

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***HALOARCULA SP. ve HALOLAMİNA SP. SUŞLARINDA SELÜLAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ***

Haktan ŞAFAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***HALOARCULA SP. ve HALOLAMİNA SP. SUŞLARINDA SELÜLAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ***

Haktan ŞAFAK

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**SAMSUN
2019**

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Haktan ŞAFAK tarafından hazırlanan “*Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşlarında selüloz enzim aktivitelerinin belirlenmesi” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan : **Doç. Dr. Metin KONUŞ**
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye **Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN**
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye **Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz KAYA**
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yukardaki sonucu onaylarım .../.../20...

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

XXXXXX

Tarih

İmza

Haktan ŞAFAK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HALOARCULA SP. VE HALOLAMİNA SP. SUŞLARINDA SELÜLAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Haktan ŞAFAK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Halofilik selülaazlar, yüksek sıcaklık, yüksek NaCl konsantrasyonu ve ekstrem pH gibi koşullarda veya organik çözücülerin varlığında optimum aktiviteleri nedeni ile dayanıklı biyokatalizörler olarak ağır endüstriyel işlemlerin vazgeçilmez enzimleridir. Endüstriyel açıdan önemli bir selülaaz enzimini elde etmek amacıyla bu çalışmada daha önce tuzcul habitatlardan izole edilmiş on adet *Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşları selülaaz aktiviteleri bakımından karşılaştırılmıştır. Ham selülaaz aktivitesinin en yüksek olduğu suş *Haloarcula* sp. ÇKT3 olarak bulunmuştur. Optimizasyon çalışmaları, enzimin 70 °C, pH: 7.0 ve 4 M NaCl konsantrasyonunda optimum aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (169.6 U/mL). *Haloarcula* sp. ÇKT3'te selülaaz enzimini kodlayan endoglukanaz geni (ÇKT3eg) karakterize edilmiş ve ardından *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerinde heterolog ifadesi gerçekleştirilmiştir. rÇKT3eg enziminin 151.7 U/mL ile optimum 50 °C, pH: 7.0 ve 3 M NaCl konsantrasyonunda aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Farklı sıcaklık ve pH değerleri ile farklı konsantrasyonda NaCl ve organik çözücü varlığında 24 saat inkübasyon sonrasında enzimlerin stabiliteleri test edilmiştir. Her iki enzimin pH ve NaCl stabilitesi sırasıyla pH: 7.0 ve 3 M NaCl'de %98'dir. Ham selülaaz enzimi 37 °C'de %96 termostabilite değerine sahipken, rÇKT3eg'nin en iyi termostabilitesi 25 °C'de %94 olarak bulunmuştur. Ayrıca, ham selülaazın %25 DMSO varlığında aktivitesini %23 oranında kaybettiği, 3.5 mM SDS varlığında ise en kararlı aktivitesini sergilediği tespit edilmiştir. Etanol rÇKT3eg'nin aktivitesini %30 oranında azaltırken, 3.5 mM SDS en az inhibisyona neden olmuştur. Optimum koşullarda, ham ve rekombinant selülaaz enzimlerinin spesifik aktiviteleri sırası ile 16.9 ve 31.6 U/mg'dır. Sonuç olarak, ÇKT3eg, ekstrem koşullardaki dayanıklılığı ile endüstriyel kullanım açısından umut verici bir aday enzimdir.

Ocak 2019, 126 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Halolarcula* sp., *Halolamina* sp., *Haloarcula* sp. ÇKT3, Selülaaz aktivite, Optimizasyon, Stabilitite

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION OF CELLULASE ENZYME ACTIVITY IN *HALOARCU*LA SP. AND *HALOLAMINA* SP. STRAINS

Haktan ŞAFAK

Ondokuz Mayıs University
Graduate School of Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Halophilic cellulases are indispensable enzymes of heavy industrial processes as resistant biocatalysts due to their optimum activity at high temperature, high NaCl concentration and extreme pH conditions or in the presence of organic solvents. In order to obtain an industrially important cellulase enzyme, ten *Haloarcula* sp. and *Halolamina* sp. strains previously isolated from saline habitats were compared in terms of cellulase activity. The strain with the highest crude cellulase activity was found as *Haloarcula* sp. ÇKT3. Optimization studies showed that the enzyme has optimum activity at 70 °C, pH: 7.0 and 4 M NaCl concentration (169.6 U/mL). The endoglucanase gene (ÇKT3eg) encoding the cellulase enzyme in ÇKT3 was characterized and then heterologous expression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. It was determined that rÇKT3eg enzyme has 151.7 U/mL activity at optimum 50 °C, pH: 7 and 3 M NaCl concentration. Stability of enzymes was tested after 24 hours of incubation in the presence of different NaCl concentrations and organic solvents, with different temperature and pH values. The pH and NaCl stability of both enzymes were 98% in pH: 7.0 and 3 M NaCl, respectively. The crude cellulase enzyme has a thermostability value of 96% at 37 °C while the thermostability of rÇKT3eg was found as 94% at 25 °C. Furthermore, it was found that the crude cellulase lost its activity by 23% in the presence of 25% DMSO and exerted the most stable activity in the presence of 3.5 mM SDS. While ethanol reduced the activity of rÇKT3eg by 30%, 3.5 mM SDS caused the least inhibition. At optimum conditions, the specific activities of the crude and recombinant cellulase enzymes are 16.9 and 31.6 U/mg, respectively. As a result, ÇKT3eg is a promising enzyme for industrial use with its durability in extreme conditions.

January 2019, 126 pages

Key Words: *Halolarcula* sp., *Halolamina* sp., *Haloarcula* sp. ÇKT3, Cellulase activity, Optimization, Stability

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

Haloarcula sp. ve *Halolamina* sp. suşlarında selüloz enzim aktivitelerinin belirlenmesi konulu bu araştırmayı bana öneren ve konu üzerinde çalışma fırsatını veren, bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN başta olmak üzere öğrenimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız ve her daim paylaşıpacağımıza inandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli Araş. Gör. Zafer SEÇGİN'e ve çalışma arkadaşlarım Çiğdem OTUR, Büşra ABANOZ SEÇGİN, Eylem TÜRE ve Çağrı AKCAN'a yine her zaman yanımda olan yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden bugüne hep en iyi yerlere gelmemi arzulayan ve benden uzakta da olsalar her zaman ilgilerini ve sevgilerini çok yakınımnda hissettiğim ve benden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, canım babam, annem ve ablalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması PYO.ZRT.1904.17.052 numaralı “*Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. Suşlarında Selüloz Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi” başlıklı Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Ocak 2019, Samsun

Haktan ŞAFAK
Ziraat Mühendisi

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Enzimlerin Adlandırılmaları ve Sınıflandırılmaları.....	3
2.2. Endüstriyel Enzimler.....	4
2.3. Selüloz Enzimi ve Kullanım Alanları.....	7
2.4. Halofilik Mikroorganizmalar.....	10
2.4.1. Halofilik mikroorganizmaların endüstriyel enzim üretimleri.....	15
3. MATERYAL VE METOT.....	19
3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar, Plazmitler ve Kültür Koşulları.....	19
3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	20
3.2. Tamponlar ve Çözeltiler.....	21
3.3. Kimyasallar ve Enzimler.....	21
3.4. Suşların Üreme Eğrileri.....	21
3.5. Selüloz Üretiminin Nitel ve Nicel Olarak Belirlenmesi.....	21
3.5.1. Nitel selüloz tayini.....	21
3.5.2. Nicel selüloz tayini ham enzim eldesi.....	21
3.5.3. Selüloz aktivite tayini.....	22
3.6. Selüloz Aktivitesinin Arttırılmasına Yönelik Optimizasyon Çalışmaları.....	23
3.6.1. Sıcaklık etkisi.....	23
3.6.2. pH etkisi.....	23
3.6.3. NaCl etkisi.....	23
3.7. DNA Teknikleri ve Manipülasyonları.....	24
3.7.1. Genomik DNA izolasyonu.....	24
3.8.2. Plazmit izolasyonu.....	24
3.8.3. Primer Dizaynı.....	24
3.8.4. Selüloz enzimini kodlayan genin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu.....	25
3.8.5. Restirksiyon endonükleaz kesimleri.....	26
3.8.6. Agaroz jel elektroforezi.....	26
3.8.7. DNA fragmentlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu.....	26
3.8.8. Ligasyon reaksiyonları.....	26
3.8.9. <i>E. coli</i> alıcı (kompetant) hücre hazırlığı.....	27
3.8.10. <i>E. coli</i> alıcı hücrelerinin transformasyonu.....	28
3.9. Dizileme Reaksiyonu.....	28
3.10. Rekombinant <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 Suşuna Ait Selüloz Enziminin Saflaştırılması.....	28
3.10.1. Selüloz geninin IPTG ile indüklenmesi.....	28
3.10.2. Selüloz enziminin saflaştırılması.....	29
3.11. Selüloz Enziminin Konsantrasyon Tayini.....	29

3.12.Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamil Jel Elektrophorez (SDS-PAGE) Analizi	30
3.13.SDS-PAGE'in Coomassie Blue R-250 ile Boyanması	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Farklı Besiyerleri ve İnkübasyon Sıcaklıklarında Suşlara Ait Selüla	
Aktivitelelerinin Nitel Olarak Belirlenmesi	31
4.2. CM'de Tüm Suşlara Ait Nicel Selüla Aktivitesinin Belirlenmesi	36
4.3. SG'de Tüm Suşlara Ait Nicel Selüla Aktivitesinin Belirlenmesi	37
4.4. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 Suşunun Selüla Aktivitesinin Arttırılmasına Yönelik	
Optimizasyon Çalışmaları	39
4.4.1. Sıcaklık etkisi	39
4.4.2. pH etkisi	40
4.4.3. NaCl etkisi.....	41
4.5. Selüla Enziminin Stabilitesi	42
4.5.1. Selüla enziminin termostabilitesi	42
4.5.2. Selüla enziminin pH stabilitesi.....	44
4.5.3. Selüla enziminin NaCl stabilitesi	45
4.5.4. Selüla enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı	47
4.6. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT-3 Suşuna Ait Endoglukanaz Geninin PZR ile	
Çoğaltılması ve pGEM-T® Easy Ara Vektörüne Klonlanması.....	49
4.6.1. Endoglukanaz geninin PZR ile çoğaltılması	49
4.6.2. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT-3 endoglukanaz geninin pGEM-T® Easy ara	
vektörüne klonlanması	49
4.7. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 Suşuna Ait Endoglukanaz Geninin Karakterizasyonu	50
4.8. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 Endoglukanaz Geninin İfade Vektörü Olan pET-	
28a(+)'ya Klonlanması ve <i>E. coli</i> BL21(DE3) Hücrelerine Aktarılması.....	54
4.9. <i>E. coli</i> BL21 Hücrelerinde <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT-3 Endoglukanaz Enziminin	
Heterolog İfadesi	57
4.10.rÇKT3eg'de Selüla Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	59
4.10.1. Sıcaklık etkisi.....	59
4.10.2. pH etkisi	60
4.10.3. NaCl etkisi	61
4.11.rÇKT3eg Saf Selüla Enziminin Stabilitesi	63
4.11.1. Saf selüla enziminin termostabilitesi	63
4.11.2. Saf selüla enziminin pH stabilitesi.....	64
4.11.3. Saf selüla enziminin NaCl stabilitesi	65
4.11.4. Saf selüla enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı	67
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	76
EKLER.....	93
EK 1 GEN SEKANSLARI	93
EK 2 KULLANILAN PLAZMİDLER VE DNA MARKÖRLERİ.....	94
EK 3 BESİYERLERİNİN HAZIRLANIŞI VE İÇERİKLERİ.....	97
EK 4 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER.....	101
EK 5 KİMYASALLAR VE ENZİMLER.....	106
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

dH₂O	: Distile (Saf) Su
M	: Molar
mM	: Mili Molar
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
kb	: Kilobaz
bç	: Baz Çifti
g	: Gram
L	: Litre
µg	: Mikro Gram
µL	: Mikro Litre
dak	: Dakika
sn	: Saniye
mL	: Mili Litre
U	: Ünite

KISALTMALAR

CMCNa	: Sodyum Karboksimetil Selüloz
DNS	: 3,5 Dinitro salisilik asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Trifosfat
EtBr	: Etidyum Bromür
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
TAE	: Tris-Asetik Asit-EDTA
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Halofillerin üç taksonomik alan içinde dağılımı	10
Şekil 2.2.	Halofillerin hipersalin ortamlara uyarlanması.....	12
Şekil 4.1.	SG+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüla z aktivite sonuçları	31
Şekil 4.2.	CM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüla z aktivite sonuçları	32
Şekil 4.3.	DSM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüla z aktivite sonuçları	33
Şekil 4.4.	SCM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüla z aktivite sonuçları	33
Şekil 4.5.	MH+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüla z aktivite sonuçları	34
Şekil 4.6.	NM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüla z aktivite sonuçları	35
Şekil 4.7.	37 (a) ve 50 (b) °C’lerde inkübe edilen <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşunun zamana ba ğlı üreme profili	36
Şekil 4.8.	CM besiyerinde üreyen suşlara ait selüla z aktivitesi	37
Şekil 4.9.	SG besiyerinde üreyen suşlara ait selüla z aktivitesi	38
Şekil 4.10.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşunda selüla z enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	39
Şekil 4.11.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşunda optimum sıcaklıkta selüla z enzim aktivitesi üzerine pH’nın etkisi.....	40
Şekil 4.12.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşunda optimum sıcaklık ve pH’da selüla z enzim aktivitesi üzerine NaCl’nin etkisi	42
Şekil 4.13.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selüla z enziminin termostabilitesi	43
Şekil 4.14.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selüla z enziminin pH stabilitesi.....	45
Şekil 4.15.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selüla z enziminin farklı NaCl konstantrasyonlardaki kararlılığı	46
Şekil 4.16.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selüla z enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı.....	48
Şekil 4.17.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 genomik DNA’sı kullanılarak yapılan PZR sonucu.....	49
Şekil 4.18.	Rekombinant pGÇKT3EG vektörünün PZR ve enzim kesimi ile doğrulanması	50



Şekil 4.19.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 endoglukanaz genine ait nükleotit ve aminoasit dizisi	52
Şekil 4.20.	<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 endoglukanaz gen ürününün diğer haloarke endoglukanaz enzimleriyle olan aminoasit dizi hizalaması	53
Şekil 4.21.	pET-28a(+) ve pGÇKT3EG vektörlerinin <i>Bam</i> HI ve <i>Hind</i> III restriksiyon enzimleri ile kesimi	55
Şekil 4.22.	Rekombinant pETÇKT3EG vektörünün PZR ve restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanması.....	56
Şekil 4.23.	Rekombinant <i>E. coli</i> BLÇKT3EG’de pBLÇKT3EG vektörünün varlığının PZR ve restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanması	56
Şekil 4.24.	1 mM IPTG ile indüklenmiş <i>E. coli</i> BLÇKT3EG total proteini içerisinde rÇKT3eg.	57
Şekil 4.25.	rÇKT3eg selülazının saflaştırılması	59
Şekil 4.26.	rÇKT3eg saf selülaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	60
Şekil 4.27.	rÇKT3eg saf selülaz enzim aktivitesi üzerine pH etkisi	61
Şekil 4.28.	rÇKT3eg saf selülaz enzim aktivitesi üzerine NaCl etkisi.....	62
Şekil 4.29.	rÇKT3eg saf selülaz enziminin termostabilitesi	63
Şekil 4.30.	rÇKT3eg saf selülaz enziminin pH stabilitesi.....	65
Şekil 4.31.	rÇKT3eg saf selülaz enziminin NaCl stabilitesi	66
Şekil 4.32.	rÇKT3eg saf selülaz enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması (Kushner, 1985).	11
Çizelge 2.2. Halofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalarına ilişkin bazı örnekler (Ali vd, 2014b)	15
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler	19
Çizelge 3.2. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3'e ait selüloz geninin (<i>ÇKT3eg</i>) çoğaltılması ve dizilenmesi için kullanılan primerler	25
Çizelge 3.3. <i>ÇKT3eg</i> geninin PZR içeriği ve uygulanan koşullar	25
Çizelge 3.4. ÇKT3eg jel ekstraktının pGEM-T® Easy vektörüne ligasyonu için gerekli içerikler ve uygulanan koşullar	26
Çizelge 3.5. Jelden ekstrakte edilen <i>ÇKT3eg</i> geninin pET-28a(+) vektörüne ligasyonu için gerekli içerikler ve koşullar.....	27
Çizelge 3.6. Poliakrilamid jel hazırlanması	30
Çizelge 4.1. <i>Haloarcula</i> ve <i>Halolamina</i> sp. suşlarının CM ve SG kültürlerindeki selüloz üretimleri (U/mL)	38
Çizelge 4.2. Farklı organik çözücülerin selüloz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri	47
Çizelge 4.3. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 endoglukanaz gen ürününün diğer haloarke endoglukanaz enzimlerinin aminoasit dizilerine olan yüzde benzerlik ve farklılıkları	54
Çizelge 4.4. Farklı organik çözücülerin saf selüloz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri	67
Çizelge 4.5. Ham ve saf selüloz enzim üretimi için optimum koşullar ve aktivite değerleri	69
Çizelge 4.6. Ham ve saf selüloz enziminin stabilitesi	69

1. GİRİŞ

İnsanların enzim kullanımı uygarlığın en erken zamanlarına kadar uzanmaktadır. İlkel topluluklarda belirli yiyecek ve içecek türlerinin üretimi, deri üretimi için deri ve postların bronzlaştırılması gibi önemli insan faaliyetleri, enzim aktivitelerinin uygulanmasını içermektedir (Polaina ve MacCabe, 2007). 19. yüzyıldan sonra biyokimyanın gelişmesi ve bilim adamlarının öncü çalışmaları ile enzimlerin doğası ve nasıl işledikleri anlaşılmaya başlanmıştır. Fransa'da Anselme Payen ve Jean-François Persoz (1833), filizlenen arpadan bir amilolitik maddenin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kısa bir süre sonra, İsveçli kimyager Jöns Jacob Berzelius, kimyasal reaksiyonları hızlandıran bazı maddelerin bu özelliklerini tanımlamak için kataliz (1835) terimini kullanmıştır. Almanya'da fizyolog Theodor Schwann sindirim enzimi pepsin'i keşfetmiş (1836), ve 1877 yılında Wilhelm Kühne 'enzim' terimini önermiştir (Polaina ve MacCabe, 2007).

Enzimler, yaşamı sürdürebilen çeşitli kimyasal dönüşümler için gerekli olan büyük biyomoleküllerdir (Smith vd, 1997). Oldukça spesifik olan enzimler sadece belirli bir reaksiyon hızını hızlandırarak aktivasyon enerjisini herhangi bir kalıcı değişime uğratmadan düşürür (Singh vd, 2016). Bunlar, yiyeceklerin sindiriminden DNA'nın sentezine kadar değişen metabolik reaksiyonların hem oranını hem de spesifitesini büyük ölçüde hızlandıran yüksek oranda seçici katalizörlerdir. Biyolojik bir hücrede neredeyse tüm kimyasal reaksiyonlar enzimlere ihtiyaç duyar.

Rekombinant teknoloji ve protein mühendisliğindeki gelişmelere bağlı olarak enzimler, farklı endüstriyel ve terapötik amaçlarla yaygın olarak kullanılan önemli moleküller olarak gelişmişlerdir. Enzim teknolojisinin hızlı gelişimi ile mikrobiyal enzimler en dikkat edici moleküllerdir (Gurung vd, 2013). Enzimlerin endüstriyel uygulamalarını zorlaştıran başlıca parametreler, kararlılık, katalitik etkinlik ve özgülük faktörleridir. Bu tür eksikliklerin üstesinden gelmek için, doğal kaynaklardan enzimlerin taranması, rastgele mutasyonlar, immobilizasyon dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar denenmiştir (Elleuche vd, 2014). Endüstriyel enzimlerin rasyonel tasarımında nihai amaç, endüstriyel süreç için yeni ve sağlam katalitik fonksiyonlara sahip enzimler üretmektir. Spesifik yaşam koşullarına uyum

sağlayan haloarkaelerden elde edilen enzimler, yüksek sıcaklık (50-90 °C aralığında), tuzluluk (2-5 M aralığında) ve pH gibi zorlu koşullar altında ya da organik çözücüler varlığında, sağlam biyokatalizörler olarak optimum aktivite gösterebilirler.

Sıcaklığın artması, organik bileşiklerin çözünürlüğü ve biyolojik olarak kullanılabilme açısından önemli etkilere sahiptir. Sıcaklığın artması beraberinde viskositenin düşmesini ve organik bileşiklerin difüzyon katsayısının artmasını da beraberinde getirmektedir. Sonuç olarak, küçük alanlarda yüksek reaksiyon hızı gerçekleşmektedir (Güven, 2011). Termostabil proteinler de çok sayıda yüklü ve hidrofobik aminoasitleri ihtiva ettiğinden, yüksek sıcaklıklarda yapılarını koruyarak optimum aktivite gösterebilirler (Fujiwara, 2002). Yüksek oranda yüklü dış yüzeyler, çoklu iyon çifti ağları tarafından tutulan sert kıvrımlar, sıkı hidrofobik çekirdek yapısı ve kısmen daha fazla asidik ve bazik amino asit içeriğinin neden olduğu daha kompakt ve yoğun paketlenmiş protein yapıları gibi özelliklerinden dolayı zorlu endüstriyel uygulamalarda büyük avantaja sahiptirler (Elleuche vd, 2014).

Bu nedenle, çalışmanın amacı, ilk olarak Tuz Gölü (*Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4, TG5), Çankırı Kaya Tuzu Mağarası (*Haloarcula* sp. ÇKT1, ÇKT2 ve ÇKT3) ve Yozgat Kaya Tuzu Mağarası (*Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2)'ndan izole edilmiş 10 Haloarke suşunun selüloz aktivitesi bakımından karşılaştırılmasıdır. Selüloz üretimi için en uygun sıcaklık ve kültür koşullarının belirlenmesi sonrasında en iyi aktivitenin elde edildiği suшта selüloz enziminin karakterizasyonu, ardından ilgili genin ifade vektörü aracılığı ile *E. coli* BL21 hücrelerinde heterolog ifadesinin sağlanması amaçlanmıştır. Son olarak, elde edilen rekombinant selüloz enziminin ham selülozda olduğu gibi, yüksek sıcaklık, pH, NaCl ve bazı organik çözücüler varlığında aktivitesi ve stabilitesinin belirlenmesi ile endüstriyel açıdan kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Enzimlerin Adlandırılmaları ve Sınıflandırılmaları

1961'deki Enzim Komisyonu'nun (E.C) ilk raporuna göre, enzimler katalize edilen reaksiyonun türüne göre altı ana sınıfa ayrılmaktadır. Örneğin; Endobeta 1,4-glukanaz (EC 3.2.1.4.)'da E.C. enzim komisyonunu belirtirken sayılar sırası ile enzimin ait olduğu altı sınıftan hangisinin olduğunu, alt sınıfını, alt-alt sınıfını ve son sayı ise alt-alt sınıfındaki enzimin seri numarasını belirtir. Kataliz ettikleri reaksiyonlara göre, enzimler oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlar olarak sınıflandırılabilirler (Stryer, 1995);

Oksidoredüktazlar redoks reaksiyonlarını katalize eden tüm enzimleri kapsar. Genellikle önerilen ad dehidrojenazdır, fakat redüktaz da kullanılabilir. Oksidaz ise sadece O₂ indirgeme için alıcı olduğunda kullanılır. Örneğin; Dehidrojenaz, hidrojen taşıyan ve aktaran enzimlerdir. Oksidazlar; elektron kaybeden ve aktaran enzimlerdir (Aehle, 2007).

Transferazlar asetil, metil, fosfat, amino, vb. grupların transferlerini katalize ederler. Yaygın olarak kullanılan adları arasında asetiltransferaz, metilaz, protein kinaz ve polimeraz yer almaktadır (Aehle, 2007).

Hidrolazlar C-O, C-N, C-C ve diğer bazı bağların hidrolitik bölünmesini katalize eder. Örneğin: selüloz, biyoetanol biyo-dönüşümüne yönelik fermente olabilen şekerle sonuçlanan selülozlar tarafından hidrolize edilebilen beta-1-4 bağlı D-glukoz birimlerinden oluşur. Yaygın olarak kabul edilen enzimatik selüloz hidroliz mekanizması, endobeta 1,4-glukanaz (EC 3.2.1.4.), ekzogluksanaz (EC 3.2.1.91) ve beta glukozidaz (EC 3.2.1.21) dahil olmak üzere 3 tip selülozun sinerjik etkisini içerir (Okafor ve Okeke, 2017).

Liyazlar C-C, C-O, C-S ve C-N bağlarının, hidroliz veya oksidasyondan başka yollarla parçalanmasını katalize eder (Okafor ve Okeke, 2017). Önerilen ad dekarboksilaz, aldolaz, dehidrataz (sırasıyla CO₂, aldehid ve suyun eliminasyonu) şeklindedir. Sistematik ad, substrat grubu-liyazına göre oluşturulur (Aehle, 2007).

İzomerazlar bir molekül içinde atomik yeniden düzenlemeleri katalize ederler. Örnek olarak; rotamaz, protein disülfid izomeraz (PDI), epimeraz ve rasemaz verilebilir (Okafor ve Okeke, 2017).

Sentazlar (Ligazlar) ATP veya başka bir nükleosit trifosfatta bir pirofosfat bağının hidrolizi ile birleşen iki molekülün birleşmesini katalize eder. Örnekler arasında peptid sentaz, aminoasit tRNA sentetaz, DNA ligaz ve RNA ligaz bulunur (Aehle, 2007)

2.2. Endüstriyel Enzimler

Enzimler oldukça spesifik ürün seçiciliğine sahip olmaları, toksik olmamaları ve reaksiyon koşullarını dengede tutmaları gibi avantajları sayesinde endüstriyel ölçekli üretimlerin aranan biyokatalizörleridir (Bommarius ve Paye, 2013; Chapman vd, 2018). Endüstriyel biyokatalizörler olarak enzimler geleneksel kimyasal işlemlere kıyasla sürdürülebilirlik ve işlem verimliliği bakımından sayısız avantajlar sunmakta olup farmastötik, gıda, ve içecek endüstrilerindeki büyük ölçekli üretimlerde kullanılmaktadırlar. Biyoetanol üretimi ve doğal gaz dönüşümü gibi enerji sektöründe kullanımları için stabilitelerinde ve biyokataliz özelliklerinde iyileştirilmelere ihtiyaç durulmaktadır (Bommarius ve Paye, 2013; Chapman vd, 2018).

Endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimlerin kullanımını destekleyen faktörler, artan tüketim ürünlerinin talebi, maliyet azaltma ihtiyacı, doğal kaynakların tükenmesi ve çevre güvenliğidir (Choi vd, 2015). Mikroorganizmalar, kolay bulunabilirlik ve hızlı büyüme yeteneği nedeniyle endüstriyel enzimler için tercih edilen kaynaklardır (Illanes vd, 2012). Bu nedenle, ağır kimyasalların ve bileşiklerin sentezi için "temiz" çözümler sunmaktadırlar. Deri, tekstil, kâğıt, gıda, ilaç ve deterjan gibi birçok endüstride çok sayıda enzim ticari olarak kullanılmaktadır. Önemli endüstriyel biyokatalizörler arasında lipaz (biyoyakıt ve ilaç endüstrisi), tripsin (deri endüstrisi), ksilanaz (kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi), lipoksijenaz (gıda endüstrisi), fitaz (yem endüstrisi), soğuk aktif proteazlar ve α -amilaz (deterjan endüstrisi), ve hiyalüronidaz (bir farmasötik enzim) bulunmaktadır (Yang vd, 2011; Bhavsar vd, 2013; Plagemann vd, 2013; Khatri vd, 2016; Rebello vd, 2017). Gıda, ilaç, tekstil, kağıt, deri ve diğer endüstrilerde mikrobiyal enzimlerin uygulamaları, çevreye daha az zarar vermesi, daha fazla verim ve daha yüksek kalitede ürünleri meydana getirmesi nedeniyle geleneksel yöntemlere göre çok sayıdadır ve hızla artmaktadır (Singh vd, 2016).

Yüksek miktarda ve üstün performansta enzim üretimi amacıyla rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak mikroorganizmalar yardımıyla ve gen manipülasyonu yoluyla endüstriyel kullanıma uygun enzimler üretilmektedir (Illanes vd, 2012). Ayrıca, genetik bozukluklardan dolayı, insanlarda bazı enzim eksikliklerinin yol açtığı hastalıkların tedavisinde de mikrobiyal enzimler kullanılmaktadır (Vellard, 2003; Singh vd, 2016, 2017). Bu bağlamda, enzimler farmasötik ve diagnostik endüstrilerde çok önemli ve hayati rollere sahiptir (Mane ve Tale, 2015). Güçlü bir fibrinolitik enzim olan Nattokinaz (EC 3.4.21.62), tromboz tedavisi için umut veren bir maddedir (Cho vd, 2010). Asit proteaz, dekstranaz (EC 2.4.1.2) ve rodanaz (EC 2.8.1.1), sırasıyla, sindirim dispepsi, diş çürüğü ve siyanür zehirlenmesi tedavisinde kullanılabilir (Okafor ve Okeke, 2017). Lipazlar (EC 3.1.1.3), organik sentezde en sık kullanılan enzimlerdir ve optik olarak aktif alkollerin, asitlerin, esterlerin ve laktonların sentezinde kullanılırlar (Singh vd, 2016). Ayrıca, enzimler diyabet ve diğer sağlık bozukluklarının kantitatif tayini için klinik teşhiste kullanılmaktadır, örneğin, glikoz için glikoz oksidaz (EC 1.1.3.4); üre için üreaz (EC 3.5.1.5) ve glutamat dehidrogenaz (EC 1.4.1.2); trigliseritler için lipaz, karboksil esteraz ve gliserol kinaz; ürik asit için ürat oksidaz (EC 1.7.3.3); kreatinin için kreatinaz (EC 3.5.3.3) ve sarkosin oksidazlar (EC 1.5.3.1) bunlardandır (Le Roes-Hill ve Prins, 2016). Kolesterolün saptanmasında ve dönüştürülmesinde yararlı biyoteknolojik uygulamalar için kolesterol oksidaz (EC 1.1.3.6) da bildirilmiştir (Le Roes-Hill ve Prins, 2016).

Birleşmiş Milletler Ekonomik ve Sosyal İşler Dairesi (UNDESA), dünya nüfusunun 6.9 milyardan 9.1 milyara çıkacağını ve gıda talebinin 2050 yılına kadar %70 oranında artacağını öngörmektedir (http://www.un.org/waterforlifedecade/food_security.shtml). Bu nedenle, artan gıda ihtiyacının karşılanması noktasından başlayarak gıda endüstrisinde enzimler geniş uygulamalara sahiptir. Bu biyomoleküller, gıda üretimi ve lezzet, aroma, renk, doku, görünüm ve besleyici değer gibi bileşenlerin geliştirilmesinde etkili bir şekilde yer alırlar. Söz gelimi, α -amilazlar, gıda endüstrisinde pişirme, demleme, kek üretimi, sindirim yardımcılarının hazırlanması, meyve suları ve nişasta şurupları şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Van Der Maarel vd, 2002). α -amilazlar nişastayı maya tarafından daha da fermente edilen daha küçük dekstrinlere indirgemek amacıyla ekmek hamuruna eklenirler. Bu enzim fermantasyon oranını ve hamurun

viskozitesinin azaltılmasına destek olur, böylelikle, ürünün hacmi ve dokusunun iyileştirilmesi sağlanır. Transglütaminazın, proteinlerin çapraz bağlanmasının, ürünlerin viskoelastik özelliklerinin iyileştirilmesini sağladığı, bu nedenle, sosis, erişte ve yoğurtun işlenmesinde bir tekstüre maddesi olarak uygulanması üzerine çok fazla çalışma yapılmıştır (Kuraishi vd, 2001). Ayrıca, putresin oksidaz (EC 1.4.3.10), gıda bozulmasına neden olan putresin gibi biyojen aminleri tespit etmek için kullanılmaktadır (Le Roes-Hill ve Prins, 2016).

Deri endüstrisinde, deri işlemenin farklı aşamalarında atılan zararlı atıklar ciddi sağlık tehlikelerine ve çevresel sorunlara neden olmaktadır (Choudhary vd, 2004). Bu atıkları biyolojik olarak parçalayabilen enzimler, deri kalitesini iyileştirmek ve atıkları azaltmak için etkili alternatiflerdir (Adrio ve Demain, 2014). Ayrıca, deri işleme sırasında sertleştirme, ıslatma, kireçleme, saçların uzaklaştırılması (*dehairing*), yağ alma ve tabaklama gibi farklı aşamalarda deri kalitesini artırmak ve prosedürü kolaylaştırmak için uygun enzimler gerekmektedir (Mojsov, 2011). Enzimlerin deri endüstrisinde uygulanmasına yönelik ilk deneme, bu endüstrideki en uzun işlem olan *dehairing* aşamasında proteaz, lipaz ve amilaz gibi çok miktarda enzimin kullanımı ile gerçekleştirilmiştir (Bailey, 1992; Sankaran, 1995; Raju vd, 1996; Singh vd, 2016).

Tekstil endüstrisi, kumaşların çözülmesinden kaynaklanan geniş çaplı atıklardan, ağartıcı kimyasal maddelerden ve boyadan sorumlu olduğu için çevre kirliliğine en çok etki eden endüstrilerden biridir (Ahuja vd, 2004). Bu endüstride, elyaf işleme konusunda çevre dostu teknolojilerin geliştirilmesine ve nihai ürün kalitesini iyileştirmeye yönelik stratejilerin uygulanması enzimlerin kullanılmasını içermektedir (Choi vd, 2015). Pamuk ön işleme aşamalarında rol oynayan enzimlerin ana sınıfları hidrolaz ve oksidoredüktazlardır. Hidrolaz grubu (amilaz, selüloz, kütinaz, proteaz, pektinaz ve lipaz/esteraz vb.), kumaşın biyo-parlatılması ve biyo-boyanmasında, yünün tahriş edilmesinde, pamuk yumuşatılmasında, kot ve yün ağartılması ile sentetik liflerin modifikasyonunda yer alır (Araujo vd, 2008; Chen vd, 2013). Diğer enzim grubu olan oksidoredüktazlar; katalaz, lakkaz, peroksidaz ve ligninaz enzimlerini içerir ve bunlar arasında biyo-ağartma, ağartma sonlandırma, boya renklendirme, kumaş, yün uygulamaları yer almaktadır (Mojsov, 2011).

Ekosistem üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmak için kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde mikrobiyal enzimlerin kullanımı sürekli olarak artmaktadır. Ayrıca,

enzimlerin kullanımı, işlem süresini, enerji tüketimini ve işlenecek kimyasal miktarını azaltmaktadır (Srivastava ve Singh, 2015). Ksillanlar ve ligninazlar kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinde, lignin ve hemiselülozları kaldırarak posa değerini arttırmak için kullanılmaktadırlar (Maijala vd, 2008). Selülozlar, kullanılmış basılı kağıtların geri dönüşümü için biyoprosesin geliştirilmesinde de kullanılmıştır (Patrick, 2004). Lakkaz uygulaması kimyasal hamurlama işleminde büyük miktarda klorin kullanım ve gereksinimine bir alternatiftir (Fu vd, 2005). Ayrıca, kağıt endüstrisinde parlaklığı arttırmak için de kullanılmaktadır (Clarke vd, 2000).

2.3. Selülaz Enzimi ve Kullanım Alanları

Selüloz, her yıl, büyük miktarlarda tarım, sanayi, orman ve konut atıkları biçiminde toplanan, ve bundan dolayı, dünyanın en bol bulunan doğal organik bileşiklerindendir (Mandels, 1975). Her ne kadar bol bulunsada, yüksek kristalli yapısı, suda çözünmez oluşu ve depolimerizasyona karşı yüksek direnci bakımından selüloz bir biyopolimerdir (Xu vd, 2004a). Selülozun yenilenebilir bir enerji kaynağı olma potansiyeli, ancak selülozlar gibi selülozu parçalayan enzimlerin de tanımlanmasından sonra fark edilmiştir (Bhat ve Bhat, 1997).

Selülazlar biyokütlenin selüloz kompleksini glikoza dönüştürmek için sinerjik olarak hareket eden üç ana bileşenden oluşur (Sukumaran vd, 2009):

- i) Çözünebilir ve çözünmeyen 1,4- β -glukan substratları üzerinde rastgele davranan ve genellikle yaygın olan “endo-1,4- β -glukanazlar” veya 1,4- β -D-glukan 4-glukanhidrolazlar (EC 3.2.1.4) karboksimetilselülozdan (CMC) salınan indirgeyici gruplar belirlenerek ölçülür.
- ii) Hem 1,4- β -D-glukanlardan D-glukoza serbest bırakan, hem de D-sellobiozu yavaş yavaş hidrolize eden 1,4- β -D-glukan glikohidrolazları (EC 3.2.1.74) içeren “ekzo-1,4- β -D-glukanazlar” ve 1,4- β -glukanlardan D-sellobiozu serbest bırakan 1,4- β -D-glukan sellobiohidrolaz (EC 3.2.1.91).
- iii) D-glikoz ünitelerini sellobiyoz ve çözünebilir sellodekstrinlerden ve aynı zamanda bir glikozit dizisinden serbest bırakmaya yarayan “ β -D-glukosidazlar” veya w-D-glukozit glukozhidrolazlar (EC 3.2.1.21) (Xu vd, 2004b).

Selülaazlar ve ksilanazlar, sırasıyla selüloz ve hemiselüloz polisakkaritlerinde bulunan β -1,4 glikozidik bağların parçalanmasında rol alan hidrolitik enzimlerdir (Lopez-Ramirez vd, 2018). Buna ek olarak, ksilanaz, biyokütlenin hemiseliloz bileşeninin ksiloza dönüştürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Biyokütlenin selüloz ve hemiselüloz fraksiyonunun fermente edilebilir şekerlere verimli şekilde dönüştürülmesi, hammadde birimi başına büyük bir enzim ünitesi gerektirir (Sharma vd, 2004; Lima vd, 2005). Örneğin, selülaaz ve hemiselülaazın yüksek piyasa fiyatı, selülozun etanole dönüşüm sürecini pahalı hale getirmektedir (Saratale vd, 2011). Bu nedenle, mikrobiyal selülaaz enzimlerinin üretimi, mevcut selülaazların verimliliğinin artırılması ve ekstrem ortamlarda stabil olan yeni selülaazların tanımlaması gibi çeşitli alternatif stratejiler geliştirilmiştir (Maurelli ve Morana, 2013). Bu enzimler, kimya, yakıt, tekstil, gıda, bira ve şarap gibi çeşitli endüstrilerde, araştırma ve geliştirme alanlarına ek olarak çamaşır, kağıt hamuru ve kağıt ve tarımda çok sayıda uygulamaya sahiptir (Bhat, 2000; Lopez-Ramirez vd, 2018).

Selülaaz enzimleri, endüstriyel kullanımlar için üçüncü en önemli enzimdir. Dünya çapında araştırmalar, selülozik enzimlerin, tarımsal selülozik malzemelerin ticari olarak üretilmesindeki potansiyeli üzerine odaklanmıştır (Pandey vd, 1999). Çeşitli endüstrilerde selüloz hidrolize edici termofilik enzimlerin önemi yenilenebilir tarımsal artıklardan biyoetanol ve katma değerli organik bileşiklerin üretimini kapsamaktadır (Hardiman vd, 2010).

Tekstil endüstrisinde pamuk, kumaşa ve ipliğe dönüşmeden önce, rafine etme, ağartma, boyama ve parlatma gibi çeşitli işlemlere maruz kalır (Queiroga vd, 2007). Bu süreçler sırasında çok miktarda enerji, su ve kaynak tüketilmektedir. Temiz süreçlerin geliştirilmesi için, bu endüstride enzimlerin kullanımı hızla artmaktadır. Tipik örnekler arasında, kot pantolonlarda *Trichoderma viride*'den elde edilen selülaaz enzimi kullanılarak lekelenme ve yün durumunda bir biyo-karbonizasyon işlemi yer alır (Yachmenev vd, 2002).

Bacillus sp. CY-3 suşundan elde edilen selülaaz enziminin optimum katalitik aktivitesini 100 °C'de gösterdiği, bununla birlikte, 20-60 °C aralığında ortalama %74.25, 60-110 °C aralığında ise %87 rölatif aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu enzimin 60 dakika süreyle 90-110 °C aralığında %93 düzeyinde aktivite göstermesi hiper termofil özelliğinin göstergesidir. Enzimin bu özelliği, özellikle 90-100 °C aralığında yaklaşık 60 dak. uygulama gerektiren tekstil endüstrisi için

oldukça önemli bir kullanım olanağı oluşturmaktadır (Caf, 2012). Wang vd (2016b)'ne ait çalışmada psikofilik *Cellulophaga algicola* IC166^T suşundan elde edilen selülaz enziminin en iyi aktivitesinin 40 °C'de ve pH: 6.0 değerinde olduğu saptanmıştır. Bu enzimin sıcaklık ve pH değerleri dikkate alındığında, tekstil endüstrisinde kullanılma potansiyeline sahip olduğu saptanmıştır.

Kâğıt endüstrilerinde ksilanaz ve ligninaz, tipik kirlilikleri olan lignin ve hemiselülozları uzaklaştırarak posa kalitesini arttırmak için kullanılırlar (Maijala vd, 2008). Kağıt hamuru üretiminde lipaz, odundaki zifti parçalamak için kullanılsa da, lipaz varlığı imalat sürecinde ciddi sorunlara neden olur. Bu sebeple, gazete gibi basılı kağıtların geri dönüşümü için selülaz kullanımı tercih edilmiştir (Patrick, 2004). Selülazlar, biyomekanik hamurlama, mürekkep giderme ve drenaj yönetimi, biyolojik olarak parçalanabilen kağıt havlular, sıhhi kağıt ve kartonlar gibi çok çeşitli endüstriler için kullanılırlar (Kuhad vd, 2011; Shweta, 2012). Clarke vd (2000)'ne ait çalışmada *Neocallimastix patriciarum*'dan elde edilen selülaz enziminin en iyi aktivitesinin 40 °C'de ve pH: 8.0 değerinde olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada *Neocallimastix patriciarum* suşu kullanılarak izole edilen selülazın kağıt endüstrisinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

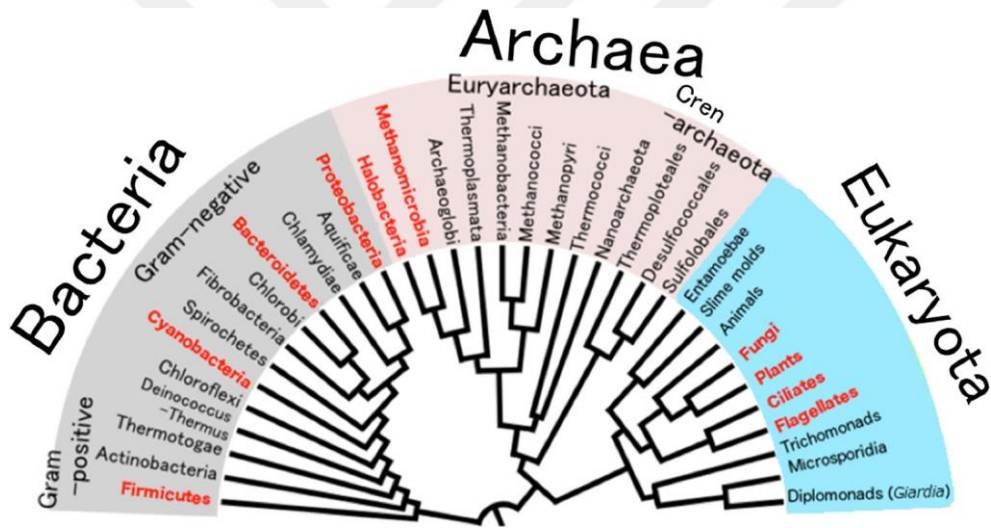
Selülaz enzimleri, tek başına ya da diğer enzimler ile kombinasyon halinde, gıda endüstrisinde önemli bir yere sahiplerdir. Selülazlar, meyve ve sebze suları, hayvan yemi üretimi ve alkol bazlı sanayilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Menendez vd, 2015; Singh vd, 2016). Selülazlar, ayrıca flavonoidlerin çiçek ve tohumlardan ekstraksiyonu için de kullanılmaktadırlar. Selülazlar, bu ekstraksiyonda artan verim, düşük işlem süresi ve daha az ısı hasarı nedeniyle geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre daha fazla tercih edilmektedir (Cao vd, 2014; Sajith vd, 2016). Hayvan yemi endüstrisindeki uygulama alanı tahıl temelli gıda ve besleyici değerin sindirilebilirliğini geliştirmek amacıyla monogastrik hayvan yemlerine eklenilmesi şeklindedir (Himmel vd, 1999; Beauchemin vd, 2003).

Awasthi vd (2018) tarafından yapılan çalışmada *Bacillus* suşlarından elde edilen selülaz enziminin optimum 60 °C ve pH: 8.0 değerinde en iyi aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiş ve yapılan bu çalışmada elde edilen selülazın gıda endüstrisinde atıkların parçalanması işlemlerinde kullanılabilirliğini vurgulanmıştır.

Şarap ve bira endüstrisinde, selülozlar, ürünlerin kalitesini ve verimini artırmak için fermantasyon işlemlerine dahil olurlar. Glukanaz, ürünün viskozitesini azaltan ve filtrelenebilirliği arttıran mashing işleminde kullanılır. Şarap endüstrisinde şarap ekstraksiyonu için, kolay arıtma, filtrasyon ve stabilizasyon işlemleri sırasında selüloz, hemiselüloz ve pektinaz karışımı kullanılmaktadır. Şarap ürünlerinin aroması gibi duyuşal özelliği geliştirmek için ise β -glukozidaz kullanılmaktadır (Kuhad vd, 2011).

2.4. Halofilik Mikroorganizmalar

Tuz konsantrasyonlarında en iyi şekilde üreyen mikroorganizmalar, (100 g/L'den daha yüksek oranlarda) halofiller kategorisine girmektedirler. Bu mikroorganizmalar üç taksonomik alan içinde bulunabilirler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Halofillerin üç taksonomik alan içinde dağılımı. Kırmızıyla açıklanmış olan gruplar en az bir halofil içerir. Ağaç, küçük alt birim rRNA gen dizileri kullanılarak yapılmıştır (Ciccarelli vd, 2006)

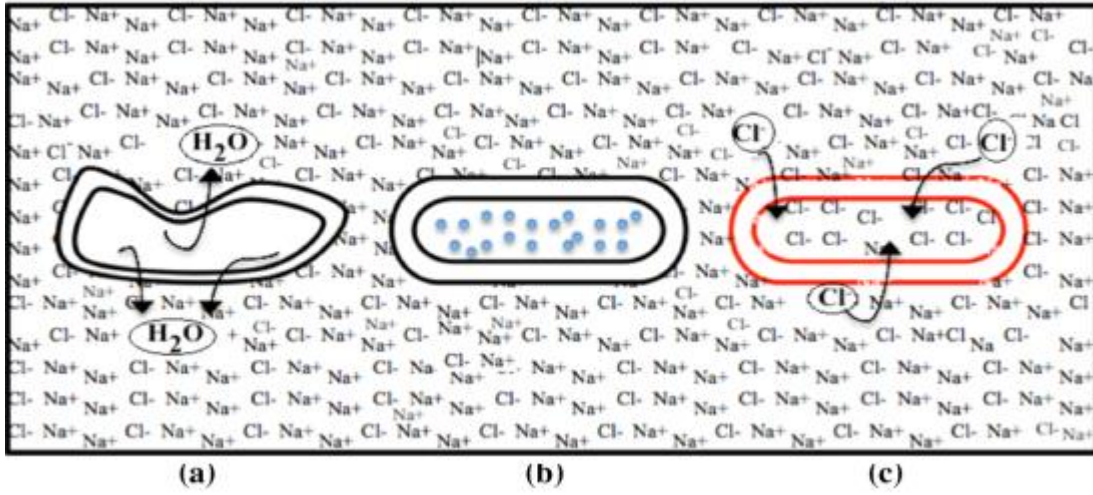
Halofilik mikroorganizmalar 0.2 – 5.1 M arasında değişen çok çeşitli NaCl konsantrasyonlarında üreme yeteneğine sahiptirler. Bu değişken NaCl konsantrasyonuna dayanarak halofiller, üremeleri için ihtiyaç duydukları tuz miktarına göre farklı gruplara ayrılmaktadırlar (Çizelge 2.1) (Kushner, 1985; DasSarma, 2006). Buna göre; 0.2 M'dan daha düşük NaCl konsantrasyonunda hayatta kalabilenler “halofil olmayanlar”, 0.2-0.5 M NaCl konsantrasyon aralığında yaşayabilenler “hafif halofiller”, 0.5-2.5 M NaCl konsantrasyonunda yaşayabilenler “orta halofiller”, 2.5 ile 5.2 M NaCl konsantrasyon aralığında hayatta kalabilenler ise

“ekstrem (aşırı) halofil” mikroorganizmalar olarak adlandırılmaktadırlar (Pikuta vd, 2007). *Staphylococcus aureus* ve *Vibrio* sp. gibi halotolerant olarak adlandırılan mikroorganizmalar ise tuzsuz koşullarda ve yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyebilirler (Ventosa vd, 1998; Ara vd, 2013).

Çizelge 2.1. Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması (Kushner, 1985).

Kategori	Tuz Konsantrasyonu (M)	
	Aralık	Optimum
Halofolik olmayanlar	0 - 1.0	< 0.2
Hafif halofiller	0.2 - 2.0	0.2 - 0.5
İlımlı halofiller	0.4 - 3.5	0.5 - 2.0
Sınırdaki ekstrem halofiller	1.4 - 4.0	2.0 - 3.0
Ektrem halofiller	2.0 - 5.2	> 3.0
Halotolerantlar	> 1.0	< 0.2

Yeryüzündeki yaşamın evrimi sırasında karşılaşılan ilk kimyasal stres, tuz stresi olabilir. Bu nedenle, evrimin başlangıcından beri, organizmalar protoplazmik yapıların ve iyon regülasyonunun stabilizasyonu için stratejileri ve etkili mekanizmaları geliştirmiş olmalıdırlar (Sarwar vd, 2015). Bu mekanizmalar, membran bileşimi modifikasyonu, membran akışkanlığındaki varyasyonlar, Na⁺/H⁺ antiporter aktivitesi, genel tuzluluk tolerans proteinleri vb. dahil olmak üzere çeşitli doğal mekanizmalar içermektedir (DasSarma vd, 2009). Yüksek tuz içeren koşullarında mikroorganizmaların hayatta kalması, ozmotik dengeyi çevreye karşı korumak için özel hücresel ve enzimatik uyarlamalar gerektirmektedir. Yüksek tuzluluğa sahip ortamlara adapte olamayan mikroorganizmalar suyu kaybedecek ve hücrelerin ilk olarak büzülmesine ve daha sonra hücresel yapı kaybına ve işlev kaybına neden olacaktır (Şekil 2.2a). Bu koşullar altında aşırı su kaybından kaçınmak için, halofiller, sitoplazmanın ozmotik aktivitesini arttırmak için iki ayrı stratejiyi geliştirmişlerdir: (i) organik çözücüler üretmek (osmotik bir koruyucu; Şekil 2.2b) ya da (ii) sitoplazmalarında büyük tuz konsantrasyonları biriktirerek, hücrelerin içindeki toplam tuz konsantrasyonunun çevreyle eşleştiği bir denge durumuna ulaşmaktadır (Şekil 2.2c) (Eisenberg, 1995; Mongodin vd, 2005). Bu nedenle, halofil enzimleri farklı adaptasyon mekanizmalarına sahiptir ve düşük su aktivitesi ile organik çözücü varlığında oldukça stabildir. Halofilik enzimler yüksek yüzdelerde serin ve treonin gibi asit özellikli aminoasitlere sahiptirler (Elleuche vd, 2014).



Şekil 2.2. Halofillerin hipersalin ortamlara uyarlanması. a) Halofilik olmayan makromoleküllerin bütünlüğü tehlikeye girer ve hücrenin dışına su akışı turgor etkisi yaratır, b) Orta haldeki halofiller, yapılarını uyumlu organik çözücülerin sentezi yoluyla sürdürürler, c) Aşırı halofiller yapılarını hücresel ve çevresel tuz konsantrasyonlarının dengelenmesiyle sürdürürler (Bell, 2012)

Prokaryotik ekstremofiller, fizyoloji, ekoloji, biyokimya ve genetik açısından kendine özgü özelliklerinden dolayı bilimsel ilgi odağı haline gelmiştir. Şu ana kadar tespit edilen ekstremofillerin çoğu Archaea alanına aittir (Woese vd, 1990). Halofilik Archaea, Halobacteriales dizisindeki tek aile olan Halobacteriaceae ailesini oluşturur. Haloarchaea, tuzlu gıda bozulmalarındaki rollerinden dolayı erken bir araştırma konusu olmuştur (Rodriguez-Valera, 1992). Bu mikroorganizmalar, birçok hipersalin ortamlarında gelişerek baskın popülasyonlar oluştururlar (Oren, 2002a). Ortamdaki tuz konsantrasyonuna göre, pigmentli ve pigmentli olmayan çeşitli koloniler meydana getirirler. Halofilik olmayan veya normal bakterilere kıyasla yavaş üremektedirler. Aşırı halofilik bakteriler diğerlerine göre çok daha yavaş üremektedir (Ventosa, 2006). Bakteriler ile yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, halofilik olanların fizyolojisi ve enzimolojisi üzerine çalışmalar halen daha azdır. Ancak, diğer mikrobiyal yaşamın üremesini sınırlayan tuzcul ortamlarda gelişebilme yeteneğine sahip olduklarından, transgenik ürünlerin tuza toleranslı bir karakterle üretilmesinde kullanılabilirler. Bazı suşlarına tuz toleransı veren genler tanımlanmış ve izole edilmiştir. Bu izole edilmiş genler, yüksek tuz içeren koşullarda direnç gösteren transgenik bitkilerin oluşumu için başarıyla transfer edilmiştir (Zuleta vd, 2003; Klähn ve Hagemann, 2011).

Halofilik mikroorganizmalara ait bilinen ilk açıklama, M.Ö. 2700'e kadar uzanmaktadır (Bass-Becking, 1931) ve hipersalin ortamlarında bulunan kırmızı tuzlu su mikroorganizmaların izolasyonunu bildirmektedir. En eski zamanlardan Pierce (1914) tarafından rapor edilen, eski Mısır döneminde yaşayan bir halofilik mikroorganizmanın izolasyonu yapıldığı bilinmektedir. 1920'lerin sonu ile 1940'ların başları arasında halofilik bakteriler, örneğin balıklar, hayvan postları ve ançuez gibi pek çok kaynaktan izole edilmiştir (Baumgartner, 1937). En önemlisi, tuzun doymuş olduğu ortamlarda yaşayan mikroorganizmalara duyulan ilgi sonucu yapılan çalışmalardır (Petter, 1932; Hof, 1935). Ölü Deniz'in hipersalin sularının, 1936'ya kadar Benjamin Elazari'nin "Ölü Denizde Yaşam" (Wilkansky, 1936) adlı kitabında yazdığı ilginç bir makalenin yayınlanmasından sonra 1936'ya kadar verimsiz ve cansız olduğu düşünülmüştür. Petter ve Hof'un eserlerinden esinlenen Elazari, sular ve Ölü Deniz'in kıyılarındaki aşırı halofiller, *Halobacterium trapanicum* ve *Micrococcus morrhuae* ve orta halofiller olan *Chromohalobacterium marismortui*, *Pseudomonas halestrogus* ve *Flavobacterium halmephium*'u (Elazari-Volcani, 1940; Volcani, 1944) izole etmiştir. Ancak, bu ilk keşif takip edilmemiş ve Elazari, neredeyse 20 yıl halofilleri inceleyerek araştırma odağını değiştirmiştir. 1980'lerde, Antonio Ventosa ve meslektaşları Elazari'nin kaldığı yerden ayrılarak, Ölü Deniz'de geniş çaplı mikrobiyal yaşam çalışmalarına başlamışlardır (Ventosa vd, 1999; Ventosa vd, 2015). Oren ve arkadaşları ayrıca hipersalin ortamlarındaki ekolojiyi, fizyolojiyi, biyokimyasını ve mikroorganizmaların biyolojisini araştırmışlardır (Oren, 1983; Oren ve Gurevich, 1995; Oren ve Litchfield, 1998; Edbeib vd, 2016).

Halofilik bakteriler, birçoğu Proteobacteria (sınıf, Gammaproteobacteria) (Oren, 2002b) ailesi olan Halomonadaceae'ye ait birçok filogenetik alt grupta bol miktarda bulunmaktadır. Dünyada göllerde ve kıyı bölgelerinde, örneğin Ölü Deniz'de, İsrail'de (Wang vd, 2016a), Urmia Gölü'nde, İran'da (Mehrshad vd, 2015), Tunus'taki tuzlu topraklarda (Boujelben vd, 2012), Rambla Salada, Murcia, İspanya (Luque vd, 2014), Büyük Tuz Gölü, Utah, ABD (Tazi vd, 2014), Dagong Salamine Kuyu, Çin (Xiang vd, 2008) gibi bir çok yerde bulunurlar. En büyük halofilik Archaea ailesi, 129 türle 36 cinsinden oluşan Halobacteriaceae tarafından temsil edilmektedir. Ayrıca Halobacteriaceae, en fazla tuza ihtiyaç duyan suşların bulunduğu ailedir (Oren, 2012). Halofiller, güneş enerjisi, derin deniz tuzlu suları, tuz madenleri, hipersalin ve alkali göller, bataklık lagünleri ve hidrotermal dahil

olmak üzere çeşitli yaşam alanlarında yaşamaktadır (Oren, 2006). İlginç bir şekilde, halofillerin bazı beklenmedik yerlerden, örneğin, kutup buzulları ve çöl mağaralarındaki örümcek ağlarından izole edildiği belirtilmiştir (Gunde-Cimerman vd, 2009).

Halofilik bakteriler ve özellikle haloarkeler, ağır ve hipersalin koşullarına iyi adapte olmuş benzersiz ve farklı bir grup ekstremofilik mikroorganizmalar olup bu özellikleri, tuzların denatüre edici etkileriyle rekabet edebilmelerini sağlayan genleri taşımaları ile alakalıdır (Sarwar vd, 2015). Halofilik mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar, ekstrem ekosistemlerdeki etkileşimlerin daha iyi anlaşılmasını sağlarken, bir yandan stres yanıtları konusundaki bilginin artmasına, diğer yandan ise endüstride kullanılan mikroorganizmaların fonksiyonlarını arttıran genlerin belirlenmesine katkı sağlamaktadır (Ali vd, 2014b). Hipersalin mikroorganizmalarına karşı olan ilgi genom dizilemesindeki son gelişmelere yeniden artış göstermiştir. İlk rapor edilen genom dizisi halofilik archaeon olan, *Halobacterium* NRC-1 (Ng vd, 2000)'a aittir. Son yıllarda, genomları sekanslanmış olan sekiz halofilik türün yarısı *Halomonas* cinsinin üyeleridir. (Oren, 2014). Bu bağlamda, *siliko* post-genomik analiz ve sonrasındaki genetik mühendisliği çalışmaları eşliğinde halofillerin üremelerinin optimizasyonunun sağlanmasıyla, endüstriyel ve çevresel biyoteknoloji uygulamaları için biyokimyasal yolların değiştirilmesi ya da yeni yolların yaratılması gibi çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Cai vd, 2011; Yue vd, 2014).

Halofilik mikroorganizmalar; karbon, azot, kükürt ve fosforun biyokimyasal döngülerine, besin maddelerinin üretimine ve iyonların dengesine katılmaları ve çoğunluğunun sadece karbon üzerinde tek bir enerji kaynağı kullanarak hayatta kalabilmelerini sağlayan basit beslenme biçimleri nedeniyle önemli bir grubu oluşturmaktadırlar (Oren, 2000).

Halobacteriaceae, ışığın emilmesine ve tuz kristallerince yoğun olan havuzlarda buharlaşmanın artmasına yardımcı olan belirli karotenoid pigmentler üretmektedir (Oren, 2010). Halofilik mikroorganizmalar ve ürettikleri enzimlerin çeşitli biyoteknolojik işlemlerde uygulamaları bulunmaktadır (DasSarma vd, 2010). Halofilik bakteriler, hem aerobik hem de anaerobik koşullarda belirli organik ve inorganik bileşiklerin biyodegradasyonu için tercih edilmektedirler. Bu tür bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarını içeren atık su ve tuzlu ortamları bu bakterilerle muamele edilmektedir (Dincer ve Kargi, 2001). Kadmiyum, civa, arsenik

vb. gibi ağır metallerin atık suların arındırılması halofilik bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir. Fenol, formaldehit, organofosfor vd. gibi bileşikler, Halomonadaceae ailesinin üyeleri dahil halofilik bakteriler tarafından başarılı bir şekilde parçalanır. Halofillerin, küresel ısınmaya ilişkin beklenen petrol sıkıntısını ve endişelerini gidermek için sürdürülebilir biyoenerji teknolojisinde kullanıldığı da düşünülmektedir (Ventosa vd, 1998; Sarwar vd, 2015).

2.4.1. Halofilik mikroorganizmaların endüstriyel enzim üretimleri

Halofilik enzimler, onların ekstremofilik özelliklerinden dolayı halofilik olmayan benzerlerinden daha stabildir. Bu enzimler, yüksek tuzlu ortamlarda, termotolerant ve alkalifilikte aktif kalmaktadırlar (Lourdes Moreno vd, 2009). Halofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamaları hakkında yakın zamanda bildirilen çalışmalar Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Halofilik mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamalarına ilişkin bazı örnekler (Ali vd, 2014b)

Uygulamalar	Referanslar
Antibiyotikler	(Ghosh vd, 2010; Sepcic vd, 2011)
Antioksidanlar	(Ravindran vd, 2012)
Biyoplastikler	(Huval ve Vreeland, 1991)
Biyoremediasyon	(DasSarma ve Arora, 2002; Chung vd, 2009)
Çevresel indikatör	(Ali vd, 2014a)
Halofilik amilazlar	(Chakraborty vd, 2009)
Halofilik selülozlar / ksilanazlar	(Wang vd, 2009; Zhang vd, 2011)
Halofilik proteazlar	(Karbalaei-Heidari vd, 2009; Setati, 2010)

Gıda endüstrisinde gıda boyası pigmentleri, stres koruyucu metabolitler, kozmetik endüstrisinde katkı maddeleri vb. gibi benzersiz ticari uygulamaları için çok çeşitli halofiller kullanılmaktadır (Bestvater vd, 2008). Amilazlar, selülozlar, proteazlar ve lipazlar dahil olmak üzere tuza toleranslı enzimler, ticari düzeyde halofilik arke ve bakterilerden başarıyla üretilmektedir (Ghasemi vd, 2011). Gliserol, ektoinler, trehaloz, prolin, gliserol ve hidroksiaseton gibi uyumlu çözücülerin bazıları, aşırı soğutma veya ısıtma sırasında dehidrojenaz enzim için yüksek derecede koruma göstermiştir. Ektoin, fosförukotkinazın dondurulması veya soğutulması için etkili bir stabilize edici faktör olarak bildirilmiştir (Severin vd, 1992). Benzer şekilde, biyorhodopsin üretiminde halofilik mikroorganizmaların kullanımı, biyobozunma işlemleri için geliştirilmiş biyo-surfaktanlar ve optik hesaplama, yağın geri kazanımı

için ekzopolisakkaridler, gıda katkı maddeleri ve stres koruyucuları olarak uyumlu çözücüler rapor edilmiştir (Margesin ve Schinner, 2001; DasSarma ve Arora, 2002).

Halofilik mikroorganizmalar, plastiklerin ısıı işlemine uygulanabilen hidroksialkanoatları üretirler (Huval ve Vreeland, 1991). Örneğin *Haloferax mediterranei*'den pH ve ısıya dayanıklı ekzopolisakkaritler elde edildiği bildirilmiştir (Oren, 2010). Biyoremediasyon süreçlerinde halofilik mikroorganizmalar kullanılabilmektedir (Margesin ve Schinner, 2001; Wang vd, 2009; Ali vd, 2014a). Bu mikroorganizmalar toprak ve su tuzluluğu için bir gösterge olarak da kullanılabilirler (Ramos-Cormenzana, 1993). Halofillerden elde edilen hücre dışı enzimler ağır biyopolimerleri daha basit bileşiklere dönüştürebilir. Suyun azalması ve tuzluluğun artması ile ilgili çoğalan problemler, halofilik mikroorganizmaları, zorlu koşullarda büyümelerini sağlamak için bitkilere dahil edilebilecek toleranslı genlerin elde edilmesinde önemli bir seçenek haline getirmektedir (Gunde-Cimerman vd, 2009; Gostinar vd, 2011).

Lipazlar ve esterazlar, düşük su aktivitesi ortamlarında geliştirilen endüstriyel işlemlerde gereksinim duyulan enzimlerdir; bununla birlikte, bu enzimlerin haloarkeler ile yapılan çalışmaları azdır (Boutaiba vd, 2006). *Halobacterium* sp. NRC-1 ve *Haloarcula marismortui*'den (<http://www.genome.ad.jp>) gelen genom dizilerinin analizi, bilinen lipazları ve esterazları kodlayan genleri ortaya koymuştur. Bugüne kadar, endüstride halofillerden elde edilen çeşitli enzimlerin (hidrolazlar, lipazlar, esterazlar, proteazlar, nükleazlar vb.) potansiyel kullanımı farklı çalışmalarda bildirilmiştir (Jaeger ve Eggert, 2002; Prez-Pomares vd, 2009). Söz gelimi, *Haloarcula* sp.'den izole edilen α -amilazın 50 C'de 4.3 M tuzda etkili bir şekilde işlev gördüğü ve benzen, tolüen ve kloroformda stabil olduğu gösterilmiştir (Hutcheon vd, 2005). Orta derecede halofilik *Marinobacter* sp. EMB8'den türetilen α -amilazın nano-immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çeşitli parametrelerin optimizasyonu, %96 immobilizasyon verimiyle sonuçlanmış ve tekrarlanan beş tekrardan sonra etkinliğin devam ettiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, bu çalışma sonuçları endüstride halofilik enzimlerin uygulamalarının uygulanabilirliğini gösteren önemli örneklerden biridir (Fukushima vd, 2005).

Mikrobiyal proteazlar en yaygın olarak incelenen enzimlerden biridir ve endüstriyel süreçlerde yaygın olarak kullanılırlar. Genellikle amaşır deterjanları,

gıda işleme, ilaç, deri ve diagnostik reaktifler, atık yönetimi ve gümüş geri kazanımı için katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır (Amoozegar vd, 2008; Karbalaie-Heidari vd, 2009). Halofilik proteazlar, *Bacillus* sp. (Kamekura ve Onishi, 1974; Setyorini vd, 2006; Shivanand ve Jayaraman, 2009), *Pseudoaltermonas* sp. (Sánchez-Porro vd, 2003), *Salinivobrio* sp. (Amoozegar vd, 2007), *Salicola* sp. (de Lourdes Moreno vd, 2009), *Halobacillus* spp. (Karbalaie-Heidari vd, 2009), *Filobacillus* sp. (Hiraga vd, 2005), *Chromohalobacter* sp. (Vidyasagar vd, 2009), *Nesterenkonia* sp. (Bakhtiar vd, 2005) dahil olmak üzere birçok bakteri türünden izole ve karakterize edilmişlerdir.

Ksilanazlar ksilanın bozulmasında çok önemli bir rol oynar. Kağıt hamurunun özelliklerini geliştirmek için kullanılan işlemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve son yirmi yıldır ksilanazların kâğıt ve kağıt hamuru üretiminde potansiyel kullanımları sürekli olarak artmaktadır (Mamo vd, 2009). Halofilik mikroorganizmalar, bu alandaki araştırmalar ile bu özelliklere sahip enzimlerin en muhtemel kaynaklarıdır. Tanımlanan bazı halofilik/halotolerant ksilanazlar; *Glaciecola mesophila* (Guo vd, 2009) ve *Chromohalobacter* sp. (Prakash vd, 2009) gibi deniz ve hipersalin ortamlarından bulunan bakterilerden elde edilen enzimlerdir.

Selülozlar esas olarak tekstil endüstrisinde kumaşların biyo-parlatılması ve taşlanmış kot pantolonların üretimi için ve çamaşır yumuşatma ve parlatma için çamaşır deterjanlarında uygulanmaktadır (Aygan ve Arıkan, 2008). Ön-işlemden geçirilmiş selülozik malzemelerin fermente olabilen şekere hidrolize edilmesi için enzimler kullanıldığı için selülozlara olan ilgi de artmaktadır (Wang vd, 2009). Halen, *Bacillus* sp.'den üretilen halofilik ve halotolerant selülozlar (Aygan vd, 2008), *Salinivibrio* sp. (Wang vd, 2009) ve metagenom kütüphanesi (Voget vd, 2006) karakterize edilmiştir. Bu enzimler, çeşitli endüstriyel uygulamalar için ideal bir aday haline getiren, termostabil, kokusuz ve alkali olmalarıdır. Halofilik *Aspergillus terreus* Uni-MAP AA-6, ön-muamele edilmiş lignoselülozların *in situ* enzimatik sakarifikasyonuna yönelik büyük bir potansiyel uygulamaya sahiptir (Gunny vd, 2014). Endüstriyel bir perspektiften bakıldığında, bu *in situ* süreç uygun maliyetli olmaktadır. Çin'in Yuncheng Tuz Gölü'ndeki tuzlu topraktan izole edilen halofilik *Haloarcula* sp. LLSG7'den elde edilen selüloz enziminin 20-90 °C aralığındaki aktivitesi belirlenmiş ve en iyi aktivite için optimum 50 °C, pH: 8.0 ve %20 NaCl varlığının gerektiği görülmüştür (Li ve Yu, 2013a). Selüloz, polar olmayan organik

Çözücülerin varlığında da olağanüstü bir stabilite sergilemiştir. Bu kararlı yapısıyla gerek kağıt endüstrisi gerek tekstil endüstrisi olmak üzere bir çok endüstri dalında uygulanan kimyasal ve mekanik işlemler sırasında aktivitesini korumakta ve devam ettirebilmektedir (Hezayen vd, 2000; Hutcheon vd, 2005).

Mevcut alışma

Benzersiz ekstrem aktiviteli ve gelişmiş stabiliteye sahip enzimlerin keşfi enzim araştırmalarında öncelikli bir alandır. Bu çalışmada, daha önce önemli proteaz ve amilaz aktiviteleri olduğu belirlenmiş olan Tuz Gölü (*Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4, TG5), Çankırı Kaya Tuzu Mağarası (*Haloarcula* sp. KT1, KT2 ve KT3) ve Yozgat Kaya Tuzu Mağarası (*Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2) izolatlarında iki farklı sıcaklık ve altı farklı besiyerinde selülaz enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. En uygun sıcaklık, besiyeri ve en iyi selülaz üreticisi suşun belirlenmesinden sonra bu suştan elde edilen ham selülaz enziminin aktivitesinin arttırılmasına yönelik farklı sıcaklık ve pH değerleri ile farklı NaCl konsantrasyonlarının denendiği optimizasyon ve stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, selülaz enzimini kodlayan gen nükleotit ve aminoasit dizi analizleri ile karakterize edilmiştir. Selülaz geni pET-28a(+) vektörüne klonlanarak *Escherichia coli* BL21 hücrelerinde ifadesi sağlanmıştır. Saflaştırılan rekombinant selülaz enziminde optimizasyon ve stabilite çalışmaları yapılarak en yüksek aktivite koşulları belirlenmiştir. Elde edilen bulgular söz konusu selülaz enziminin tekstil, gıda ve deterjan endüstrilerinde kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Caf, 2012; Awasthi vd, 2018).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar, Plazmitler ve Kültür Koşulları

Çalışmada kullanılmış olan mikroorganizmalar ve plazmitler Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ve plazmitler

Mikroorganizmalar	Tanımlama	Referans
<i>Haloarcula</i> sp.		
TG1, TG2, TG3, TG4, TG5	Tuz Gölü izolatları	(Abanoz, 2016)
<i>Haloarcula</i> sp.		
ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3	Çankırı Kaya Tuzu Mağarası izolatları	(Abanoz, 2016)
<i>Halolamina</i> sp.		
YKT1, YKT2	Yozgat Kaya Tuzu Mağarası izolatları	(Abanoz, 2016)
<i>Escherichia coli</i> (E. coli)		
DH5α	F ⁻ /dlacZD (<i>lacZYA argF</i>), U169, <i>supE44k-thi-1, gyrA, recA1, relA1, endA1, hsdR17</i>	<i>E. coli</i> Genetik Stok Merkezi (ABD)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B- m_B-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen, Merck (Almanya)
<i>E. coli</i> pGÇKT3EG	Rekombinant pGÇKT3EG plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> DH5α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> pETÇKT3EG	Rekombinant pETÇKT3EG vektörünü taşıyan <i>E. coli</i> DH5α	Bu çalışma
<i>E. coli</i> BLÇKT3EG	Rekombinant pBLÇKT3EG plazmidini taşıyan <i>E. coli</i> BL21	Bu çalışma
Plazmitler		
pGEM-T® Easy	Amp ^R , lacZ [']	Promega Inc. (Madison, WI, ABD)
pET-28a(+)	T7 Promoter, His Tag,	Novagen

	<i>lacI</i>	
pGÇKT3EG	ÇKT3eg genini taşıyan rekombinant pGEM-T® Easy vektörü	Bu çalışma
pETÇKT3EG	ÇKT3eg genini taşıyan rekombinant pET-28a(+) Vektörü	Bu çalışma
pBLÇKT3EG	<i>E. coli</i> BL21(DE3) içerisinde ÇKT3eg genini taşıyan rekombinant pET-28a(+) vektörü	Bu çalışma

Escherichia coli (*E. coli*) Luria broth (LB) (Ek 3) sıvı besiyerinde 37 °C’de 200 rpm’de çalkalanarak ve agar plaklarda (LA) (Ek 3) 37 °C’ de inkübe edilerek üretilmiştir. Uzun süreli muhafaza için, 16 saatlik kültürden 3 mL alınıp santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet LB’de çözöldükten sonra (1:1) oranında %87’lik gliserol ile karıştırılarak -86 °C’ de saklanmıştır.

Çalışmada, daha önce üç lokasyondan izole edilmiş olan (Abanoz, 2016) *Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşları Sehgal–Gibbons (SG) (Sehgal ve Gibbons, 1960) (Ek 3) besiyerine ekilerek 37 °C’de 2 hafta boyunca 150 rpm hızda çalkalanarak inkübasyona bırakılmıştır. Uzun süreli saklama için, üreyen kültürlerden 4 mL alınıp santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve pellet 800 µL SG’de çözöldükten sonra %87’lik gliserol ile birebir oranında karıştırılarak -86 °C’de saklanmıştır. Suşların selüloz üretimlerinin belirlenmesi için kullanılan besiyerleri (SG), Complex Medium (CM) (Li ve Yu, 2013b), Dubos Salt Medium (DSM) (Lovd, 2009), Starch casein mineral (SCM) (Budihal vd, 2016), Modified Hans Medium (MH) (Mandels, 1975) ve Nutrient Medium (NM) (Hendricks vd, 1995)’dir. Çalışmada ara klonlama vektörü pGEM-T® Easy (Promega) (Ek 2) ve His-Tag ifade vektörü pET28a(+) (Novagen) (Ek 2) kullanılmıştır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin içerikleri ve hazırlanışları Ek 3’te verilmiştir.

3.2. Tamponlar ve Çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltileri içerikleri ve hazırlanışları Ek 4'te verilmiştir.

3.3. Kimyasallar ve Enzimler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve enzimler Ek 5'te verilmiştir.

3.4. Suşların Üreme Eğrileri

Haloarcula sp. ve *Halolamina* sp. suşlarına ait stoklardan ($OD_{600} \sim 1.8-2.0$) 1000 μ L alınıp içerisinde 100 mL SG besiyeri bulunan erlenlere ekim yapılmıştır. 37 °C ve 150 rpm'de üreyen kültürlerden 24 saat aralıklarla 10-15 gün boyunca alınan örneklerin OD_{600} nm'deki absorbans değerleri Shimadzu UV Spektrofotometre ile ölçülerek üreme eğrileri elde edilmiştir.

3.5. Selüloz Üretiminin Nitel ve Nicel Olarak Belirlenmesi

3.5.1. Nitel selüloz tayini

Selüloz üretiminin nitel tayini için Budihal vd (2016) tarafından rapor edilen yöntem uygulanmıştır. SG besiyerlerinde üreyen suşlara ait 120 saatlik kültürlerden 20'şer μ L alınarak SG, CM, DSM, SCM, MH ve NM katı besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ardından, 5 gün boyunca 37 ve 50 °C' lerde inkübe edilen kültürlerin üzeri %0,1' lik kongo kırmızı çözeltisi (Ek 4) ile kaplanmıştır. 15 dak. inkübasyon sonrasında boya dökülüp petri yüzeylerine 1 M NaCl çözeltisi eklenmiştir. Tekrar 15 dak. inkübasyon yapılarak, sonrasında çözelti petri yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Selüloz üreten bakterilerin etrafında temiz bir zon oluşması beklenmektedir. Dolayısı ile, deney sonucunda, bakteri kültürlerinin etraflarında oluşan zon çapları (mm) ölçülerek selüloz üretimleri nitel olarak karşılaştırılmıştır.

3.5.2. Nicel selüloz tayini ham enzim eldesi

Fermantasyon kültürlerinden ham enzim eldesi için Li ve Yu (2013b)' te rapor edilen yöntem uygulanmıştır. 50 mL hacimdeki SG, CM, DSM, SCM, MH ve NM

besiyerlerinde 72 saat boyunca üreyen ön kültürlerden 1 mL alınıp 150 mL hacimdeki yeni SG, CM, DSM, SCM, MH ve NM besiyerlerine ekim yapılmıştır. OD₆₀₀~1.8-2.0 değerine gelinceye kadar kültürler 37 °C’de ve 150 rpm’de 120 saat inkübe edilmiştir. 120 saat sonunda üreyen kültürler +4 °C’ de 15 dak. santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant 20 mM Tris-HCl (pH: 8.0) (Ek 4) tamponunda diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonunda %70’lik amonyum sülfat çöktürme metodu uygulanmıştır (Englard ve Seifter, 1990). Amonyum sülfat çöktürme işlemi için;

$$G(NH_4)_2SO_4 = \frac{1,77 \times V_{(ml)} \times (S_2 - S_1)}{3,54 \times S_2} \quad (3.1)$$

formülü kullanılmıştır (Coligan, 1998). Hesaplanan amonyum sülfat tartılıp diyaliz sonunda elde edilen 150 mL hacimdeki süpernatant içerisine yavaş yavaş eklenmek suretiyle manyetik balık yardımıyla karıştırılarak gece boyunca çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra, 4 °C’ de 12.000 Xg’de 10 dak. santrifüje tabi tutulmuştur. Oluşan çökelti 20 mM Tris-HCl tamponu ile (pH 8.0, 3.6 M NaCl ihtiva eden) çözdürüldükten sonra, son olarak amonyum tuzlarını uzaklaştırmak için aynı tampon içerisinde tekrar diyalize tabi tutulmuştur. Diyaliz sonunda örnekler Eppendorf tüpe alınıp -20 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.5.3. Selüloz aktivite tayini

Selüloz aktivitesi, substrat olarak CMC-Na (Ek 4) kullanılarak indirgen şekerlerin ölçülmesi temeline dayanan 3,5-dinitro-salisilat asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir (Miller vd, 1960). Tepkime karışımları; 0.5 mL 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.0) [CMC-Na (5.0 g/L) ihtiva eden] (Ek 4) ve 0.1 mL enzim çözeltisi içermektedir. Reaksiyon karışımı 50 °C’de bir su banyosu içinde 30 dak. inkübe edilmiştir. Ardından, karışım üzerine 900 µL DNS ajanı (Ek 4) eklenmiş ve 5 dak. kaynar suda bekletildikten sonra spektrofotometrik ölçüm (OD₅₄₀) gerçekleştirilmiştir. Kör ucu olarak enzim yerine dH₂O kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon sonucu kullanılmıştır. Bu ölçüm; reaksiyon karışımında serbest bırakılan indirgen şeker miktarını vermektedir. Buna göre, 1 ünite (U) selüloz enzim aktivitesi; deney koşulları altında daikada 1 µmol glukozun açığa çıkmasını sağlayan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (Li ve Yu, 2013b). Spesifik aktivitenin (U enzim/mg protein) belirlenmesi için deneyde kullanılan protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976).

3.6. Selülag Aktivitesinin Arttırılmasına Yönelik Optimizasyon Çalışmaları

3.6.1. Sıcaklık etkisi

Sıcaklığın selülag enzim aktivitesi üzerindeki etkisini araştırmak ve en yüksek aktivitenin elde edildiği sıcaklığı belirlemek için, selülag aktivite deneyinde inkübasyon sıcaklığı olarak 25, 37, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C kullanılmıştır. Selülag enziminin termostabilitesi için ham enzim solüsyonu (1µL); 25, 37, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve standart koşullarda (pH: 8.0, 3.4 M NaCl konsantrasyonu) aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Hiç muamele edilmeden doğrudan optimum koşullarda (pH: 8.0, 3.4 M NaCl) aktivitesi ölçülen enzime ait değer %100 olarak kabul edilmiş ve diğerlerinin aktivite değerleri rölatif % değeri olarak hesaplanmıştır.

3.6.2. pH etkisi

pH'in, selülag aktivitesi üzerindeki etkisi, 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 ve 10.0'lik bir pH aralığında optimum sıcaklık ve 3.4 M NaCl varlığında incelenmiştir. pH kararlılığı (stabilite)'nin belirlenmesi için, enzim, tamponun farklı pH değerlerinde (pH: 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 ve 10.0) ve optimum sıcaklıkta (50 °C) 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından, optimum (50 °C) sıcaklıkta selülag aktivite deneyi gerçekleştirilmiştir. Kontroldeki (ön inkübasyon uygulanmayan) selülag aktivitesi %100 olarak kabul edilip diğer pH koşullarındaki aktivite değerleri rölatif olarak hesaplanmıştır.

3.6.3. NaCl etkisi

Selülag aktivitesi; 0, 1, 2, 3, 4 ve 5 M NaCl konsantrasyonlarında incelenmiştir. Enzimin tuz stabilitesi, enzimi, optimum koşullarda (50 °C ve pH 8.0) farklı konsantrasyonlarda NaCl ile 24 saat boyunca inkübe edip aktivitesi 50 °C'de ölçülerek tespit edilmiştir. Kontrol aktivite değeri %100 alınıp diğer değerleri % rölatif olarak belirlenmiştir.

3.7. DNA Teknikleri ve Manipölasyonları

3.7.1. Genomik DNA izolasyonu

Haloarcula sp. ÇKT3 suşundan genomik DNA izolasyonu Qiagen DNA Extraction Mini Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SG sıvı besiyerinde üreyen kültürlerden 5 mL örnek alınıp 7.500 rpm’de 10 dak. santrifüj edilmiş, elde edilen pellet genomik DNA izolasyonunda kullanılmıştır. İzole edilen genomik DNA'ların konsantrasyonları ve kaliteleri NanoDrop® ND-2000 Spektrofotometresinde (Thermo Fisher Scientific) ölçülerek belirlenmiştir.

3.8.2. Plazmit izolasyonu

E. coli suşlarından plazmit izolasyonu için 37 °C’de 16 saat inkübe edilen kültürlerinden 3 mL çöktürölüp (13 000 rpm’de 1 dak. santrifüj ile) inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen hücrelerden GeneJET plazmit izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak, kit prosedüründe belirtilen şekilde plazmit izolasyonu yapılmıştır.

3.8.3. Primer Dizaynı

En iyi selölaz aktivitesinin belirlendiği *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşundan selölaz geninin çoğaltılmasında kullanılacak primerlerin dizaynı için NCBI veritabanından elde edilmiş olan *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 suşuna ait 1059 bp uzunluğundaki *celM* (HFX_2771) (selölaz, endo-1,3(4)-beta-glukanaz, peptidaz M42 aile proteini/endoglukanazı kodlayan gen) nükleotit dizisi kullanılmıştır (Gen Bank erişim no: CP001868.2) (<https://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AFK20447>) (Ek 1). Genin amplifikasyonu için gerekli olan primer dizaynı Primer3plus programı (<https://primer3plus.com>) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İleri ve geri primerlerin 5' bölgelerine sırası ile *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon kesim dizileri eklenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. *Haloarcula* sp. ÇKT3'e ait selülaaz geninin (*ÇKT3eg*) çoğaltılması ve dizilenmesi için kullanılan primerler

Primer Adı	Primer Dizisi	Beklenen ürün uzunluğu (bp)
celM_F	5' <u>ggatcc</u> atggacacacgacgacgc 3'	1059
celM_R	5' <u>aagctt</u> ctacacgtcgacgctaaagg 3'	

Çizelge 3.2'de yer alan ileri (celM_F) ve geri (celM_R) primerlerinin 5' uçlarında altı çizili olarak yer alan diziler sırasıyla *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerini göstermektedir.

3.8.4. Selülaaz enzimini kodlayan genin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyonu

Haloarcula sp. ÇKT3 suşundan selülaaz enzimini kodlayan geni (*ÇKT3eg*) çoğaltmak için uygulanan PZR içeriği ve koşulları Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. *ÇKT3eg* geninin PZR içeriği ve uygulanan koşullar

PZR içeriği	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon	PZR Koşulları	Sıcaklık °C	Süre	Döngü Sayısı
Reaksiyon Buffer (10X)	2.5	1 X	İlk Denatürasyon	95	10 dak	35 döngü
dNTP karışımı (10µM)	0.5	200 µM	Denatürasyon	95	40 sn	
İleri Primer (10 µM)	1.25	0.2 µM	Bağlanma	65	30 sn	
Geri Primer (10 µM)	1.25	0.2 µM	Uzama	72	1 dak	
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	2.5 µM	Son Uzama	68	5 dak	
DMSO	1		Bekleme	4	∞	
Taq DNA Pol (5 U/µL)	0.5	2.5 µM				
Kalıp DNA (50 ng)	1	50 ng				
dH ₂ O	15.5					

3.8.5. Restiriksiyon endonükleaz kesimleri

Klonlama çalışmalarında *BamHI* ve *HindIII* (Thermo Fisher Scientific) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır. Enzim reaksiyonları üretici şirketin tavsiye ettiği içerik ve koşullar baz alınarak yapılmıştır.

3.8.6. Agaroz jel elektroforezi

DNA örnekleri 1 mg/mL ethidyum bromür içeren %0.8 konsantrasyonunda hazırlanmış agaroz jelde, 45 dak. 80 V akım uygulanarak yürütülmüştür. Elektroforez tamponu olarak 1X TAE (Tris-asetat-EDTA) (Ek 4) kullanılmıştır. Elektroforez sonrası jeldeki DNA bantları UV transilluminatörde incelenmiştir.

3.8.7. DNA fragmentlerinin agaroz jelden ekstraksiyonu

Agaroz jel elektroforez işleminden sonra elde edilmek istenen DNA bantları jelden kesilerek Eppendorf tüplere alınmıştır. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) kiti kullanılarak kesilen bantların ekstraksiyonu yapılmıştır. Ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonu NanoDrop® ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) cihazında belirlenmiştir.

3.8.8. Ligasyon reaksiyonları

Ekstrakte edilen ürünlerin pGEM-T® Easy ve pET28a(+) vektörlerine yerleştirilmesi için hazırlanan ligasyon reaksiyonlarının içerik ve koşulları sırasıyla Çizelge 3.4 ve 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. ÇKT3eg jel ekstraktının pGEM-T® Easy vektörüne ligasyonu için gerekli içerikler ve uygulanan koşullar

İçerik	Hacim (µL)	Koşul
2X Ligasyon Tamponu	5	
T4 DNA Ligaz (Promega) (3 Weiss units/µL)	1	4 °C'de 16 saat inkübasyon
pGEM-T® Easy Vektör (50 ng)	1	

Jel Ekstraksiyon Ürünü (18 ng/ μ L)	3
--	---

Çizelge 3.5. Jelden ekstrakte edilen *ÇKT3eg* geninin pET-28a(+) vektörüne ligasyonu için gerekli içerikler ve koşullar

İçerik	Hacim (μ L)	Koşul
10X Ligasyon Tamponu	1	4 °C’de 16 saat inkübasyon
T4 DNA Ligaz (5U/L) (Thermo Fisher Scientific)	1	
pET-28a(+) vektörü (20 ng/ μ L)	1	
Jel Ekstraksiyon Ürünü (20 ng/ μ L)	1.7	
dH ₂ O	5.3	

3.8.9. *E. coli* alıcı (kompetant) hücre hazırlığı

E. coli alıcı hücreleri Hanahan (1983) tarafından önerilen RbCl₂ metodu kullanılarak hazırlanmıştır. *E. coli* DH5 α ve *E. coli* BL21 stokları -86 °C’den alınıp LB agar plaklarında canlandırılmış, tek koloni seçilip yeni hazırlanmış sıvı LB içerisine ekimi yapılarak 37 °C ve 220 rpm’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. 16 saat sonunda oluşan kültürlerden 3 mL kadar alınıp 200 mL LB besi ortamına ekim yapılmıştır. OD₆₀₀ değeri 0.4 ile 0.7 aralığına erişinceye kadar kültürler 37 °C’de 200 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. İstenilen OD₆₀₀ değeri elde edildikten sonra kültürler 15 dak. buz içinde bekletilip 3500 rpm’de 4 °C’de 5 dak. santrifüje tabi tutulmuştur. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet 20 mL soğuk tampon 1 (Ek 4) çözeltisinde çözülmüş ve santrifüj yapılmıştır. Oluşan pellet 8 mL soğuk tampon 2 (Ek 4)’de çözülerek 100 μ L’lik hacimlerde ependorflara ayrılmıştır. 20 dak. buz içerisinde inkübe edilen tüpler sıvı azot ile dondurulmuş ve -86 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.8.10. *E. coli* alıcı hücrelerinin transformasyonu

E. coli alıcı hücrelerinin transformasyonu Sambrook vd (1989) tarafından optimizasyonu yapılmış metot ile gerçekleştirilmiştir. -86 °C’de muhafaza edilen 100 µL’lik hacimdeki *E. coli* alıcı hücrelerinin buz içerisinde bir süre çözünmeleri sağlanmıştır. Alıcı hücrelerin içerisine 1-10 µL hacimde plazmit DNA (1-50 ng) ya da ligasyon ürünü eklenerek yavaşça pipetleme yapılmıştır. Daha sonra Eppendorf tüpler 30 dak. buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre ile DNA karışımı 42 °C’de 60 sn. ısı şokuyla muamele edilmiştir. Ardından, buz içerisinde 5 dak. inkübasyona bırakılmıştır. Karışımın üzerine 900 µL SOC besiyeri (Ek 3) eklenerek 37 °C’de, 1 saat boyunca ve 150 rpm çalkalama hızında inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda ve 3400 rpm’de 10 dak. santrifüj sonrasında pellet 100 µL SOC besiyerinde çözülmüştür. Bakteri çözeltisi seçici antibiyotik içeren LB agarlı plaklara (LA) yayma ekim yöntemi ile ekildikten sonra 37 °C’de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.9. Dizileme Reaksiyonu

DNA dizileme GENOKS (Ankara) firması aracılığı ile BGI (Hong Kong) firmasına yaptırılmıştır. Dizileme için PZR’de kullanılan ileri ve geri primerler kullanılmıştır. Sanger dizileme yöntemi kullanılarak AB3730xl cihazında kapiller ayırım ile yapılan dizileme sonucunda elde edilen nükleotit dizileri BLAST programı aracılığı ile veri tabanındaki dizilerle karşılaştırılmıştır. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.10. Rekombinant *E. coli* BL21 Hücrelerinde *Haloarcula* sp. ÇKT3 Suşuna Ait Selülaz Enziminin Saflaştırılması

3.10.1. Selülaz geninin IPTG ile indüklenmesi

Selülaz geninin IPTG ile indüklenmesi Kurt (2011) tarafından optimizasyonu yapılmış metot ile gerçekleştirilmiştir. Rekombinant *E. coli* BL21 suşuna ait stoklardan 10 mL LB besiyerine 100 µL ekim yapıp 37 °C’de 200 rpm’de 16 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından, ön kültürden alınan 2’şer mL kültür 100 mL LB içeren 2 farklı erlene ekilip aynı koşullarda inkübe edilmiştir. OD₆₀₀ 0.6 değerine geldiğinde erlenlerin birine IPTG (1mM) eklenip diğerine kontrol amacıyla IPTG eklemesi yapılmamış ve 5 saat boyunca inkübasyon devam ettirilmiştir. 5 saat

sonunda kültürler falkonlara alınarak, 4 °C’de ve 6000 rpm’de 15 dak. santrifüjün ardından pellet protein izolasyonunda kullanılmıştır.

3.10.2. Selülaz enziminin saflaştırılması

Enzimin saflaştırılması için Kurt (2011) tarafından optimize edilen metot kullanılmıştır. Örnekler 6x10 sn. boyunca ve 5 sn. aralıklarla 8 kez sonike edilmiştir (%75 amplitude) (Sonics Vibra Cell). Sonike edilen örnekler, 15000 rpm’de, 4 °C’de, 15 dak. santrifüj edilerek pelletler çöktürülmüştür. Alınan süpernatantlar -86 °C’de muhafaza edilmiştir. Selülaz enziminin HisTag pürifikasyonu için öncelikle kolon (Protino® Ni-TED 2000 Packed Columns Macherey-Nagel), 4 mL LEW tamponu (10 mM imidazol, pH: 8.0) (Ek 4) ile dengelenmiştir ve süpernatant yavaş yavaş kolona aktarılmıştır. Daha sonra, kolon 3 kez 20 mM imidazol içeren LEW tamponu ile yıkanmıştır. Örnekler 3 mL Elüsyon Tamponu (Ek 4) ile kolondan indirilmiştir. Örneğin 100 µL’si ayrılarak ekspresyonu kontrolü etmek amacıyla SDS-PAGE analizi için kullanılmıştır. Kalan örnekler için 4 °C’de 16 saat süresince diyaliz tamponunda (Ek 4) diyaliz edilerek renatüre edilmiştir. Renatüre olan örnekler, küçük hacimler halinde -86 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.11. Selülaz Enziminin Konsantrasyon Tayini

Selülaz enzim konsantrasyonu kuantifikasyon metodu ile belirlenmiştir (Bradford, 1976). Deney, asidik Coomassie Brilliant Blue G-250 solüsyonunun proteine bağlandığında absorbensinin 465’den 595 nm’ye değişiminden kaynaklanan görünür bir renk değişiminin gözlemine dayanmaktadır. Protein kalibrasyon eğrisini hazırlamak için sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Farklı Eppendorf tüplere 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan BSA’dan 2, 4, 6, 8 ve 10 µL eklenmiş ve hacimler dH₂O ile 100 µL’ye ayarlanmıştır. Kör uc için, Eppendorf tüp içine sadece 100 µL dH₂O eklenmiştir. Her tüpe 900 µL Bradford ajanı (Ek 4) eklenmiş ve vorteks ile solüsyon karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dak. inkübasyondan sonra, protein konsantrasyonları OD₆₀₀ & µg protein eksenli standart eğri kullanılarak belirlenmiştir.

3.12. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorez (SDS-PAGE)

Analizi

Diyaliz ürünü proteinleri denatüre koşullar altında %4.5 istifleme ve %16 ayrılma poliakrilamid jelinde yürütülmüştür. Elektrophorez sırasında jele 16 A akım uygulanmıştır. SDS-poliakrilamid jellerin hazırlanışı Çizelge 3.6'da verilmiştir (Laemmli, 1970).

Çizelge 3.6. Poliakrilamid jel hazırlanması

	İstifleme jeli	Ayrılma jeli
Monomer konsantrasyonu	%4.5	%16
Akrilamid/bis	1.3 mL	6 mL
dH₂O	6.1 mL	1.35 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	2.5 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL	-
%10 (w/v) SDS	100 µL	100 µL
%10 Amonyum persülfat	50 µL	50 µL
TEMED	10 µL	5 µL
Toplam monomer	10 mL	

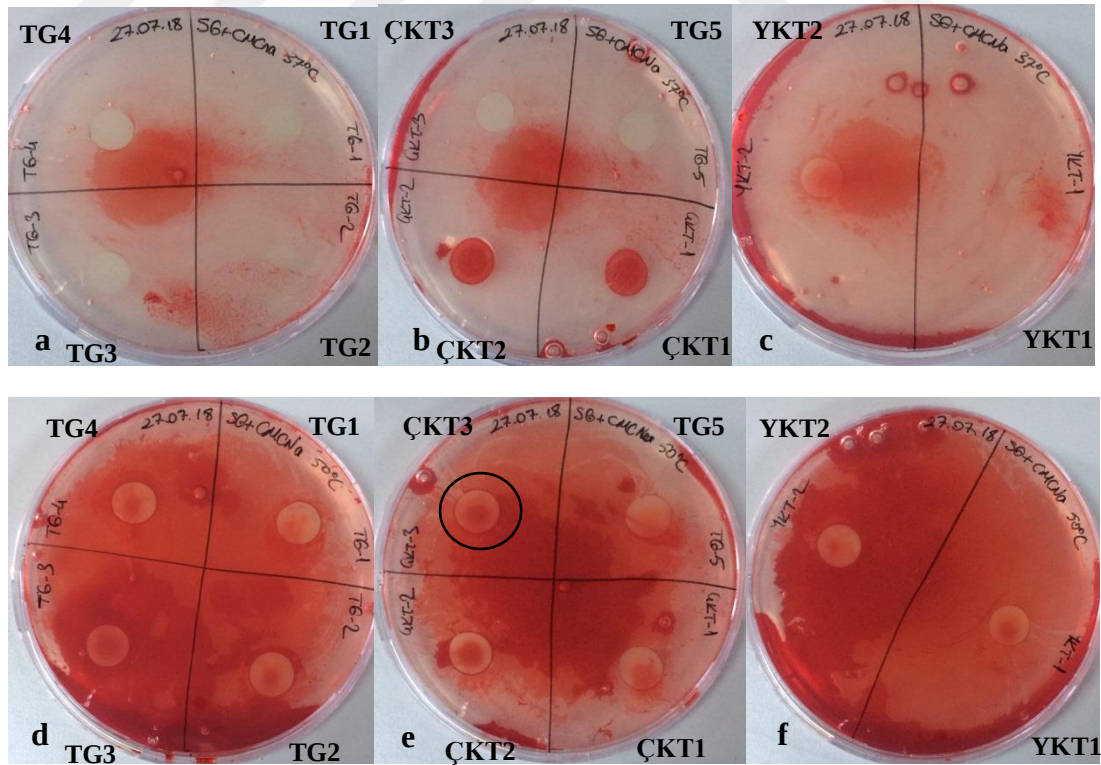
3.13. SDS-PAGE'in Coomassie Blue R-250 ile Boyanması

SDS-Poliakrilamid jellerin elektrophorez sonrasında oda sıcaklığında 45 dak. boyunca 50 mL hacminde taze hazırlanmış Coomassie Blue R-250 (Ek 4) içinde boyanması sağlanmıştır. Jeller boya arındırma çözeltisinde (Ek 4) 2-3 saat inkübe edildikten sonra görüntülenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

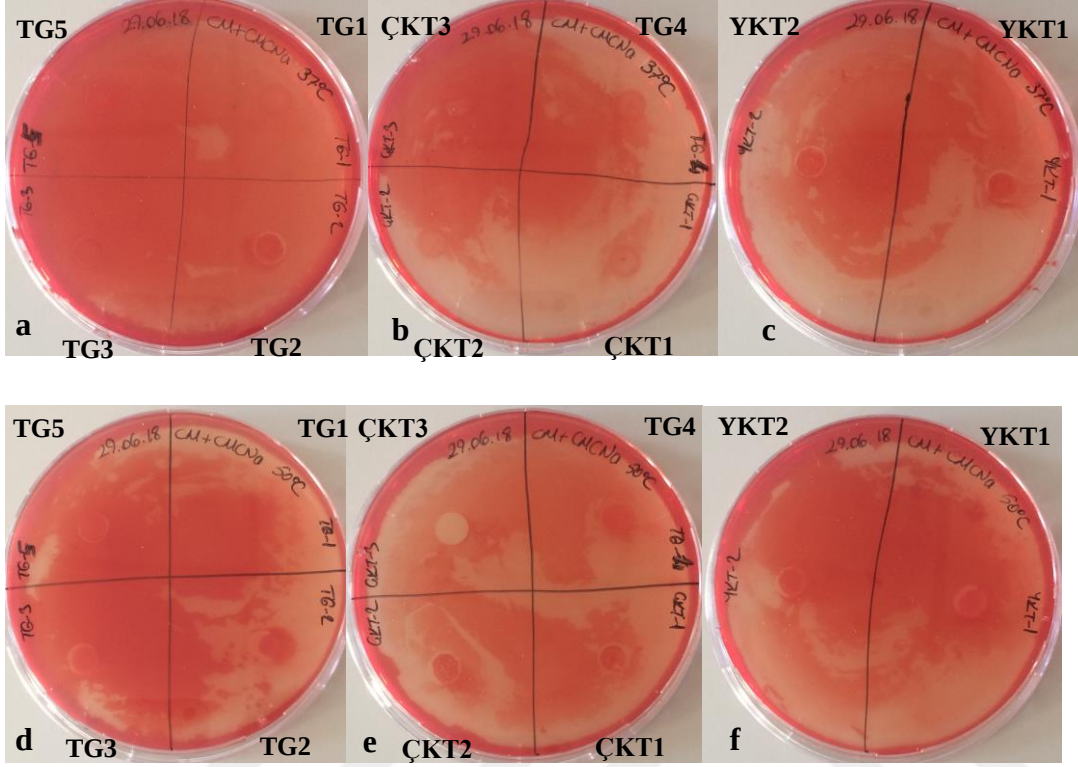
4.1. Farklı Besiyerleri ve İnkübasyon Sıcaklıklarında Suşlara Ait Selüloz Aktivitelerinin Nitel Olarak Belirlenmesi

Suşlara ait gliserol stoklarından 50 mL SG besiyerine 1 mL ekilmiş, kültürler 37 °C’de ve 150 rpm’de yaklaşık 5 gün ($OD_{600}=1.8-2.0$) inkübe edilmiştir. Ardından, ön kültürlerden 20 µL alınarak 5 g/L CMCNa içeren SG, CM, DSM, SCM, MH ve NM (SG+CMCNa, CM+CMCNa, DSM+CMCNa, SCM+CMCNa, MH+CMCNa ve NM+CMCNa) katı besiyerleri üzerine damlatılmıştır. Kültürler iki farklı sıcaklıkta (37 ve 50 °C) 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmışlardır (Li ve Yu, 2013b). İnkübasyon sonrasında, kültürlerin üzerine Kongo Red (% 0.1) (Ek 4) çözeltisi ilave edilmiştir. 15 dak. inkübasyon sonrasında boya dökülüp petri yüzeylerine 1 M NaCl çözeltisi eklenmiştir. Tekrar 15 dak. inkübasyon sonrasında, NaCl çözeltisi dökülerek petri yüzeyinden uzaklaştırılmıştır (Budihal vd, 2016). Boyama işlemi sonunda 37 ve 50 °C’de inkübe edilen suşların etrafında oluşan zonlar Şekil 4.1-4.6’da gösterilmiştir.

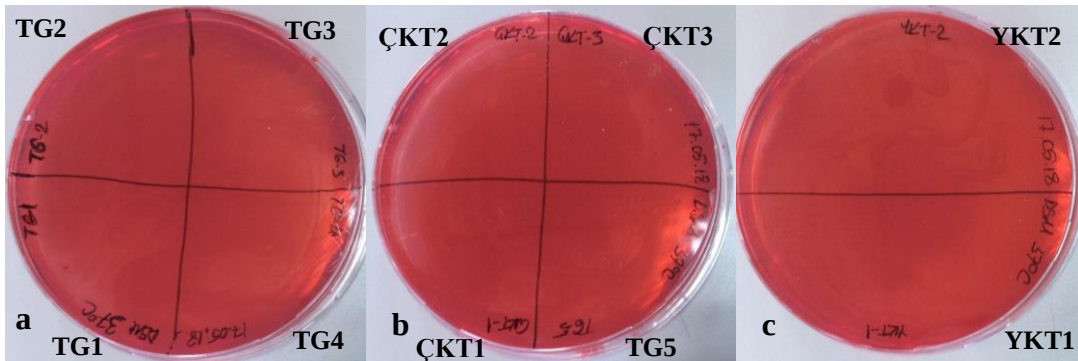


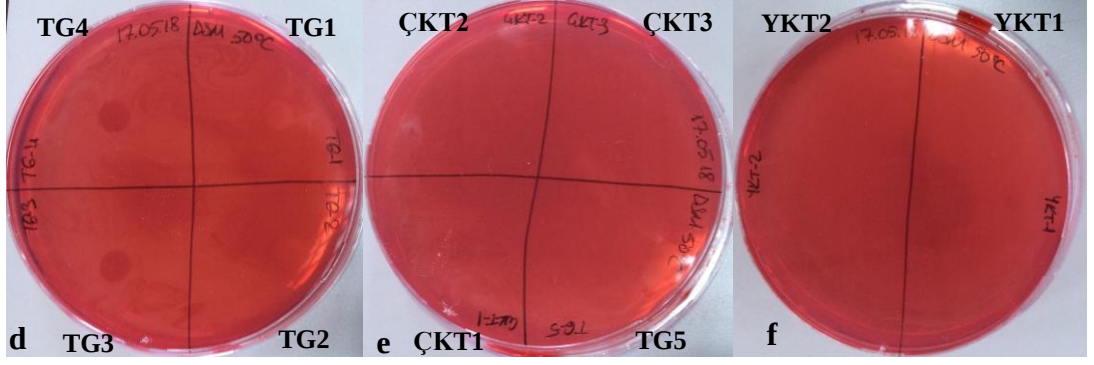
Şekil 4.1. SG+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüloz aktivite sonuçları. 37 °C (a, b ,c) ve 50 °C (d, e, f). Suşlar: (a,d) *Haloarcula* sp.

TG1, TG2, TG3, TG4; (b, e) *Haloarcula* sp. TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3;
(c, f) *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2

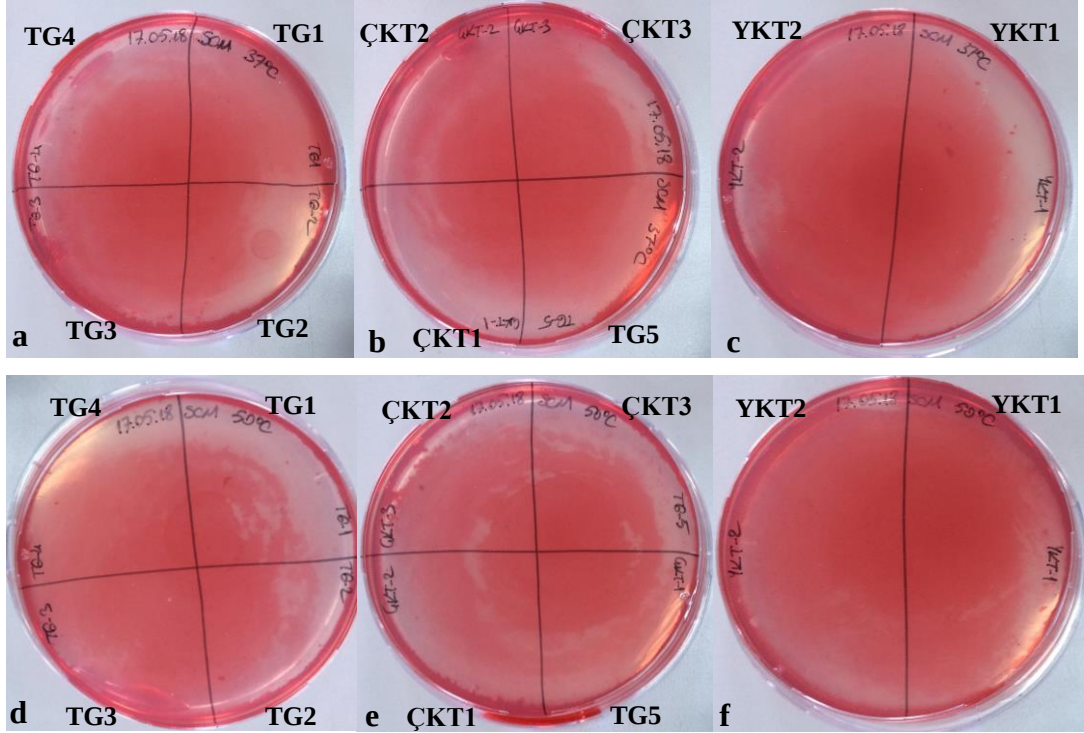


Şekil 4.2. CM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüloz aktivite sonuçları. 37 °C (a, b ,c) ve 50 °C (d, e, f). Suşlar: (a, d) *Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4; (b, e) *Haloarcula* sp. TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3; (c, f) *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2

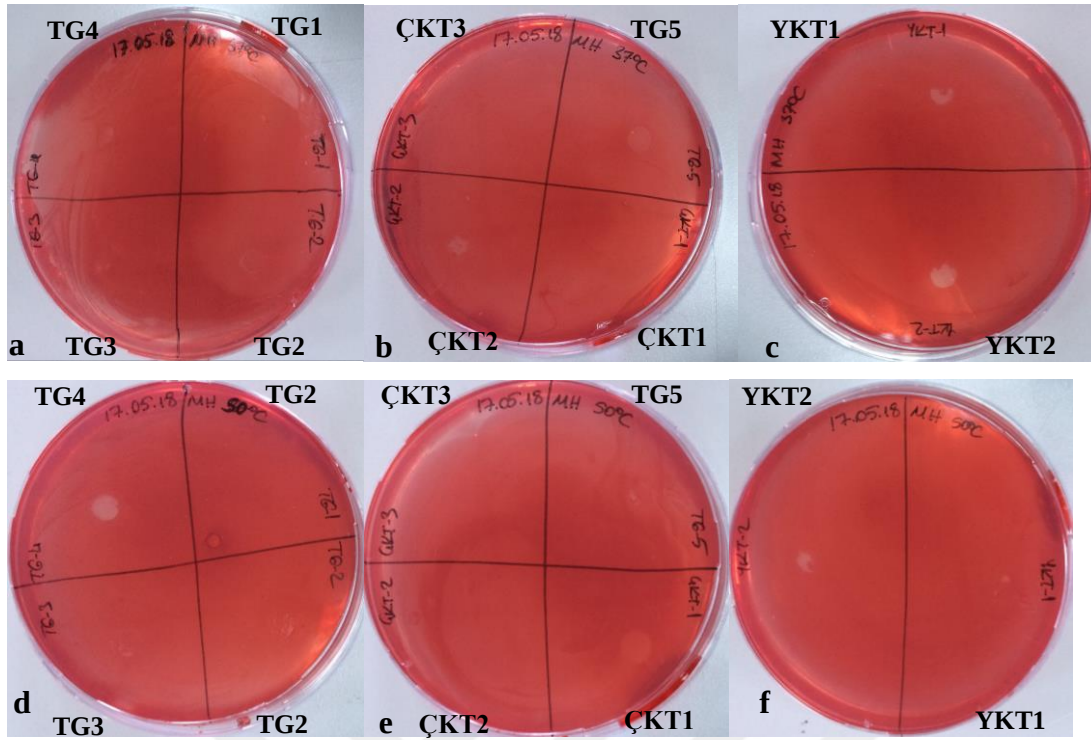




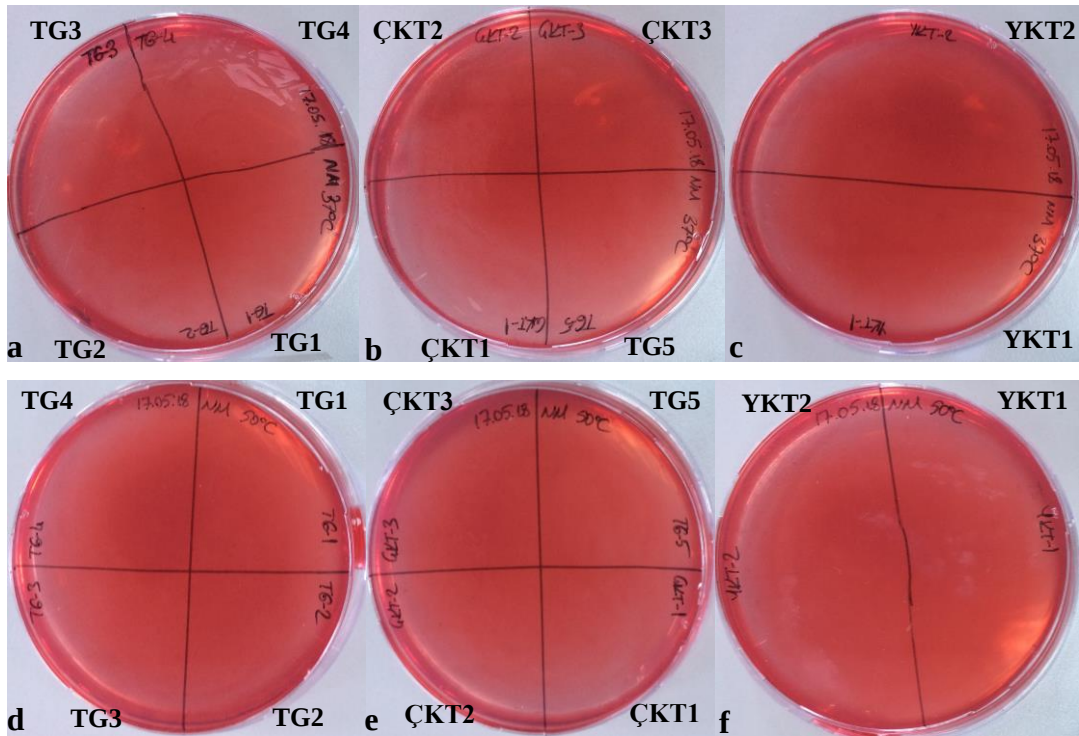
Şekil 4.3. DSM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selülag aktivite sonuçları. 37 °C (a, b,c) ve 50 °C (d, e, f). Suşlar: (a, d) *Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4; (b, e) *Haloarcula* sp. TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3; (c, f) *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2



Şekil 4.4. SCM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selülag aktivite sonuçları. 37 °C (a, b ,c) ve 50 °C (d, e, f). Suşlar: (a, d) *Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4; (b, e) *Haloarcula* sp. TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3; (c, f) *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2



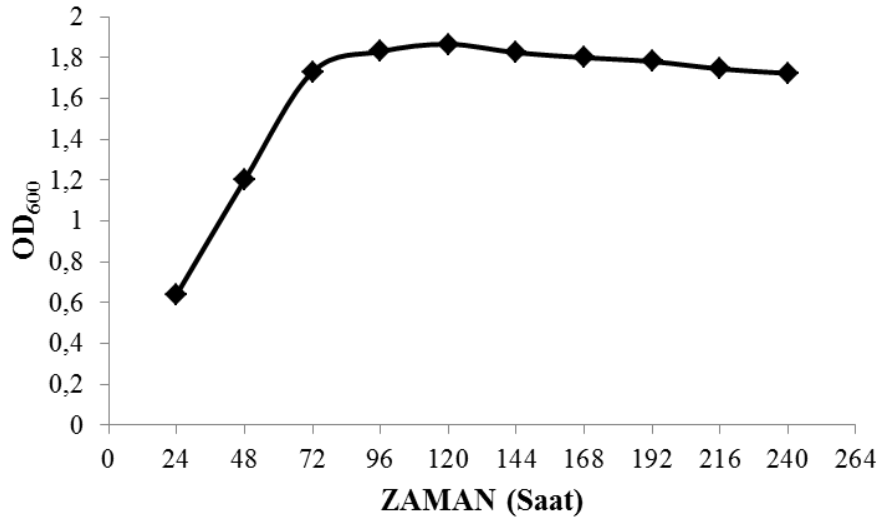
Şekil 4.5. MH+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selüloz aktivite sonuçları. 37 °C (a, b,c) ve 50 °C (d, e, f). Suşlar: (a, d) *Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4; (b, e) *Haloarcula* sp. TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3; (c, f) *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2



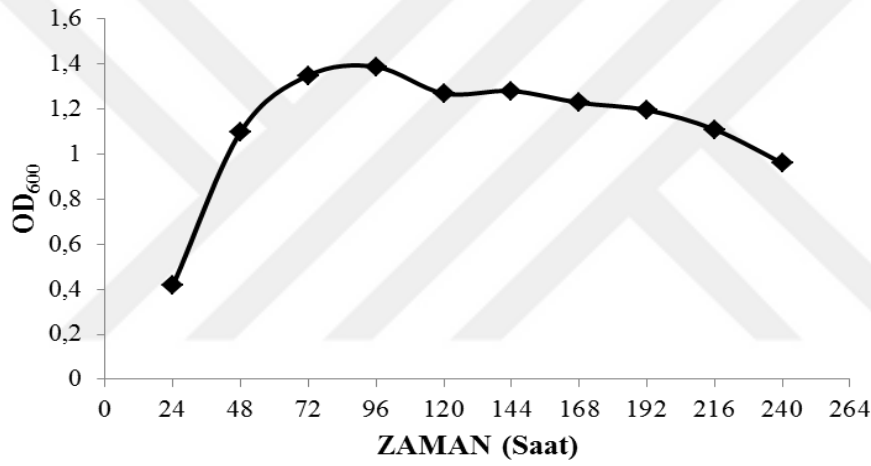
Şekil 4.6. NM+CMCNa besiyerlerinde üreyen kültürlerle ait selülaaz aktivite sonuçları. 37 °C (a, b ,c) ve 50 °C (d, e, f). Suşlar: (a, d) *Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4; (b, e) *Haloarcula* sp. TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3; (c, f) *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2

Haloarcula sp. TG1-TG5, ÇKT1-ÇKT3 ve *Halolamina* sp. YKT1-YKT2 suşlarının selülaaz üretimlerinin altı farklı besiyeri ve iki farklı inkübasyon sıcaklığında karşılaştırıldığı deneyler sonucunda, SG ve CM kültürlerinde belirgin selülaaz zonlarının oluşumu tespit edilmiştir. CM besiyeri *Haloarcula* sp. LLSG7 suşunun selülaaz üretiminin tespitinde kullanılan bir besiyeridir (Li ve Yu, 2013b). SG besiyeri ise özellikle ekstrem haloarkelerin iyi üreme gösterdikleri besiyerlerinden biridir (Abanoz, 2016). Diğer dört besiyerinden biri olan SCM; genellikle selülaaz üretimi için kullanılan (Actinobacteria) (Budihal vd, 2016), MH ise halofilik bakterilerin üremeleri için son derece uygun bir besiyeridir (Mandels, 1975). DSM besiyeri, selülotik mikroorganizmaların izolasyonları ve üretimleri için kullanılmaktadır (Lo vd, 2009). Son olarak, NM besiyeri halofilik suşların yüksek selülaaz aktivitesi gösterdiği besiyerilerlerinden biridir (Hendricks vd, 1995). Bununla birlikte, DSM, SCM, MH ve NM besiyerlerinin bu çalışmada *Haloarcula* ve *Halolamina* sp. suşlarının üremeleri ve selülaaz üretimleri üzerinde olumlu etkileri gözlenmemiştir (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, ve 4.6).

İki farklı inkübasyon sıcaklığı karşılaştırıldığında, 50 °C’de inkübe edilen suşlara ait kültürlerin selülaaz üretiminin 37 °C’de inkübasyona kıyasla biraz daha belirgin olduğu ve en iyi selülaaz üretiminin 50 °C’de SG+CMCNa besiyerinde *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşu tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Bununla birlikte, *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunun iki farklı sıcaklıkta zamana bağlı üreme grafikleri karşılaştırıldığında 37 °C’de üreyen suşların daha fazla üredikleri ve ölüm fazına daha uzun sürede girdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Bu sebeple, bakterinin üremesi ve inkübasyon süresi dikkate alınarak, selülaaz üretimi için inkübasyon sıcaklığı 37 °C olarak belirlenmiştir.



(a)



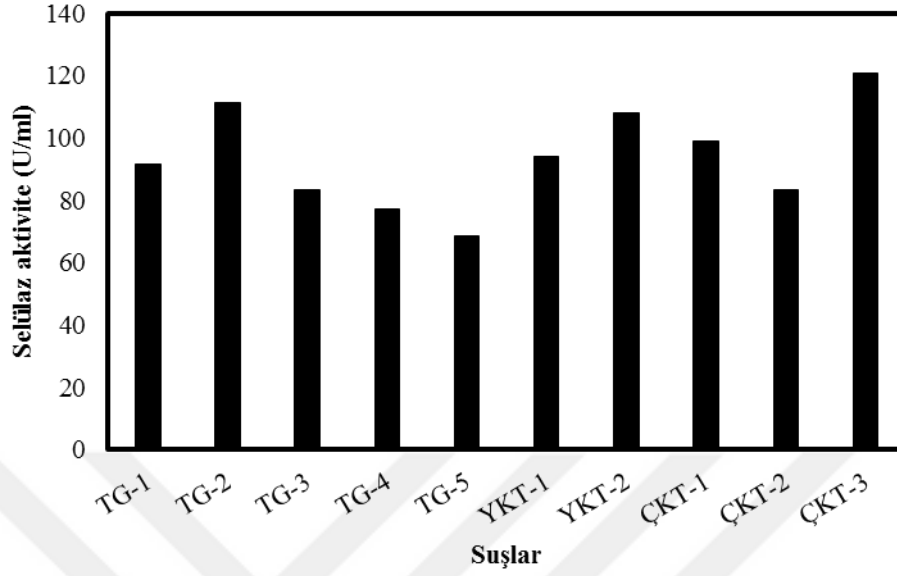
(b)

Şekil 4.7. 37 (a) ve 50 (b) °C’lerde inkübe edilen *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunun zamana bağlı üreme profili

4.2. CM’de Tüm Suşlara Ait Nicel Selüloz Aktivitesinin Belirlenmesi

Suşlara ait gliserol stoklarından 50 mL SG besiyerine 2’şer mL ekim yapılmış, 37 °C, 150 rpm ve 3 gün inkübasyon sonrasında ön kültürlerden 1 mL alınıp 150 mL CM besiyerine transfer edilmiştir. Aynı koşullarda 5 günlük CM fermantasyonu sonrasında elde edilen ham enzim kullanılarak standart deney koşullarında (50 °C, pH: 8.0, 3.4 M NaCl) DNS metodu ile tüm suşlara ait selüloz aktiviteleri nicel olarak belirlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, *Haloarcula* sp. ÇKT3’nin diğer suşlara

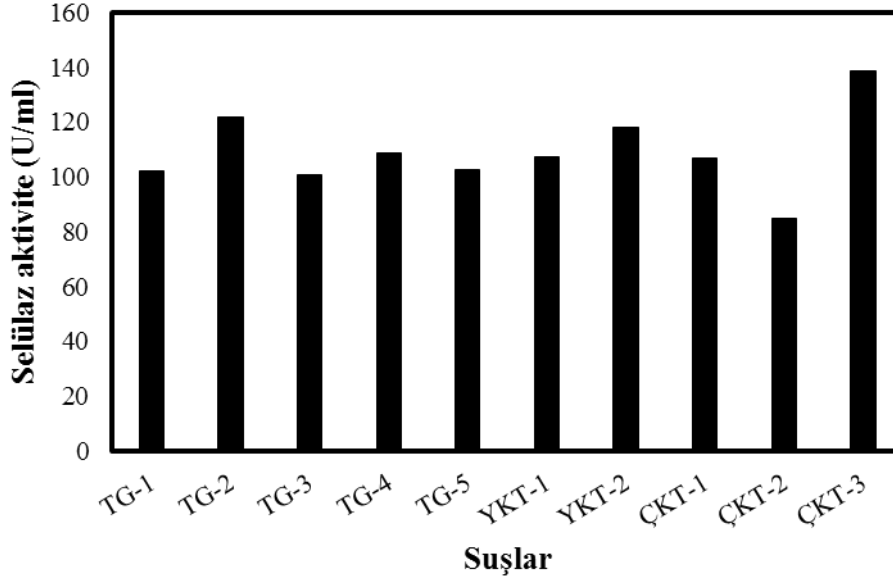
kıyasla selülag aktivitesinin daha yüksek olduğu gör÷lmektedir (120.7 U/mL) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. CM besiyerinde üreyen suşlara ait selülag aktivitesi

4.3. SG’de Tüm Suşlara Ait Nicel Selülag Aktivitesinin Belirlenmesi

Aynı koşullarda, CM yerine SG fermantasyonu ile elde edilen süpernatantlardan ham enzim elde ettikten sonra standart deney koşulları uygulanarak (50 °C, pH: 8.0, 3.4 M NaCl) tüm suşların selülag aktiviteleri belirlenmiştir. SG besiyerinde üreyen *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunun diğerlerine kıyasla selülag aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (138.51 U/mL) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. SG besiyerinde üreyen suşlara ait selülaz aktivitesi

İki farklı kültürde suşların enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, en iyi selülaz aktivitesinin elde edildiği suşun *Haloarcula* sp. ÇKT3, en iyi aktivitenin gözlemlendiği besiyerinin ise SG olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu nedenle, selülaz enzim karakterizasyonu için *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşu ve SG kültürleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. *Haloarcula* ve *Halolamina* sp. suşlarının CM ve SG kültürlerindeki selülaz üretimleri (U/mL)

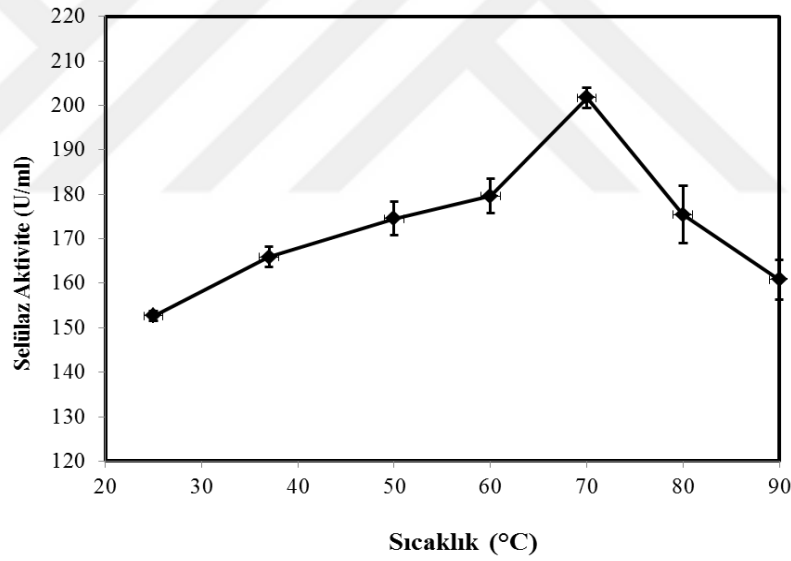
Selülaz aktivitesi (U/mL)		
Besiyerleri		
Suşlar	CM	SG
<i>Haloarcula</i> sp. TG1	91.4862	102.168
<i>Haloarcula</i> sp. TG2	111.402	121.993
<i>Haloarcula</i> sp. TG3	83.3956	100.846
<i>Haloarcula</i> sp. TG4	77.172	108.776
<i>Haloarcula</i> sp. TG5	68.7778	102.828
<i>Halolamina</i> sp. YKT1	93.9756	107.454
<i>Halolamina</i> sp. YKT2	108.29	118.028
<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT1	98.9544	106.794
<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT2	83.3956	84.9855
<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3	120.737	138.514

Çalışmanın devamında, *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşuna ait selülaazın karakterizasyonu amacıyla enzim aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, NaCl ve çeşitli organik çözücülerin etkisine bakılmıştır.

4.4. *Haloarcula* sp. ÇKT3 Suşunun Selülaaz Aktivitesinin Arttırılmasına Yönelik Optimizasyon Çalışmaları

4.4.1. Sıcaklık etkisi

Haloarcula sp. ÇKT3 suşundan elde edilen ham selülaaz enzimi kullanılarak farklı sıcaklıkların enzim aktivitesi üzerindeki etkisine bakılmıştır. Bu amaçla, DNS deneyindeki inkübasyon için farklı sıcaklık değerleri (25, 37, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C) denenmiştir. Deney üç tekrarlı olarak yapılmıştır ve ölçülen değerler standart hatalar dikkate alınarak hesaplanmıştır. 201.7 U/mL değeri ile *Haloarcula* sp. ÇKT3 selülaaz enzimine ait en iyi aktivitenin 70 °C’de elde edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



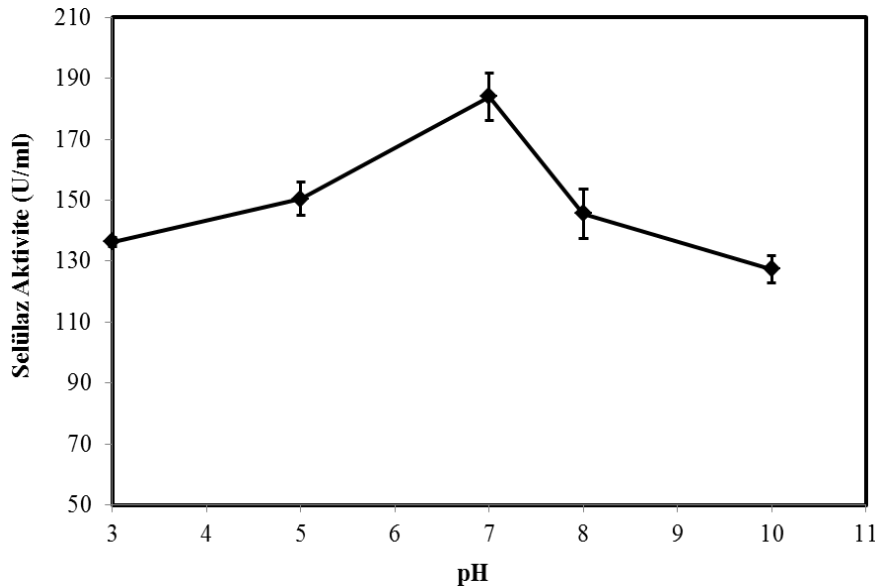
Şekil 4.10. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunda selülaaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Premalatha vd (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, *Enhydrobacter* sp. ACCA2 suşundan elde edilen selülaaz enzimi için optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla 25 ile 45 °C sıcaklık aralığında, en iyi selülaaz aktivitesinin 30 °C elde edildiği bulunmuştur. Li vd (2012b)’e ait bir çalışmada, Çin’in Yuncheng Tuz Gölü’ndeki tuzlu topraktan izole edilen halofilik suş *Thalassobacillus* sp. LY18’den elde edilen selülaaz enziminin 30-90 °C aralığındaki aktivitesi belirlenmiş ve en iyi

aktivite için optimum sıcaklığın 60 °C olduğu görülmüştür. Ayrıca, aynı lokasyondan izole edilmiş halofilik bir arke olan *Haloarcula* sp. LLSG7 suşuna ait selüloz enziminin 20-90 °C aralığındaki aktivitesi belirlenmiş ve en iyi aktivite için optimum sıcaklığın 50 °C olduğu görülmüştür (Li ve Yu, 2013b). Başka bir çalışmada, ABD-Utah eyaletindeki Büyük Tuz Gölü'nden izole edilmiş, ekstrem bir halofilik arke olan *Halorhabdus utahensis*'den üretilen selüloz enziminin aktivitesi için optimum sıcaklığın 55 ve 75 °C aralığında olduğu belirlenmiştir (Wainø ve Ingvorsen, 2003). Son iki çalışmada görüldüğü üzere, halofilik mikroorganizmalarda özellikle de haloarkelerde selüloz aktivitesi için optimum sıcaklık 50 °C ve üzerindeki değerlere karşılık gelmektedir. Bu çalışmada da, 70 °C'lik optimum sıcaklık değeri ile *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham selüloz enzimi yüksek sıcaklıkta en yüksek aktivitesini göstermektedir.

4.4.2. pH etkisi

Haloarcula sp. ÇKT3 suşunun selüloz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisine bakmak için DNS deneyi optimum inkübasyon sıcaklığı olarak 70 °C ve 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 ve 10.0 pH değerlerinde üç tekrarlı olarak yapılmıştır. En iyi selüloz aktivitesi 184.017 U/mL değeri ile pH: 7.0'de elde edilmiştir (Şekil 4.11).

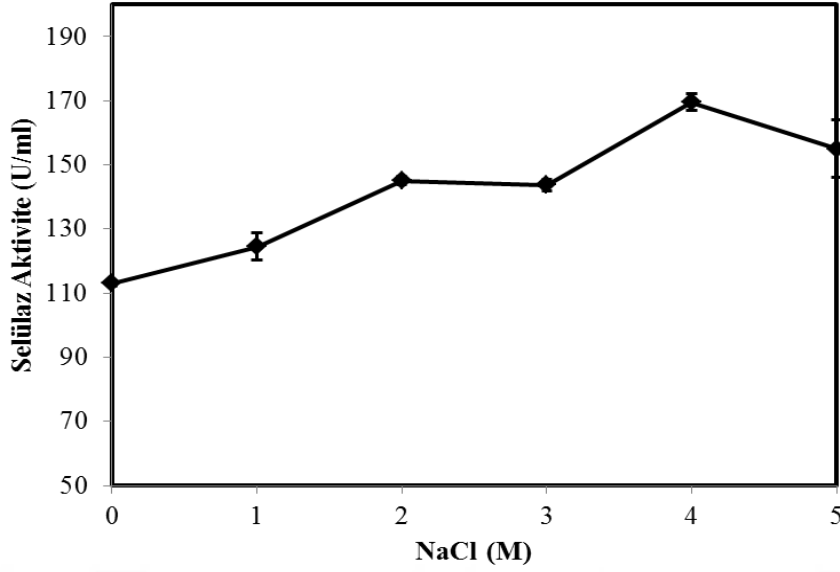


Şekil 4.11. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunda optimum sıcaklıkta selüloz enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Endo vd (2001)'ne ait çalışmada, halofilik *Bacillus* cinsi bakterilerden elde ettikleri selüloz enziminin 8.5 ile 10.0 arasında pH değerlerinde optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Başka bir çalışmada, alkalifilik *Bacillus sphaericus* JS₁'e ait alkali özellikteki selüloz enziminin pH: 7.0-12.0 aralığındaki aktivite değerlerine bakılmış ve en iyi aktivitenin pH: 8.0 değerinde elde edildiği görülmüştür (Singh vd, 2004). Wang vd (2016b)'ne ait çalışmada psikofilik *Cellulophaga algicola* IC166^T suşundan elde edilen selüloz enziminin pH: 1.0-12.0 aralığındaki aktivitesi değerlendirilmiş ve en iyi aktivitenin pH: 6.0 değerinde olduğu saptanmıştır. Halofilik arke *Haloarcula* sp. LLSG7, halofilik bakteriler *Bacillus* sp. L1 ve *Thalassobacillus* sp. LY18'ye ait selüloz enzimlerinin en iyi aktivite gösterdikleri pH aralığının 7.0 ila 8.5 olduğu gözlemlenmiştir (Li vd, 2012b; Li ve Yu, 2012, 2013b). Mevcut çalışmada, pH: 10.0 değerinde aktivitenin düşmesi sebebiyle pH: 11.0 ve daha alkali değerlerde aktivite ölçümleri yapılmamıştır. Sonuç olarak, *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşundan elde edilen selüloz için optimum pH değeri 7.0 olup diğer halofilik suşların optimum pH profiline uymaktadır.

4.4.3. NaCl etkisi

Haloarcula sp. ÇKT3 suşunun selüloz enzim aktivitesi üzerine NaCl'nin etkisini incelemek amacıyla deney optimum inkübasyon sıcaklığı (70 °C) ve optimum pH değeri (7.0) kullanılarak 0, 1, 2, 3, 4, ve 5 M NaCl konsantrasyonlarında üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşuna ait en iyi selüloz aktivite değeri 169.58 U/mL olup, optimum koşullar 70 °C sıcaklık, pH: 7.0 ve 4 M NaCl olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunda optimum sıcaklık ve pH'da selülaz enzim aktivitesi üzerine NaCl'nin etkisi

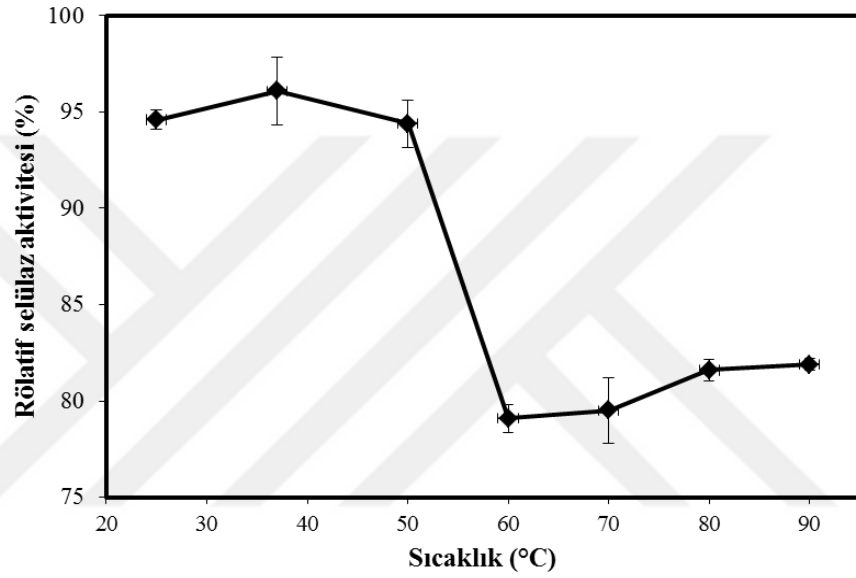
Wang vd (2009)'ne ait bir çalışmada, *Salinivibrio* sp. NTU-05 suşundan elde edilen selülaz enziminin %0 ile 30 NaCl aralığında aktivite değerleri ölçülmüş ve en iyi aktivitenin %5 NaCl'de (0.85 M) olduğu gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada, Çin'in Yuncheng Tuz Gölü'nden izole edilen *Gracilibacillus* sp. SK1 suşu kullanılarak üretilen selülaz enzimi optimum %7.5 ile %17.5 (1.2-3 M) NaCl aralığında aktivite göstermiş ve %12.5 (2.1 M) NaCl'de en iyi selülaz aktivitesi tespit edilmiştir (Yu ve Li, 2015). Sonuçlar incelendiğinde, halofilik selülazlarda tuz ihtiyacı değişmekle birlikte *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selülazın, diğer halofilik mikroorganizmalara göre daha yüksek NaCl (4 M) varlığında aktivite gösterdiği saptanmıştır.

4.5. Selülaz Enziminin Stabilitesi

4.5.1. Selülaz enziminin termostabilitesi

Haloarcula sp. ÇKT3 suşuna ait ham selülaz enziminin termostabilitesini belirleyebilmek için ham enzim solüsyonu 25, 37, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve standart koşullarda (50 °C, pH: 8.0, 3.4 M NaCl) deney gerçekleştirilerek selülaz aktivite değerleri hesaplanmıştır. Sıcaklık ile ön muamelesi yapılmamış enzimin kullanıldığı kontrol

reaksiyonundan elde edilen aktivite değeri %100 kabul edilerek selüloz aktiviteleri rölatif % değeri olarak hesaplanmıştır. Termostabilite deney sonuçlarına göre, en yüksek aktivite değeri %96.1 ile 37 °C'deki 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilirken, selüloz enziminin kararlılığı 37-50 °C sıcaklık aralığında %95 oranındadır. 60-90 °C arasında ise %80 oranında aktivitesini devam ettirmekte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Elde edilen değerler, *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham selülozının yüksek sıcaklıklarda uzun süreli inkübasyonunun aktivitesi üzerinde en fazla %20 oranında kayba neden olduğunu göstermektedir.



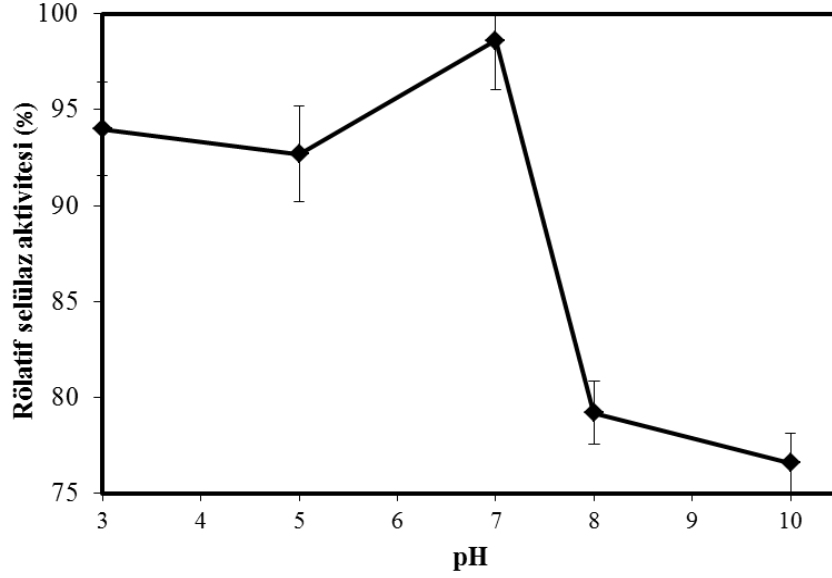
Şekil 4.13. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selüloz enziminin termostabilitesi

Simankova vd (1993)'nin Ukrayna'da bulunan Syvash Gölü'nün yüksek tuz konsantrasyonlu bölgelerinden izole ettikleri bir halofilik *Halocella cellulolytica* suşuna ait ham selüloz enziminin kararlılığını test etmek amacıyla 20-50 °C aralığında 24 saat süreyle enzim aktivitesinin stabilitesini değerlendirmişler ve en iyi aktivitenin 39 °C olduğunu tespit etmişler. Li ve Yu (2012) tarafından yapılan çalışmada, halotolerant *Bacillus* sp. L1 suşuna ait halofilik selülozın 20-90 °C aralığında 24 saat süreyle stabilitesini test etmişlerdir. Deney sonucunda, 20-70 °C aralığında aktivitenin %90'ından fazlasının korunduğu 80 °C'de aktivitenin %80 oranında korunduğu ve 90 °C ise enzimin tamamen inhibe olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada, endofitik bir bakteri olan *Bacillus pumilus* kullanılarak elde edilen selüloz enziminin 35-75 °C sıcaklık aralıklarında 24 saat süreyle kararlılığı denenmiş ve 35-

55 °C aralığında aktivitenin %95'inden fazlasının korunduğu, 60 °C'den sonra ise aktivitenin tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir (Lima vd, 2005). Li ve Yu (2013a) tarafından yapılan çalışmada ise halofilik arke *Haloarcula* sp. G10 suşuna ait halofilik selülazın 20-90 °C aralığında 24 saat süreyle stabilitesi test edilmiştir. Deney sonucunda, 20-70 °C aralığında aktivitenin %90'ından fazlasının korunduğu, 80°C'de aktivitenin %70'e düştüğü, 90 °C ise enzimin tamamen inhibe olduğu saptanmıştır. Literatür ile karşılaştırıldığında, *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşuna ait ham selülaz enzimi 90 °C bile %80 oranında aktivitesini koruduğundan diğer halofiliklere kıyasla oldukça termostabil bir enzim olarak endüstriyel açıdan avantaj sunmaktadır.

4.5.2. Selülaz enziminin pH stabilitesi

Haloarcula sp. ÇKT3 suşuna ait ham selülaz enziminin pH kararlılığının belirlenmesi için, enzim, kullanılan tamponun farklı pH değerlerinde (pH: 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 ve 10.0) ve standart koşullarda (50 °C, pH: 8.0 ve 3.4 M NaCl) 24 saat inkübe edilip aktivite deneyi gerçekleştirilmiştir. Kontroldeki (ön inkübasyon uygulanmayan ve pH: 8.0) selülaz aktivitesi %100 olarak kabul edilip diğer pH koşullarındaki aktivite değerleri rölatif olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, ham selülaz aktivitesinin en yüksek değeri pH: 7.0'de %98.6'lık bir kararlılıkta elde edilmiştir. pH stabilitesi pH: 7.0-8.0 aralığında ciddi oranda düşmüştür (%98.6'dan %79.2 değerine düşüş). pH:10.0'daki kararlılığı %76.6 bulunmuştur (Şekil 4.14). Hakamada vd (1997), halofilik bakterilerden elde ettikleri ham enzim ile gerçekleştirdikleri pH stabilite deneylerinde, 7.0 ile 9.0 aralığında bir pH değerinde iyi stabilite ve enzim aktivitesini (%87) tespit etmişlerdir.



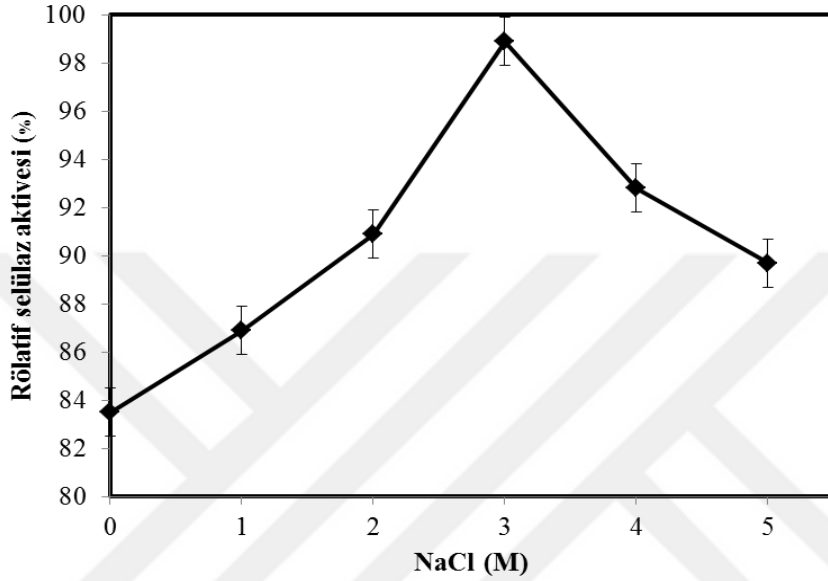
Şekil 4.14. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selülaaz enziminin pH stabilitesi

Başka bir çalışmada, Türkiye'nin Tuzköy Tuz Madeni'nden izole edilen halofilik *Haloarcula hispanica* 2TK2 suşuna ait ham selülaaz enziminin, pH 4.0-8.0 aralığında 24 saat süreyle stabilitesi test edilmiş ve deney sonucunda 7.0-7.5 aralığında aktivitenin %80'inden fazlasının korunduğu ve daha yüksek pH değerlerinde enzimin aktivitesinin %50'den fazlasının kaybedildiği görülmüştür (Birbir vd, 2004). Diğer bir çalışmada, Annamalai vd (2013) tarafından izole edilen halofilik *Bacillus halodurans* CAS 1 suşunun selülaaz enziminin pH: 4.0-12.0 aralığında 24 saat süreyle stabilitesi test edilmiş ve deney sonucunda pH: 7.0-10.0 aralığında aktivitenin %85'inden fazlasının korunduğu ve daha sonra enzimin aktivitesinin pH: 11.0 ve 12.0 aralığında tekrar yaklaşık %80 olduğu kaydedilmiştir. pH kararlılığı bakımından literatürle karşılaştırıldığında, *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham selülaazının alkali pH'daki kararlılığı %80'in altındadır.

4.5.3. Selülaaz enziminin NaCl stabilitesi

Haloarcula sp. ÇKT3 suşuna ait ham selülaaz enziminin tuz stabilitesi, enzimi, standart koşullarda (50 °C, pH 8.0 ve 3.4 M NaCl) farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2, 3, 4, ve 5 M) NaCl ile 24 saat boyunca inkübe edip aktivitesi ölçülerek tespit edilmiştir. Kontrol (24 saat inkübasyonda tutulmayan ve NaCl konsantrasyonu 3.4 M) aktivite değeri % 100 alınıp diğer değerleri % rölatif olarak belirlenmiştir.

Sonuçlara bakıldığında ise enzim aktivitesinin %90'dan fazlası 2 ila 4 M NaCl aralığında korunduğu en yüksek kararlılığın 3 M NaCl varlığında 24 saat inkübasyon sırasında elde edildiği tespit edilmiştir. 0 M ve 1 M NaCl içeren inkübasyon çözeltisinde selüloz aktivitesi sırasıyla %83.5 ve %86.9 oranında korunmuştur (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selüloz enziminin farklı NaCl konantrasyonlardaki kararlılığı

Wang vd (2009)'ın yaptığı çalışmalarda, halofilik bakteri *Salinivibrio* sp. NTU-05'ya ait selüloz enziminin yüksek NaCl varlığında altında (3-4 M) selüloz aktivitesinin %80'den fazlasının korunduğu gözlemlenmiştir. Li ve Yu (2012), *Thalassobacillus* sp. LY18 suşundan elde ettikleri selüloz enziminin %0-20'lik NaCl aralığında 24 saat süreyle stabilitesini gözlemlemişler ve %10 ile %12.5 (1.7 ve 2.1 M) NaCl varlığında en yüksek stabilite değerini bulmuşlardır. Zhang vd (2012) izole ettikleri alkalifilik and halofilik *Bacillus* sp. BG-CS10 suşunu kullanarak ürettikleri selüloz enziminin NaCl stabilitesini tespit etmek amacıyla yaptıkları deneyde 0 ile 3.5 M NaCl aralığını kullanmışlar ve en iyi stabilitenin 3 M olduğunu gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise Li ve Yu (2012) halotolerant bir izolat *Bacillus* sp. L1 suşunu kullanarak elde ettikleri halofilik selülozın %0-20'lik NaCl aralığında 24 saat süreyle stabilitesini gözlemlemişler ve %7.5 (1.2 M) NaCl varlığında en yüksek stabilite değerini bulmuşlardır. Literatür çalışmaları ile elde edilen sonuçlar

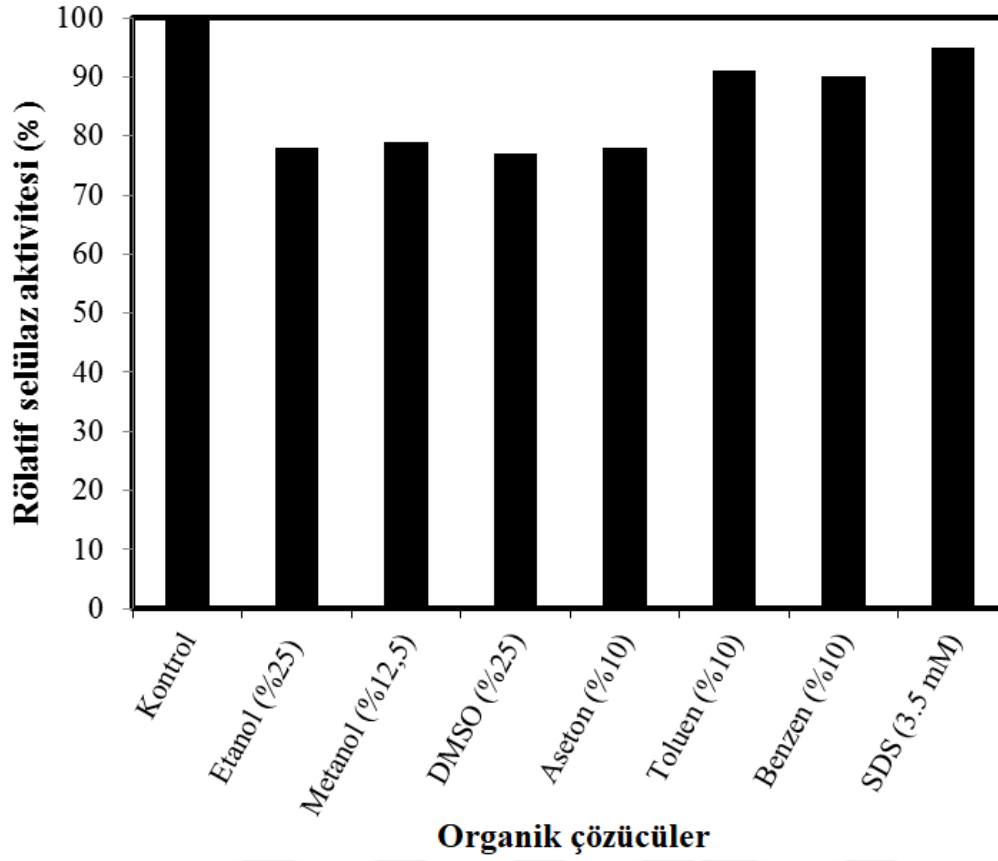
karşılaştırıldığında, *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşundan elde edilen selüloz enziminin yüksek NaCl konsantrasyonlarında %90'ın üzerindeki rölatif aktivite ile oldukça kararlı bir yapı sergilediğini göstermektedir. Bu kararlı yapı, gerek kağıt endüstrisi gerek tekstil endüstrisi olmak üzere bir çok endüstri dalında uygulanan kimyasal ve mekanik işlemler sırasında enzim aktivitesinin korunması ve sürdürülebilmesine katkı sağlamaktadır (Hezayen vd, 2000; Hutcheon vd, 2005).

4.5.4. Selüloz enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı

Haloarcula sp. ÇKT3 suşunun selüloz enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla DMSO (%25), etanol (%25), metanol (%12.5), aseton (%10), toluen (%10), benzen (%10) ve SDS (3.5 mM) kullanılmıştır. Ham selüloz enzimi bu organik çözücüler içerisinde 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra standart deney koşullarında altında (50 °C, pH 8.0, 3.4 M NaCl) DNS deneyi ile aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak organik çözücü ile muamele edilmemiş ham enzimin kullanıldığı deney sonucu %100 alınıp diğer değerleri (%) rölatif olarak belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında, enzim aktivitesi en fazla inhibisyonunun %23 ve %22 oranında azalma ile sırasıyla DMSO (%25) ve etanol (%25) varlığında gerçekleştiği, enzimin en kararlı aktiviteyi ise 3.5 mM SDS varlığında gösterdiği (%95 rölatif selüloz aktivitesi) görülmektedir (Çizelge 4.2, Şekil 4.16).

Çizelge 4.2. Farklı organik çözücülerin selüloz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri

Organik Çözücüler	% Selüloz aktivitesi	U/mL
Kontrol	100	157
Etanol (%25)	78	123.1
Metanol (%12.5)	79	124
DMSO (%25)	77	121.4
Aseton (%10)	78	122.9
Toluen (%10)	91	143.2
Benzen (%10)	90	141.4
SDS (%0.1) (3.5 mM)	95	150.3



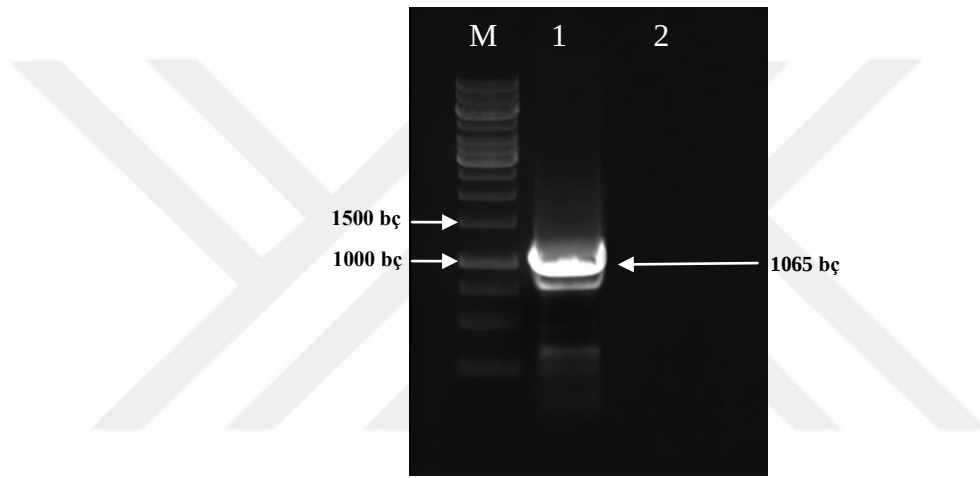
Şekil 4.16. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşu tarafından üretilen selülaaz enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı

SDS ve Tween-80'nin; *Paenibacillus* sp. B39 ve *Bacillus* sp. C1 HM171927 suşlarında selülaaz aktivitesini sırasıyla % 59-71 ve % 50-59 oranında inhibe ettiği rapor edilmiştir (Wang vd, 2009; Sadhu vd, 2013). Başka bir çalışmada, Zhang vd (2012) izole ettikleri alkalifilik ve halofilik *Bacillus* sp. BG-CS10 suşunu kullanarak bu suşa ait selülaaz enziminin organik çözücülere karşı stabilitesini test etmişlerdir. DMSO (%5), gliserol (%5), Triton X-405 (%5), izopropanol (%5), metanol (%5), EDTA (5 mM) ve SDS (%0.025) kullanarak yaptıkları deneyde en az inhibisyonun (%2-7 aralığında) DMSO ve izopropanol, en fazla inhibisyonun ise metanol ve EDTA (ca. %50) varlığında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada, deniz bakterisi olan *Bacillus aquimaris* suşuna ait selülaaz enziminin organik çözücülere karşı stabilitesi, aseton (%10), metanol (%10), benzen (%10), toluen (%10) kullanılarak test edilmiştir. En az inhibisyonun (%14-29) aseton ve metanol, en fazla inhibisyonun ise (%76) toluen varlığında gerçekleştiği belirlenmiştir (Trivedi vd, 2011).

4.6. *Haloarcula* sp. ÇKT3 Suşuna Ait Endoglukanaz Geninin PZR ile Çoğaltılması ve pGEM-T® Easy Ara Vektörüne Klonlanması

4.6.1. Endoglukanaz geninin PZR ile çoğaltılması

H. mediterranei ATCC 33500 suşunun endo-1,3(4)-beta-glukanaz enzimini kodlayan *celM* (HFX_2771) genine ait nükleotid dizisi kullanılarak (Gen Bank erişim no: CP001868.2) dizayn edilen primer çifti (*celMF*: 5' ggatccatggacacacgacgacgc 3', *celMR*: 5' aagcttctacacgtcgacgctaaagg 3'), ve izole edilen kalıp genomik DNA ile *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz geni PZR ile çoğaltılmıştır (Şekil 4.17).

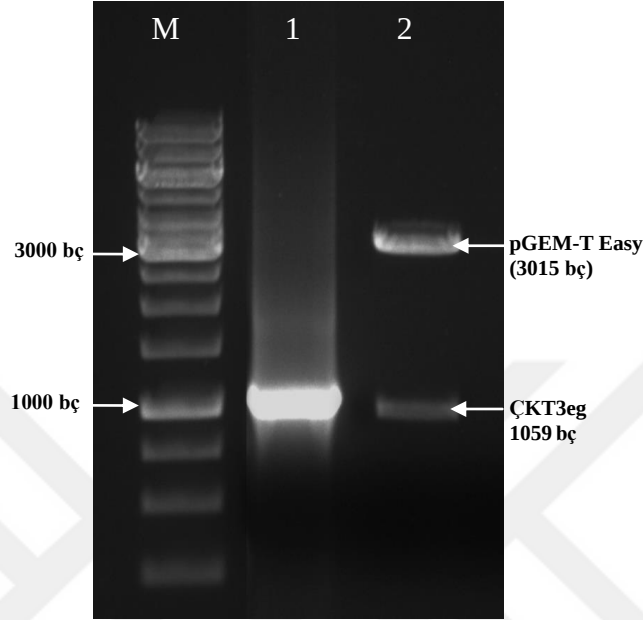


Şekil 4.17. *Haloarcula* sp. ÇKT3 genomik DNA'sı kullanılarak yapılan PZR sonucu. M: O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) 1: *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz ampliconu. 2: Kalıp DNA yerine dH₂O kullanılarak yapılan negatif kontrol

4.6.2. *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz geninin pGEM-T® Easy ara vektörüne klonlanması

Taq DNA polimeraz ile çoğaltılan *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz genine ait bant jelden kesilmiş, jel ekstraksiyon kiti (Macherey-Nagel) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Jel ekstraktı pGEM-T® Easy ara klonlama vektörüne ligasyon ile yapıştırılmış ve ardından transformasyonla *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonrasında elde edilen hücreler ampisilin (100 µg/mL), X-Gal (Ek 4) ve IPTG (Ek 4) içeren LB agar besiyerine yayma ekim tekniği ile ekilerek 37 °C'de 16 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Daha sonra, üreyen beyaz renkli koloniler seçilerek LB besiyerine ekimleri yapılmıştır. Bu kolonilerden izole edilen

plazmitler kullanılarak yapılan PZR, restriksiyon enzim kesimi (Şekil 4.18) ve ayrıca DNA dizi analizi ile rekombinasyon doğrulanmıştır. Rekombinant vektör; pGÇKT3EG, bu vektörü taşıyan rekombinant *E. coli* DH5α hücreleri de *E. coli* pGÇKT3EG olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.18. Rekombinant pGÇKT3EG vektörünün PZR ve enzim kesimi ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder. 1: *ÇKT3eg* genini çoğaltmak amacıyla kalıp DNA olarak pGÇKT3EG vektörünün kullanıldığı PZR reaksiyonu, 2: *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmiş pGÇKT3EG

4.7. *Haloarcula* sp. ÇKT3 Suşuna Ait Endoglukanaz Geninin Karakterizasyonu

H. mediterranei suşuna ait *HFX_2771* genine uygun olarak tasarlanan primerlerle PZR ile çoğaltılıp pGEM-T® Easy ara vektörüne klonlanan *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşuna ait endoglukanaz geninin DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.19). İlgili gen “atg” başlangıç kodonu ile başlayıp bir “tag” stop kodonu ile 1059 bp uzunluğunda sona ermektedir. Bilgisayar-destekli biyoinformatik analizler, bu genin 352 aminoasitten oluşan 36.925 kDa molekül ağırlığında bir ürünü kodladığını göstermektedir. Genin ortalama A+T içeriği %33.7 ve pI değeri 4.051’dir. MegAlign (BioStar) programı kullanılarak *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz genine ait nükleotit dizisi beş farklı haloarkeye ait selülaz gen dizisi ile karşılaştırılmıştır. Buna göre; *Haloarcula marismortui* ATCC 43049’ye ait endoglukanaz genini kodlayan

cdlM'ye %92.6, *Haloferax mediterranei* ATCC 33500'e ait endo-1,3(4)-beta-glukanazı kodlayan *HFX_2771 (celM)* genine %59.9, *Haloarcula hispanica* ATCC 33960'e ait endoglukanaz / peptidaz M42 aile proteini kodlayan *celM (HAH_1445)* genine %88, *Haloarcula* sp. CBA1115, SG26_15220'ya %88.1 ve *Haloarcula hispanica* N601'e ait endoglukanaz kodlayan *HISP_07380* genine %88.1 oranında % benzerlik göstermektedir. *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz gen ürününün diğer haloarke endoglukanaz enzimleriyle olan aminoasit dizi hizalaması Şekil 4.20'de verilmektedir. *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz aminoasit dizisi *CdLM*'ye %96, *HFX_2771*'e %60.6, *HAH_1445*'e %88, SG26_15220'ya %94 ve *HISP_07380*'e %93.8 oranında benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.3).



ATG GAC ACA CGA CGA CGA GAG TTC CTT GAA TCG CTG CTG ACA ACG CCC
M D T R R R E F L E S L L T T P
GGC CCG TCT GGA TAC GAG GCT GAC AGC CAG CGC GTG TGG CTC GAC TAC
G P S G Y E A D S Q R V W L D Y
GTC AGC GAG TTC GCC GAC GAG GTC CGA ACG GAC GAC TAC GGG AAC GCT
V S E F A D E V R T D D Y G N A
GTC GCA AAG GTC GAG GGC GGC AAC ACG ATC GTT GCG CTC GCG GGC CAC
V A K V E G G N T I V A L A G H
GGC GAC GAA ATC GGG TTC ATC GTT CGG GAC TTC ACG GAC GAC GGC TTC
G D E I G F I V R D F T D D G F
GTC AAA CTG GGC CGC ATC GGC GGC TCT GAC AAG ACC GTC TCG CGC GGG
V K L G R I G G S D K T V S R G
CAA CAC GTC ACC ATT CAC ACG GCT GAC GGT CCC GTC TCG GGC GTC GTG
Q H V T I H T A D G P V S G V V
GGA CAG ACC GCG ATT CAC CTC CGG GAT TCG GAC GAC GAT TCA GTC CCC
G Q T A I H L R D S D D D S V P
GAA ATC TCC GAA CAG TAC GTC GAC GTG GGT GCA GCG GAC GGC GAC GAG
E I S E Q Y V D V G A A D G D E
GTG GAA TCA CTC GTC GAC CGC GGC GAC CCA GTG ACG TTC GTC CAG ACG
V E S L V D R G D P V T F V Q T
CTG AGT GAA CTG GAG AAC GGC CGC CTT GCC GCA CGG GGG ATG GAC AAC
L S E L E N G R L A A R G M D N
CGT ATC GGT ATC TGG GCG GCC GCC GAG GGC CTC CAC CGC GCG GCA GAA
R I G I W A A A E G L H R A A E
TCA GAC CCC GAC GCG ACG GTG TAC GCT GTC TCG ACA GTG CAG GAG GAA
S D P D A T V Y A V S T V Q E E
GTC GGC GTA CAG GGG GCG AAG ATG GTC GGG TTC GAC CTC GCG CCG GAC
V G V Q G A K M V G F D L A P D
GTG GCC ATC GCG GCG GAC GTG ACG CAC GCG ACG GAC GCA CCG GGT TCG
V A I A A D V T H A T D A P G S
CCC GGC AAG GCC GCG ACG GGT GTG GAT CTC GGC GAG GGA CCG GTC GTC
P G K A A T G V D L G E G P V V
GCC CGC GGG AGC GCG AAC TAT CCG GTC GCC GTC GAC GCT CTT CGA GAG
A R G S A N Y P V A V D A L R E
ACG AGC GAG GCC GAG GAC ATC GAC ATC CAG TTG CAG GCG GCG GGC ACT
T S E A E D I D I Q L Q A A G T
CGA ACC GGG ACC GAT GCG GAC GCA TTC TAC ACC TCA CGT GGT GGG ATT
R T G T D A D A F Y T S R G G I
CCG TCG GTC AAC GTC GGG CTG CCG AAC CGC TAC ATG CAC ACG CCG GTC
P S V N V G L P N R Y M H T P V
GAG GTC ATC GAT CCC GAC GAC CTC GAC GCG CTT GCA GAC CTG CTA GCT
E V I D P D D L D A L A D L L A
GGC TTC GCC GTC CGA GCG GCC GAT CGA GCG CCC TTT AGC GTC GAC GTG
G F A V R A A D R A P F S V D V

TAG

.

Şekil 4.19. *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz genine ait nükleotit ve aminoasit dizisi

Çizelge 4.3. *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz gen ürününün diğer haloarke endoglukanaz enzimlerinin aminoasit dizilerine olan yüzde benzerlik ve farklılıkları. CelM: *Haloarcula hispanica* ATCC 33960 endoglukanaz / peptidaz M42 aile proteini, CdlM: *Haloarcula marismortui* ATCC 43049'ye ait endoglukanaz, HFX_2771: *Haloferax mediterranei* ATCC 33500'e ait endo-1,3(4)-beta-glukanaz, HISP07380: *Haloarcula hispanica* N601'e ait endoglukanaz, SG26 15220: *Haloarcula* sp. CBA1115 endoglukanaz

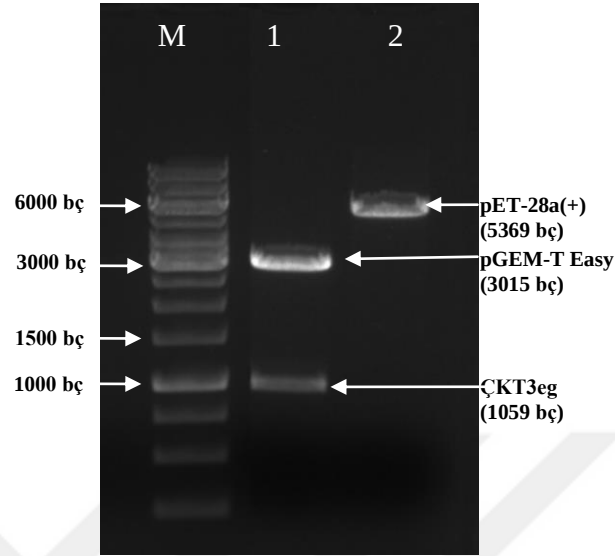
		Yüzde Benzerlik							
		1	2	3	4	5	6		
Yüzde Farklılık	1		95.7	61.4	98.6	100.0	94.0	1	CelM.PRO
	2	4.4		61.6	95.5	95.7	96.0	2	CdlM.PRO
	3	52.2	50.7		61.6	61.4	60.6	3	HFX2771.PRO
	4	1.4	4.7	51.6		98.6	93.8	4	HISP07380.PRO
	5	0.0	4.4	52.2	1.4		94.0	5	SG26 15220.PRO
	6	6.2	3.8	53.3	6.5	6.2		6	CKT3.PRO
		1	2	3	4	5	6		

4.8. *Haloarcula* sp. ÇKT3 Endoglukanaz Geninin İfade Vektörü Olan pET-28a(+)'ya Klonlanması ve *E. coli* BL21(DE3) Hücrelerine Aktarılması

pET-28a(+); güçlü bir T7 bakteriyofaj promotoruna ve translasyon sinyallerine sahip, rekombinant proteinlerin *E. coli* hücrelerine klonlanması ve heterolog ekspresyonu için kullanılmakta olan en güçlü ifade vektördür. Aynı zamanda, His-Tag etiketi sayesinde IPTG ile indüklenmiş proteinlerin kolayca saflaştırılmalarına imkan sağlar. Heterolog proteinlerin ifadesi için konakçı *E. coli* suşunun proteaz enzimlerinden yoksun olması gerekmektedir. Bu nedenle, sitoplazmik Lon proteaz ve dış membran OmpT proteazlarından yoksun olan, ayrıca, *lacUV5* promotoru kontrolündeki T7 polimeraz genini taşıyan λ DE3 lizogenine sahip *E. coli* BL21 (DE3) suşu bu çalışmada kullanılmıştır (Rosano ve Ceccarelli, 2014).

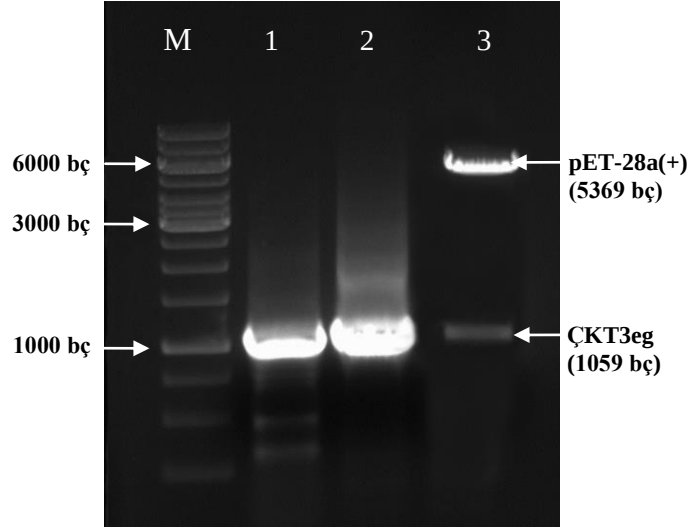
Öncelikle, rekombinant pGÇKT3EG vektörünün *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmesi sonucunda serbest kalan *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz geni ile aynı restriksiyon enzimleri ile linear hale getirilmiş pET-28a(+) vektörü agaroz jelde yürütüldükten sonra bantlar kesilerek ekstrakte edilmiş

(Şekil 4.21) ve elde edilen DNA'lar ligasyon ile yapıştırılmıştır. Ligasyon ürünü transformasyon yoluyla *E. coli* DH5α hücrelerine aktarılmıştır.



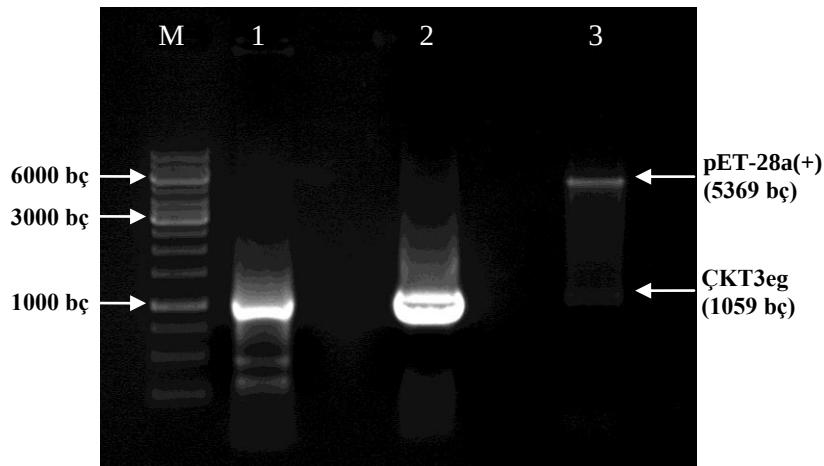
Şekil 4.21. pET-28a(+) ve pGÇKT3EG vektörlerinin *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesimi. M: O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1: *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesilip ayrılan pGEM-T Easy vektörü ve ÇKT3eg geni, 2: *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesilip linear duruma getirilen pET-28a(+) vektörü (5369 bç)

Kanamisin içeren (30 µg/mL) seçici LA katı besiyerinde 16 saat 37 °C inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerden plazmid izolasyonları yapılmıştır. Bu plazmitler kullanılarak PZR ve *Bam*HI-*Hind*III ikili enzim kesimleri gerçekleştirilmiş ve rekombinasyon doğrulanmıştır (Şekil 4.22). Rekombinant vektör pETÇKT3EG, bu vektörü taşıyan *E. coli* DH5α hücreleri ise *E. coli* pETÇKT3EG olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.22. Rekombinant pETÇKT3EG vektörünün PZR ve restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanması. M: O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1: *Haloarcula* sp. ÇKT3 genomik DNA'sı kullanılarak elde edilen endoglukanaz amplikonu, 2: pETÇKT3EG vektörünün kalıp olarak kullanıldığı PZR reaksiyonu, 3: BamHI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pETÇKT3EG

E. coli pETÇKT3EG hücrelerinden izole edilen rekombinant pETÇKT3EG vektörü transformasyon yoluyla *E. coli* BL21(DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Kanamisin içeren seçici besiyerinde üreyen kolonilerden biri seçilip çoğaltılmış ve plazmit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu plazmit ile PZR ve enzim kesimleri yapılarak rekombinasyon doğrulanmıştır (Şekil 4.23). Rekombinant vektör pBLÇKT3EG, bu vektörü taşıyan rekombinant *E. coli* BL21 hücreleri ise *E. coli* BLÇKT3EG olarak adlandırılmıştır.

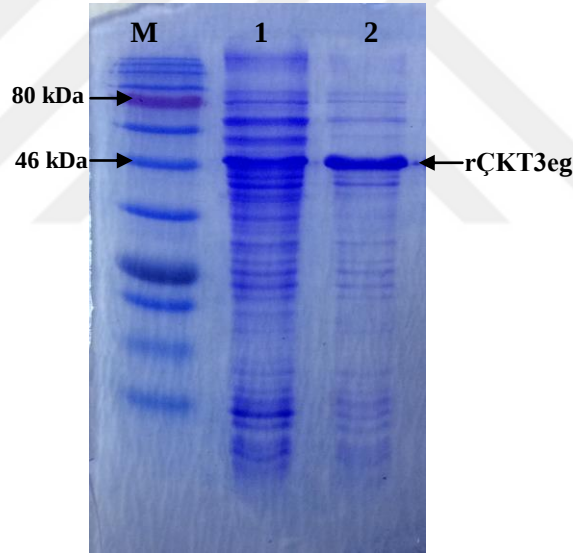


Şekil 4.23. Rekombinant *E. coli* BLÇKT3EG'de pBLÇKT3EG vektörünün varlığının PZR ve restriksiyon enzim kesimi ile doğrulanması. M:

O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1: *Haloarcula* sp. ÇKT3 genomik DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PZR, 2: *E. coli* BLÇKT3EG'den izole edilen pETÇKT3EGvektörünün kalıp olarak kullanıldığı PZR sonucu, 3; *Bam*HI ve *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pBLÇKT3EG

4.9. *E. coli* BL21 Hüçlerinde *Haloarcula* sp. ÇKT3 Endoglukanaz Enziminin Heterolog İfadesi

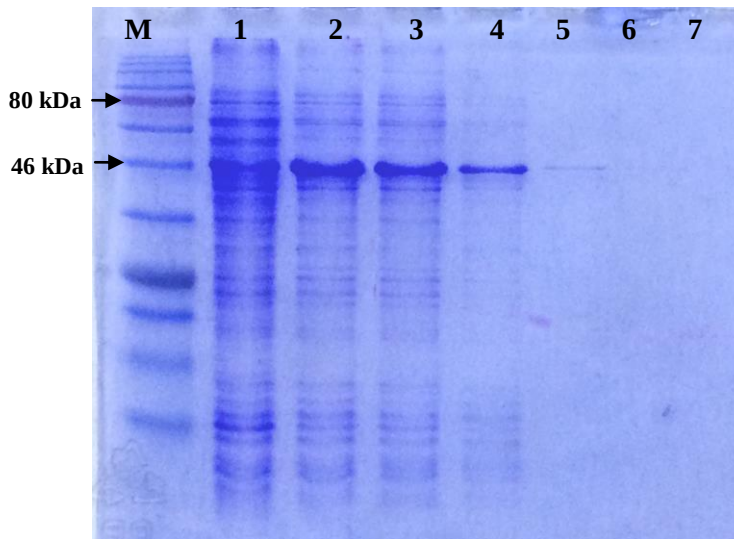
Rekombinant *E. coli* BLÇKT3EG'e ait 16 saatlik ön kültürden yeni LB besiyerlerine ekim yapılarak 37 °C'de ve 200 rpm'de 5 saat inkübasyon sonunda OD₆₀₀: 0.6 değerine ulaşan kültürlerle 1 mM IPTG eklenmiş ve SDS-PAGE analizi ile selülaz enzimini veren *Haloarcula* sp. ÇKT3 endoglukanaz enziminin *E. coli* BL21 hüçresinde ifade olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24). Rekombinant endoglukanaz enzimi rÇKT3eg olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.24. 1 mM IPTG ile indüklenmiş *E. coli* BLÇKT3EG total proteini içerisinde rÇKT3eg. M: Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa) (New England Biolabs), 1: IPTG ile indüklemeye yapılmayan (kontrol) *E. coli* total proteini, 2: IPTG ile indüklemeye yapılan *E. coli* BLÇKT3EG total proteini ve rÇKT3eg

lac ve L8-UV5 promotorlarının IPTG yokluğunda iyi bir şekilde baskılanmalarına rağmen her ikisinin de bazal aktivite sergilediği bilinmektedir (Novy ve Morris, 2001). Dolayısı ile, IPTG ile indüklemenin gerçekleşmediği kontrol kültüründe de rÇKT3eg ifadesinin görülmesinin sebebi büyük olasılıkla bahsedilen bazal ifadedir.

Haloarcula sp. ÇKT3 endoglukanaz geninin translasyonu sonrasında elde edilen protein dizisinin teorik olarak pI değeri 4.05 ve moleküler ağırlığı 36.9 kDa olarak bulunmuştur (https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool). SDS-poliakrilamid jel görüntüsüne bakıldığında ilgili proteinin 46 kDa civarında bir bant verdiği görülmektedir. SDS-PAGE’de saflaştırılan rekombinant proteinlerin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlıklarından daha yüksek bir konumda görüntülenmeleri hidrofobisite ve yük durumları ile bağlantılıdır. Genellikle, SDS yaklaşık olarak 1 moleküle/iki aminoasit oranında proteinlere bağlanır. Bağlanma hidrofobik etkileşimlerle gerçekleştiğinden SDS proteinlerin hidrofobik kısımlarına bağlanmayı tercih eder. Dolayısı ile, hidrofobik proteinlerin hidrofilik olanlara göre daha yüksek miktarlarda SDS’e bağlanması ve daha hızlı yürümesi beklenmektedir. Proteinlerin izoelektrik noktaları (pI) da jel hareketlerini etkileyebilmektedir. Asidik proteinler (pI ları 6’dan düşük) negatif yükün SDS ile birbirini itmesinden dolayı beklenenden daha yavaş yürürler. Proteinler, bu tip fizyokimyasal özellikleri göstermekle birlikte bazı durumlarda hidrofobik proteinlerin beklenilenden çok daha yavaş yürüdüğü ve bunun nedeninin posttranslasyonel değişimler olabileceği bildirilmiştir (Shiari vd, 2008). Buradan yola çıkarak, rÇKT3eg proteininin SDS-poliakrilamid jelde beklenilenden daha yüksek molekül ağırlığında gözükmesi yüksek hidrofobisite ve pI durumları ile ilişkilendirilebilir. Rekombinant selüloz enzimi (rÇKT3eg), Protino® Ni-TED 2000 (Macharey Nagel) saflaştırma kolonu kullanılarak *E. coli* BLÇKT3EG’den saflaştırılmıştır (Şekil 4.25). Saflaştırma, denatüre edici koşullar altında gerçekleştirilmiştir (8 M üre varlığında).



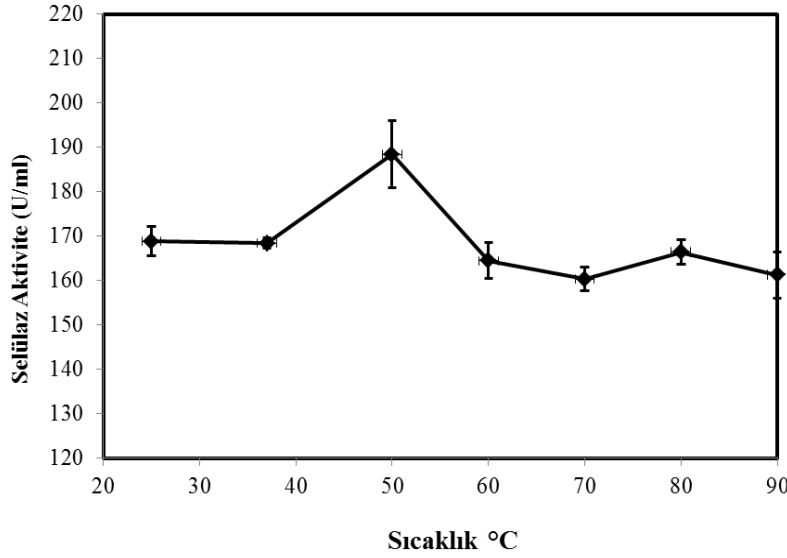
Şekil 4.25. rÇKT3eg selülazının saflaştırılması. M: Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa), 1: IPTG ile indüklemeye yapılmayan (kontrol) *E. coli* BLÇKT3EG total proteini 2: IPTG ile indüklemeye yapılan *E. coli* BLÇKT3EG total proteini, 3: IPTG ile indüklenen örneğin kolondan geçtikten sonraki numunesi (Flow through), 4: Örneğin birinci yıkaması, 5: Örneğin ikinci yıkaması, 6: Örneğin üçüncü yıkaması, 7: Elüant

4.10. rÇKT3eg’de Selülaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Rekombinant *E. coli* BLÇKT3EG suşundan saflaştırılan rÇKT3eg diyaliz ile renatüre edilmiş (2.5 M üre varlığında), ardından, liyofilizasyon ile derişik hale getirilmiştir (4.8 mg/mL). Standart koşullarda (50 °C, pH: 8.0, ve 3.4 M NaCl) DNS yöntemi kullanılarak yapılan deney sonucunda saf selülaz enzimine ait aktivite değeri 170.11 U/mL olarak hesaplanmıştır. Çalışmanın devamında, saf selülaz enziminin aktivitesi üzerine farklı sıcaklık ve pH değerleri, farklı NaCl konsantrasyonları ile organik çözücü varlığının etkileri tespit edilmiştir.

4.10.1. Sıcaklık etkisi

E. coli BLÇKT3EG suşundan saflaştırılan rÇKT3eg selülaz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla selülaz aktivite deneyi inkübasyon sıcaklığı olarak 25, 37, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C değerlerinde gerçekleştirilmiştir. Deney üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, en iyi selülaz aktivitesinin 50 °C’de gerçekleştiği ve aktivite değerinin 188.44 U/mL olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.26).

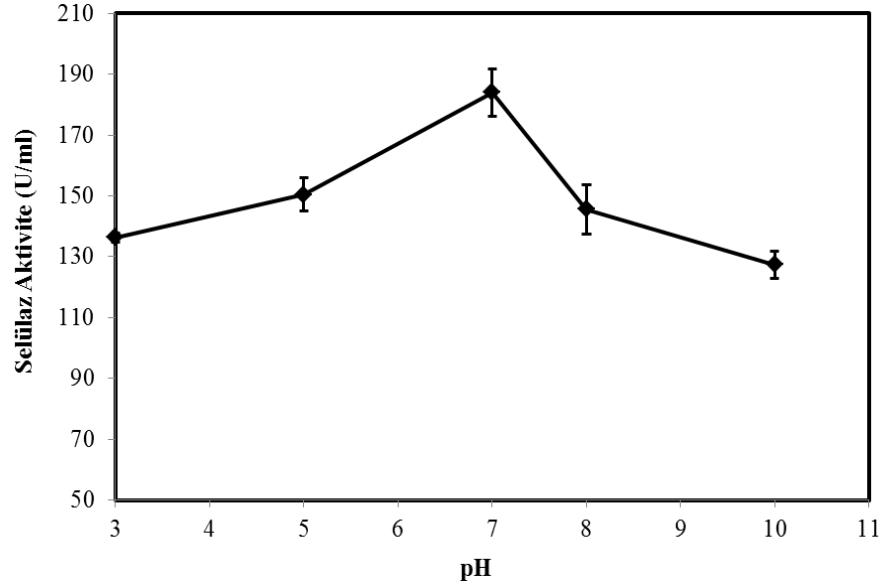


Şekil 4.26. rÇKT3eg saf selülaaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Schimming vd (1991) tarafından yapılan çalışmada, termofilik bakteri *Clostridium thermocellum* suşu kullanılarak üretilen selülaaz enzimini kodlayan endoglukanaz geni *E. coli*'ye klonlanmış, rekombinant selülaaz enziminin en iyi aktivite gösterdiği optimum sıcaklık 80 °C olarak bulunmuştur. Bir diğer çalışmada, *Bacillus licheniformis* EGW039 selülaaz enzimini kodlayan *eg1314* geni *E. coli*'de ifade ettirilmiş ve aktivite için optimum sıcaklığın 40 °C elde edildiği bulunmuştur (Teng vd, 2006). Diğer taraftan, *Bacillus amyloliquefaciens* suşuna ait selülaaz geninin *E. coli*'de heterolog ifadesi ile rekombinant selülaaz enzimine ait en iyi aktivitenin 80 °C'de elde edildiği bulunmuştur (Olsen vd, 1991). Halldórsdóttir vd (1998) tarafından yapılan bir çalışmada ise, deniz bakterisi olan termofilik *Rhodothermus marinus* suşunun *celA* geninin *E. coli*'de ifadesi gerçekleştirilmiş ve yapılan aktivite deneyleri sonucunda, rekombinant selülaaz enziminin en iyi aktiviteye sahip olduğu sıcaklık değeri 100 °C olarak kaydedilmiştir.

4.10.2. pH etkisi

E. coli BLÇKT3EG suşundan saflaştırılan rÇKT3eg selülaaz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisini belirlemek üzere, DNS deneyi optimum inkübasyon sıcaklığı olarak 50 °C'de ve 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 ve 10.0 şeklinde farklı pH değerlerinde üç tekrarlı olarak yapılmıştır. En iyi aktivite pH: 7.0'de ve 157.35 U/mL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.27).



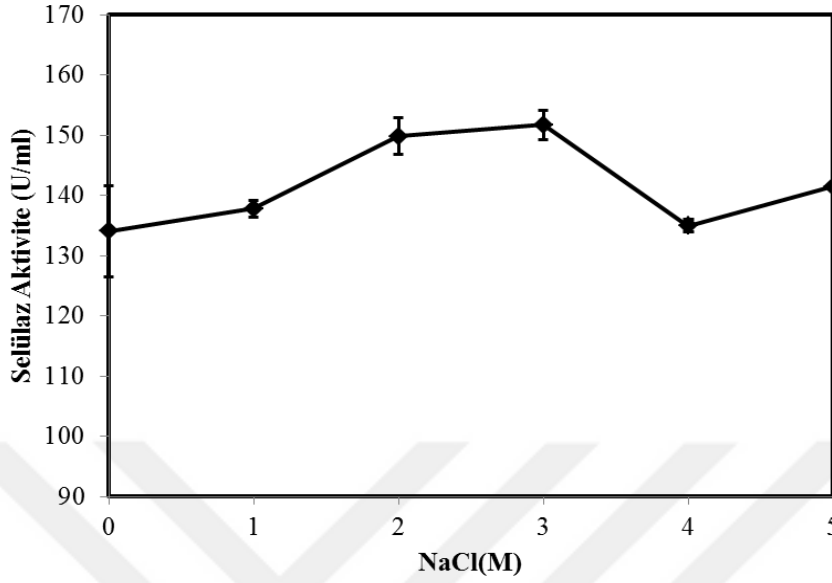
Şekil 4.27. rÇKT3eg saf selülaz enzim aktivitesi üzerine pH etkisi

Termofilik organotrofik *Thermotoga maritima* suşunda selülaz enzimini kodlayan *celA* ve *celB* genlerine ait ve *E. coli* BL21’de ifade edilen rekombinant selülazın en iyi aktiviteye pH: 8.0’de sahip olduğu tespit edilmiştir (Liebl vd, 1996). Akita vd (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, alkalifilik bakteri *Bacillus halodurans* C-125 suşunda üretilen selülaz enzimini kodlayan *bgn2115* geninin *E. coli* BL21 hücrelerindeki ifadesi ile elde edilen rekombinant selülazın en iyi aktivite değeri pH: 7.0 olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, halofilik *Halomonas* sp. S66-4 suşunda selülaz enzimi kodlayan *cel8H* geni *E. coli* BL21’e klonlanmış ve heterolog olarak ifade edilen rekombinant selülazın pH: 3.0-12.0 aralığında aktivitesi incelenmiş ve en iyi aktivite için optimum pH değerinin 5.0 olduğu tespit edilmiştir (Huang vd, 2010). Optimum pH değeri bakımından rÇKT3eg saf selülaz enziminin nötr pH’da en iyi aktiviteyi sergilediği görülmektedir.

4.10.3. NaCl etkisi

E. coli BLÇKT3EG suşundan saflaştırılan rÇKT3eg selülaz enziminin aktivitesi NaCl’nin etkisini incelemek amacıyla DNS deneyi optimum inkübasyon sıcaklığı (50 °C) ve pH değeri (7.0)’nde gerçekleştirilmiş, ancak, NaCl konsantrasyonu olarak 0, 1, 2, 3, 4, ve 5 M denemiştir. Sonuçta, *E. coli* BLÇKT3EG suşundan saflaştırılan rÇKT3eg selülaz üretimi ve aktivitesi için optimum koşulların 50 °C sıcaklık, pH:

7.0 ve 3 M NaCl olduğu belirlenmiştir. Optimum koşullarda elde edilen saf enzim aktivitesi 151.7 U/mL olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.28).



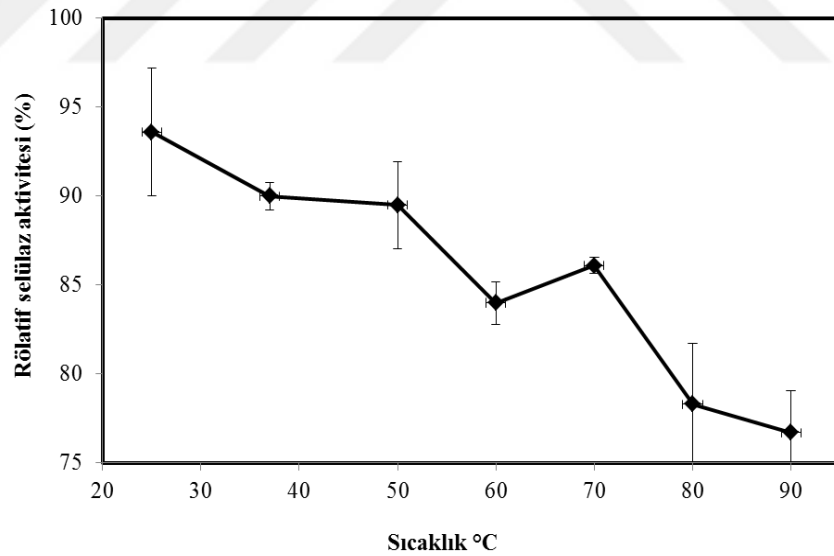
Şekil 4.28. rÇKT3eg saf selülaz enzim aktivitesi üzerine NaCl etkisi

Gao vd (2010)'ne ait bir çalışmada, Çin'in Xiamen Deniz'inin kıyı bölgesinden alınan mangrov toprak örneğinden tuzluluğa dirençli bakteri *Vibrio* sp. G21 izole edilmiştir. *Vibrio* sp. G21 suşundan elde edilen selülaz enzimini kodlayan *cel5A* geni *E. coli* BL21 hücrelerine klonlanmış ve 0 ile 4 M NaCl aralığında aktivite değerleri ölçülmüştür. En iyi aktivitenin 2 M NaCl'de olduğu gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada, tuzcul *Paenibacillus* sp. S09 suşunda selülaz enzimini kodlayan *plicA* geninin *E. coli* BL21'de ifadesi sağlanmış ve rekombinant enzimin en iyi aktivite değeri 1 M NaCl varlığında elde edilmiştir (Cheng vd, 2014). Zhang vd (2012) tarafından yapılan çalışmada, alkalifilik ve halofilik *Bacillus* sp. BGCS10 suşu tarafından üretilen halofilik selülaz enzimini kodlayan *celB* geni, *E. coli* BL21 hücrelerinde ifade ettirilmiştir. Elde edilen rekombinant selülaz enziminin 0 ile 4 M NaCl aralığında aktivite değerleri incelendiğinde, optimum 2 M NaCl'de en iyi aktivitenin elde edildiği bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, rÇKT3eg enziminin yukarıda sözü edilen rekombinant selülaz enzimlerinden daha yüksek bir NaCl yoğunluğunda (3 M) en iyi aktivitesini gösterdiği saptanmıştır.

4.11. rÇKT3eg Saf Selülaz Enziminin Stabilitesi

4.11.1. Saf selülaz enziminin termostabilitesi

rÇKT3eg'in termostabilitesini belirleyebilmek için saf selülaz enzimi 25, 37, 50, 60, 70, 80 ve 90 °C sıcaklıklarda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmış ve devamında ham enzimin stabilite deneylerinde olduğu gibi standart DNS koşullarında (50 °C, pH: 8.0, 3.4 M NaCl) aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık ile ön muamelesi yapılmamış saf enzimin kullanıldığı kontrol reaksiyonundan elde edilen aktivite değeri %100 kabul edilerek selülaz aktiviteleri rölatif % değeri olarak hesaplanmıştır. Termostabilite deney sonuçlarına göre, rÇKT3eg'in enzim aktivitesini 50 °C'ye kadar %90 oranında koruduğu bu sıcaklık değerinin üstünde aktivitesini kademeli olarak kaybederek 90 °C'de 24 saat inkübasyon sonrasında %23 oranında aktivite kaybı gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Ham selülaz enziminin termostabilite deney sonuçlarında da benzer durum söz konusudur. Enzim 90 °C'de aktivitesini %20 oranında kaybederken en yüksek aktivite değeri 37 °C'deki 24 saatlik inkübasyon sonucunda elde edilmiştir.



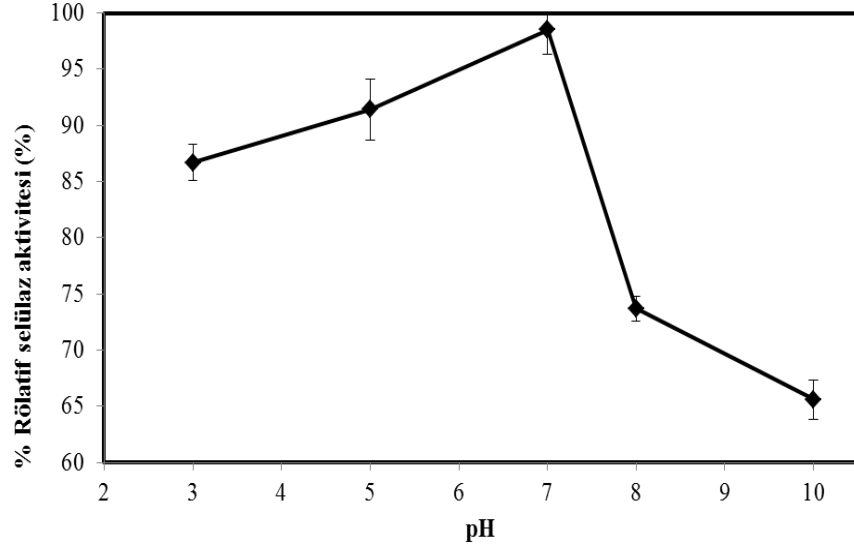
Şekil 4.29. rÇKT3eg saf selülaz enziminin termostabilitesi

Shi vd (2013) tarafından yapılan çalışmada, deniz bakterisi olan termofilik *Dictyoglomus thermophilum*'dan elde edilen selülaz enzimini kodlayan *cel5H* geni izole edilerek *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmıştır. 50-85 °C aralığında 24 saat süreyle rekombinant selülaz enziminin stabilitesini test edilmiştir. Deney sonucunda,

50-70 °C aralığında aktivitenin %90'ından fazlasının korunduğu, 80 ve 85 °C'de aktivitenin %70'e düştüğü gözlemlenmiştir. Bir başka termofilik deniz bakterisi *Rhodothermus marinus*'tan selüloz enziminin kodlandığı *bglA* geni *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmış ve rekombinant selüloz enziminin 20-40-60-80-100 °C değerlerinde 24 saat süreyle termostabilitesi test edilmiştir. Deney sonucunda, rekombinant enzimin aktivitesinin 90 °C'de %90'ından fazlasının korunduğu gözlemlenmiştir (Spilliaert vd, 1994).

4.11.2. Saf selüloz enziminin pH stabilitesi

rÇKT3eg'in pH kararlılığının belirlenmesi için, saf selüloz enzimi, kullanılan Tris-HCl tamponun farklı pH değerlerinde (pH: 3.0, 5.0, 7.0, 8.0 ve 10.0) ve standart sıcaklıkta ve NaCl konsantrasyonunda 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından, standart sıcaklıkta (50 °C) ve NaCl konsantrasyonunda (3.4 M) selüloz aktivite deneyi gerçekleştirilmiştir. Kontroldeki (ön inkübasyon uygulanmayan) selüloz aktivitesi %100 olarak kabul edilip diğer pH koşullarındaki aktivite değerleri rölatif % olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, saf selüloz aktivitesinin en iyi pH: 7.0 değerinde ve %98.5 aktivite oranı ile pH kararlılığını gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, alkali pH değerlerinde 24 saatlik inkübasyon enzimin kararlılığının azalmasına yol açmıştır. pH:10.0 değerinde aktivite kaybı %35 civarındadır (Şekil 4.30). Ham selüloz enziminin pH stabilitesi ile karşılaştırıldığında kararlılığın en yüksek pH'da daha fazla düşüş gösterdiği, bununla birlikte, genel profilin benzer olduğu görülmektedir.



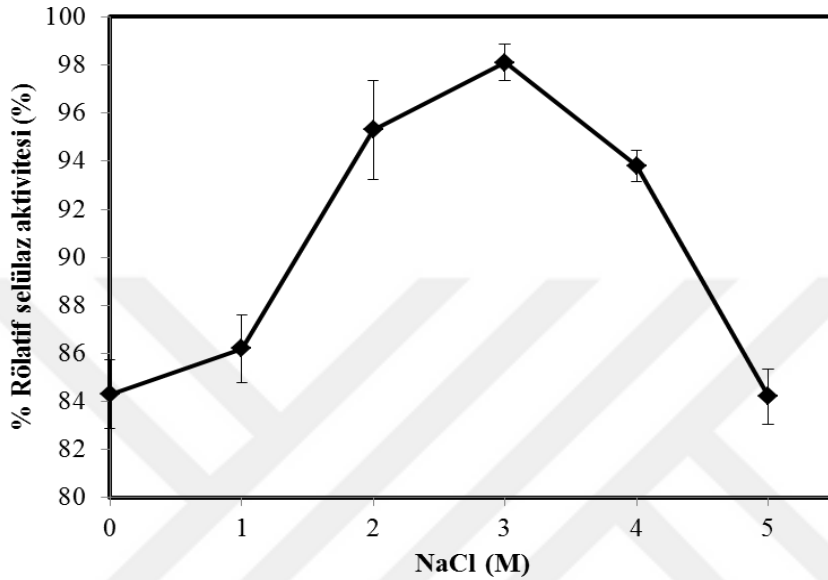
Şekil 4.30. r KT3eg saf selülaz enziminin pH stabilitesi

Tabernero vd (1994)'ne ait bir çalışmada, alkalifilik *Bacillus* sp. N137 suşu kullanılarak elde edilen selülaz enzimini kodlayan *bgaA* geni *E. coli* BL21 hücrelerine klonlanmıştır. İfade edilen rekombinant selülaz enziminin pH stabilitesi pH: 5.0-12.0 aralığında 24 saat süreyle    lm ş, sonuçta pH: 5.5 ila 8.0 aralığında aktivitenin %90'ından fazlasının korunduğu, 8.0 ila 12.0 aralığındaki değerlerde ise aktivitenin %80'inden fazlasının korunduğu tespit edilmiştir. Mao vd (2013) tarafından yapılan çalışmada, alkalifilik *Bacillus altitudinis* YC-9 suşunda selülaz enzimini kodlayan *glu* geni *E. coli* BL21 hücrelerine aktarılmış, heterolog ifadesi sağlanan rekombinant enzimin pH: 4.0-10.0 aralığında 24 saat süreyle inkübasyonunun ardından, pH: 6.0 ila 9.0 aralığında aktivitenin %90'ından fazlasının korunduğu, pH: 9.0-10.0'da ise aktivitesinin %50'sinden fazlasının kayba uğradığı tespit edilmiştir. r KT3eg enziminin pH kararlılığı pH: 3.0-7.0 aralığında %85'in üzerinde olup daha çok düşük pH değerlerinde daha kararlı bir aktivite sergilediği görülmektedir.

4.11.3. Saf selülaz enziminin NaCl stabilitesi

r KT3eg'in NaCl kararlılığının belirlenmesi için, saf selülaz enzimi, standart koşullarda (50  C ve pH 8.0) farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2, 3, 4, ve 5 M) NaCl ile 24 saat boyunca inkübe edilip aktivitesi    lm şt r. Kontrol (24 saat inkübasyonda tutulmayan ve NaCl konsantrasyonu 3.4 M) aktivite değeri %100

alınıp diğer değerler % rölatif olarak belirlenmiştir. Sonuçlar ham selüloz enzimine ait NaCl stabilite sonuçları ile oldukça benzerlik göstermektedir. Saf enzim aktivitesinin %90'dan fazlasının 1 ile 4 M NaCl aralığında korunduğu en yüksek aktivitesin %98.1 ile 3 M NaCl varlığında gerçekleştiği tespit edilmiştir. NaCl yokluğunda selüloz enzim aktivitesi %84.3 oranında stabil kalmıştır (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. rÇKT3eg saf selüloz enziminin NaCl stabilitesi

Huang vd (2010)'nin yaptığı çalışmada halofilik *Halomonas* sp. S66-4 suşunda selüloz enzimi kodlayan *cel8H* geni *E. coli* BL21 hücrelerine klonlanmış ve rekombinant selülozın farklı NaCl konsantrasyonlarında (0, 1, 2, 3, 4, 5) kararlılığı test edilmiştir. Deney sonucunda, 0 ile 3 M NaCl aralığında aktivitenin %100'üne yakını korunmuş, 4 M NaCl varlığında aktivite %70'e düşerken 5 M'da ise bu düşüş %60'a ulaşmıştır. Bir başka çalışmada, halotolerant *Thermobifida halotolerans* YIM 90462^T suşunda selüloz enzimi kodlayan *thcel6A* geni *E. coli* BL21'e klonlanmış ve rekombinant selülozın farklı NaCl konsantrasyonlarında (%0-30) kararlılığı test edilmiştir. Deney sonucunda, %0 ile %15 NaCl aralığında (0-2.5 M) aktivitenin %100'ü korunmuş olup, %20 NaCl varlığında (3.4 M) aktivitesi %60'a inerken, %25 ve %30 NaCl varlığında ise (4.2-5.1 M) aktivitesi kaybı %40'dır (Yin vd, 2015). Zhang vd (2011)'nin yaptığı çalışmada, halofilik arke *Halorhabdus utahensis* CBH1 suşunda selüloz enzimi kodlayan *Hu-CBH1* geni *E. coli* BL21'e klonlanmış ve saf enzimin 0.25-0.5-2-3-5 M NaCl konsantrasyonlarında kararlılığı test edilmiştir. 0.25 ile 0.5 M NaCl aralığında %10 aktivite gösteren enzimin aktivitesi, 2 ve 3 M NaCl

varlığında aktivitesinin %100'ün üzerine çıkmıştır. 5 M NaCl varlığında ise aktivitesinin yalnızca %5'ini kaybettiği gözlemlenmiştir.

rÇKT3eg saf selüloz enziminin maksimum kararlılığının 3 M NaCl olması ve 0-5 M NaCl aralığında bile %84'lük bir oranda aktivitesini sürdürebiliyor olması tuz toleransının oldukça iyi olduğunu göstermektedir. Dolayısı ile, rÇKT3eg saf selüloz enzimi, yüksek tuz toleransı sayesinde, tarımsal atıkların arıtılması ve selülozik malzemelerinin biyolojik ayrıştırılmasında karşılaşılan güç fizyolojik koşullara dayanıklı bir özellik sergilemesi bakımından (Wang vd, 2009) bu tür biyoteknolojik uygulamalar için ilgi çekici bir biyokatalizör olma potansiyeline sahiptir.

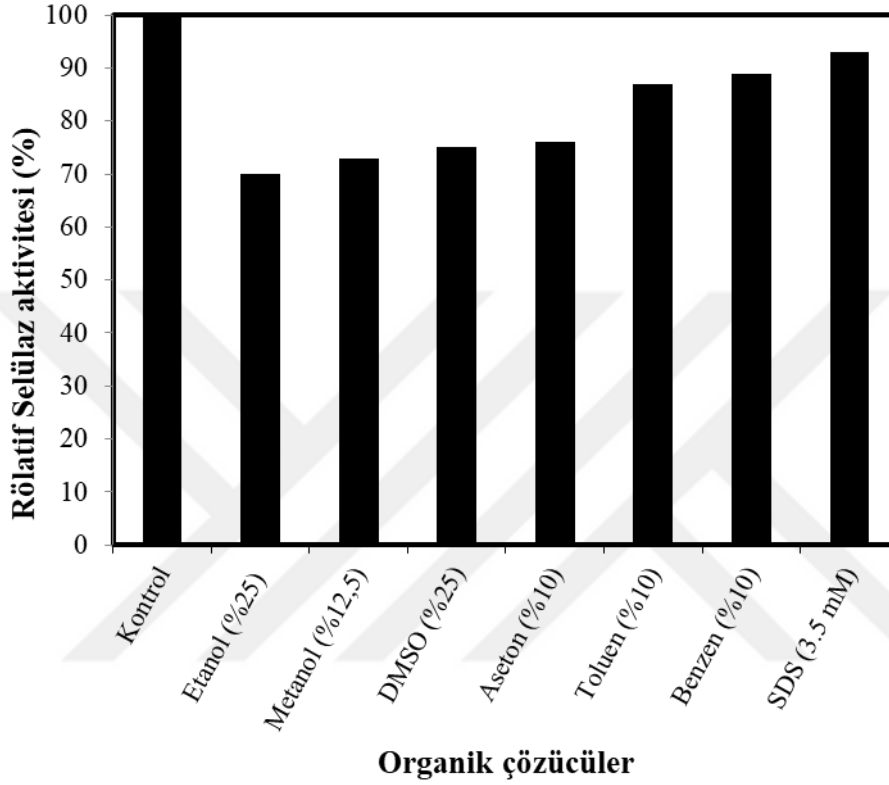
4.11.4. Saf selüloz enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı

rÇKT3eg saf selüloz enziminin aktivitesi ve stabilitesi üzerine organik çözücülerin etkisini incelemek amacıyla saf enzim 24 saat boyunca DMSO (%25), etanol (%25), metanol (%12.5), aseton (%10), toluen (%10), benzen (%10) ve SDS (3.5 mM) ile inkübe edilmiştir. Ardından, standart deney koşulları altında (50 °C, pH 8.0, 3.4 M NaCl) DNS deneyi ile aktivite ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak organik çözücü ile muamele edilmemiş saf enzimin kullanıldığı deney sonucu %100 alınıp diğer değerleri (%) rölatif olarak belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, enzim aktivitesinin en fazla inhibisyonunun %30'luk aktivite kaybı ile etanol (%25) varlığında gerçekleştiği, en az inhibitör etkiyi ise %93 oranında bir aktivite değeri SDS (%0.1, 3.5 mM)'in dahil olduğu deney şartlarında elde edildiği belirlenmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.32). Gerek ham gerekse de saf selüloz enzimi üzerinde aynı maddeler ve birbirine yakın oranlarda, inhibitör etkiye neden olmaktadır (Ham enzimin de bu organik çözücüler içerisinde en hassas olduğu maddenin etanol (%25), en etkisi düşük maddenin ise SDS (3.5 mM) olduğu belirlenmiştir).

Çizelge 4.4. Farklı organik çözücülerin saf selüloz enzim aktivitesi üzerindeki etkileri

Organik Çözücüler	% Selüloz aktivitesi	U/mL
Kontrol	100	150.7
Etanol (%25)	70	106.7
Metanol (%12.5)	73	111.1
DMSO (%25)	75	113.8

Aseton (%10)	76	114.5
Toluen (%10)	87	132.3
Benzen (%10)	89	135.5
SDS (3.5 mM)	93	140.1



Şekil 4.32. rÇKT3eg saf selülaaz enziminin farklı organik çözücülerde kararlılığı

Literatür incelendiğinde farklı suşlarda benzer çalışmaların rapor edildiği görülmektedir. Örneğin, deniz bakterisi *Photobacterium panuliri* LBS5 suşuna ait *cel8* geni *E. coli* BL21'ye klonlanmış, ifadesi sağlanan ve saflaştırılan rekombinant enzimin optimum aktivitesi, 40 °C'de, pH 4.0'te ve 2 M NaCl varlığında belirlenmiştir. Enzim, farklı organik çözücülerde olağanüstü bir stabilite sergilemiş ve aktivite, bütanol, izopropanol, petrol eteri, benzen, aseton ve n-heksan varlığında yaklaşık 1,5 kat artmıştır. DMSO, enzimatik stabiliteyi etkilemese de, etanol ve metanol varlığında aktivitenin %20'sinden fazlası kayba uğramıştır (Deep vd, 2016). Başka bir çalışmada, halofilik ve alkalitermofilik bakteri *Alkalilimnicola* sp. suşunda selülaaz enzimi kodlayan *en5H* geni *E. coli* BL21 hücrelerine klonlanmış ve heterolog olarak ifade edilen rekombinant selülazın farklı organik çözücülerde kararlılığı test

edilmiştir. Etanol (%20), metanol (%20), DMSO (%20), aseton (%20), benzen (%20) ve SDS (%1) kullanılarak yapılan deneyde en fazla inhibisyonun etanol (%43), aseton (%40) ve SDS (%33)'te olduğu, en az inhibisyonun ise metanol (%19), DMSO (%15) ve benzen (%14) varlığında gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Mesbah ve Wiegel, 2017).

Hem *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham enzimine hem de *E. coli* BLÇKT3EG'den saflaştırılan rÇKT3eg saf selülag enzimine ait aktivite ve stabilite değerleri sırasıyla Çizelge 4.5 ve 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.5. Ham ve saf selülag enzim üretimi için optimum koşullar ve aktivite değerleri

Selülag Enzimi Kaynağı	pH	Sıcaklık (°C)	NaCl (M)	Selülag Aktivitesi (U/mL)	Toplam protein konsantrasyonu (mg/mL)	Spesifik aktivite (U/mg)
Ham selülag	7.0	70	4	169.58 ± 2.6095	10	16.9
rÇKT3eg	7.0	50	3	151.7 ± 2.481	4.8	31.6

Çizelge 4.6. Ham ve saf selülag enziminin stabilitesi

Selülag Enzimi Kaynağı	Termo stabilite	pH stabilite	NaCl stabilite	Organik çözücü stabilitesi
Ham selülag enzimi	37 °C %96.1	7.0 %98.6	3 M %98.9	SDS (%0.1)/%98 DMSO (%25)/%77
rÇKT3eg	25 °C %93.6	7.0 %98.5	3 M %98.1	SDS (%0.1)/%93 Etanol (%25)/%70

Literatürde farklı çalışmalarda, belirli bir mikroorganizmaya ait selülag enziminin ham ve rekombinant formlarının enzim aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Sözgelimi, Boonvitthya vd (2013)'ne ait çalışmada *Pichia pastoris* suşundan elde edilen selülag

enziminin en iyi aktivitesinin optimum pH: 5.0 ve 60 °C’de olduğu belirlenmiştir. pH ve sıcaklık stabilitesi açısından değerlendirildiğinde ise pH: 4.0-8.0 aralığında en kararlı olduğu pH değerinin 4.5 olduğu (%100), pH: 4.0 değerinde %80’inden fazla aktivitesini koruduğu gözlemlenmiştir. pH: 5.0’de ise aktivitesinin %40’ını kaybettiği görülmüştür. 40-100 °C aralığında stabilitesi denenmiş ve aktivitesinin en fazla korunduğu (%100) sıcaklıkların 40 ila 50 °C olduğu görülmüş, 60 °C’de ise aktivitesinin yalnızca %2’sini kaybettiği saptanmıştır. Selülaz enzimini kodlayan *egII* geni *E. coli* BL21’e klonlanmış ve heterolog olarak ifade edilen rekombinant selülazın optimum pH: 4.8 ve 75 °C’de olduğu görülmüştür. Rekombinant selülazın stabilitesi test edildiğinde ise deney sonucunda pH: 4.0-8.0 aralığında en kararlı olduğu pH değerinin 4.5 olduğu (%100), pH: 4.0 değerinde aktivitesini %70’den fazla koruduğu gözlemlenmiştir. pH: 5.0’de ise aktivitesinin %30’unu kaybettiği görülmüştür. 40-100 °C aralığında stabilitesi denenmiş ve aktivitesinin en fazla korunduğu (%95) sıcaklıkların 45 ila 70 °C olduğu görülmüş, 75 °C’de ise aktivitesinin yalnızca %2’sini kaybettiği saptanmıştır.

Başka bir çalışmada, Yang vd (2010), izole ettikleri yüksek selülaz aktiviteli bakteriyi 16S rRNA ve morfolojik olarak tanımlamışlardır. *Bacillus subtilis* I15 olarak isimlendirilen termofilik bakteriden izole edilen enzim, maksimum aktivitesini optimum 60 °C ve pH: 6.0’da göstermiştir. 60 °C’de 2 saatlik inkübasyondan sonrası pH ve sıcaklık stabilitesi değerlendirildiğinde, enzimin pH: 5.0-10.0 aralığında en kararlı olduğu pH değerinin 6.0 olduğu gözlemlenmiştir. Sıcaklık testinde ise 40-100 °C aralığında kararlılığı denenmiş ve aktivitesinin en fazla korunduğu sıcaklığın 60 °C olduğu görülmüştür. Selülaz enzimini kodlayan *celI15* geni *E. coli* BL21’e klonlanmış ve heterolog olarak ifade edilen rekombinant selülazın optimum pH: 6.0 ve 65 °C’de olduğu görülmüştür. Rekombinant selülazın 65 °C’de 2 saatlik inkübasyondan sonra pH ve sıcaklık stabilitesi test edilmiştir. pH: 5.0-10.0 aralığında en kararlı olduğu pH değerinin 6.0 olduğu, 40-100 °C aralığında ise aktivitesinin en fazla korunduğu sıcaklığın 65 °C olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Enzim ve mikrobiyal biyoteknoloji ürün ve bu ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve aynı zamanda ekonomik değerinin yüksek olması nedeniyle enzim ticaretinde dışa bağımlı ülkeler için gün geçtikçe önem arz etmektedir. Endüstriyel enzimlerin %90'ının mikroorganizmalardan sağlanmasının sebebi biyoçeşitliliğin yüksek oranda olması ve bu biyoçeşitliliğin genetik anlamda yapılacak modifikasyonlara uygun olmasıdır. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, istenmeyen yan ürün meydana getirmemeleri, daha dengeli ve daha az maliyetli olmaları, büyük oranlarda ve yüksek saflıkta elde edilmeleri gibi avantajları nedeniyle enzim teknolojisinde neredeyse tek kaynak olarak birinci sırayı almaktadırlar (Wiseman, 1985; Horikoshi, 1999).

Dewan (2014), endüstriyel enzim marketinin 2018'de 7100 milyon dolara ulaşacağını, ve 5 yıllık periyot süresince yıllık ilerleme hızının %8 olduğunu rapor etmiştir (Dumorne vd, 2017). 2024'te ise 10,519 milyon dolara ulaşacağı öngörülmektedir (<https://www.prnewswire.com/news-releases/global-enzymes-market-expected-to-reach-10-519-million-by-2024-898959866.html>). Günümüzde selüloz (endoglukanaz) enziminin dünya enzim ticaretindeki yeri yaklaşık %20 düzeyindedir (Kuduğ, 2013).

Bu çalışmada, selüloolitik aktiviteyi gösteren *Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, ÇKT1, ÇKT2 ve ÇKT3 suşları ile *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2 suşları ile çalışılmıştır. Tüm suşların nitel selüloz aktivitelerinin belirlenmesi için iki farklı inkübasyon sıcaklığı (37 ve 50 °C) ve CMCNa içeren altı farklı katı besiyeri (SG+CMCNa, CM+CMCNa, DSM+CMCNa, SCM+CMCNa, MH+CMCNa ve NM+CMCNa) kullanılmıştır. Kongo Red (%0.1) metodu ile sonuçlar değerlendirildiğinde, 37 °C sıcaklıkta CM ve SG'de ve *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunda en iyi aktivite gözlemlenmiştir. Ardından, *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunun CM ve SG besiyerlerindeki selüloz üretimi ortamda üretilen indirgeyici şeker konsantrasyonu miktarını baz alan DNS yöntemi ile nicel olarak belirlenmiş ve SG'de aktivitenin daha iyi olduğu tespit edilerek çalışmaya SG besiyeri ile devam edilmiştir.

Haloarcula sp. ÇKT3'e ait SG kültürlerinden amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen ham selüloz enziminin karakterizasyonu amacıyla farklı sıcaklık (25, 37,

50, 60, 70, 80, 90 °C) ve pH (3.0, 5.0, 7.0, 8.0, 10.0) değerleri ile farklı konsantrasyonlarda NaCl (0, 1, 2, 3, 4, 5 M) varlığında optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre, *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham selüloz enziminin optimum 70 °C sıcaklıkta, pH: 7.0 değerinde ve 4 M NaCl varlığında 169.58 U/ml aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ham selüloz enziminin farklı sıcaklık, pH ve NaCl varlığında stabilitesinin belirlenmesi amacıyla optimizasyonda kullanılan değerlerde enzim 24 saat inkübe edilip standart koşullarda DNS metodu ile aktivite değerleri hesaplanmıştır. *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham selüloz enziminin kontrole kıyasla 37-50 °C aralığında %95 oranında, 60-90 °C arasında ise %80 oranında aktivitesini devam ettirdiği tespit edilmiştir. pH stabilitesi incelendiğinde, ham selüloz aktivitesinin en yüksek değeri pH: 7.0'de %98.6'lık bir kararlılıkta elde edilmiştir. pH stabilitesi pH: 7.0-8.0 aralığında %98.6'dan %79.2'ye düşmüştür. pH: 10.0'daki kararlılığı %76.6 bulunmuştur. Ham selüloz enzim aktivitesinin %90'dan fazlası 2 ila 4 M NaCl aralığında korunurken en yüksek kararlılığın 3 M NaCl varlığında 24 saat inkübasyon sırasında elde edildiği belirlenmiştir. 0 M ve 1 M NaCl içeren inkübasyon çözeltisinde selüloz aktivitesi sırasıyla %83.5 ve %86.9 oranında korunmuştur. Ayrıca, organik çözücüler varlığında *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham selülozunun enzim aktivitesi değerlendirilmiş, en fazla inhibisyonunun %23 ve %22 oranında aktivite kaybı ile sırasıyla DMSO (%25) ve etanol (%25) varlığında gerçekleştiği, enzimin en kararlı aktiviteyi ise 3.5 mM SDS varlığında gösterdiği (%95) tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, *Haloarcula* sp. ÇKT3 ham selülozunun yüksek sıcaklık (50 °C), nötr pH (7.0) ve yüksek NaCl konsantrasyonlarında (2-4 M) kararlılığının %90 oranında devam ettirebilen, aynı zamanda farklı organik çözücü varlığında dayanıklı, bu nedenle de biyoteknolojik açıdan kullanılabilirliği yüksek bir enzim olduğunu ortaya koymaktadır.

Ladeira vd (2015)'ne ait çalışmada termofilik bakteri *Bacillus* sp. SMIA-2 suşundan elde edilen selüloz enziminin optimum çalışma koşullarının 70 °C'de ve pH: 7.5 değerinde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca 30-90 °C sıcaklık aralığında kararlılığı test edilen selüloz enziminin, 40 ila 60 °C aralığında aktivitesinin %95'inden fazlasını koruduğu gözlemlenmiştir. pH 6.0-11.0 aralığında stabilitesine bakıldığında ise pH 7.0 ila 7.5 değerlerinde aktivitesinin %100'üne yakını koruduğu rapor edilmiştir. Elde edilen selüloz enziminin deterjan endüstrisi için potansiyel bir aday olabileceği rapor edilmiştir. *Haloarcula* sp. ÇKT3'ten izole

edilen selülaaz enziminin en iyi aktivitesinin 70 °C, pH: 7.0 ve 4 M NaCl varlığında olması ve aktivitesinin 25-50 °C aralığında %95'ten fazlasını korunması ve yine pH: 5.0-7.0 aralığında aktivitesinin yalnızca %5'ini kaybetmesi dikkat çekicidir. Bu özellikleriyle, *Haloarcula* sp. ÇKT3 selülazının deterjan endüstrisi alanında kullanılabileceği öngörülmektedir. Düşük sıcaklıkta yüksek aktiviteye sahip olması deterjan sektörü dışında tekstil alanında da kullanılabilirliğini işaret etmektedir. pH stabilitesi bakımında hafif asidik-nötr değerlerin daha iyi sonuç vermesi açısından değerlendirildiğinde ise hemiselülozik materyalin gıdalardan uzaklaştırılmasında yararlı olabileceği görülmektedir.

Haloarcula sp. ÇKT3 tarafından kodlanan ve bu çalışmada *ÇKT3eg* olarak adlandırılan endoglukanaz geni PZR ile amplifiye edilip pGEM-T® Easy ara vektörüne klonlanmıştır. 1059 bp uzunluğundaki *ÇKT3eg* geninin “atg” başlangıç kodunu ile başlayıp bir “tag” stop kodunu ile sona erdiği, bu genin 352 aminoasitlik ve 36.9 kDa ağırlığında bir ürünü kodladığı belirlenmiştir. En yüksek %96'lık aminoasit dizisi benzerlik yüzdesi ile *Haloarcula marismortui* ATCC 43049'ye (Baliga vd, 2004) ait endoglukanaza özdeşlik göstermektedir.

Rekombinant pGEM-T® Easy'deki *ÇKT3eg* geni pET-28a(+) vektörü aracılığı ile *E. coli* BL21 (DE3) hücrelerine aktarılmıştır. Rekombinant hücrelerde 1 mM IPTG ile 5 saat inkübasyonun ardından ifadesi sağlanan rekombinant *ÇKT3eg* amino ucuna eklenen histidinlerde (His-Tag) var olan imidazol grubunun nikel ile afinitesinden dolayı afinite kromatografisi ile denatüre koşullarda saflaştırılmış ve diyaliz ile renatüre edilmiştir. Liyofilizasyon ile ise derişimi arttırılan saf r ÇKT3eg enziminin selülaaz aktivitesinin optimizasyonu çalışmaları yürütülmüştür. Ham enzimde uygulanan koşullarda gerçekleştirilen optimizasyon deneyleri sonucunda en iyi aktivite 50 °C ve pH: 7.0 değerlerinde, ve 3 M NaCl varlığında elde edilmiştir (151.7 U/ml). Her iki enzime ait spesifik selülaaz aktivite değerleri kıyaslandığında r ÇKT3eg 'nin 31.6 U/mg spesifik aktivite ile ham selülazdan (16.9 U/mg) %46.5 oranında daha etkin olduğu bulunmuştur.

Termostabilite sonuçlarına göre, r ÇKT3eg aktivitesinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında 50 °C'ye kadar %90 oranında korunmakta olduğu, 90 °C'de ise aktivite kaybının %23'e ulaştığı belirlenmiştir. pH stabilitesi, %98.5 aktivite oranı ile en iyi pH: 7.0 değerinde elde edilmiştir. pH:10.0 değerinde aktivite kaybı %35 civarındadır. NaCl stabilitesi sonucuna bakıldığında ham selülaaz enzimine ait NaCl

stabilite sonuçları ile oldukça benzerlik göstermektedir. Saf enzim aktivitesinin %90'dan fazlasının 1 ile 4 M NaCl aralığında korunduğu en yüksek aktivitesin %98.1 ile 3 M NaCl varlığında gerçekleştiği tespit edilmiştir. NaCl yokluğunda selüloz enzim aktivitesi %84.3 oranında stabil kalmıştır. rÇKT3eg saf selüloz enzim aktivitesi 3.5 mM SDS varlığında %93 oranında stabil iken %25 etanol varlığında %30 oranında kayba uğramıştır. Optimizasyon ve stabilite deney sonuçları karşılaştırıldığında rÇKT3 enziminin ham ÇKT3eg enzimi gibi yüksek sıcaklık (50 °C), nötr pH (7.0) ve yüksek NaCl konsantrasyonlarında (2-4 M) kararlılığını %90 oranında devam ettirebildiği görülmektedir. Ayrıca, bu termostabil, tuz ve pH-toleransı geniş selüloz, yüksek tuz konsantrasyonu altında selüloz degradasyonu işlemlerinde kullanılmak üzere umut verici bir aday enzim olduğu görülmektedir.

Aygan ve Arikan (2008) tarafından yapılan çalışmada, Van Gölü'nden izole edilen halofilik *Bacillus* sp. C14 suşundan elde edilen selüloz enziminin optimum pH 11.0'de, 50 °C'de ve 3.4 M NaCl varlığında aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus* sp. C14 selülozünün, pH 6.0-12.0 değerlerinde ve 20-90 °C sıcaklık aralığında 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin %60'ından fazlasını koruduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, EDTA (5 mM) ve SDS (34.6 mM) inhibitörlerine karşı sırasıyla %93 ve %81 oranında aktivitesini koruduğu, Triton X-100 (%1), üre (8 M) KCl (5 mM) ve PMSF (5 mM) gibi inhibitör maddeler varlığında ise enzim aktivitesinin %50'nin altında kaldığı gözlemlenmiştir.

Shivanand vd (2013), tarafından yapılan çalışmada ise, Hindistan'da tuzlu bataklık ekosistemlerinden toplanan toprak ve su örnekleri kullanılarak izole edilen *Halomonas* sp. PS47 suşunun ürettiği selüloz enziminin optimum pH 7.5'te, 30 °C'de ve 1 M NaCl varlığında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu enzimin, pH 7.0-10.0 değerlerinde ve 35-65 °C sıcaklık aralığında 24 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin %60'ından fazlasının korunduğu gözlemlenmiştir.

Ticari enzimlerin endüstriyel alanda birçok uygulama alanına sahip olması sebebiyle doğal ortamdan elde edilen enzimlerin bu sektördeki talebi karşılayamadığı açıktır. Bu nedenle, biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğindeki kaydedilen ilerlemeler, meydana gelen yeni yöntemler göz önüne alınarak enzim endüstrisinde kullanılan mikroorganizmaların önemi her geçen gün daha da artmaktadır. Çankırı Kaya Tuzu mağarası izolatu olan *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşuna

ait selölaz enziminin karakterize edildiği bu çalışma ile endüstriyel enzim piyasasında önemli rol üstlenebilecek bir molekülün tanımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın devamında, gerek ham gerekse de rKT3eg'nin EDTA, PMSF, üre gibi farklı inhibitör maddeler varlığında kararlılığı tespit edilerek enzim hakkında daha fazla bilgi edinilebilecektir.



KAYNAKLAR

- Abanoz, B. 2016. Halofilik bakterilerde tuz direncini sağlayan moleküler mekanizmaların ve endüstriyel enzim üretimlerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Samsun*, 120.
- Adrio, J. and Demain, A. 2014. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules* 4: 117–139.
- Aehle, W. 2007. *Enzymes In Industry: Production And Applications*. John Wiley & Sons,
- Ahuja, S. K., Ferreira, G. M. and Moreira, A. R. 2004. Utilization of enzymes for environmental applications. *Critical Reviews In Biotechnology*, 24:2-3, 125-154.
- Akita, M., Kayatama, K., Hatada, Y., Ito, S. and Horikoshi, K. 2005. A novel β -glucanase gene from *Bacillus halodurans* C-125. *FEMS Microbiology Letters*, 248:1, 9-15.
- Ali, I., Akbar, A., Yanwisetpakdee, B., Prasongsuk, S., Lotrakul, P. and Punnapayak, H. 2014a. Purification, characterization, and potential of saline waste water remediation of a polyextremophilic α -amylase from an obligate halophilic *Aspergillus gracilis*. *BioMed Research International*, 2014.
- Ali, I., Siwarungson, N., Punnapayak, H., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Bankeeree, W. and Rakshit, S. K. 2014b. Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in Phetchaburi province, Thailand. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 983-988.
- Amoozegar, M. A., Fatemi, A. Z., Karbalaie-Heidari, H. R. and Razavi, M. R. 2007. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. *Microbiological Research*, 162:4, 369-377.
- Amoozegar, M. A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M. and Naddaf, S. 2008. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. *Journal of Basic Microbiology*, 48:3, 160-167.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S. and Balasubramanian, T. 2013. Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate Polymers*, 94:1, 409-415.
- Ara, I., Daram, D., Baljinova, T., Yamamura, H., Hozzein, W., Bakir, M. and Suto, M. 2013. Isolation, classification, phylogenetic analysis and scanning electron microscopy of halophilic, halotolerant and alkaliphilic actinomycetes isolated from hypersaline soil. *African Journal of Microbiology Research*, 7:4, 298-308.

- Araujo, R., Casal, M. and Cavaco-Paulo, A. 2008. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26:5, 332-349.
- Awasthi, M. K., Wong, J. W., Kumar, S., Awasthi, S. K., Wang, Q., Wang, M., Ren, X., Zhao, J., Chen, H. and Zhang, Z. 2018. Biodegradation of food waste using microbial cultures producing thermostable α -amylase and cellulase under different pH and temperature. *Bioresource Technology*, 248, 160-170.
- Aygan, A. and Arikan, B. 2008. A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic *Bacillus* sp. C14 isolated from Van Soda Lake. *Int J Agric Biol*, 10, 369-374.
- Aygan, A., Arikan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S. and Çolak, Ö. 2008. Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:3, 547-553.
- Bailey, D. G. 1992. *Inedible Meat by-Products*. Springer, 19-34.
- Bairoch, A. 2000. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Research*, 28:1, 304-305.
- Bakhtiar, S., Estiveira, R. J. and Hatti-Kaul, R. 2005. Substrate specificity of alkaline protease from alkaliphilic feather-degrading *Nesterenkonia* sp. AL20. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:5, 534-540.
- Baliga, N. S., Bonneau, R., Facciotti, M. T., Pan, M., Glusman, G., Deutsch, E. W., Shannon, P., Chiu, Y., Weng, R. S. ve Gan, R. R. 2004. Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea. *Genome Research*, 14:11, 2221-2234.
- Bass-Becking, L. 1931. Historical notes on salt and salt-manufacture. *The Scientific Monthly*, 32:5, 434-446.
- Baumgartner, J. 1937. The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophile. *Journal of Food Science*, 2:4, 321-329.
- Beauchemin, K., Colombatto, D., Morgavi, D. and Yang, W. 2003. Use of Exogenous Fibrolytic Enzymes to Improve Feed Utilization by Ruminants 1 2. *Journal of Animal Science*, 81:14_suppl_2, E37-E47.
- Bell, E. 2012. *Life at Extremes: Environments, Organisms, And Strategies For Survival*. Cabi,
- Bestvater, T., Louis, P. and Galinski, E. A. 2008. Heterologous ectoine production in *Escherichia coli*: by-passing the metabolic bottle-neck. *Saline Systems*, 4:1, 12.
- Bhat, M. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18:5, 355-383.
- Bhat, M. and Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15:3-4, 583-620.

- Bhavsar, K., Gujar, P., Shah, P., Kumar, V. R. and Khire, J. 2013. Combinatorial approach of statistical optimization and mutagenesis for improved production of acidic phytase by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation condition. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 97:2, 673-679.
- Birbir, M., Ogan, A., Calli, B. and Mertoglu, B. 2004. Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:6, 613-621.
- Bommarius, A. S. and Paye, M. F. 2013. Stabilizing biocatalysts. *Chemical Society Reviews*, 42:15, 6534-6565.
- Boonvitthya, N., Bozonnet, S., Burapatana, V., O'Donohue, M. J. and Chulalakasanukul, W. 2013. Comparison of the heterologous expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase II and cellobiohydrolase II in the yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Molecular Biotechnology*, 54:2, 158-169.
- Boujelben, I., Yarza, P., Almansa, C., Villamor, J., Maalej, S., Antón, J. and Santos, F. 2012. Virioplankton community structure in Tunisian solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM. 01793-01712.
- Boutaiba, S., Bhatnagar, T., Hacene, H., Mitchell, D. and Baratti, J. 2006. Preliminary characterisation of a lipolytic activity from an extremely halophilic archaeon, *Natronococcus* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41:1-2, 21-26.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:1-2, 248-254.
- Budihal, S. R., Agsar, D. and Patil, S. R. 2016. Enhanced production and application of acidothermophilic *Streptomyces* sp. cellulase. *Bioresource Technology*, 200, 706-712.
- Caf, Y. 2012. Termofil *Bacillus* sp.'den Alkalın, Termofilik, Oksidant Dirençli, Proteaz Negatif Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı ADANA. 94.
- Cai, L., Tan, D., Aibaidula, G., Dong, X.-R., Chen, J.-C., Tian, W.-D. and Chen, G.-Q. 2011. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microbial Cell Factories*, 10:1, 88.
- Cao, Y., Zhang, H. and Xiong, P. 2014. Application of cellulase-assisted method to extract flavonoids from plants. *Agricultural Science & Technology*, 15:5, 729.
- Chakraborty, S., Khopade, A., Kokare, C., Mahadik, K. and Chopade, B. 2009. Isolation and characterization of novel α -amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58:1-4, 17-23.

- Chapman, J., Ismail, A. and Dinu, C. 2018. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8:6, 238.
- Chen, S., Su, L., Chen, J. and Wu, J. 2013. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 31:8, 1754-1767.
- Cheng, R., Xu, L., Wang, S., Wang, Y. and Zhang, J. 2014. Recombinant expression and characterization of an acid-, alkali- and salt-tolerant β -1, 3-1, 4-glucanase from *Paenibacillus* sp. S09. *Biotechnology letters*, 36:4, 797-803.
- Cho, Y.-H., Song, J. Y., Kim, K. M., Kim, M. K., Lee, I. Y., Kim, S. B., Kim, H. S., Han, N. S., Lee, B. H. and Kim, B. S. 2010. Production of nattokinase by batch and fed-batch culture of *Bacillus subtilis*. *New Biotechnology*, 27:4, 341-346.
- Choi, J.-M., Han, S.-S. and Kim, H.-S. 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. *Biotechnology Advances*, 33:7, 1443-1454.
- Choudhary, R., Jana, A. and Jha, M. 2004. Enzyme technology applications in leather processing.
- Chung, J., Shin, S. and Oh, J. 2009. Characterization of a microbial community capable of reducing perchlorate and nitrate in high salinity. *Biotechnology Letters*, 31:7, 959-966.
- Ciccarelli, F. D., Doerks, T., Von Mering, C., Creevey, C. J., Snel, B. and Bork, P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science*, 311:5765, 1283-1287.
- Clarke, J., Davidson, K., Rixon, J., Halstead, J., Fransen, M., Gilbert, H. and Hazlewood, G. 2000. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combinations of xylanase, mannanase and α -galactosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53:6, 661-667.
- Coligan, J. E. 1998. Commonly used detergents. *Current Protocols In Molecular Biology*, 43:1, A. 11. 1-A. 11. 3.
- DasSarma, P., Coker, J., Huse, V. and DasSarma, S. 2010. Halophiles, biotechnology. *Encyclopedia of industrial biotechnology, bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Edited by: Flickinger MC. 2010: Wiley, John & Sons, Incorporated.
- DasSarma, P., Coker, J. A., Huse, V. and DasSarma, S. 2009. Halophiles, industrial applications. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, 1-43.
- DasSarma, S. 2006. Extreme halophiles are models for astrobiology. *Microbe-American Society for Microbiology*, 1:3, 120.
- DasSarma, S. and Arora, P. 2002. Halophiles, encyclopedia of life sciences. 8: 458–466: London: Nature Publishing Group.

- de Lima, A. L. G., do Nascimento, R. P., da Silva Bon, E. P. and Coelho, R. R. R. 2005. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and Microbial Technology*, 37:2, 272-277.
- de Lourdes Moreno, M., García, M. T., Ventosa, A. and Mellado, E. 2009. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase-and protease-producing extreme halophile. *FEMS Microbiology Ecology*, 68:1, 59-71.
- Dewan, S. 2014. Global markets for enzymes in industrial applications. Wellesley, MA: BCC Research.
- Dincer, A. and Kargi, F. 2001. Performance of rotating biological disc system treating saline wastewater. *Process Biochemistry*, 36:8-9, 901-906.
- Dumorne, K., Córdova, D. C., Astorga-Eló, M. and Renganathan, P. 2017. Extremozymes: a potential source for industrial applications. *J Microbiol Biotechnol*, 27:4, 649-659.
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A. and Huyop, F. 2016. Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32:8, 135.
- Eisenberg, H. 1995. Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 318:1, 1-5.
- Elazari-Volcani, B. E. 1940. *Studies on The Microflora of The Dead Sea*,
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K. and Antranikian, G. 2014. Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. *Current Opinion In Biotechnology*, 29, 116-123.
- Endo, K., Hakamada, Y., Takizawa, S., Kubota, H., Sumitomo, N., Kobayashi, T. and Ito, S. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:1-2, 109-116.
- Englard, S. and Seifter, S. 1990. *Methods In Enzymology*. Elsevier, 285-300.
- Fu, G. Z., Chan, A. and Minns, D. 2005. Preliminary Assessment of the Environmental Benefits of Enzyme Bleaching for Pulp and Paper Making (7 pp). *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 10:2, 136-142.
- Fujiwara, S. 2002. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94:6, 518-525.
- Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A. and Usami, R. 2005. Organic solvent tolerance of halophilic α -amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles*, 9:1, 85-89.

- Gao, Z., Ruan, L., Chen, X., Zhang, Y. and Xu, X. 2010. A novel salt-tolerant endo- β -1, 4-glucanase *Cel5A* in *Vibrio* sp. G21 isolated from mangrove soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87:4, 1373-1382.
- Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Ebrahiminezhad, A., Kazemi, A., Shahbazi, M. and Talebnia, N. 2011. Screening and isolation of extracellular protease producing bacteria from the Maharloo Salt Lake. *Iranian journal of Pharmaceutical Sciences*, 7:3, 175-180.
- Ghosh, R., Chattopadhyay, P. K., Chattopadhyay, B. and Pal, D. 2010. Antibiotic resistance profile of halophilic microorganisms isolated from tannery effluent.
- Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N. and Plemenitaš, A. 2011. *Advances In Applied Microbiology*. Elsevier, 71-96.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J. and Plemenitaš, A. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological research*, 113:11, 1231-1241.
- Gunny, A. A. N., Arbain, D., Gumba, R. E., Jong, B. C. and Jamal, P. 2014. Potential halophilic cellulases for in situ enzymatic saccharification of ionic liquids pretreated lignocelluloses. *Bioresource Technology*, 155, 177-181.
- Guo, B., Chen, X.-L., Sun, C.-Y., Zhou, B.-C. and Zhang, Y.-Z. 2009. Gene cloning, expression and characterization of a new cold-active and salt-tolerant endo- β -1, 4-xylanase from marine *Glaciecola mesophila* KMM 241. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 84:6, 1107.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V. 2013. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Research International*, 2013.
- Güven, R. G. 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açından Önemli Bazı Enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9, 1-10.
- Hakamada, Y., Koike, K., Yoshimatsu, T., Mori, H., Kobayashi, T. and Ito, S. 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles*, 1:3, 151-156.
- Halldórsdóttir, S., Thorolfsdóttir, E., Spilliaert, R., Johansson, M., Thorbjarnardóttir, S., Palsdóttir, A., Hreggvidsson, G., Kristjansson, J., Holst, O. and Eggertsson, G. 1998. Cloning, sequencing and overexpression of a *Rhodothermus marinus* gene encoding a thermostable cellulase of glycosyl hydrolase family 12. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 49:3, 277-284.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166:4, 557-580.
- Hardiman, E., Gibbs, M., Reeves, R. and Bergquist, P. 2010. Directed evolution of a thermophilic β -glucosidase for cellulosic bioethanol production. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 161:1-8, 301-312.

- Hendricks, C. W., Doyle, J. D. and Hugley, B. 1995. A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:5, 2016-2019.
- Hezayen, F., Rehm, B., Eberhardt, R. and Steinbüchel, A. 2000. Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54:3, 319-325.
- Himmel, M. E., Ruth, M. F. and Wyman, C. E. 1999. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion In Biotechnology*, 10:4, 358-364.
- Hiraga, K., Nishikata, Y., Namwong, S., Tanasupawat, S., Takada, K. and Oda, K. 2005. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69:1, 38-44.
- Hof, T. 1935. Investigations concerning bacterial life in strong brines. *Recueil Des Travaux Botaniques Néerlandais*, 32:1, 92-173.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63:4, 735-750.
- Huang, X., Shao, Z., Hong, Y., Lin, L., Li, C., Huang, F., Wang, H. and Liu, Z. 2010. Cel8H, a novel endoglucanase from the halophilic bacterium *Halomonas* sp. S66-4: molecular cloning, heterogonous expression, and biochemical characterization. *The Journal of Microbiology*, 48:3, 318-324.
- Hutcheon, G. W., Vasisht, N. and Bolhuis, A. 2005. Characterisation of a highly stable α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, 9:6, 487-495.
- Huval, J. and Vreeland, R. 1991. Taxonomy of halophilic bacteria from underground saline waters and salt formations. *General and Applied Aspects of Halophilic Bacteria*, 53-60.
- Illanes, A., Cauerrhff, A., Wilson, L. and Castro, G. R. 2012. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, 48-57.
- Jaeger, K.-E. and Eggert, T. 2002. Lipases for biotechnology. *Current Opinion In Biotechnology*, 13:4, 390-397.
- Kamekura, M. and Onishi, H. 1974. Protease formation by a moderately halophilic *Bacillus* strain. *Applied Microbiology*, 27:4, 809-810.
- Karbalaee-Heidari, H. R., Amoozegar, M. A., Hajighasemi, M., Ziaee, A.-A. and Ventosa, A. 2009. Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36:1, 21-27.

- Khatri, V., Hébert-Ouellet, Y., Meddeb-Mouelhi, F. and Beauregard, M. 2016. Specific tracking of xylan using fluorescent-tagged carbohydrate-binding module 15 as molecular probe. *Biotechnology for Biofuels*, 9:1, 74.
- Klähn, S. and Hagemann, M. 2011. Compatible solute biosynthesis in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 13:3, 551-562.
- Kuduğ, H. 2013. Mikrobiyal kaynaklı selülöz enziminin *E. coli*'de rekombinant olarak üretilmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, TOKAT.
- Kuhad, R. C., Gupta, R. and Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. and Susa, Y. 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17:2, 221-246.
- Kurt, A. 2011. The regulatory effect of ccar activator on the cephamycin c gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. Ph.D., Department of Biological Sciences, 162.
- Kushner, D. 1985. The halobacteriaceae. *The Bacteria*, 8, 171-214.
- Ladeira, S. A., Cruz, E., Delatorre, A. B., Barbosa, J. B. and Leal Martins, M. L. 2015. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp: SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18:2, 110-115.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:5259, 680.
- Le Roes-Hill, M. and Prins, A. 2016. *Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. InTech.
- Li, T., Liang, J., Ambrogelly, A., Brennan, T., Gloor, G., Huisman, G., Lalonde, J., Lekhal, A., Mijts, B. and Muley, S. 2012a. Efficient, chemoenzymatic process for manufacture of the boceprevir bicyclic [3.1. 0] proline intermediate based on amine oxidase-catalyzed desymmetrization. *Journal of the American Chemical Society*, 134:14, 6467-6472.
- Li, X., Wang, H.-L., Li, T. and Yu, H.-Y. 2012b. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant alkaline cellulase from a halophilic isolate of *Thalassobacillus*. *Biotechnology Letters*, 34:8, 1531-1536.
- Li, X. and Yu, H.-Y. 2012. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus* sp. L1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39:8, 1117-1124.
- Li, X. and Yu, H.-Y. 2013a. Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from *Haloarcula* sp. G10. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 62, 101-106.

- Li, X. and Yu, H.-Y. 2013b. Halostable cellulase with organic solvent tolerance from *Haloarcula* sp. LLSG7 and its application in bioethanol fermentation using agricultural wastes. *Journal of industrial Microbiology & Biotechnology*, 40:12, 1357-1365.
- Liebl, W., Ruile, P., Bronnenmeier, K., Riedel, K., Lottspeich, F. and Greif, I. 1996. Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases, *CelA* and *CelB*, and characterization of the recombinant enzymes. *Microbiology*, 142:9, 2533-2542.
- Lima, A. O., Quecine, M. C., Fungaro, M. H., Andreote, F. D., Maccheroni, W., Araújo, W. L., Silva-Filho, M. C., Pizzirani-Kleiner, A. A. and Azevedo, J. L. 2005. Molecular characterization of a β -1, 4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68:1, 57-65.
- Lo, Y.-C., Saratale, G. D., Chen, W.-M., Bai, M.-D. and Chang, J.-S. 2009. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44:6-7, 417-425.
- Lopez-Ramirez, N., Volke-Sepulveda, T., Gaime-Perraud, I., Saucedo-Castañeda, G. and Favela-Torres, E. 2018. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. *Bioresource Technology*, 265, 291-298.
- Luque, R., Béjar, V., Quesada, E. and Llamas, I. 2014. Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Canadian Journal of Microbiology*, 60:12, 839-846.
- Lutz, S., Liu, L. and Liu, Y. 2009. Engineering kinases to phosphorylate nucleoside analogs for antiviral and cancer therapy. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 63:11, 737-744.
- Maijala, P., Kleen, M., Westin, C., Poppius-Levlin, K., Herranen, K., Lehto, J., Reponen, P., Mäentausta, O., Mettälä, A. and Hatakka, A. 2008. Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Enzyme and Microbial technology*, 43:2, 169-177.
- Mamo, G., Thunnissen, M., Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. 2009. An alkaline active xylanase: insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. *Biochimie*, 91:9, 1187-1196.
- Mandels, M. (1975). Microbial sources of cellulase. Biotechnology and bioengineering symposium, 81-105.
- Mane, P. and Tale, V. 2015. Overview of microbial therapeutic enzymes. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4:4, 17-26.
- Mao, S., Lu, Z., Zhang, C., Lu, F. and Bie, X. 2013. Purification, characterization, and heterologous expression of a thermostable β -1, 3-1, 4-glucanase from

- Bacillus altitudinis* YC-9. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169:3, 960-975.
- Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5:2, 73-83.
- Maurelli, L. and Morana, A. 2013. Hyperthermophilic enzymes: their potential in biotechnology. *Current Biotechnology*, 2:4, 313-324.
- Mehrshad, M., Amoozegar, M. A., Makhdoumi, A., Rasooli, M., Asadi, B., Schumann, P. and Ventosa, A. 2015. *Halovarius luteus* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a Salt Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65:8, 2420-2425.
- Menendez, E., Garcia-Fraile, P. and Rivas, R. 2015. Biotechnological applications of bacterial cellulases.
- Mesbah, N. M. and Wiegel, J. 2017. A halophilic, alkalithermostable, ionic liquid-tolerant cellulase and its application in in situ saccharification of rice straw. *BioEnergy Research*, 10:2, 583-591.
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. and Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry*, 1:2, 127-132.
- Mojsov, K. 2011. Application of enzymes in the textile industry: a review.
- Mongodin, E. F., Nelson, K., Daugherty, S., Deboy, R., Wister, J., Khouri, H., Weidman, J., Walsh, D., Papke, R. and Perez, G. S. 2005. The genome of *Salinibacter ruber*: convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:50, 18147-18152.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S. R., Baliga, N. S., Thorsson, V. and Sbrogna, J. 2000. Genome sequence of *Halobacterium species* NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:22, 12176-12181.
- Novy, R. and Morris, B. 2001. Use of glucose to control basal expression in the pET system. *Innovations*, 13, 13-15.
- Okafor, N. and Okeke, B. C. 2017. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. CRC Press,
- Olsen, O., Borriss, R., Simon, O. and Thomsen, K. K. 1991. Hybrid *Bacillus* (1-3, 1-4)- β -glucanases: engineering thermostable enzymes by construction of hybrid genes. *Molecular and General Genetics MGG*, 225:2, 177-185.
- Oren, A. 1983. Population dynamics of halobacteria in the Dead Sea water column1. *Limnology and Oceanography*, 28:6, 1094-1103.
- Oren, A. 2000. *Journey to Diverse Microbial Worlds*. Springer, 227-238.

- Oren, A. 2002a. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28:1, 56-63.
- Oren, A. 2002b. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 39:1, 1-7.
- Oren, A. 2006. *The prokaryotes*. Springer, 113-164.
- Oren, A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology*, 31:8-9, 825-834.
- Oren, A. 2012. Taxonomy of the family Halobacteriaceae: a paradigm for changing concepts in prokaryote systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:2, 263-271.
- Oren, A. 2014. Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 18:5, 825-834.
- Oren, A. and Gurevich, P. 1995. Dynamics of a bloom of halophilic archaea in the Dead Sea. *Hydrobiologia*, 315:2, 149-158.
- Oren, A. and Litchfield, C. D. 1998. Early salt production at the Dead Sea and the Mediterranean coast of the Holy Land. *JOURNAL OF SALT HISTORY*, 6, 7-18.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R. and Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 149-162.
- Patrick, K. 2004. Enzyme technology improves efficiency, cost, safety of stickies removal program. *Paper Age*, 120, 22-25.
- Pérez-Pomares, F., Díaz, S., Bautista, V., Pire, C., Bravo, G., Esclapez, J., Zafrilla, B. and Bonete, M.-J. 2009. Identification of several intracellular carbohydrate-degrading activities from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 13:4, 633-641.
- Petter, H. F. M. 1932. Over roode en andere bacterien van gezouten visch.
- Pierce, G. 1914. The behavior of certain microorganisms in brine. *Carnegie Inst Washington Publ*, 193, 49-69.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B. and Tang, J. 2007. Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews In Microbiology*, 33:3, 183-209.
- Plagemann, I., Zelena, K., Arendt, P., Ringel, P. D., Krings, U. and Berger, R. G. 2013. LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, 99-104.
- Polaina, J. and MacCabe, A. P. 2007. *Industrial Enzymes*. Springer,

- Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M., Muralikrishna, G. and Sreeramulu, K. 2009. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α -amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*, 44:2, 210-215.
- Premalatha, N., Gopal, N. O., Jose, P. A., Anandham, R. and Kwon, S.-W. 2015. Optimization of cellulase production by *Enhydrobacter* sp. ACCA2 and its application in biomass saccharification. *Frontiers In Microbiology*, 6, 1046.
- Queiroga, A. C., Pintado, M. M. and Malcata, F. X. 2007. Novel microbial-mediated modifications of wool. *Enzyme and Microbial technology*, 40:6, 1491-1495.
- Raju, A. A., Chandrababu, N., Samivelu, N., Rose, C. and Rao, N. M. 1996. Eco-friendly enzymatic dehairing using extracellular proteases from a *Bacillus species* isolate. *The Journal of the American Leather Chemists Association (USA)*.
- Ramos-Cormenzana, A. 1993. Ecology of moderately halophilic bacteria. *The Biology of Halophilic Bacteria*, 55-86.
- Ravindran, C., Varatharajan, G. R., Rajasabapathy, R., Vijayakanth, S., Kumar, A. H. and Meena, R. M. 2012. A role for antioxidants in acclimation of marine derived pathogenic fungus (NIOCC 1) to salt stress. *Microbial Pathogenesis*, 53:3-4, 168-179.
- Rebello, S., Jose, L., Sindhu, R. and Aneesh, E. M. 2017. Molecular advancements in the development of thermostable phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101:7, 2677-2689.
- Rodriguez-Valera, F. (1992). Biotechnological potential of halobacteria. Biochemical Society Symposium, 135-147.
- Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers In Microbiology*, 5, 172.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S. K., Mayilraj, S. and Maiti, T. K. 2013. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *SpringerPlus*, 2:1, 10.
- Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S. and Benjamin, S. 2016. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *J Nutr Food Sci*, 6:1, 461.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold spring harbor laboratory press,
- Sánchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E. and Ventosa, A. 2003. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94:2, 295-300.
- Sankaran, S. 1995. *Five Decades of Leather: A Journey Down Memory Lane*. Indian Leather,

- Saratale, G., Chien, I. and Chang, J. 2011. Enzymatic pretreatment of cellulosic wastes for anaerobic treatment and bioenergy production. *Environmental Anaerobic Technology Applications and New Developments*. London Imperial College Press, London, UK, 279-308.
- Sarwar, M. K., Azam, I. and Iqbal, T. 2015. Biology and Applications of Halophilic Bacteria and Archaea: A. *Electronic Journal of Biology*, 11:3, 98-103.
- Schimming, S., Schwarz, W. H. and Staudenbauer, W. L. 1991. Properties of a thermoactive β -1, 3-1, 4-glucanase (lichenase) from *Clostridium thermocellum* expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 177:1, 447-452.
- Sehgal, S. and Gibbons, N. 1960. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 6:2, 165-169.
- Sepcic, K., Zalar, P. and Gunde-Cimerman, N. 2011. Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi. *Marine Drugs*, 9:1, 43-58.
- Setati, M. E. 2010. Diversity and industrial potential of hydrolaseproducing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9:11, 1555-1560.
- Setyorini, E., Takenaka, S., Murakami, S. and Aoki, K. 2006. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70:2, 433-440.
- Severin, J., Wohlfarth, A. and Galinski, E. A. 1992. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *Microbiology*, 138:8, 1629-1638.
- Sharma, S. K., Kalra, K. L. and Kocher, G. S. 2004. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. *Biomass and Bioenergy*, 27:4, 399-402.
- Shi, R., Li, Z., Ye, Q., Xu, J. and Liu, Y. 2013. Heterologous expression and characterization of a novel thermo-halotolerant endoglucanase *Cel5H* from *Dictyoglomus thermophilum*. *Bioresource Technology*, 142, 338-344.
- Shiari, B., Miller, R. E. and Klug, D. D. 2008. Multiscale modeling of solids at the nanoscale: dynamic approach. *Canadian Journal of Physics*, 86:2, 391-400.
- Shivanand, P. and Jayaraman, G. 2009. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium, *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry*, 44:10, 1088-1094.
- Shivanand, P., Mugeraya, G. and Kumar, A. 2013. Utilization of renewable agricultural residues for the production of extracellular halostable cellulase from newly isolated *Halomonas* sp. strain PS47. *Annals of Microbiology*, 63:4, 1257-1263.

- Shweta, A. 2012. Cellulases of bacterial origin and their applications: A review. *International Journal of Science and Research*, 3, 1652-1655.
- Simankova, M., Chernych, N., Osipov, G. and Zavarzin, G. 1993. *Halocella cellulolytica* gen. nov., sp. nov., a new obligately anaerobic, halophilic, cellulolytic bacterium. *Systematic and Applied Microbiology*, 16:3, 385-389.
- Singh, J., Batra, N. and Sobti, R. C. 2004. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31:2, 51-56.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P. K. 2016. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6:2, 174.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P. K. 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, 7:1, 15.
- Smith, A. D., Datta, S. P. and Smith, G. H. 1997. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press,
- Spilliaert, R., Hreggvidsson, G. O., Kristjansson, J. K., Eggertsson, G. and Palsdottir, A. 1994. Cloning and Sequencing of a *Rhodothermus marinus* Gene, *bglA*, Coding for a Thermostable β -Glucanase and its Expression in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 224:3, 923-930.
- Srivastava, N. and Singh, P. 2015. Degradation of toxic pollutants from pulp & paper mill effluent. *Discovery*, 40:183, 221-227.
- Stryer, L. 1995. Enzymes: basic concepts and kinetics. *Biochemistry*, 4, 181-206.
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., Mathew, G. M. and Pandey, A. 2009. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 34:2, 421-424.
- Tabernero, C., Coll, P. M., Fernández-Ábalos, J. M., Perez, P. and Santamaría, R. I. 1994. Cloning and DNA sequencing of *bgaA*, a gene encoding an endo-beta-1, 3-1, 4-glucanase, from an alkalophilic *Bacillus* strain (N137). *Applied and Environmental Microbiology*, 60:4, 1213-1220.
- Tazi, L., Breakwell, D. P., Harker, A. R. and Crandall, K. A. 2014. Life in extreme environments: microbial diversity in Great Salt Lake, Utah. *Extremophiles*, 18:3, 525-535.
- Teng, D., Wang, J.-h., Fan, Y., Yang, Y.-l., Tian, Z.-g., Luo, J., Yang, G.-p. and Zhang, F. 2006. Cloning of β -1, 3-1, 4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72:4, 705-712.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. and Jha, B. 2011. Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase. *Chemosphere*, 83:5, 706-712.

- Van Der Maarel, M. J., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94:2, 137-155.
- Vellard, M. 2003. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:4, 444-450.
- Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. Symposia-society for general microbiology, Cambridge; Cambridge University Press; 1999, 223.
- Ventosa, A., Arahall, D. R. and Volcani, B. E. 1999. Studies on the microbiota of the Dead Sea—50 years later. *Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments*, 139-147.
- Ventosa, A., de la Haba, R. R., Sánchez-Porro, C. and Papke, R. T. 2015. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 80-87.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. and Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:2, 504-544.
- Vidyasagar, M., Prakash, S., Mahajan, V., Shouche, Y. S. and Sreeramulu, K. 2009. Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:1, 12-19.
- Voget, S., Steele, H. and Streit, W. 2006. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal of Biotechnology*, 126:1, 26-36.
- Volcani, B. 1944. The microorganisms of the Dead Sea. *Papers Collected to Commemorate The 70th Anniversary of Dr. Chaim Weizmann*, 71-85.
- Wainø, M. and Ingvorsen, K. 2003. Production of β -xylanase and β -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7:2, 87-93.
- Wang, C.-Y., Hsieh, Y.-R., Ng, C.-C., Chan, H., Lin, H.-T., Tzeng, W.-S. and Shyu, Y.-T. 2009. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio* sp. strain NTU-05. *Enzyme and Microbial Technology*, 44:6-7, 373-379.
- Wang, X., Wang, X., Liu, M., Zhou, L., Gu, Z. and Zhao, J. 2016a. Bioremediation of marine oil pollution by *Brevundimonas diminuta*: effect of salinity and nutrients. *Desalination and Water Treatment*, 57:42, 19768-19775.
- Wang, Y., Yu, W. and Han, F. 2016b. Expression and characterization of a cold-adapted, thermotolerant and denaturant-stable GH5 endoglucanase Celal_2753 that withstands boiling from the psychrophilic bacterium *Cellulophaga algicola* IC166 T. *Biotechnology letters*, 38:2, 285-290.

- Wang, Z.-X., Shi, X.-X., Chen, G.-R., Ren, Z.-H., Luo, L. and Yan, J. 2006. A new synthesis of α -arbutin via Lewis acid catalyzed selective glycosylation of tetra-O-benzyl- α -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate with hydroquinone. *Carbohydrate Research*, 341:11, 1945-1947.
- Wilkansky, B. 1936. Life in the dead sea. *Nature*, 138:3489, 467.
- Wiseman, A. 1985. *Handbook of Enzyme Biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The Application of Enzymes In Industry*. E. Horwood, 274-373.,
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87:12, 4576-4579.
- Xiang, W., Guo, J., Feng, W., Huang, M., Chen, H., Zhao, J., Zhang, J., Yang, Z. and Sun, Q. 2008. Community of extremely halophilic bacteria in historic Dagong Brine Well in southwestern China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:10, 2297-2305.
- Xu, Q., Barak, Y., Kenig, R., Shoham, Y., Bayer, E. A. and Lamed, R. 2004a. A novel *Acetivibrio cellulolyticus* anchoring scaffoldin that bears divergent cohesins. *Journal of bacteriology*, 186:17, 5782-5789.
- Xu, Q., Bayer, E. A., Goldman, M., Kenig, R., Shoham, Y. and Lamed, R. 2004b. Architecture of the *Bacteroides cellulosolvens* cellulosome: description of a cell surface-anchoring scaffoldin and a family 48 cellulase. *Journal of Bacteriology*, 186:4, 968-977.
- Yachmenev, V. G., Bertoniere, N. R. and Blanchard, E. J. 2002. Intensification of the bio-processing of cotton textiles by combined enzyme/ultrasound treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 77:5, 559-567.
- Yang, D., Weng, H., Wang, M., Xu, W., Li, Y. and Yang, H. 2010. Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15. *Molecular Biology Reports*, 37:4, 1923-1929.
- Yang, H., Liu, L., Li, J., Du, G. and Chen, J. 2011. Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline α -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microbial cell Factories*, 10:1, 77.
- Yin, Y.-R., Zhang, F., Hu, Q.-W., Xian, W.-D., Hozzein, W. N., Zhou, E.-M., Ming, H., Nie, G.-X. and Li, W.-J. 2015. Heterologous expression and characterization of a novel halotolerant, thermostable, and alkali-stable GH6 endoglucanase from *Thermobifida halotolerans*. *Biotechnology Letters*, 37:4, 857-862.
- Yu, H.-Y. and Li, X. 2015. Alkali-stable cellulase from a halophilic isolate, *Gracilibacillus* sp. SK1 and its application in lignocellulosic saccharification for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 81, 19-25.
- Yue, H., Ling, C., Yang, T., Chen, X., Chen, Y., Deng, H., Wu, Q., Chen, J. and Chen, G.-Q. 2014. A seawater-based open and continuous process for

polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnology for Biofuels*, 7:1, 108.

Zhang, G., Li, S., Xue, Y., Mao, L. and Ma, Y. 2012. Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus* sp. BG-CS10. *Extremophiles*, 16:1, 35-43.

Zhang, T., Datta, S., Eichler, J., Ivanova, N., Axen, S. D., Kerfeld, C. A., Chen, F., Kyrpides, N., Hugenholtz, P. and Cheng, J.-F. 2011. Identification of a haloalkaliphilic and thermostable cellulase with improved ionic liquid tolerance. *Green Chemistry*, 13:8, 2083-2090.

Zuleta, L. M. C., Cavaleiro, A. J., Silva, D. H. S., Furlan, M., Young, M. C. M., Albuquerque, S., Castro-Gamboa, I. and da Silva Bolzani, V. 2003. seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 64:2, 549-553.



EKLER

EK 1 GEN SEKANSLARI

***Haloferax mediterranei* ATCC 33500 *celM* (HFX_2771) genine ait nükleotit dizisi (Gen Bank erişim no: CP001868.2)**

*Bam*HI

GGATCC

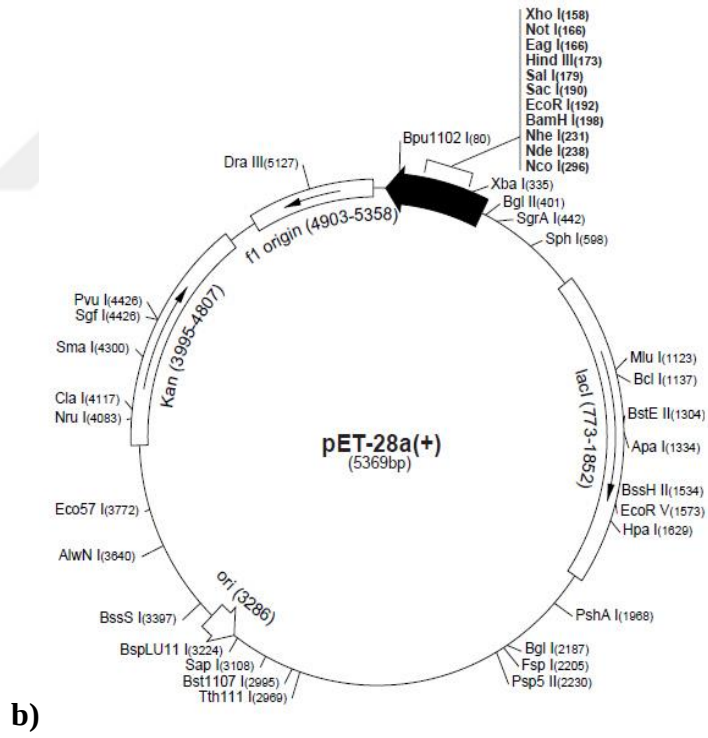
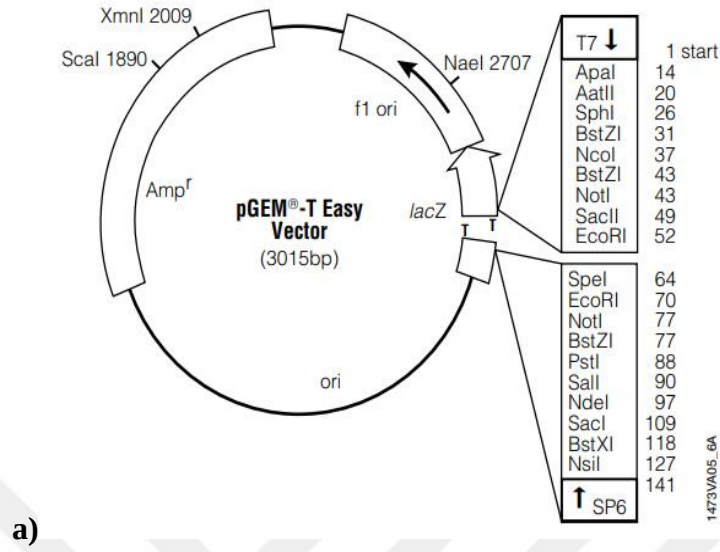
ATGGAAAGACGACCGACGCGAATTTCTCGAAGACCTGCTTACCACACCAAGTCCGTCCGGC
TACGAGACCGACGGACAGCGCGTGTGGATAGACTACGTCTCCCAGTTTGCAGACGACGTA
ACCGTCGACGCGTACGGTAACGCTGTCGCGGTTACGAAGGCTCCGGCGACGGCCCCGAA
ATCGCCTTTACCGGCCACGCCGACCAGATTGGCTACATCGTCCGCGACATCGACGATGAC
GGCTTCGTCCGCATCGGTCCCATCGGCGGTGCCGACCGAACCCTCTCGAAGGGCCAGCAC
GTGACAGTTACGCCGACGGAGGCGATGTCCACGGCGTCATCGGCCAGACTGCCATCCAC
CTCCGCGACGTTGGAGAGGAAGAATACGACGACCTCGAAGAGCAGTTTCGTGATATCGGC
GCGACGAGCAAGGACGAGGCGAATGACTACGTGCAAGTCCGGCGACCCCGTGACGGTCGAA
GCACGAGTCCGCGACCTCGCGGGCGACCGCGTCGCAGCCAACGGGATGGACAACCGCGTC
GGCAGTGGTCCGGCCGCCGAAGGACTTCGCGCTGCCGTGCGAAGGTGCGAAGATGGTCGGC
GTATACGCCGTCAGCACGGTACAAGAGGAAGTCCGGCGTGCAAGGTGCGAAGATGGTCGGC
TACGACCTCAATCCCACGCGGTGGTCGCGGTGACGTAACGCACGCAACCGACAACCCG
GACGTACCGGGCAAGCAGAAAGGACCGGTGCAACTCGCTGAGGGACCGGTTATCTCCCGC
GGGAGCGCGAATCACCCGAACGTCGTCGCACTCGCCCACGACGCGGCTGACGAGGCCGAC
ATCGACGTACAGCTACAGGCCGACGGCATCCGCACGGGTACGGACGCGGACGCTTTCTAC
ACGAGTCGCTCCGGCATTCCCTCCCTCAACATCGGCATCCCGAACCGCTACATGCACACG
CCGGTCGAAGTCATCTCGACGACCGACCTCGACGACGTGGCCGCGCTTCTCGGGTCGATA
GCGGCGCTCGCTGGCGACGTTGAGTCGTTCCGGCGTCGAACTG**TAAGCTT**

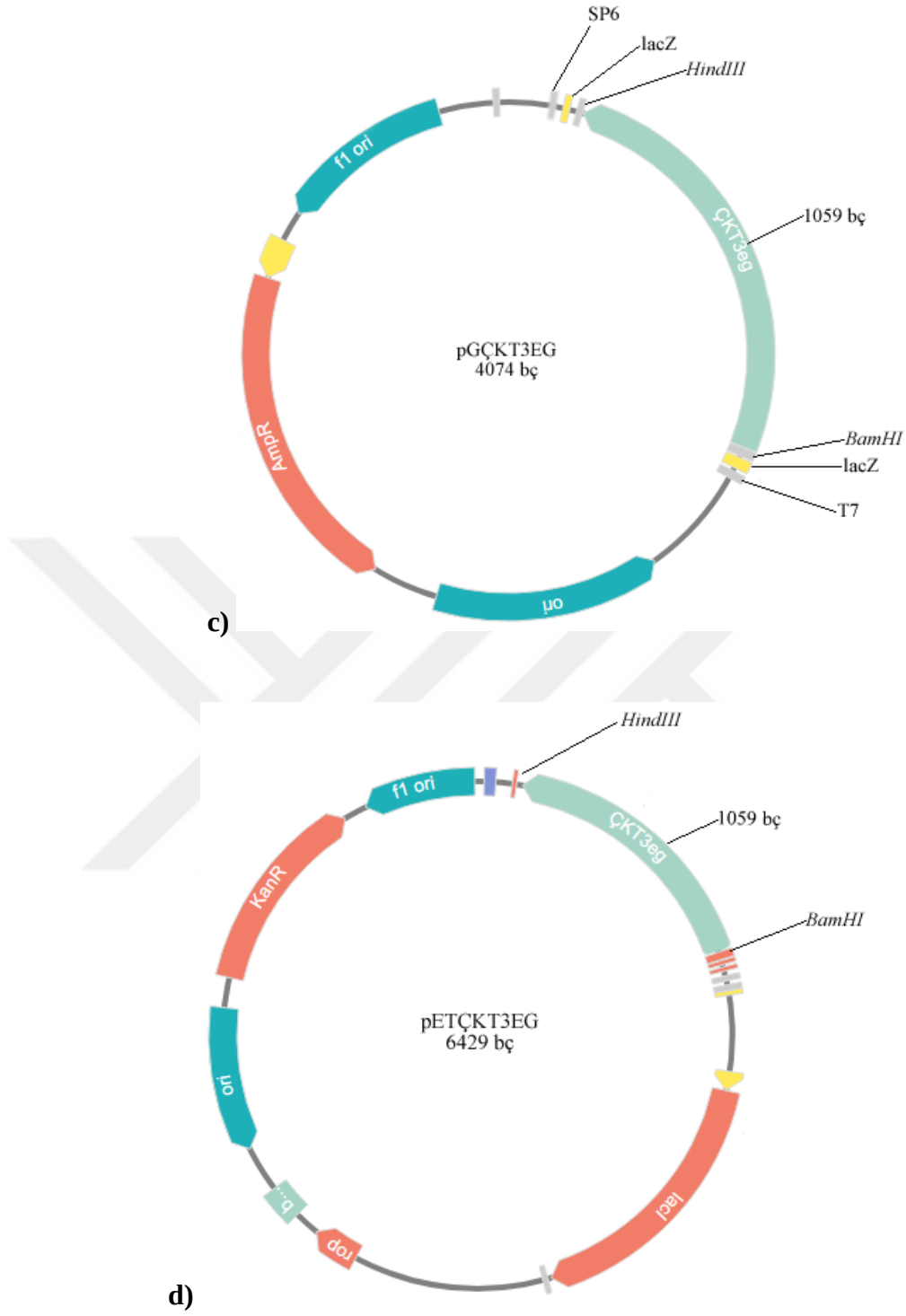
*Hind*III

Kalın yazılmış nükleotitler başlangıç ve bitiş kodlarını, altı çizili yerler ise restriksiyon enzimi tanıma dizilerini içermektedir.

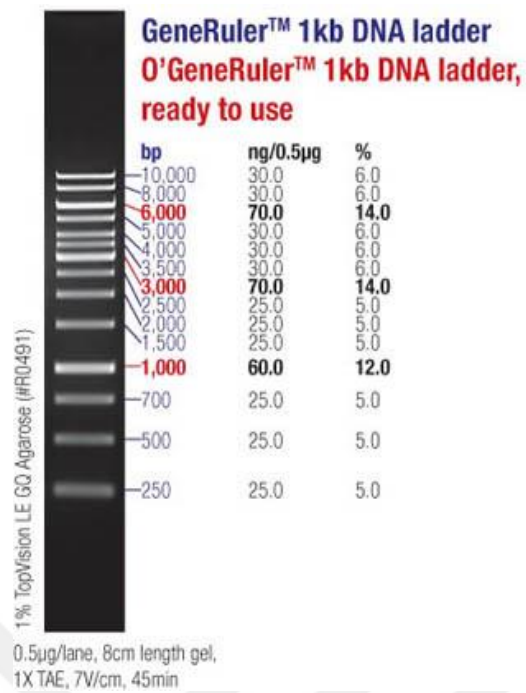
EK 2 KULLANILAN PLAZMİDLER VE DNA MARKÖRLERİ

Plazmid vektörleri

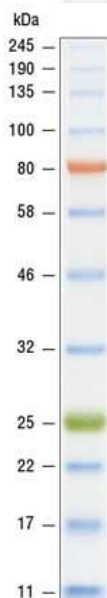




Vektör ve plazmidlerin yapısı **a) pGEM-T ® Easy**: *E. coli* klonlama vektörü **(b) pET-28a(+)** : *E. coli* His-Tag ifade vektörü **c) pGÇKT3EG d) pETÇKT3EG**.



O'GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific)



Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa) (New England Biolabs)

EK 3 BESİYERLERİNİN HAZIRLANIŞI VE İÇERİKLERİ

Sıvı besiyerleri

Lurient-Bertani (LB)

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
Trypton	10
Maya özütü	5
NaCl	5

pH: 7.0 olarak ayarlanır ve 121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.

Sehgal–Gibbons (SG) Besiyeri (Sehgal ve Gibbons, 1960)

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
NaCl	250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20
KCl	2
Sodyum sitrat	3
Kazamino asit	7.5
Maya özütü	1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0023

pH: 7.35 olarak ayarlanır ve 121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.

Complex Medium (CM) Besiyeri (Li ve Yu, 2013b)

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
Casein peptone	7.5
Maya özütü	10
Sodyum sitrat	3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20
KCl	2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
NaCl	250

pH: 7.0 olarak ayarlanır ve 121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.

Katı besiyerleri

LB Agar

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
Tripton	10
Maya özütü	5
NaCl	5
pH: 7.0 olarak ayarlanır.	
Agar	15
121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.	

SGA

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
NaCl	250
MgSO ₄ •7H ₂ O	20
CMC-Na	10
KCl	2
Sodyum sitrat	3
Kazamino asit	7.5
Maya özütü	1
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.0023
pH: 7.35 olarak ayarlanır	
Agar	15
121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.	

CMA

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
Kazein pepton	7.5
Maya özütü	10
CMC-Na	10
Sodyum sitrat	3
MgSO ₄ •7H ₂ O	20
KCl	2
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01
NaCl	250

pH: 7.0 olarak ayarlanır.

Agar 15

121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.

Dubos Salt Medium (DSM) (Lo vd, 2009)

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
------------------------	-------------------

NaNO ₃	0.5
-------------------	-----

NaCl	250
------	-----

K ₂ HPO ₄	1
---------------------------------	---

MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5
--------------------------------------	-----

KCl	0.5
-----	-----

CMC-Na	10
--------	----

FeSO ₄ •7H ₂ O	0.001
--------------------------------------	-------

pH: 7.0 olarak ayarlanır.

Agar 15

121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.

Starch Casein Mineral (SCM) (Budihal vd, 2016)

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
------------------------	-------------------

CMC-Na	10
--------	----

Sığır özütü	2
-------------	---

Nişasta	10
---------	----

K ₂ HPO ₄	2
---------------------------------	---

KNO ₃	2
------------------	---

NaCl	250
------	-----

Kazein	0.3
--------	-----

MgSO ₄ •7H ₂ O	0.05
--------------------------------------	------

CaCO ₃	0.01
-------------------	------

FeSO ₄ •7H ₂ O	0.01
--------------------------------------	------

pH: 7.0 olarak ayarlanır.

Agar 15

121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.

Modified Hans Medium (MH) (Mandels, 1975)

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
K ₂ HPO ₄	18.8
NH ₄ Cl	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
NaCl	250
CMC-Na	10
pH: 7.0 olarak ayarlanır.	
Agar	15
121°C’de 15 dak. otoklavlanarak sterilizasyon sağlanır.	

Nutrient Medium (NM) (Hendricks vd, 1995)

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
CMC-Na	10
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄	0.5
NaCl	250
Pepton	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25

SOC Besiyeri (Hanahan, 1983)

Rekombinant vektörün alıcı hücreye transferinden sonra fenotipik ekspresyon için kısa süreliğine üretildiği besiyeridir.

<u>Kimyasal</u>	<u>g/L</u>
Tripton	20
Maya özütü	5
NaCl	0.5

Kimyasallar 950 ml deiyonize suda çözündürülmüştür. 10 ml 250 mM KCl çözeltisi eklenmiştir. pH: 7.0’a ayarlanmıştır ve ardından 121°C’de 15 dak. otoklavlanarak

sterilizasyon yapılmıştır. Otoklavdan sonra besiyeri soğuduğunda 10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ve 20 mM glukoz çözeltisinden eklenmiştir.

EK 4 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER

Plazmid ve kromozomal DNA izolasyonu

TE Çözeltisi

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

SET Tamponu

NaCl	75 mM
EDTA (pH 8.0)	25 mM
Tris-HCl (pH 7.5)	20 mM

STE Tamponu

Sükroz	0.3 M
Tris-HCl (pH 8.0)	25 mM
EDTA (pH 8.0)	25 mM

Lizis Solüsyonu

NaOH	0.3 M
SDS	%2

Fenol-kloroform çözeltisi (su ile doyurulmuş) (Hintermann, 1981)

Fenol	500 mL
Kloroform	500 mL
Distile su	400 mL

Çözelti oda sıcaklığında saklanır ve ışıktan korunur.

Agaroz Jel Elektroforezi

Tris-Asetat-EDTA Tamponu (TAE) (50 X)

Tris	242 g
Glasiyal Asetik Asit	57.1 mL
EDTA (0.4 M, pH: 8.0)	125 mL
Distile su ile hacim 1000 mL'ye tamamlanır.	

Etidyum Bromür Çözeltisi

Etidyum Bromür (10 mg/mL)	100 µL/mL
TAE Tamponu (1X)	1 l

E. coli Alıcı Hücre Hazırlığı İçin Kullanılan Tamponlar

Tampon 1

Potasyum asetat	30 mM
RuCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Gliserol (%87)	8.6 mL

Son hacim dH₂O ile 50 mL'ye tamamlanır ve filtre sterilizasyonu yapılır.

Tampon 2

MOPS	10 mM
RuCl ₂	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Gliserol (%87)	8.6 mL

0.2 M KOH ile pH 6.5'e ayarlanır. Hacim dH₂O ile 50 mL'ye tamamlanır.

Mavi Beyaz Seçilim İçin Kullanılan Kimyasallar

IPTG (Isopropyl--D-thiogalactoside)

IPTG	100 mg
dH ₂ O	1 mL

Çözündürüldükten sonra filtre sterilizasyonu yapılır ve -20 °C'de saklanır.

X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -D-galaktosit)

X-Gal	20 mg
Dimethylformamit	1 mL

-20 °C’de saklanır ve ışıktan korunur.

Antibiyotik Stokların Hazırlanışı

	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon
Ampisilin	100 mg/mL dH ₂ O	100 μ g/mL
Kanamisin	30 mg/mL dH ₂ O	30 μ g/mL

Protein saflaştırma**LEW Tamponu**

Üre	8 M
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM

pH 8.0’a ayarlanır. +4 °C’de saklanır ve ışıktan korunur.

Dengeleme Tamponu

LEW Tamponuna 10 mM imidazol eklenmesiyle oluşur, pH: 8.0

Yıkama Buffer

LEW Tamponuna 20 mM imidazol eklenmesiyle oluşur, pH: 8.0

Elüsyon Buffer

LEW Tamponuna 250 mM imidazol eklenmesiyle oluşur, pH: 8.0

Diyaliz Buffer

Üre	2.5 M
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM

Enzim aktivite tahlili

Substrat tamponu

CMCNa	5 g
dH ₂ O	1 L

DNS ajanı (3,5 dinitro salisilik asit)

DNS	1g
dH ₂ O	100 mL

Poliakrilamid jel elektroforezi

BradFord Reaktifi (5X)

Coomassie Brilliant Blue G250 100 mg
50 mL etanol (%95) içinde çözülmüştür. Solüsyon, 100 mL %85 fosforik asit ile karıştırılmıştır ve dH₂O ile 1 l'ye tamamlanmıştır. Reaktif, Watman No. 1 filtre kağıdından süzülür.

Tris HCl (1,5 M)

Tris base	54.45 g
dH ₂ O	150 mL

HCl ile pH 8.8'e ayarlanır. dH₂O ile 300 mL'ye tamamlanır ve +4 °C'de saklanır.

Tris HCl (0,5 M)

Tris bazı	6 g
dH ₂ O	60 mL

HCl ile pH 6.8'e ayarlanır. dH₂O ile 100 mL'ye tamamlanır ve +4°C'de saklanır.

Acrylamide/Bis (30:1)

Acrylamide	146 g
N.N'-Methylene-bis Acrylamide	4 g
dH ₂ O	500 mL

Filtreden geçirilir ve ışıktan muhafaza edilerek +4°C'de saklanır.

Coomassie R-250 Boyama

Coomassie blue R-250	0.25 g
Metanol	125 mL
Glasiyal Asetik Asit	25 mL
dH ₂ O	100 mL

Fiksasyon Solüsyonu

Etanol	40 mL
Glasiyal Asetik Asit	10 mL
dH ₂ O	50 mL

Destaining Solüsyon

Metanol	100 mL
Glasiyal Asetik Asit	100 mL
dH ₂ O	800 mL

Running Buffer (5X) (SDS-PAGE için)

Tris base	15 g
Glycine	72 g
SDS	5 g
dH ₂ O	1 L

+4 °C’de saklanır.

Sample Buffer (4X)

dH ₂ O	3 mL
Tris HCl (0.5 M)	1 mL
Gliserol	1.6 mL
SDS (10 %)	0.4 mL
β-mercaptoethanol	0.4 mL
Bromophenol blue (0.5%, w/v)	0.4 mL

Kongo Red Çözeltisi (%0.1)

Kongo Red	0.1 g
dH ₂ O	100 mL

EK 5 KİMYASALLAR VE ENZİMLER

Agar	HiMedia
Agaroz	Sigma
Amonyum persülfat	Sigma
Amonyum sülfat	Sigma
Ampisilin	Sigma
β -merkapttoethanol	Sigma
CaCO ₃	Sigma
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma
CMC-Na	Sigma
Casein	Fluka
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma
DMSO	Merck
EDTA	Sigma
Etanol	Merck
Etidyum Bromür	Sigma
Fe ₂ (SO ₄) ₃	Sigma
Fenol-Kloroform	Ambresco
Glasiyal Asetik Asit	Merck
Gliserol	Sigma
Glukoz	Merck
HCl	Sigma
H ₂ SO ₄	Merck
IPTG	Sigma
Kanamisin	Sigma
KCl	Merck
Kloroform	Merck
KNO ₃	Merck
K ₂ HPO ₄	Merck
Kongo Red	Sigma

Lizozim	Sigma
Maya özütü	Merck
Metanol	Sigma
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma
NaCl	Merck
NaNO ₃	Sigma
NaOH	Merck
NH ₄ Cl	Sigma
Nişasta	Merck
RuCl ₂	Sigma
SDS	Merck
Sodyum asetat	Merck
Sodyum sitrat	Merck
Sığır özütü	BD
Sükroz	Merck
Tripton	Merck
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma

Enzimler

<i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific
<i>Hind</i> III	Thermo Fisher Scientific
Proteinaz K+	Sigma
T4 DNA Ligaz	Thermo Fisher Scientific
<i>Taq</i> DNA Polimeraz	New England Biolabs
T4 DNA Ligaz (pGEM-T® Easy için)	Promega

Markörler

O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
O'GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa)	New England Biolabs

Kitler

GeneJet Mini Plazmid İzolasyon Kiti	Thermo Fisher Scientific
Jel Ektraksiyon Kiti	Macherey-Nagel

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Haktan ŞAFAK

Doğum Yeri : TRABZON

Doğum Tarihi : 06.04.1993

Yabancı Dili : İngilizce

E-Posta : haktansafak61@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Trabzon Anadolu Teknik Lisesi, TRABZON, 2011

Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal
Biyoteknoloji Bölümü, 2016

Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal
Biyoteknoloji Bölümü, 2019

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Haktan ŞAFAK, Aslıhan KURT KIZILDOĞAN *Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşlarında selülaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi, 6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji kongresi, 74, 10/2017, Adana.