., 1999. The *Bacillus* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. ***FEMS Microbiology Ecology*, 28**: 1-9.
- Wiseman, A., 1987. ***Handbook of Enzymes Biotechnology. Second Edition. Chapter 3.*** The Application of Enzymes in Industry p. 274-373, New York.
- Withers, S. G., 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. ***Carbohydr. Polym.* 44(4)**: 325–327
- Y. Kobayashi, R. Echizen, M. Mada and M. Mutai, 1984. Intestinal Flora and Dietary Factors, ***Proceedings of the 4th RIKEN Symposium on Intestinal Flora, Tokyo, 1983***, ed. by T. Mitsuoka, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1984, pp. 69~90.
- Yang, P., Li, Y., Wang, Y., Meng, K., Luo, H., Yuan, Y., Bai, Y., Zhan, Z., Yao, B., 2009. A novel β -mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: gene cloning, expression and enzymatic characterization. ***App. Biochem. Biotechnol.* 159**: 85–94
- Yaropolov, A. I., Skorobogat'ko, O. V., Vartanov, S. S., Varfolomeyev, S. D., 1994. Laccase. Properties, catalytic mechanism, and applicability. ***Appl. Biochem. Biotechnol.* 49**: 257–80.
- York, M. K., Traylor, M. M., Hardy, J., Henry, M., 2007. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Indole test. In: Garcia LS (editor in chief). ***Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press***, Washington D.C. p. 3.17.23.1 - 3.17.23.3
- York, M. K., Traylor, M. M., Hardy, J., Henry, M., 2007. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. MR-VP (Methyl Red–Voges-Proskauer) Tests. In: Garcia LS (editor in chief). ***Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press***, Washington D.C. p. 3.17.33.1 - 3.17.33.4
- York, M. K., Traylor, M. M., Hardy, J., Henry, M., 2007. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Indole test. In: Garcia LS (editor in chief). ***Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press***, Washington D.C. p. 3.17.12.1 - 3.17.12.2

EKLER

Ek 1. Besiyerleri

Ek.1.1.Alkalofil broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Glikoz	10 gr
Yeast Ekstrakt	5 gr
Pepton	5 gr
KH ₂ PO ₄	1 gr
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 gr
NaNO ₃	10 gr
ddH ₂ O	1000 ml

Not: NaNO₃ ayrı olarak otoklavlanmalıdır ve otoklav sonrası besiyerine katılmalıdır.

Ek.1.2. Alkalofil agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Glikoz	10 gr
Yeast Ekstrakt	5 gr
Pepton	5 gr
KH ₂ PO ₄	1 gr
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 gr
NaNO ₃	10 gr
Agar	15 gr
ddH ₂ O	1000 ml

Not: NaNO₃ ayrı olarak otoklavlanmalıdır ve otoklav sonrası besiyerine katılmalıdır.

Ek 1. 3. Nişasta agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Nişasta	2gr
Agar	2gr
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1.4. Skim milk agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Skim milk	0.1gr
Agar	2gr
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1. 5. Tween 80 Agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Tween 80	3ml
Agar	2gr
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1.6. Nitrat broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
KNO ₃	1gr
Tryptic Soy Broth	100ml

Ek 1.7. Karbonhidrat Fermentasyon Ortamı

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Fenol Red	0.03gr
Tryptic Soy Broth	100 ml

Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar

Ek 2. 1. Agaroz jel hazırlama

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Agaroz	0.4gr
TBE	40ml
Ethidium Bromid	4 μ l
1.5 dalga fırın	

Ek 2.2. CTAB+0.7 M NaCl

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
CTAB	10gr
NaCl	4.1gr
Steril distile su	100ml

Ek 2.3. Fenol-kloroform-izoamilalkol

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Fenol-kloroform-izoamilalkol	25:24:1

Ek 2.4. TBE Hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris HCl	10.78 gr
Borik asit	5,503 gr
EDTA	0,5845 gr
Saf su	1000ml

Ek 2.5. 0.5M EDTA

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
EDTA	18,62gr
Saf su	100ml

Ek 2.6.Ethidium bromide

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Ethidium Bromid	0,01 gr
Distile su	1ml

Ek 2.7. RNAaz hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
RNAase	25µl
Stril saf su	1ml

Ek 2.8. SDS çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
SDS	10gr
Distile su	100ml

Ek 2.9. Kloroform-izoamilalkol çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Kloroform-izoamilalkol	24:1

Ek 2.10. Loading dye Hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Sukroz	30gr
EDTA (0.5 M PH:8)	20 ml
Bromo Blue	10mg
Steril saf su	50 ml

Ek 2.11. T.E. (Tris-Edta) çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris	1,211gr
0.5 M EDTA	4ml

Ek 2.12.TAE(tris-asetat) çözeltisi

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
Tris HCl	4,84 gr
Asetik asit	1, 142 gr
EDTA	2ml



ÖZ GEÇMİŞ

Van ilinde 18.03.1992 yılında doğdu. İlköğretimini Van Husrev Paşa İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra lise eğitimini Van Şehit Koray Akoğuz Lisesi'nde tamamladı. 2010 Yılında girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2014 yılında biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 23/08/2017

Tez Başlığı / Konusu: **VAN GÖLÜ'NDEN TOPLANAN SU VE SEDİMENT NUMUNELERİNDEN
İZOLE EDİLEN BAKTERİLERİN LAKKAZ ve MANNANAZ ENZİMLERİNİ
ÜRETME KABİLİYETLERİ**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 69 sayfalık kısmına ilişkin, 23/08/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 12 (oniki) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

23.08.2017

Adı Soyadı: Nevroz ASLAN

Öğrenci No: 149102136

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı:

Statüsü: Y. Lisans ☒

Doktora ☐

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Yrd.Doç.Dr. Erdal ÖĞÜN

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Prof.Dr.Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü

(Unvan, Ad Soyad, İmza)