

T.C

EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**TERMOFİLİK BİR AKTİNOMİSET OLAN
Thermobifida fusca EFTS 7A SUŞUNDAN SELÜLAZ
GENİNİN KLONLANMASI
VE REKOMBİNANT PROTEİNİNİN ÜRETİLMESİ**

Gizem VAR

Danışman: Prof. Dr. İsmail KARABOZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir

2019

Gizem VAR tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “**Termofilik bir aktinomiset olan *Thermobifida fusca* EFTS 7A suşundan selüloz geninin klonlanması ve rekombinant proteininin üretilmesi.**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12/07/2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı: Prof. Dr. İsmail KARABOZ

Raportör Üye: Prof. Dr. H. Halil BIYIK

Üye: Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT

İmza









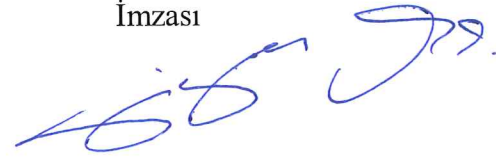
EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Termofilik bir aktinomiset olan *Thermobifida fusca* EFTS 7A suşundan selülaz geninin klonlanması ve rekombinant proteininin üretilmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12/07/2019

İmzası



Adı-Soyadı

Gizem VAR



ÖZET**TERMOFİLİK BİR AKTİNOMİSET OLAN *Thermobifida fusca*
EFTS 7A SUŞUNDAN SELÜLAZ GENİNİN KLONLANMASI VE
REKOMBİNANT PROTEİNİNİN ÜRETİLMESİ**

VAR, Gizem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail KARABOZ

Haziran 2019-Temmuz 2019, 142 sayfa

Bu tezde, İzmir Eski Foça'da bulunan, bir mantar çiftliği kompostundan elde edilen bir izolat kullanılmıştır. Bu izolatin, ekstraselüler selülaaz ve ksilanaz üretim kapasiteleri, Kongo Red ve Gram İyodür gibi tarama metodları ile modifiye *Thermoactinomyces* besiyerinde belirlenmiştir. İzolatin tanımlanması, 16S rRNA gen bölgesine göre yapılmış ve Gen Bankası'ndaki baz dizisi çakışmasına göre *Thermobifida fusca* EFTS 7A olarak adlandırılmıştır. Ekstraselüler selülaaz, β -glukosidaz ve ksilanaz aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği koşullar, çeşitli pH ortamları, farklı karbon, organik ve inorganik azot kaynakları denenerek tespit edilmiştir. Optimum şartlar altında en yüksek selülaaz aktivitesi avicel varlığında 7.günde 230,6 U/L ve en yüksek ksilanaz aktivitesi ise ksilan varlığında 7.günde 1350,6 U/L olarak ölçülmüştür. En yüksek β -glukosidaz aktivitesi, gliserol ve sellobiyoz içeren ortamda 6.günde 203,3 U/L olarak belirlenmiştir. Klonlanması düşünülen selüloolitik gen bölgesi, genomu oluşturulmuş *Thermobifida fusca* YX aktinomiseti baz alınarak belirlenmiştir. Seçilen bölge, Tfu_0901 (cel5A) olup bir endoglukanazdır. Klonlama çalışmalarında kullanılacak kit içeriğine uygun primer çifti tasarlanmıştır. Bu gen bölgesi PZR aracılığıyla izole edilmiş ve jelden ekstraksiyonu yapılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu PZR ürünü dizi analizine gönderilmiş ve diziler veritabanları ile karşılaştırılarak PZR ürününün ilgilenilen gen bölgesi olduğu belirlenmiştir. Klonlama için, gen bölgesi cel5A ve pKLAC2 vektörü restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiştir. Kesim ürünleri saflaştırılıp

ligasyon işlemi gerçekleştirilerek pKLAC2 vektörüne aktarılmıştır. Plazmit lineer ekspresyon kaseti oluşturmak için BstXI ile kesilmiş ve kompetent *Kluyveromyces lactis* GG79 hücrelerine transforme edilmiştir. Petriler 5mM asetamid içeren YCB agar ortamında inkübe edilmiş ve zayıf koloni gelişimi gözlenmiştir. DNS yöntemi ile yapılan rekombinant selülaz aktivite ölçümleri, 2.günde 50,4 U/L ve 3.günde 44,7 U/L olarak ölçülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Termofilik aktinomiset, selülaz, primer, PZR, restriksiyon enzimi, klonlama



ABSTRACT**CLONING OF CELLULASE GENES FROM *Thermobifida fusca*
EFTS 7A WHICH IS A THERMOPHYLIC ACTINOMYCES
AND PRODUCTION OF ITS RECOMBINANT PROTEIN**

VAR, Gizem

MSc in Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. İsmail KARABOZ

June 2019-July 2019, 142 pages

In this thesis, an isolate obtained from a mushroom farm compost situated in Izmir Eski Foca was used. The extracellular cellulase and xylanase production capacities of these isolates, were determined with methods such as Congo Red and Gram's Iodine in modified *Thermoactinomyces* medium. Identification of the microorganism was done by its 16S rRNA gene sequencing and it was named *Thermobifida fusca* EFTS 7A according to the GeneBank sequence comparison studies. Activities of extracellular cellulase, beta glucosidase and xylanase were measured spectrophotometrically. The optimum activity conditions of enzymes were designated by experimenting different carbon, organic, inorganic nitrogen sources and various pH areas. Under optimum conditions, the highest cellulase activity within the presence of avicel on 7th day measured as 230,6 U/L and the highest xylanase activity within the presence of xylan on the 7th day measured as 1350,6 U/L. The highest β -glucosidase activity has been determined as 203,3 U/L, in an environment that contains glycerol and cellobiose. The cellulolytic gene region to be cloned is designated based on the *Thermobifida fusca* YX actinomycete which its genome was sequenced. The depicted region tfu_0901(ce15A) is an endoglucanase. A primer couple is designed accordingly to be used in the kit which was used in cloning processes. This gene region was isolated via PCR and was purified by extracting from gel. This purified PCR product was sent to DNA sequence analysis and the sequences were compared to sequences in databases so that the region was proven the significant region of

PCR. The gene region cel5A and pKLAC2 vector were cut off with restriction enzymes and both products were purified again. The PCR product was transferred to pKLAC2 vector, by performing ligation process. In order to form linear expression cassette, the pKLAC2 vector was cut by BstXI enzyme. The linear expression cassette was transformed to the competent *Kluyveromyces lactis* GG79 cells. The recombinant cellulase activity measurements performed via DNS methodology were calculated as 50,4 U/L on 2nd day and 44,7 U/L on 3rd day.

Keywords: Thermophilic actinomyces, cellulase, primers, PCR, restriction enzymes and cloning



ÖNSÖZ

Fosil yakıtların yakın gelecekte tükeneceği gerçeği, yenilenebilir ve temiz enerji kaynaklarının geliştirilmesine yönelik çalışmaları ivmelendirmiştir. Biyoyakıt üretimi gibi yenilenebilir enerji kaynaklarının, geliştirilmesi aşamalarında ve birçok biyoteknolojik alanda kritik noktaları oluşturmaları nedeniyle enzimler önemlerini her geçen gün arttırmaktadırlar. Bu gibi potansiyelleri nedeniyle, danışman hocam sayın Prof. Dr. İsmail Karaboz ve değerli hocam Doç. Dr. Ali Koçyiğit tarafından, bir mantar çiftliği kompostundan izole ettiğimiz, tanımladığımız *Thermobifida fusca* EFTS 7A aktinomistenin selüloz kapasitesinin taranması, aktivitelerinin ölçülmesi ve ilgili gen bölgesinin klonlanmasına karar verilmiştir.

Tez çalışmam, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün 2012 FEN 002 nolu projeye sağladığı fon tarafından finanse edilmiştir. Süreç boyunca, malzeme teminininden uygulamaların bitimine dek gerçekleştirilen tüm aşamalar bana, bilimsel çalışma temellerinin nasıl kurulacağı, ilerleyeceği ve geliştirileceği hakkında etkin bir altyapı oluşturmuştur. Bu temel sayesinde elde edilen verilerin, katma değer taşıyan süreçlerin zemini oluşturarak sonraki basamaklar için değerli katkılar sağlayacağını umut ediyorum.

İZMİR

12/07/2019

Gizem VAR



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
TABLolar DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Lignoselüloz Yapısı ve Lignoselülozik Maddeler.....	3
2.1.1 Lignin	3
2.1.2 Hemiselüloz	5
2.1.3 Selüloz.....	5
2.2 Lignoselülozu Degrade Eden Enzimler	7
2.2.1 Ksilanazlar	7
2.2.2 Kompleks selülaz sistemleri (Selülozom).....	9
2.2.3 Selülazların sınıflandırılması	10
2.2.4 Selülazlar.....	11
2.2.5 Selülazların biyoteknolojik uygulamaları	16
2.3 Thermobifida fusca YX Genomu	24
2.3.1 Genom özellikleri ve actinobacteria genomiksi ile karşılaştırılması... ..	25
2.3.2 Selülaz ve glikosid hidrolazları.....	27
2.3.3 Transkripsiyon ve translasyon	28
2.4 Selülaz Geninin Klonlanması ve Ekspresyonu.....	29
2.5 Selülazların farklı mikrobiyal konaklara heterolog klonlanması ve ekspresyonu	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1 Materyal	36
3.1.1 Örneklerin eldesi.....	36
3.1.2 Besiyerleri, çözeltiler, solüsyonlar ve reaktifler	36

İÇİNDEKİLER(Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.3 Kullanılan ticari kitler	43
3.1.4 Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	45
3.2 Yöntem.....	47
3.2.1 Bakterilerin izolasyonu	47
3.2.2 Selüloz üreticisi bakteri izolatının tanılanması.....	47
3.2.3 Katı besiyerinde selüloz aktivitesinin belirlenmesi.....	51
3.2.4 Farklı parametrelerin selüloz aktivitesine etkisi.....	52
3.2.5 Farklı parametrelerin ksilanaz aktivitesine etkisi.....	56
3.2.6 β -glukosidaz aktivitesi	58
3.2.7 Protein miktarının belirlenmesi	58
3.2.8 <i>Thermobifida fusca</i> EFTS 7A' a ait selüloz geninin klonlanması.....	58
4. BULGULAR	64
4.1 Selüloolitik termofilik bakterilerin izolasyonu.....	64
4.2 <i>Thermobifida fusca</i> EFTS 7A'nın Tanınması	65
4.2.1 İzolat EFTS 7A'nın morfolojik ve kültürel özellikleri	65
4.2.2 İzolat EFTS 7A'nın moleküler tanılanması.....	65
4.3 Hacimsel Enzim Aktiviteleri	68
4.3.1 Farklı karbon kaynaklarının selüloz aktivitesine etkisi.....	68
4.3.2 Farklı N kaynaklarının selüloz aktivitesine etkisi	70
4.3.3 Farklı pH değerlerinin selüloz aktivitesine etkisi.....	70
4.3.4 Optimum şartlarda selüloz aktivitesi.....	71
4.3.5 Farklı karbon kaynaklarının ksilanaz aktivitesine etkisi.....	72
4.3.6 Farklı pH değerlerinin ksilanaz aktivitesine etkisi.....	73
4.3.7 Farklı azot kaynaklarının ksilanaz aktivitesine etkisi	74
4.3.8 Optimum koşullarda ksilanaz aktivitesi.....	74
4.3.9 β -Glukosidaz aktivitesi	74
4.4 Optimum Koşullarda Enzimlerin Spesifik Aktiviteleri	76
4.4.1 Selüloz aktivitesi	76
4.4.2 Ksilanaz aktivitesi	77
4.4.3 β -glukosidaz aktivitesi	78
4.5 <i>Thermobifida fusca</i> EFTS 7A'a Ait Selüloz Genin Klonlanması.....	79

İÇİNDEKİLER(Devam)

	<u>Sayfa</u>
4.5.1 <i>Thermobifida fusca</i> EFTS 7A'nın genomik DNA izolasyonu.....	79
4.5.2 <i>Thermobifida fusca</i> EFTS 7A' a ait selülaz geni için primer tasarımı.....	79
4.5.3 PZR ile tfu_0901 gen bölgesinin çoğaltılması.....	81
4.5.4 Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları	81
4.5.5 PZR ürünlerinin saflaştırılması.....	83
4.5.6 PZR ürününün (tfu_0901) pKLAC2 vektörüne klonlanması	84
4.5.7 pKLAC2 lineer ekspresyon kaseti oluşturma basamakları	86
4.5.8 Lineer ekspresyon kasetinin kompetent <i>K. lactis</i> GG799 hücrelerine aktarılması.....	86
5. TARTIŞMA	89
6. SONUÇLAR.....	95
7. ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR DİZİNİ	98
TEŞEKKÜR.....	123
ÖZGEÇMİŞ	124

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>T.fusca</i> genomunun dairesel temsili.....	26
4.1 CMC içeren modifiye TA ortamında selülaaz zonları.....	64
4.2 CMC içeren modifiye TA ortamında selülaaz zonları.....	64
4.3 İzolat EFTS 7A'nın % 0,8 agaroz jeldeki genomik DNA görüntüsü	65
4.4 16S rDNA polimeraz zincir reaksiyonu ürünü	66
4.5 Mega 4,0 programı kullanılarak oluşturulan filogenetik dendogram.....	68
4.6 Farklı karbon kaynakları varlığında selülaaz aktivitelerindeki değişim	69
4.7 Glukoz standart grafiği	69
4.8 Farklı pH değerlerinin selülaaz aktivitesine etkisi.....	70
4.9 Optimum koşullarda CMC substratı ile selülaaz aktivitesi	71
4.10 Optimum koşullarda Avicel substratı ile selülaaz aktivitesi	71
4.11 Ksiloz standart grafiği	72
4.12 Farklı karbon kaynakları varlığında ksilanaz aktivitelerindeki değişim	73
4.13 Farklı pH değerlerinin ksilanaz aktivitesine etkisi.....	73
4.14 Optimum koşullarda ksilanaz aktivitesi	74
4.15 p-nitrofenol standart grafiği	75
4.16 β -glukosidaz aktivitesi.....	75
4.17 Protein standart grafiği	76
4.18 CMC substratı ile selülaaz aktivitesi.....	76
4.19 Avicel substratı ile selülaaz aktivitesi	77
4.20 Ksilan substratı ile ksilanaz aktivitesi	77
4.21 Sellobiyoz substratı varlığında β -glukosidaz aktivitesi.....	78
4.22 Sellobiyoz ve gliserol varlığında β -glukosidaz aktivitesi.....	78
4.23 <i>Thermobifida fusca</i> EFTS 7A' a ait genomik DNA.....	79
4.24 pKLAC2 plazmidi	80
4.25 cel5A PZR ürünü	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Bazı tarımsal kaynakların ve atıkların lignoselüloz içerikleri	4
2.2 Çeşitli lignoselülozik bileşiklerin selüloz içerikleri	6
2.3 Termofilik selülaz üreten mikroorganizmalar	13
3.1 Glukoz standart grafiği içeriği	53
3.2 Standartlarda bulunan glukoz miktarı.....	54
4.1 PZR termal döngü tablosu	82



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Gr (+): Gram pozitif

DNS: Dinitrosalisilik asit

CMC: Karbosimetilselüloz

PMSF: Fenilmetil sülfonidflorid

Tris: Tris (Hidroksymethyl)aminomethane

Na₂CO₃: Sodyum karbonat

NaOH: Sodyum Hidroksit

K₂HPO₄: Dipotasyum hidrojen fosfat

KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat

BSA: Bovin Serum Albumin

CO₂: Karbondioksit

mg: miligram

µl: mikrolitre

dk: dakika

µg: mikrogram

g: gram

nm: nanometre

M: Molarite

rpm: rounds per minute

DNA: Deoksiribonükleik asit

CBM: Cellulose Binding Module

CBD: Cellulose Binding Domain

dNTP: Deoksinükleotitfosfatlar

1. GİRİŞ

Günümüzde, enerji tüketiminin % 80'inden fazlasının fosil yakıtlara bağlı olduğu kabul edilmektedir (Guo et al., 2010a). Bitki biyoması, H₂O, CO₂ ve güneş enerjisi aracılığıyla fotosentezlenen dünya üzerindeki en önemli ve yenilenebilir enerji rezervidir (Tetsuya et al., 1997). İnsan popülasyonunun hızlı artışı, fosil yakıt rezervlerinin sınırlı olması ve tükenmeye başlaması, artan petrol fiyatları ve küresel ısınma gibi nedenler bu önemli enerji rezervinin biyolojik prosesler aracılığıyla etkili kullanımlarını önemli bir kilit noktası haline getirmiştir.

Yenilenebilir, önemli bir kullanım alanı bulunmayan ve ucuz hammadde kaynağı olan tarımsal atıklar, lignoselülozik biyomasın büyük bir oranını oluşturur. Bu yenilenebilir kaynaklar; bitkinin mısır koçanı, püskülü gibi sap, gövde ve yaprak kısımları, şeker pancarı küspesi, pirinç samanı, pirinç dış kabuğu, talaş ve orman atığı gibi rezervler olabilmektedir. Bununla birlikte kağıt hamuru endüstriyel atıkları, belediyeye ait selülozik atıklar, kağıt fabrikalarının sulu çamur atıkları ve biyoyakıt üretimi için tarımı yapılan *Miscanthus* sp. gibi enerji bitkileri önemli karbon depo kaynaklarıdır (Sadhu and Maiti., 2013).

Bitki hücre duvarının kompleks yapısı temel olarak, hemiselüloz ve lignin ile sıkıca bağlanmış selüloz fiberlerinden oluşmaktadır. Selüloz, bitki biyokütlesinin ana bileşeni olup doğada en yüksek oranda bulunan polimerdir. Her yıl, bitkiler yaklaşık 10¹¹ ton selüloz üretmektedirler. Doğada selüloz, 20000-25000 arasında β -D-glukoz ünitesinin, 1,4- β -glukosid bağıyla bağlanması sonucu oluşan linear bir polimerdir. Selülozun degradasyonu, farklı farklı selüloolitik enzimler aracılığıyla kompleks bir interaksiyon ile gerçekleştirilmektedir. Temel olarak, endoglukanaz (EC 3.2.1.1.4), ekzoglukanaz (EC 3.2.1.91) ve β -glukosidaz (EC 3.2.1.21)' i içeren üç enzim tipinin, selülozu β -glukoz birimlerine çevirdiği kabul edilmiştir (Lynd et al., 2002). Aerobik selüloolitik mikroorganizmalardan elde edilen kapsamlı veriler, selülozun endoglukanaz ve ekzoglukanaz enzimlerinin aracılığıyla, sellobiyozu kadar parçalandığını ve ardından β -glukosidaz enziminin ise sellobiyozu, glukoz birimlerine parçaladığını desteklemektedir (Zhang et al., 2004).

Fosil yakıtlarının sınırlı depoları, artan teknoloji ile birlikte ciddi tehlike oluşturan bir oranda tüketilmektedir. Ayrıca fosil yakıtlarının kullanımı, küresel iklim değişikliği, petrol fiyatlarının artışına neden olmakla beraber dengesiz ve güvenilir bir seyir izleyen petrol kaynaklarına karşı bir endişe oluşturmaktadır. Bu gibi nedenlerden dolayı yeşil enerji üretimi için yenilenebilir kaynakların kullanılması ve üretim sistemlerinin geliştirilmesine yönelik ciddi bir talep oluşturmuştur. Kanada yenilenebilir yakıt standardı, 2010 yılına kadar benzin içerisindeki etanol miktarını %5'e, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Birimi 2009'a kadar etanol oranını %10.21'e, Brezilya ise %25'e kadar arttırmıştır.

Selülozlar, dünya genelindeki endüstriyel enzim taleplerinin %8'ini oluşturmaktadır. Selüloz piyasası selülozların ön-işleme tabii tutulmuş selülozik hammaddelerin şekerlere hidrolizlenmesi, bunların geniş çaplı biyobazlı ürünlere ve bioetanolle fermente edilebildiğinde bu talebin ciddi bir oranda artacağı düşünülmektedir. ABD, selüloz pazarının her yıl yaklaşık 400 milyon \$ artacağını öngörmüştür (Zhang et al., 2006). 2004-2014 yılları arasında selüloz kullanımının yaklaşık olarak %100 artacağı belirtilmiştir. Genencor ve Novozyme Biotech gibi biyoteknoloji kuruluşları, selülozun etanolle prosesi için selüloz maliyetinin, bir galon etanol için 5.40\$'dan yaklaşık olarak 20 sente düştüğünü açıklamışlardır. Bu azalış miktarının sağlanmasında iki ana stratejinin: 1) Strain geliştirilmesi (alternatif indükleyici sistemler oluşturulması ve daha ucuz substratların temin edilmesi) ve 2) Selüloz enzim performansının iyileştirilmesinin önemli olduğu belirtilmiştir (Sadhu and Maiti., 2013).

Biyoyakıt üretimine ek olarak, selülozlar; sentetik kimya, tekstil, gıda, kağıt ve kağıt hamuru ve yem endüstrisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır.

Selülozun farklı kullanım alanlarının bulunması, çeşitli sanayi kuruluşları için önemini arttırmıştır. Rekombinant üretimini yapacağımız selüloz ve ksilanaz gibi enzimlerin endüstri kollarında, özellikle selülozik biyomastan elde edilen biyoyakıtlar alanında gerçekleştirilecek çalışmalara katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Lignoselüloz Yapısı ve Lignoselülozik Maddeler

Lignoselülozik materyaller, biyoetanol üretimi için dünyadaki en önemli yenilenebilir kaynaktır (Perlack et. al., 2005). Kaynak olarak kullanılan bu hammadde, yapıları, kompozisyonları ve orjinleri bakımından birkaç grup içermektedir. Bu kaynaklar, orman ürünleri materyalleri (yumuşak ve sert odunsular), tarımsal ürün atıkları (ana tarımsal kaynak atıkları, gıda olarak kullanılmayan ekinler, çim, enerji bitkileri), şehir ve endüstriyel kaynaklı atık materyallerdir (Hu et. al., 2008; Cardona et. al., 2009).

Lignoselülozik materyaller temel olarak, selüloz, hemiselüloz ve lignin gibi üç ana polimerden oluşmaktadır. Bu üç polimer dışında, farklı yüzdelerde pektin, nişasta, proteinler, farklı ekstraktlar ve reçineli materyalleri de içermektedir. Lignoselülozik yapının bileşiminde; %20-35 hemiselüloz, %10-15 lignin ve %35-50 selüloz bulunmaktadır (Wyman 1994; O'Dwyer, 2005). Selüloz, glukoz monomerlerinin, β -1,4-glikosid bağı ile bağlanması sonucu oluşmuştur. Ayrıca, lignoselülozik biyomasın ana bileşenini oluşturmaktadır. Selüloz polimeri, kuru ağırlığın % 40-60'ından sorumludur (Gnansounou, 2008). Hemiselüloz, heterojen yapıya sahip bir biyopolimerdir. Yapısında; 5 C'lu pentoz şekerler, 6 C'lu heksoz şekerler ve şeker asitleri bulunmaktadır (Saha, 2003). Selüloz, hemiselülozdan daha yüksek moleküler ağırlığına sahip bir biyopolimerdir. Hemiselülozda, kısa yan dallanmalarının bulunması ve düzensiz şeker zincirlerinin varlığı selülozdan farklı olmasının en önemli nedenleridir. Amorf yapıdaki morfolojisinden dolayı hemiselüloz daha kolay hidrolize olabilir ve suda çözünebilir.

2.1.1 Lignin

Lignin, selüloz ve hemiselüloz fiberlerini çevreleyen doğada en bol bulunan aromatik polimerlerden biridir. Yüksek bitkilerin hücre duvar yapısında bol miktarda bulunmaktadır. Ligninin ana yapı taşları, tirozin ve fenilalanin gibi aromatik aminoasitlerdir. Bu yapılar ise; kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol gibi fenilpropan alt birimlerine dönüştürülür (Münir T., 2009). Her ne kadar selüloz ve lignin selülozlu maddelerin asıl bileşenlerinden olsalar da bunların

kimyasal özellikleri tamamen farklıdır. Bitkilerde lignin, selüloz liflerini çevreler. Hücre duvarını güçlendirir ve bitkilerin patojenlere karşı daha dirençli olmasına yardımcı olur (Perez et al., 2002).

Çizelge 2.1 Bazı tarımsal kaynakların ve atıkların lignoselüloz içerikleri (Jorgensen et al., 2007)

Lignoselülozik Materyaller	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)	Lignin (%)
Sert ağaç sapı	40-55	24-40	18-25
Yumuşak ağaç sapı	45-50	25-35	25-35
Fındık kabuğu	25-30	25-30	25-35
Mısır koçanı	45	35	15
Kağıt	85-99	0	0-15
Buğday samanı	30	50	15
Pirinç samanı	32,1	24	18
Yaprak	15-20	80-85	0
Keten tohumu	80-95	5-20	0
Gazete kağıdı	40-55	25-40	18-30
Kimyasal kağıt hamurundan gelen	60-70	10-20	5-10
Ön atıksu katıları	8-15	-	24-29
Küspe	33,4	30	18,9
Domuz atığı	6	28	-
Katı sığır gübresi	1,6-4,7	1,4-3,3	2,7-5,7
Ot	25	35,7	6,4
Çimen	45	31,4	12

2.1.2 Hemiselüloz

Hemiselüloz, çeşitli formlarda bir araya gelen şeker asitlerinin yanı sıra pentoz ve heksoz şekerlerinden oluşmuş bir heteropolimerdir. Hemiselüloz, doğada en bol bulunan ikinci polimeridir. Selülozun aksine, hemiselüloz, ksilan, galaktomannan, glukuronoksilan, arabinoksilan, glukomannan ve ksiloglukan dahil olmak üzere birçok heteropolimerden oluşan rastgele ve amorf bir yapıya sahiptir. En önemli bileşeni ksilandır. Hemiselülozik yapılar, içeriklerine göre, sert odun selülozu ve yumuşak odun selülozu olarak sınıflandırılmaktadırlar. Temel olarak, yumuşak odun hemiselülozünün içeriğinde daha fazla glukomannan, sert odun hemiselülozünün kompozisyonunda ise daha fazla ksilan bulunduğu belirlenmiştir (Obembe, et, al., 2006).

2.1.3 Selüloz

Payern, dünya üzerindeki en yaygın organik polimeri selüloz olarak adlandırmıştır (Payen 1938; Guo et al., 2008). Dünya üzerindeki bu polisakkaritin toplam miktarının 7×10^{11} ton olduğu tahmin edilmektedir (Coughlan, 1985). Selüloz, tatsız, kokusuz, hidrofilik, suda ve birçok organik solventte insoluble, kiral, geniş bir kimyasal kararsızlığa sahip insolubl kristalin bir substrattır. Selüloz homopolimeri çok kararlıdır.

Bitki selülozları, lignoselüloz denilen matriks içinde temel olarak hemiselüloz, lignin, pektin ve diğer bileşenleriyle bir arada bulunur. Mikrobiyal selülozlar, bitki selülozlarına göre daha saf, daha yüksek su içeriği ve uzun zincirlere sahiptir. Selüloz $(C_6H_{10}O_5)_n$ formülüne sahip bir karbonhidrat polimeridir. Birkaç yüzden binden onbine varan 1,4- β -D-glukoz birimlerinin linear zincirleri, C1 ve C4 karbon atomlarının ekvatorial -OH grupları arasında asetal fonksiyonları aracılığıyla bağlanır (Jagtap and Rao, 2005). Bu konformasyonun yüksek stabilitesi, polimerin azalan bir esnekliğine neden olmaktadır. β -glukozidik bağın, 25°C' de yarılanma ömrünün, 5-8 milyon yıl olduğu bilinmektedir (Wolfenden, 2001). Fakat selüloz enzimatik bir şekilde çok daha hızlı parçalanmaktadır.

Çizelge 2.2 Çeşitli lignoselülozik bileşiklerin selüloz içerikleri (O'Dwyer, 2005)

Lignoselülozik Materyal	Selüloz İçerikleri %
Keten	95-99
Hasır	80-90
Bambu	40-50
Odun	40-50
Ağaç Kabuğu	20-30

Selüloz yapısında zincir-arası ve zincir-içi bağların farklı tipleri bulunur ve zincir-arası hidrojen bağlarının, selülozun sertliğini ve tekli-zincir konformasyonunu belirlediği düşünülmüştür (Watanabe and Tokuda, 2001; Klemm et al., 2002; Klemm et al., 2005). Selüloz yapıları, demet yapısı olacak şekilde bir araya gelmişlerdir. Aynı yönde uzanan 40 selüloz molekülü, en küçük demet olan elementel fibrildir. Elementel fibrillerin bir araya gelmesiyle daha büyük demetler olan mikrofibriller oluşur. Mikrofibriller fibrilleri, fibriller lamelleri oluşturur. Zincirler, 1.5 ile 3.5 nm (mikrofibriller) çapında olan temel fibrillerden oluşur ve diğer zincirlere paralel olarak düzenlenmektedir.

Selüloz zincirinin uzunluğu, monomer sayısı ile ilişkili polimerizasyon (DP) derecesiyle ifade edilmiştir. Polimerizasyon derecesi, polimer moleküllerinde birbirlerine bağlanmış olan monomer moleküllerinin sayısı olarak adlandırılmaktadır. Monomer glukozdan, polimer selüloza geçişte polimerizasyon derecesi (PD) 6'nın üzerinde olduğu zaman sudaki çözünürlük azalmaktadır (Akmaz, 2001). PD 6'dan küçük olduğunda sellodekstrinler çözünebilir. Moleküller arası güçlü hidrojen bağları ve entropik sistem etkilerinden dolayı çözünebilirlikleri PD derecesinin artmasıyla düşmektedir (Zhang et al, 2006). Selülozdaki kristalinitenin nedeni hidrojen köprüleridir. Bundan dolayı selüloz molekülleri, kolay çözünmeyen, sert ve lifli bir polimer olarak bitkilerin hücre duvarlarında ideal bir yapı oluştururlar. Kağıt hamuru, tipik olarak 300 ile 1,700; pamuk ve diğer bitki fiberlerinde 800-10,000 polimerizasyona sahiptir. Hidrojen bağları miktarı ve selüloz molekülleri arasındaki ilişki, bitki hücre duvarında iki

durum bir selüloz yapı modeli olarak önerilmiştir. Bunlar amorf ve kristalin yapılardır.

Selüloz yapısının %85'i kristalin bölgeden oluşmaktadır. Amorf bölge olarak adlandırılan ve daha az düzenli olan bölge ise selülozun %15'ini oluşturur (Ulbrik, 1991). Selülozun kristalin yapısına hidrojen bağları sebep olmaktadır. Kristalinite selüloza suda çözünememe, gerilme kuvveti ve reaksiyonlara dirençlilik özellikleri kazandırır. Kristalin bölge, selülozun enzimatik kullanımında en büyük dezavantajdır (Ryu and Mandels, 1980; Ulbrik, 1991). Amorf bölge daha kolay hidrolize olmaktadır (Tsao, 1978; Ulbrik, 1991).

Kristal ve amorf bölgeler haricinde de değişik düzensizlikler mevcuttur ve düzensizlikler yüzey alanını genişleterek kısmen de olsa suda çözünmeyi kolaylaştırır. Saf selülozla çalışıldığında, selülozun amorf bölgesinin kristalin bölgesine kıyasla mantarlar tarafından 5-10 kat daha hızlı parçalandığı görülmüştür (Klyosov, 1990; Gama et al, 1994; Lynd et al, 2002).

2.2 Lignoselülozu Degrade Eden Enzimler

2.2.1 Ksilanazlar

Ksilanazlar, ksilanların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler, temel olarak mikroorganizmalar tarafından üretilirler. Bitki hücre duvarlarının parçalanmasında, bazı tohumların çimlenmesi sırasında (örneğin arpa tanesinin maltlanması sırasında) görev yapmaktadırlar. Ksilanazlar, ayrıca deniz yosunları, protozoanlar, kabuklular, böcekler, salyangoz ve kara bitkilerinin tohumlarında da bulunabilmektedir. Ksinolitik enzim grupları; Endo-1,4,- β -ksilanaz, α - Arabinofuranosidaz, β -Ksilosidaz, asetilksilan esteraz, α - glukuronidaz'dır.

Endo-1,4,- β -Ksilanaz (EC. 3.2.1.8), ksilan yapısındaki glikosidik bağları parçalayarak substratın polimerizasyon derecesini azaltırlar. Ksilanı rastgele parçalamazlar. Hidroliz için seçilen bağlar, substrat molekülünün yapısına, zincir uzunluğuna, dallanma derecesine ve süstitüentlerin varlığına bağlıdır. Endoksilanazlar, ksilanın hidrolizi (örneğin ksiloz, ksilobiyoz ve ksilotrioz ve arabinoz) sonucu oluşan son ürünlere göre farklılaşmıştır. Bu nedenle, ksilanazlar, dallandırma yapmayan (arabinoz serbestleştirici olmayan) veya dallandırma yapan

(arabinoz serbest bırakan) olarak sınıflandırılabilir. Birçok organizma, her iki tür ksilanazı da üretebilmektedir. Bu durum, ksilan hidrolizinden maksimum verim alınmasını sağlamaktadır.

β -ksilosidaz (EC.3.2.1.37), ksilobiyoz ve daha büyük ksilooligosakaritlere olan afinitelerine göre sınıflandırılabilirler. Moleküler ağırlıkları, 26 ile 360 kDa arasında değişen monomerik, dimerik veya tetrameric yapıda bulunabilirler. Oluşan kısa oligosakkarit yapılarını hidrolizlerler. Saflaştırılmış β -ksilosidazlar, genellikle ksilanı hidrolize etmez, en iyi substratları ksilobiyozdur ve ksilooligosakaritler için afiniteleri polimerizasyon derecesi ile ters orantılıdır. P-nitrofenil- ve o-nitrofenil- β -D-ksilopiranosid gibi yapay substratları parçalayabilmektedirler. β -ksilosidazların önemli bir özelliği, ksilan, ksilanaz tarafından birkaç ardışık hidrolize maruz kaldıktan sonra ortaya çıkmaktadır. Bu reaksiyon, endoksilanazı inhibe edebilen β -D-ksilopiranosil'in kısa oligomerlerinin birikmesine yol açmaktadır. β -Ksilosidaz, biriken ürünleri hidrolize ederek inhibisyon nedenini ortadan kaldırır ve ksilan hidrolizinin etkinliğini arttırmış olur.

α -Arabinofuranosidaz, β -D-ksilopiranosil'in 2. ve 3. pozisyonlarında bulunan L-arabinoz kalıntılarını uzaklaştırır.

Asetilksilan esteraz (EC 3.1.1.6), asetillenmiş ksilanlardaki ksiloz kalıntılarının 2. ve 3. pozisyonlarındaki O-asetil kısımlarını uzaklaştırır.

α -Glukuronidaz (EC 3.2.1.131), glukuronoksilan içinde bulunan glukuronik asit kalıntıları ve β -D-ksilopiranosil omurga birimleri arasındaki α -1,2 bağlarını hidrolize etmektedir. α -Glukuronidazların substratı, enzim kaynaklarına göre farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, substrat spesifikliği mikrobiyal kaynağa göre değişmekte ve bazı glukuronidazlar bozulmamış yapıda bulunan polimerleri hidrolizleyebilmektedirler (Ramalingam and Harris., 2010)

2.2.2 Kompleks selüloz sistemleri (Selülozom)

Selülozik yapı kompleksleri, farklı sayıda selüloolitik mikroorganizma tarafından üretilen karmaşık çoklu enzimleri içeren makineler olarak tanımlanabilir. Bitki hücresi duvarında bulunan polisakkaritlerin, özellikle dünyadaki en bol bulunan organik polimer olan selülozun verimli bir şekilde parçalanmasında görev almaktadır. Selülozom, çeşitli selüloolitik alt birimlerin kompleks yapı içersinde organize edilmesinden sorumlu olan çok fonksiyonlu bir alt birimden (scaffoldin) oluşmaktadır. Bir selülozomda, çoklu endoglukanlar, sellobiyohidrolazlar, ksilanazlar ve diğer enzimler, heterojen yapılı, çözünmeyen selüloz substratlarını parçalamak için sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Selülozomlar temel olarak, enzimatik yapısı bulunmayan, scaffoldin adı verilen proteinik bir yapı ve bu yapıya bağlı olan enzimatik alt birimlerden oluşmaktadır. Ayrıca bu yapı iskeleti, çok sayıda kohezinin adı verilen birimlerden ve selüloz bağlayan bölgelerden (Cellulose Binding Domain) oluşmaktadır. Güçlü bir kohezinin-dokerinin etkileşimi, selülozom yapısını tanımlamaktadır. Selülozun substrata tutunması, selüloz bağlama modülü (CBM) tarafından gerçekleştirilir. Katalitik bileşenleri, yapı iskeleti, bakteri hücre yapısına ve selüloza bağlanma mekanizmalarına ilişkin verilerin çoğu, *Clostridium thermocellum*'a ait selülozom yapılarının çalışılmasıyla elde edilmiştir.

Bakteriyel selülozomal sistemler, genel olarak iki şekilde sınıflandırılabilir. Tek bir iskelet içeren basit selülozomal sistemler ve birden fazla etkileşimli iskelet türü içeren karmaşık selülozomal sistemlerdir. Selülozomun genel yapısını, modüllerin scaffoldin alt ünitesindeki düzeni, modüler karşılığında bulunan kohezinin(ler)in ve / veya dokerinin özgülüğü belirlemektedir. Birkaç farklı yapı türü bulunmaktadır. Birincil yapı türleri, çeşitli dokerinleri taşıyıp alt birimleri doğrudan selüloz kompleksi içerisine dahil eder, adaptör iskelet parçaları bileşenleri veya komponent içerisindeki yapı sayısını artırır ve bağlayıcı iskelet kompleksinin bakteriyel hücre yüzeyine tutunmasını sağlamaktadır (Doi ve ark, 2003).

2.2.3 Selülazların sınıflandırılması

Enzimatik yapılar, subsuratı bağlayan bir birim ya da bu oluşuma yardımcı bir yapı ile katalitik bir kısımdan oluşmaktadırlar (Gilkes et al., 1991).

Selülazlar bir çok hemiselülaz ve diğer polissakkaritlerle birlikte *O*-glikosid hidrolazlar olarak tanımlanmaktadır. Katalitik birimleri, glikozil hidrolazlar oluşturmaktadır.

Enzimler Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Biyokimya Birliği (IUBMB, UMBBB) esasları temel alınarak substrat spesifitelerine göre tanımlanmaktadırlar. Substrata spesifik sınıflandırma bazen az bilgi vermektedir. Çünkü tüm substrat çeşitliliği her bir enzim için nadiren tanımlanmaktadır. Aminoasit sekans benzerliği temel alınarak glikosid hidrolazların (GH) aileler içine dahil edilerek alternatif sınıflandırılması önerilmiştir (Henrissat, 1991; Henrissat and Bairoch, 1993; Henrissat and Bairoch, 1996).

Bununla birlikte (Henrissat et al., 1998) glikosid hidrolazlar için bir nomenklatur önerilmiştir. Bu tanımlamaya göre ilk üç büyük harfle gösterilen kısım tercih edilen substratı, sayı ise hidrolaz familyasını ve bunu takip eden büyük harf ise enzimlerin ilk rapor edildikleri düzeni belirtmektedir. Örneğin *Trichoderma reesei* 'nin CBHI, CBHII ve EGI enzimleri Cel7A (CBHI), Cel6A (CBHII) ve Cel6B (EGI) olarak tanımlanmaktadır. Tanımlanmış glikosid hidrolazların artışı nedeniyle, Coutinho ve Henrissat, sürekli güncellenen birleşik bir veritabanı (<http://www.cazy.org/>) geliştirmişlerdir(Coutinho and Henrissat, 1999). Yapılan en son güncellemeye göre (28 Ağustos 2013), glikosid hidrolazlar 132 aile içersinde gruplandırılmaktadır. Buna ek olarak, 1712 glikosid hidrolaz ise herhangi bir ailede tanımlanmamıştır.

Son yıllarda selülazların atomik yapısı ve katalitik merkezlerinin yapılarının aydınlatılması ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Hidrolizlenemeyen oligosakkarit türevlerinin geliştirilmesi ve enzimin aktif bölgesini kapatan substrat analoglarının tasarımı ile aktif bölgenin yapı analizleri sağlanmaktadır (Driguez, 1997; Notenboom, 1998; Klarskov, 1997). Ek olarak biflurojenik substratların

tasarımı selülazların kinetik özelliklerinin incelenmesinde kullanılmaktadır (Armand, 1997).

2.2.4 Selülazlar

Selülazlar, selülozik biyopolimerleri enzimatik bir şekilde hidrolizleyip, monomerik fermente edilebilir şekerlerin salınmasında kilit rol oynayan enzim grubudur. Mikroorganizmalar, verimli selülaz üreticileri olarak bilinmektedirler. Bununla birlikte, hayvanlar ve bitkiler de selülaz üreticisidirler. Bakterilerin (örneğin aerobik ve anaerobik bakteriler) yanı sıra mantarlar(ör. yumuşak çürükçül mantarlar, beyaz çürükçül mantarlar ve kahverengi çürükçül mantarlar) selülaz üretimi için potansiyel kaynaklar olarak kabul edilir. Selülazlar, O-glikozit oksidazlar (EC 3.2.1.) olarak adlandırılan büyük bir enzim sistemi grubuna aittir. Selülazlar, selülozda bulunan β -1,4-d-glukan bağlarını hidrolize ederek glikoz, sellobiyoz ve oligosakaritler elde ederler. Selülazlar, farklı enzim sınıflandırmalarında substrat spesifikliğine ve yapılarına göre tanımlanmışlardır. Bununla birlikte, selülozun hidrolizinde üç temel enzimatik aktivite yapısı bulunmaktadır. Bu yapılar:

Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4): Selüloz moleküllerini, molekül boyunca rastgele yerlerden hidroliz ederler. İndirgen olmayan zincir sonları oluşturmak için β -1,4 glukozidik bağlar üzerinde aktivite gösterirler. İlk harekette bulunan bileşenin, kristalin selüloz üzerine atak yapma ve iç glikozid bağlarını rastgele bölme özelliklerine sahip endoglukanazlardan biri olduğu düşünülmektedir. Endoglukanazlar daha çok selülozun amorf kısımlarında aktiftirler. *C. thermocellum*'un en az yedi endoglukanaz enzimine sahip olduğu biyokimyasal ve genetik çalışmalarda kanıtlanmıştır. Birincil hidroliz, endoglukanaz ve ekzoglukanazın katı substrat yüzeyine yapışmasıyla başlamaktadır. Enzimatik depolimerizasyonda endoglukanaz ve ekzoglukanaz hız kısıtlayıcı basamaktır. İkincil hidroliz, sıvı fazda birincil hidrolizden açığa çıkan sellobiyozun β -glukosidaz tarafından glukozla dönüştürülmesini içermektedir. Bazı β -glukosidazlar büyük sellodekstrinlerin hidrolizinde de görev almaktadırlar (Zhang and Lynd, 2004).

Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91): Selülaz bileşenleri arasında en az kararlılığa sahip sellobiyohidrolazdır. Bu enzim grubu selüloz lifinin sonundaki indirgen

olmayan şeker zincirinden sellobiyozun kurtarılmasını katalizlemektedir. Genel olarak ilk hücum bileşeni olmasalar da sellobiyohidrolazların kristalin selüloz hidrolizi için gerekli olduğu kabul edilmektedir. Endoglukanazlarla ekzoglukanazların sinerjistik etkisinin olduğuna dair literatürde birçok çalışma mevcuttur.

β -glukosidaz (EC3.2.1.21): β bağlı glukoz oligomerlerini parçalayarak sellotetroz ve sellobiyozu açığa çıkarırlar ve sellobiyozu glukozla hidrolize ederler. Glukosidazlar ile reaksiyon başlamadan önce endoglukanazlar ve sellobiyohidrolazlar selüloz yüzeyine tutunmaktadırlar (Akmaz, 2001).

Enzimlerin biosentezi indüksiyon mekanizması ve katabolit baskı tarafından kontrol edilmektedir. Selülaz enzimi indüklenebilen bir enzimdir ve substratı ortamda mevcut ise yeterli miktarda enzim üretilmektedir (Mandels, 1975; Ateş, 1990).

2.2.4.1 Termofilik orjinli selülazlar

Sıcaklığa-dirençli 'ekstremofiller', spesifik enzimleri ve biyokimyasal yolları sayesinde ekstrem çevre koşullarında (sıcak su kaynakları, volkanik ve jeotermal bölgeler, derin deniz ve okyanuslar) yaşayabilme kabiliyetine sahiptirler (Barnard et al., 2010; Zambare et al., 2011).

(Hiper)termofilik mikroorganizmalar, 100° C' yi dahi aşan sıcaklıklarda gelişebilen benzersiz bir gruptur. Daha belirli bir ifade ile termofiller genel olarak ılımlı termofiller (optimum büyüme sıcaklığı 50-60°C arasında olanlar), ekstrem termofiller (optimum büyüme sıcaklığı 60-80° C arasında olanlar) ve hipertermofiller (optimum büyüme sıcaklığı 80-121° C arasında olanlar) sınıflandırılabilirler (Kashefi and Lovely, 2003). Hipertermofiller, arkea domaini ve bazı bakterileri içine alan bir grup mikroorganizma 100° C civarında sıcaklıkları tolere edebilmektedirler. Sıradışı sıcak-tolerant bir hipertermofil olan *Methanopyrus kandleri*, California körfezinin 2000m derinliğinde 84-110°C olan sıcak su bacalarından izole edilmiştir. Bu organizma, 122° C'de dahi hayatta kalabilmekte ve üreyebilmektedir (Takai et al., 2008). Termofilik mikroorganizmaların ekstrem sıcaklık değerlerinde yaşamsal faaliyetlerini

sürdüremeleri bazı yapısal farklılıklarına bağlıdır. Bunlar; membran lipitlerinin erime noktasının mezofillere göre yüksek olması, DNA'larındaki G-C içeriğinin dolayısıyla hidrojen bağlarının sayılarının fazlalığı, düşük su aktivitesine sahip olmaları, içerdikleri proteinlerin çok sayıda alt birimden oluşması, daha az polar aminoasit ve daha fazla sayıda yüklü aminoasit ihtiva etmeleri şeklinde sıralanabilir (Tolner et al, 1997; Haney et al, 1999; Spink and Chaires, 1999; Dülger, 2003).

Çizelge 2.3 Termofilik selüloz üreten mikroorganizmalar (Morana et al., 2011)

Mikroorganizma	Domain	Gram Reaksiyonu	Üreme Sıcaklığı (°C)	Üreme Koşulları	Referanslar
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Bakteri	+	55	Aerobik	Mohagheghi et al., 1986 Darland and Brock. 1971
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	Bakteri	+	60	Aerobik	Wisotzkey et al., 1992
<i>Anaerocellum thermophilum</i>	Bakteri	+	75	Anaerobik	Svetlichnyi et al., 1990
<i>Aquifex aeolicus</i>	Bakteri	-	85-95	Aerobik	Deckert et al., 1998
<i>Caldibacillus cellulovorans</i>	Bakteri	+	68	Aerobik	Bergquist et al., 1999
<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	Bakteri	-	70	Anaerobik	Rainey et al., 1994
<i>Clostridium stercorarium</i>	Bakteri	+	65	Anaerobik	Madden. 1983
<i>Clostridium thermocellum</i>	Bakteri	+	60	Anaerobik	Sarawathy et al., 1993
<i>Dictyoglomus thermophilus</i>	Bakteri	-	73	Anaerobik	Saiki et al., 1985
<i>Dictyoglomus turgidus</i>	Bakteri	-	72	Anaerobik	Svetlichny and Svetlichnya, 1988
<i>Pyrococcus abyssi</i>	Arke	-	96	Anaerobik	Cohen et al., 2003

<i>Pyrococcus furiosus</i>	Arke	-	98	Anaerobik	Fiala and Stetter, 1986
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	Arke	-	98	Anaerobik	Gonzalez et al., 1998
<i>Pyrodictium abyssi</i>	Arke	-	98	Anaerobik	Stetter et al., 1983
<i>Rhodothermus marinus</i>	Bakteri	-	65	Aerobik	Alfredsson et al., 1988
<i>Spirochaeta thermophila</i>	Bakteri	+	70	Anaerobik	Aksenova et al., 1992
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Arke	-	85	Aerobik	She et al., 2001
<i>Thermoanaerobacter cellulolyticus</i>	Bakteri	+	75	Anaerobik	Taya et al., 1988
<i>Thermobifida fusca</i> (<i>Thermomonospora fusca</i>)	Bakteri	+	50-55	Aerobik	Zhang et al., 1998
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Arke	-	85	Anaerobik	Fukui et al., 2005
<i>Thermotoga maritima</i>	Bakteri	-	80	Anaerobik	Huber et al., 1986
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Bakteri	-	80	Anaerobik	Jannasch et al., 1988
<i>Thermotoga petrophila</i>	Bakteri	-	80	Anaerobik	Takahata., 2001
<i>Thermotoga thermarum</i>	Bakteri	-	77	Anaerobik	Windberger et al., 1989

2.2.4.2. Bakteriyal ve arkeal selülazlar

Termostabil selülazlar dikkate değer bir biyoteknolojik ilgiye sahiptir (Hongpattarakere, 2002). Birçok selülitik termofilik bakteri izole edilmiş, çok sayıda selüloz-degrade edici enzim idendifiye ve karakterize edilip, klonlanmış ve ekspresyonu sağlanmıştır (Bergquist et al., 1999). Diğer taraftan, selüloz-parçalayıcı enzimler için araştırmalar, bu enzimlerin varlığının bu grup içinde daha nadir olduğunu ortaya çıkarmıştır. Buna ek olarak, arkealar arasında sadece işleme tabi tutmak için *Pyrococcus* ve *Sulfolobus*' a ait termoaktif selülazlar bulunmuştur (Kim and Ishikawa, 2010). Termofilik aerobik bir bakteri olan *Rhodothermus marinus*, İzlanda Reykjanes'de denizdibi sıcak su kaynaklarından izole edilmiştir (Alfredsson et al., 1988) ve 100° C' de 3-5 h sonrasında bile %50 oranında aktiviteye sahip, yüksek termostabil bir selülaza (Cel12A) sahip olduğu görülmüştür (Hreggvidsson et al., 1996).

Termofilik, aerobik, toprakta bulunan ana selüloz parçalayıcı filamentöz bir bakteri olan *Thermobifida fusca* (eski adı *Thermomonospora fusca*), oldukça kapsamlı çalışılmış selüloz degrade edici bakterilerden biridir. Bu aktinomiset üç endoglukanaz Cel9B, Cel5A, Cel6A (eski adlandırılmaları E1,E2 ve E5), iki ekzoglukanazı Cel6B ve Cel48A (eski adlandırılması E3 ve E6) ve bir endo/ekzoglukanazı Cel9A (eski adlandırılması E4) salgılamaktadır (Ghangas and Wilson, 1988; Lao et al., 1991; Irwin et al., 1993; Irwin et al., 2000).

Alicyclobacillus generu, ilk kez (Wisotzkey et al., 1992) tarafından bulunmuş ve membran lipidlerinin ana bileşeni olan alisiklik yağ asitlerinin varlığı ile karakterize edilmişlerdir. Tüm *Alicyclobacillus* türleri, yüksek derecede termoasidofilik olup (tanımlanan optimum büyüme koşulları 45-50° C ve pH 2,0-5,0) asidik glukanazların iyi bir kaynağı olmaktadır. *Alicyclobacillus acidocaldarius*' a ait bilinen dört selülaz bulunmaktadır. Bunlar: CelA, CelB, CelG ve CelA' dır. Bu bölgeleri kodlayan gen bölgeleri klonlanmış, rekombinant proteini *E. coli*' de eksprese edilip karakterize edilmiştir (Eckert et al., 2002).

Aquifex aeolicus, Sicilya' nın kuzeyindeki Aeolic Adaları' nın sualtı volkanik bacalardan izole edilmiş hipertermofilik bir mikroorganizmadır. Bakteriyal filogenide, köklere en yakın kollarda yer almakta ve 95° C'ye varan

sıcaklıklarda gelişebilme kapasitesine sahiptir (Pitulle et al., 1994). Bugüne kadar sadece bir tane termostabil selüloz ürettiği rapor edilmiştir. İlgili gen (cel8Y) klonlanmış ve *E. coli*' de ekspresse edilmiştir (Kim et al., 2000). Gen ürünü (Cel8Y) saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Enzim CMC'deki β -1,4 bağlarını hidrolizelebilmektedir. Fakat bu özellik avicel substratında gözlenmemektedir. Optimal aktivitesinin, 80° C sıcaklıkta ve pH 7,0' de olduğu belirlenmiş ve moleküler ağırlığının 36.7 kDa olduğu tespit edilmiştir.

Yüksek aktivite gösteren selüloolitik *Thermotoga* (Liebl, 2001), *Caldicellulosiruptor* (Rainey et al., 1994) ve *Pyrococcus* (Bauer et al., 1999) organizmaları anaerobik (hiper) termofiller arasında bulunmaktadır.

2.2.5 Selülozların biyoteknolojik uygulamaları

2.2.5.1 Bira mayalama prosesinde selülozların rolü

Buğday, mısır ve pirinç oldukça yaygın olarak bira yapımında kullanılıyor olsa da; arpa bira yapımında en fazla kullanılan tahıldır. Bira üretimine dahil olan adımları sırasıyla sayacak olursak; karbonhidrat miktarını arttırmak üzere kuru maltın değirmenden geçirilerek boyutlarının ufaltılması, üzerine su eklenerek lapa haline getirilmesi, arpa mayasından tohumların ayrılması, bu mayanın şerbetçiotu ile kaynatılarak aromalandırılması, maya likörünün fermente olması, olgunlaşması, koşullandırılması, filtre edilmesi ve son ürünün paketlenmesidir. Uygun olmayan mayalanma koşulları veya düşük kaliteli arpa kullanımı kaynaklı işlem sırasında beta glukanın yüksek konsantrasyonda olması; viskozitesi yüksek bira üretimine, jelatinimsi çökeltinin oluşumuna, ortaya çıkan ürünün azalmasına ve süzme sonucu ortaya çıkan ürünün miktarının düşmesine yol açmaktadır (Bamforth, 1994; Guo et al., 2010b; Bhat, 2000).

Selülozların, mayalanma sürecinde, lapa haline getirme sırasında fazla beta glukanın hidrolizinde ve viskoziteyi azaltmakta dolayısıyla arpa mayasının tohumlardan ayrılmasını arttırmakta kullanıldığı bilinmektedir (Oksanen et al.,1985). *Trichoderma reesei*' nin selüloz sisteminden endoglukaz ve sellobiohidrolazın beta glukanların polimerizasyonunda ve maya viskozitesinde

büyük ölçüde azalma gözlemlenmemiştir. Dahası, kullanılan enzimlerin eklenme miktarının artırılması filtrelenmeyi de geliştirmiştir.

Genellikle gıda üretim süreçlerinde görülen mikroorganizmalar olan *A. niger*, *T. reesei*, and *P. funiculosum* lapa haline getirme sürecindeki en büyük selüloz kaynağı olarak bira üretiminde oldukça büyük bir teknolojik fayda sağlamaktadırlar (Castro et al., 2010; Karboune et al., 2008).

Selülotik enzimlerin üretimi, polisakkaridik fraksiyonların enzimatik hidrolizleri ve açığa çıkan şekerlerin fermantasyonunun hepsinin tek bir adımda birleşmesi alternatif bir çözüm olarak gösterilebilir. *S. cerevisiae* gerek genetik olarak kolayca manipüle ediliyor olması, GRAS olarak kabul edilmesi ve yüksek konsantrasyonlarda etanol ürettiği olması itibariyle umut verici bir aday olarak kabul edilmektedir.

Maalesef, *S. cerevisiae* selüloz degrade edici enzimlerden tamamıyla yoksun olmakla beraber endüstriyel olarak heterolog selüloz genlerin ekspresyonunda konak olarak kullanılabilir. Buna örnek olarak, *T. fusca*'nın endoglukanaz'ı olan Cel9A'nın yakın zamanda *S. cerevisiae*'de üretilmiş olması gösterilebilir. Buna ek olarak, rekombinant konaklar tarafından üretilmiş selülozların kendi içerisindeki sinerjiyi belirleyebilmek ve mayanın selülotik kapasitesini artırmak amacıyla cel9A geni *T. reesei*'nin cel5A(egll) ve cel7B genleriyle birlikte ekspres edilmiştir (Van Wyk et al., 2010). Arpa beta glukanlarını degrade etme ve sülfite akümüle etme özellikleri kazandırılmış maya türleri, biranın kalitesini artırabilmektedir. Aslında, antioksidan içermesi ve antimikrobiyal aktiviteler barındırıyor olması itibariyle sülfite önemli bir bira bileşenidir ve biranın tadını stabilize eden aldehit katkıları da oluşturabilmektedir.

2.2.5.2 Şarap üretiminde selülozların rolü

Selülozlar, hemiselülozlar ve pektinazların şarap üretiminde kullanılması daha iyi bir yüzey maserasyonuna izin vererek iyi bir renk özütlemesine yardımcı olmaktadır. Kırmızı şarap üretiminde hatırı sayılır biçimde önemli olan bu durum, durulma, filtrelemeyi artırıp şarabın genel kalite ve stabilitesini

yükseltmektedir (Galante et al., 1998). Fakat enzimlerin, şarap üzerindeki etkisi hakkındaki çalışmalar ve antosiyanin içeriğinin zıt yöndeki etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır (Sacchi et al., 2005).

Şarapların polisakkaridik kısımları, üzüm tanelerinin pekto-selülozik hücre duvarı yapısından gelmektedir (Pellerin et al., 1996; Vidal et al., 2003; Ducasse et al., 2010) Şarap yapımındaki birleşim ve miktarlar, değişik enzimlerin kullanımı ile farklılık gösterebilmektedir. (Ayestaran et al., 2004; Guadalupe et al., 2007). Son zamanlarda şarap yapımında kullanılan pektinaz preparasyonları selülaz ve az miktarda hemiselülaz eklenerek nispeten daha kısa bir zamanda daha bütün yapıda bir hücre yıkımı gerçekleştirerek meyve sıvılaşması sağlanmıştır (Plank and Zent, 1993). Masere edici enzim karışımlarının kullanımının, yalnızca pektinazların kullanımından daha iyi işe yaradığı bilinmektedir (Haight and Gump, 1994).

1980'den beri *Botrytis cinerea* tarafından, enfekte olmuş üzümlerden yapılan şaraplarda *Trichoderma* sp.'den elde edilen beta glukanaazın kullanımı önerilmektedir (Dubordieu et al., 1981; Villetaz et al., 1984). Bu organizma, 1,6-β-glukosid bağlar aracılığıyla, bağlı kısa zincirlerle yüksek moleküler ağırlıklı çözünür 1,3-β-glukanlar üretmektedir. Bunun sonucunda, şarabın filtrelenmesi ve durulması zorlaşmaktadır. *B. cineria*'nın, açığa çıkardığı istenmeyen etkileri ortadan kaldırmak için *T. harzianum*'dan bir beta glukanaaz glukanaazları hidrolize etmek üzere tanımlanmış ve patentlenmiştir.

2.2.5.3 Hayvan yemi biyoteknolojisinde selülazların rolü

Selülazlar, birçok hayvan türü için ana besin kaynağı olmasına karşın, birçok omnivor ve herbivor kendi selülazını üretmekten yoksundur. Buna karşın, geniş getiren hayvanlar selülotik mikroorganizmalarla (sindirim sistemlerine yerleşmiş yüksek özellikli bakteriler ve protozoa) simbiyotik bir yaşam kurmuştur. Bunlar selülazı oksijensiz koşullarda degrade etmektedirler (Kobayashi et al., 2008).

Geviş getirenleri de kapsayan bazı hayvanlarda düşük besin sindirme özellikleri nedeniyle varolan enerji alınımı kısıtlanmış olabilir. Buna ek olarak, dışkılamayı da teşvik edip düşük kaliteli besin kaynaklarının kullanım olasılığını

da engellemektedirler. Bitkisel polisakkaritler, diğer besin bileşenlerine nazaran daha yavaş ve eksik degrade edildiğinden dolayı düşük kaliteli lifli yeşilliklerin kullanımını artırmak için bütün bir enzimatik hidrolizi içeren verimli bir sistem gerekmektedir (Graham and Inbarr, 1992; Chesson and Forsberg, 1997; Ozkose et al., 2009).

Değişik türlerdeki tarım endüstrisi atıklardan, hayvan yemi geliştirmeye yönelik araştırmalar sürmektedir. Bu amaçla, bazı *Pleurotus* türlerini de içeren çeşitli funguslar, bitki kalıntılarını parçalayarak hayvan yemi olarak değerlendirilmelerini sağlamaktadırlar. *Pleurotus* türleri, değişik türlerdeki sitrik küspesi ve pirinç kamışının da dahil olduğu bazı lignoselülozik kalıntılarda gelişebildikleri gibi bu hammaddelerin besin değerlerini ve sindirilebilirliklerini de ekstraselüler, selüloolitik ve hemiselüloolitik enzimleri sayesinde artırmaktadırlar.

Hayvanların beslenmelerinde lignoselülotik enzimlerin katılması son zamanlarda yaygınlaşmıştır. Bu durum, sadece geviş getiren hayvanlarda değil (Bowman et al., 2002), geviş getirmeyen çiftlik hayvanları ve kümes hayvanlarında da yaygınlaşmaktadır (Woyengo et al., 2008).

Bu bağlamda selülazların, hayvan besi endüstrisinde geniş çaplı potansiyel uygulamaları söz konusudur. Bu hidrolitik enzimler, besinin hücre duvarı sindiriminin ve besin kullanımının veriminin güçlendirilmesiyle besleyici özelliklerini artırmaktadır.

Selülazlar, ayrıca hayvan yemine ilk adımlarda eklenebilmektedirler (Zhu et al., 1999). Ayrıca silaj amaçlı geliştirilmiş bazı fibrolitik enzim ürünleri, günümüzde geviş getiren hayvan diyetlerinde de kullanılmaktadır (Lewis et al., 1996). Besin endüstrisinde sıklıkla kullanılan ticari enzimler, mikrobiyal fermentasyondan üretilmiş olup, hayvan diyetlerinin enzimatik ürünleri de funguslar (genellikle *T. longibrachiatum*, *A. niger*, *A. oryzae*) ve bakteriler (genellikle *Bacillus* spp.)' den elde edilmektedir (Pendleton, 2000; Bhat and Hazlewood, 2001).

Son zamanlarda, termoasidofilik bir bakteri olan *Alicyclobacillus* sp.'a ait yeni bir selüloz olan A4 saflaştırılıp karakterize edilmiştir (Bai et al., 2010). Bu enzim, yüksek derecede aside stabil ve proteaza dirençlidir. Arpa β -glukanını, verimli bir şekilde hidrolizleme kapasitesine sahip olup gastrik koşullar altında arpa-soya fasulyesi viskozitesini iyi bir şekilde azaltmışlardır. Bu özellikleri nedeniyle Cel4A, hayvan beslemesinde nutrientlerin biyoyararlanımını arttırarak yeni bir ticari glukanaz adayı haline gelmektedir.

2.2.5.4 Biyomekanik olarak kağıt yapımında selülazların rolü

Mekanik olarak kağıt yapımı elektrik enerjisi gerektirmekte ve düşük kağıt dayanıklılığı ile sonuçlanmaktadır. Biyomekanik olarak kağıt hamuru oluşturma, mekanik olarak kağıt hamuru oluşturma aşamasından önce lignoselülozik materyalin enzimatik ön-işlemesi ile gerçekleştirilmektedir. Bu sayede, elektrik kullanımından %30 oranında tasarruf sağlanmasıyla birlikte kağıt dayanıklılığı arttırılmış olmaktadır.

Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisinde, selüloz eldesi için *Chrysosporium lucknowense* kullanılmaktadır. Son zamanlarda, bu organizmaya alternatif olarak *Aspergillus* sp. ve *T. reesei*' nin selülazları ticari ölçekte kullanılmaktadır (Bukhtojarov et al., 2004; Hinz et al., 2009).

2.2.5.5 Fiberlerin biyomodifikasyonunda selülazların rolü

Son yıllarda fiberlerin biyomodifikasyonu çevre dostu olmaları, az enerji tüketmeleri, geleneksel proseslere oranla fiberlere daha az zarar veriyor olması nedeniyle gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Pellinen et al., 1989; Henriksson and Gatenholm, 2002; Yang et al., 2008).

Selülazlar, fiber biyomodifikasyonunda selüloz fiberlerinin iç ve yüzey tabakalarını etkimesi nedeniyle tercih edilmektedirler. Bu nedenle etki mekanizması üzerine ciddi çalışmalar yapılmaktadır (Suurnakki et al., 2003). Özellikle, (Cadena et al., 2010) *Paenibacillus barcinonensis*' in endoglukanaz cel9B üzerinde çalışmış ve multi-domain enzim kapasiteleri nedeniyle üretim maliyetlerini azaltmış, kağıt dayanıklılığını arttırmıştır.

2.2.5.6 Mürekkepten arındırma işleminde selülozların rolü

Enzimatik mürekkepten arındırma prensibinde, mürekkep ile fiber bağlantısının azaltılması ve fiberlerin mürekkep partiküllerinden ayrılması prensibine dayanmaktadır (Yingjuan et al., 2005; Shufang et al., 2005).

A. niger, *T. reesei*, *Humicola insolens*, *Myceliophthora fergusii*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium* sp. gibi farklı mikroorganizmalardan selülozlar bu amaç için kullanılmaktadır (Marques et al., 2003)

2.2.5.7 Gıda teknolojisinde selülozların rolü

Meyve suyu endüstrisinde, işlem performansını artırmak, ekstraksiyon yöntemlerine yardımcı olmak, meyve sularının berraklaştırılmasını sağlamak için diğer yumuşatıcı enzimlerle birlikte uygulanmaktadır. Kayısı, mango, erik, papaya, armut ve şeftali gibi meyvelerden elde edilen püre ve nektarın viskozitesini azaltarak flavonoidlerin çiçeklerden ve tohumlardan ekstraksiyonu için kullanılır. Selüloz aracılı ekstraksiyonlar, geleneksel yöntemlere göre daha yüksek verim, daha az ısı hasarı ve kısa işlem süresi sağlamaktadırlar. Selülozlar, fenolik bileşiklerin üzüm posasından ekstraksiyonu için kullanılmaktadırlar. β -Glukozidazlar, pektinaz ile meyve ve sebzelerin yapısını, tadını ve aromasını değiştirmektedirler. Ayrıca turunçgil meyvesinin acılığını azalttığı, aromayı ve tadı iyileştirdiği bildirilmiştir. Selülozlar, verimli zeytinyağı ekstraksiyonu için diğer enzimlerle birlikte kullanılabilir (Raveendran et al., 2018).

2.2.5.8 Tekstil endüstrisinde selülozların rolü

Tekstil endüstrisinde karşılaşılan bir diğer sorun, pamuk ve pamuk olmayan materyallerin karıştırılması sırasında uygulanan işlemler ve sonrasında yapılan yıkamalarla kumaşlarda oluşan parlaklık kaybı ve eski görünümüdür. Selülozın tekstil endüstrisindeki ana kullanım alanı, taşlama (eskitleme) ve kumaş üzerindeki liflerin uzaklaştırılması işlemleridir. Kumaş üzerindeki lifler, selülozın kumaşlarla birlikte çalkalanması sayesinde uzaklaştırılmaktadır. Kumaş, işlem sayesinde parlak görünüm kazanmaktadır. Bu müdahaleler, kumaşın sertleşmesine yol açabilmektedir. Bu deformasyonun oluşmaması için katyonik yumuşatıcılar

kullanılmaktadır. Moleküler biyolojik yaklaşımlarla, selülazın kumaşın dayanıklılığına olumsuz etkileniminin azaltılması hedeflenmektedir (Hakamada, 2001).

Termofilik selülazlar tekstil endüstrisinde biyoparlatma ve biyotaşlama uygulamalarında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Termofilik fungus olan *T. emersonii* 'nin selülazları biyoparlatma etkilerini test etmek için elyaf-pamuk fabrikalarında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Gomes et al., 2007). Enzimler muamele edildiği materyali beyazlaştırmakta, parlaklık kazandırmakta ve yumuşatmaktadır. 2007'de alkalotermofilik bakteri olan *Thermomonospora* sp.' dan bir endoglukanaz izole edilmiştir. Bu enzim alkalın koşullar altında kot biyosonlandırması için kullanılmaktadır (Anish, 2006).

2.2.5.9 Biyoetanol üretimde selülazların rolü

Artan CO₂ oranının sebep olduğu iklim değişikliği, fosil enerji rezervlerinin azalması nedeniyle yakıt fiyatlarının yükselişi, çevrenin korunmasına yönelik yaklaşımların artışı gibi sebeplerden ötürü, yenilenebilir kaynaklardan biyoetanol üretimi araştırmacılar arasında oldukça önemli bir çalışma konusu haline gelmiştir (Li et al., 2009). Yıllık, dünya genelinde fotosentez ürünü kuru bitki materyali 10¹¹ tondan fazladır ve bu biyokütlenin neredeyse yarısını selüloz polimeri oluşturmaktadır (Leschine, 1995)

Etanol renksiz, biyoçözünür, az miktarda çevresel kirletici oluşturan tahıl alkölü de denilen bir sıvıdır. Biyoetanol araçlarda petrol yerine kullanılan ana yakıttır ve lignoselülozik biyomas gibi yenilenebilir materyallerden üretilebilmektedir (Hamelinck et al., 2005; Hill et al., 2006). Fosil yakıtlara karşı sera gazı emisyonunu ve eski araç motorlarından çıkan karbonmonoksit gazını azaltabilme olasılığı nedeniyle önem kazanmaktadır. Bununla birlikte yakıt içinde biyoetanolumun %5 oranına kadar kullanımı varolan araçların motor sisteminde değişiklik yapılmasını gerektirmemesi bakımından önemlidir.

Başlangıçta biyoenerji endüstrisi, gıda için kullanılan ürünlerden glukozun fermentasyonunu temel alan geleneksel teknolojileri içermekteydi.

Fakat ürünlerinin aynı zamanda gıda olarak kullanılması bu ürünlerin fiyatını arttırmış gerekli talebi karşılayamamıştır. Bu nedenle gıda için kullanılan substratlara gereksinim duyulmadan ağaç, kentsel atık sular, atık kağıtlar, tarımsal ve endüstriyel atıklar gibi ucuz kaynaklardan yararlanarak üretilen biyoyakıtların üretimi ülkeler tarafından teşvik edilmektedir (Kim and Dale, 2004; Lin and Tanaka, 2006).

Lignoselülozik biyomas selüloz, hemiselüloz ve ligninden oluşmaktadır. Bu tip bir biyomas içinde selüloz ve hemiselüloz zincirleri lignin matriksi içine gömülü olup verimli bir degradasyonu engellemektedir. Selüloz ve hemiselüloz kimyasal metodlarla ya da ilgili enzimlerle şekerlere hidrolizlenip iyi bilinen fermentasyon teknolojileri ile biyoetanole dönüştürülebilmektedirler. Genellikle, lignoselülozik biyomastan etanolün üretimi üç önemli basamaktan oluşmaktadır.

1) Ön-işleme: Selüloz ve hemiselülozun verimli bir şekilde hidrolizlenebilmesi için öncelikle ligninin ön-işleme teknolojileri ile uzaklaştırılması gerekmektedir (Mosier et al., 2005; Alvira et al., 2010)

2) Sakkarifikasyon: Polisakkaritlerin fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesidir. Biyomasın enzimatik olarak degradasyonu kapsamlı bir şekilde çalışılıyor olup endoglukanaz, β -glukosidaz, ksilanaz, α -arabinosidaz, β -ksilosidaz gibi birlikte birkaç enzimin etki etmesini gerektirmektedir.

3) Fermentasyon: Mayalar ve diğer uygun mikroorganizmalar aracılığıyla hekzos ve pentoz şeker karışımından etanol elde edilmektedir. Selülazlar lignoselülozik biyomasın başarılı bir çevrimi için zorunludur. Çünkü son yıllarda bakteriyel ve fungal orjinli selüloolitik enzimlerle ilgili yapılan çalışmalar selüloolitik substratların glukoz monomerlerine degradasyon yeteneğini arttırmaktadır (Kumar et al., 2008).

T. reesei RutC30 mükemmel bir selülaz üreticisi olarak bilinmektedir. Fakat selülozun glukoz hidrolizi için gerekli β -glukosidazın düşük oranda hidrolizi bir dezavantaj oluşturmaktadır (Kim et al., 2003).

Diğer bir açıdan, *A. niger* strainleri yüksek seviyede β -glukosidaz üretmeleri açısından çalışılmış olsalarda endoaktif enzimler bakımından yetersiz kalmaktadırlar. İstenen oranda selüloz sekresyonu için karışık kültürler kullanılmıştır fakat farklı grupların selülozları arasındaki sinerjistik etkinin saf kültürlerdeki verimden daha yüksek olmadığı görülmüştür. Lignoselülozik biyomasın degradasyonu için yeni mikroorganizma ve selülozların kullanımına ilişkin çalışmalar sürekli devam etmektedir. Gana'daki Ejura çiftliklerinden izole edilen bir *A. niger* suşu mısır koçanını hidrolize edebilmiştir. Mısırın temel tarımsal artığı olan mısır koçanı, eş zamanlı sakkarifikasyon ve fermentasyon ile basit şekerlere dönüştürülmüştür. Bunun sonucunda litrede, 24 saatte 0,64 g en yüksek etanol konsantrasyonu rapor edilmiştir (Zakpaa et al., 2009).

Bakteriler genelde daha yüksek büyüme oranına sahip olup funguslardan rekombinant enzimleri üretmeleri bakımından daha avantajlıdır. Bununla birlikte bakteriyal glikosid hidrolazlar selülozom adı verilen daha iyi yüksek aktivite ve sinerjiye sahip multi-enzim kompleksini eksprese etmektedirler (Bayer et al., 2007).

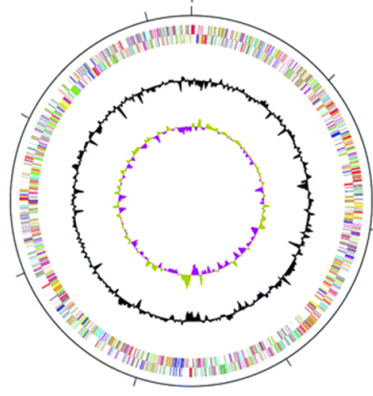
2.3 *Thermobifida fusca* YX Genomu

Thermobifida fusca (eski adıyla *Thermomonospora fusca*), *Actinobacteria* filumuna ait, Gr⁺, çubuk şekilli, aerobik, ılımlı termofilik, filamentöz, bir toprak bakterisidir (Bachmann et al., 1991; Lykidis et al., 2007). *Thermobifida fusca*, mantar büyüme ortamı, gübre, çürümüş samanlarda ve kompost yığınları gibi kendiliğinden ısınabilen organik materyallerde artan sıcaklıkla birlikte 55-60⁰ C' de gelişen bitki hücre duvarlarının ana parçalayıcısı bir aktinomisetidir. Bu nedenle termostabil selülozlar ve salgılama mekanizmaları için model organizma olarak kullanılmaktadırlar. *Thermobifida fusca*'nın, toplam genom sekansının, %85 kodlama sıklığı ile 65 RNA türü ve 3.117 proteini kodladığı öngörülen 3.642.249 bp'lik tekli dairesel kromozoma sahip olduğu gösterilmiştir. Genom analizleri, önceden tanımlanmış selüloz ve ksilanazlara ek olarak kabul edilen 29 glikosid hidrolazların varlığını açığa çıkarmıştır. Glikosid hidrolazların, temel olarak dekstran/nişasta ve ksilan-degrade edici fonksiyonları sergilediği kabul edilen enzimleri içerdiği belirlenmiştir. *T.fusca*, çoklu selüloz salgısı ve karbonhidrat-

degrade edici diğer enzimlerin çalışılması ve izole edilmesi için iyi bir kaynaktır. Klasik biyokimyasal metodların kullanılmasıyla 4 endoglukanaz geni, 2 ekzoglukanaz geni olmak üzere 6 selülaz saptanmıştır. Buna ek olarak sellobiyozu glukoza degrade eden intraselüler bir beta-glukosidaz, ekstraselüler bir ksiloglukanaz ve bir beta-1,3-glukanaz klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Salgılanan selülazlar tarımsal ürünlerin degradasyonunun kullanımı için oldukça büyük biyoteknolojik avantaja ve atıkları şekere dönüştürüp etanole çevirme özelliğine sahiptirler. *Actinobacteria* filumundan bazı mikroorganizmaların genomuna ulaşılabilmektedir. *Actinobacteria* filumuna ait bu toplam genomik sekanslarına erişim avantajı sekans karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Bu özellikler, bu mikroorganizmaların biyoteknolojik uygulamaları için önemli bilgiler sağlayabilme potansiyeline sahiptir (Lykidis et al., 2007).

2.3.1 Genom özellikleri ve actinobacteria genomiksi ile karşılaştırılması

T. fusca genomu, 3,642,249 bç' lik tekli dairesel bir kromozomdan oluşmaktadır. Genomda tahmini kodlama yapan sekanslar (Predicted coding sequences (CDSs)) 3.117 ve G-C içeriği %67'dir.



Şekil 2.1 *T.fusca* genomunun dairesel temsili

Genom yapısı:

Toplam baz: 3,642,249 Protein kodlayan genler: 3117 DNA kodlayan baz: 3,122,831

Psödogenler: 7 %G-C %67,5 tRNA 53

Tahmini genlerden %68' nin fonksiyonu belirlenmiştir. Genlerinin %26' sı (830 gen) veritabanındaki diğer organizmalarla, fonksiyonu bilinmeyenlerle birlikte sekans benzerliğine sahiptir. Ayrıca 106 geni (%3.3) ise sadece *T.fusca*' ya aittir. Dört rrn loci(bölge) 5S-23S-16S operonlarında düzenlenmiştir.

Suhre ve Claverie 'ye göre, termofilik proteomlar polar köklere karşı (Asn, Gln, Ser ve Arg) artmış içerikli yüklü köklere (Asp, Glu, Lys ve Arg) sahiptirler. Bu eğilim *T.fusca* gibi 55 °C' den daha yüksek sıcaklıklarda optimum büyüyebilme kapasitesine sahip organizmalar için yaygın bir özelliktir ve *T.fusca* Lys köklerinin dikkat çeken istisnasıyla benzer eğilimi sergilemektedir. Bu durum Birleştirilmiş Mikrobiyal Genomlar (Integrated Microbial Genomes (IMG)' daki bakteriler için minimum bir yakınlık olduğunu göstermektedir.

Birçok termofil, daha az Ala köküne sahip olmasına rağmen, *T. fusca*' da Ala kök miktarının fazla olduğu gözlemlenmiştir. *T. fusca*, IMG'de bulunan 32 *Actinobacteria* genomuyla karşılaştırıldığında özgün 412 (%13) gene sahip olduğu belirlenmiştir. Bu 412 genden, yalnızca 83 CDSs' i InterPro hitlere sahiptir. Geriye kalan genler fonksiyonel özelliği olmayan hipotetik (varsayıma dayalı) proteinlerdir. *Streptomyces coelicolor*, *Thermobifida fusca*, *Nocardia farcinica*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Corynebacterium diphtheriae* gibi beş temel *Actinobacteria* genusu arasındaki karşılaştırma, bu beş organizma arasında

1.101 genin (%30) ortak olduğunu (paylaşıldığı) göstermiştir. *T. fusca* diğer beş genomla karşılaştırıldığında 660 (%20) özgün gene sahiptir. Genel olarak, gen benzerliği ve aynı gen sırasında olması açısından bu beş genom arasında yapılan karşılaştırmalar sonucu *T. fusca*'nın, *S. coelicolor* ve *N. farcinica*'ya daha yakın ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lykidis et al., 2007).

2.3.2 Selülaz ve glikosid hidrolazları

T. fusca, CAZy ModO veritabanı (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) (Tablo 2) aracılığıyla tanımlanan polisakkarit ya da oligosakkaritler üzerine etki ettiği öngörülen 45 hidrolitik enzimi kodlamaktadır. Bu enzimler, 36 glikosid hidrolaz, 9 karbonhidrat esteraz, 2 polisakkarit lizaz içermektedir. Glikosid hidrolazlar, genomda 22 GH familyası ile GH 13 familyasına ait en çok bulunan altı üyeye yayılmışlardır. Sinyal peptidlerin bilgisayar analizleri, *T. fusca*'nın 16 glikosid hidrolaza sahip olduğunu ve salgıladığını belirtmiştir. Bu salgılanmış proteinlerin çoğunluğunun, N ucunda twin-arjinin translokasyon sinyaline (TAT) benzer bir sinyal sekansına sahip olduğu belirtilmiştir.

T. fusca'dan on dört enzim üzerinde çalışılmıştır. Bu enzimlere ek olarak, bitki hücre duvarının degradasyonu ile ilişkili potansiyel enzimler ve kabul edilen 28 glikosidil hidrolazdan daha fazlası genomda saptanmıştır (temel olarak ksilan ve dekstran/nişasta degrade edici fonksiyonlar). İki enzimin, ekzokitinaz ve endokitinaza benzer olduğu belirlenmiştir (Tfu0868 ve Tfu0580). N-asetil-hekzominidaz'ın yokluğu, kitin degradasyonunun alternatif bir yol iziyle ya da ekzokitinolitik bir enzim aracılığıyla substratın kademeli degradasyonunu devam ettirdiği anlamına gelmektedir. N-asetil-glukozamin, ksilan ve kitinin deasetilazları tanımlanmıştır. Organizmanın enerji üretimi için bu substratları kullanabildiği farz edilmiştir. *T. fusca*, ksilanın degradasyonu için birkaç enzim içermektedir. Bu enzimler; endo- β -1,4-ksilanaz (Tfu2791, Tfu1213 ve Tfu2923), ksilosidaz (Tfu1613), β -L-arabinofuranosidaz (Tfu1616) ve varsayılan asetilksilan aktivitesi ile birkaç CDSs' dir. Yukarıda bahsedilen karbonhidrazilara ek olarak, *T. fusca*, iki CDSs ile pektat liyaza önemli derecede benzer Tfu0153 ve Tfu2168'e sahiptir. Bu iki gen, TAT sistemi ile etkileşebilen bir sinyal peptide sahip proteinleri kodlamaktadır.

CelR (Tfu_0938), bundan önce birkaç selülaz geninin regülatörü olarak tanımlanmış olan, laktoz baskılayıcı bir ailenin üyesidir. İlk olarak, CelR'nin bazı selülaz genlerinin yukarı yönünde (upstream) bulunan 14-bp'lik inverted repeatlere (ters tekrarlar): 5'-(T)GGGAGCGCTCCC(A) bağlandığı ve sadece bir represör gibi davrandığı düşünülmüştür. Bununla birlikte, sellobiyozun (selülazların temel son ürünü) fizyolojik konsantrasyonunun CelR-DNA kompleksinin ayrılmasına neden olduğu ortaya çıkarılmıştır. Wilson, daha sonraki çalışmalarda CelR' nin yalnızca bir represör olmadığını aynı zamanda zorunlu bir aktivatör olduğunu öngörmüştür (Lykidis et al., 2007).

2.3.3 Transkripsiyon ve translasyon

Ribozom için 29 tane büyük, 17 tane küçük ribozomal altbirim proteini ve tipik prokaryotik translasyon başlatma faktörü (IF1, IF2 ve IF3) ve uzama faktörleri (Tu ve G) bulunmaktadır.

T. fusca' nın altı selülaz geninin (Tfu0620, Tfu0901, Tfu1074, Tfu1627, Tfu1959, ve Tfu2176) transkripsiyonel regülasyonu, 5' upstream (yukarı yönünde) bölgesindeki 14bp'lik ters tekrarlar (5'-TGGGAGCGCTCCCA) bağlanan CelR gen ürünleriyle gerçekleştirilir. CelR bir represör gibi hareket eder ve sellobiyozun (selülazın temel olarak son ürünü) fizyolojik konsantrasyonları CelR-DNA kompleksinin ayrılmasına neden olur. Yukarıda bahsedilen 14-bp'lik tekrarlayan diziler *T. fusca* genomunda beş lokasyonda daha bulunmaktadır.

Tfu0934, Tfu935 ve Tfu936 ile birlikte disakkarit bir ABC transport kasedini oluşturmakta ve yukarı kısmında (upstreamlerinde) bulunmaktadır. Bu kasetlerin kromozomal lokasyonu, CelR kodlayan genin (Tfu0938) ve intraselüler β -glukosidaz olan bgIC'nin upstreaminde bulunmaktadır. Spiridonov ve çalışma grubu, Tfu935-Tfu938 operonunu tanımlamıştır. Ayrıca Tfu935 'in upstreaminde bulunan eksik palindromların öyle olduğu kabul edilen CelR bağlanmasını gerçekleştirdiği kabul edilmiş olup CelR aracılığıyla transkripsiyonel olarak ortak düzenlenebildikleri önerilmiştir. 5' bölgelerinde mükemmel CelR bağlanma bölgeleriyle ekstra dört gen bulunmaktadır. Bu bölgeler; Tfu1135, Tfu1508, Tfu1665 ve Tfu2844'dir. Tfu1135, *T. fusca* da diğer organizmalardaki benzer genler ya da belli homologları olmayan benzer bir proteindir. Tfu1508 ana

kolaylaştırıcı aileye ait bir membran proteindir ve selüloz hidroliz ürünlerinin hücre içine transportuyla ilişki olduğu düşünülmektedir. Tfu1665 üç tane karbonhidrat bağlama domaini içeren bir proteindir. Bu yapı diğer karbonhidrat-hidrolizleyen enzimler vasıtasıyla scaffold proteini olarak etki edebilmekle birlikte bir TAT sinyali içermemektedir. Muhtemelen sec yolizi aracılığıyla salgılanmaktadır. Son olarak, spesifitesi bilinmeyen Tfu2844 ise bir oksidoredüktazdır.

Ayrıca yukarıda bahsedilen genler, mükemmel CelR bağlanma palindromları içermektedir. Buna ek olarak, salgılanan ksilanaz (Tfu2923) yukarı bölgesinde (5'-TGGGAGCGCTCCCG) kusurlu bir palindrom içermektedir. İlginç bir şekilde bu kusurlu palindrom Tfu0621 ve Tfu1959 un upstream regülatör bölgesindeki kusursuz olanına komşudur. Bu durum, bu selülazların ekspresyonunun regülasyonunda görev aldığını desteklemektedir. Aynı kusursuz palindrom *Streptomyces avermitilis*' in genomundaki dört lokasyonda ve *S. Coelicolor*' un genomundaki on lokasyonda bulunmaktadır.

Laktoz represör familyasına (lac) ait, CelR ye benzer altı tane ek geni (Tfu2790, Tfu1620, Tfu1710, Tfu0834, Tfu1922 ve Tfu0909) bulunmaktadır. Bu genler karbonhidrat-indükleyen transkripsiyonel regülasyon ile ilişkilendirilebilir. Bu genler CelR'den aynı etkiye sahip farklı yanıt verebilir. CelR'nin glukoz ve ksilan üzerinde geliştiği zaman miktarının azalması nedeniyle muhtemelen universal bir transkripsiyonel regülatör olmadığı düşünülmektedir (Lykidis et al., 2007).

2.4 Selülaz Geninin Klonlanması ve Ekspresyonu

Rekombinant DNA teknikleri, kompleks selüloolitik mikrobiyal sistemlerin çalışılmasında ve ticari uygulamalar için verimli selülaz üreticilerinin geliştirilmesi sırasında karşılaşılan çeşitli problemlerin çözümü için önemli bir araç olmaktadır. Örneğin, *Clostridium thermocellum*'un selülozomu gibi kompleks bir yapıda yer alan selülaz geninin selüloolitik olmayan bir konağa klonlanması ve ekspresyonu, sistemin diğer tüm bileşenlerinden selülazın ayrılmasına ve katalitik özelliklerinin incelenmesine olanak tanımaktadır (Gilkes et al., 1991). Bununla birlikte, selüloolitik bir konakta eksprese edildiğinde uygun

bir etiket ile birleştirilmiş protein ifadesi sayesinde özelliklerin ayrılmasına olanak vermektedir.

Selülaz genleri, farklı mikrobiyal kaynaklardan çeşitli uygun konaklara klonlanmıştır. Selülaz kodlayan genler bakteri ve mantarlarda kromozomaldır. Funguslarda selülaz genleri genomda rastgele dağılmıştır ve her gen kendi transkripsiyon regülasyon elementlerine sahiptir. Bununla birlikte, *Phanerochaete chrysosporium* ve *Trichoderma reesei*' de genler bir arada lokalize olmuşlardır. *P. chrysosporium*' da üç sellobiyohidrolaz gen kümesi, kozmit klon kütüphanesi sekans analizleri ve restriksiyon haritalama ile keşfedilmiştir (Covert et al., 1992).

Sonraki çalışmalar, *T. reesei*' de de selüloz ve hemiselüloz degradasyonu ile ilişkili çok sayıda genin genomda rastgele dağılmadığı fakat bazı bölgelerde kümelenmiş olduğu belirlenmiştir. Genlerin bir arada bulunması, koordineli bir gen regülasyonu anlamına gelmektedir ve diğer fungal türlere göre daha az bir selülitik enzim miktarına sahip olsalar dahi *Trichoderma*' nın selülitik substratların degradasyonunda daha başarılı olduğu sonucuna işaret etmektedir (Ouyang et al., 2006). Bakterilerde, selülaz genleri genomda kümelenmiş ya da kromozom üzerinde dağılmıştır. *Clostridium* genusuna ait türlerde, selülozomal kompleksleri oluşturan proteinleri kodlayan genler sıklıkla küme halinde bulunmaktadır. *C.thermocellum*' da bir çok selülaz ve ksilanazlar rastgele dağılmış olsa dahi bazı kümeleşmeler bulunmuştur (Miettinen-Oinonen, 2004). *C.cellulolyticum*' un selülozomal gen kümesi, 14 ve 12 kb' lık iki büyük polisistronik mRNA' yı transkripleyen 12 genden oluşmaktadır (Abdou et al., 2008). Bu düzenlemeye benzer şekilde *C. cellulovorans*'un selülozomal gen kümesi, 8 ve 12 kb' lık polisistronik mRNA' yı transkripleyen, cbpA selülozomal kümesini oluşturan 9 geni içermektedir (Han et al., 2003).

2.5 Selülazların farklı mikrobiyal konaklara heterolog klonlanması ve ekspresyonu

Farklı mikrobiyal genustan elde edilen selülaz genleri ilk olarak *E.coli*'de klonlanmıştır (Beguin et al., 1987). *E.coli*'de selülazların ekspresyonu, rekombinant enzimlerin intraselüler birikimi ve glikosilasyon gibi post-transkripsiyonel modifikasyonların yokluğu nedeniyle genellikle düşük seviyede

gözenmiştir. Birçok selüloz, *E.coli* ekspresyon sistemi tarafından iyi bir şekilde tanımlanmayan bir sinyal peptid taşımaktadır. Bu durum rekombinant proteinlerinin üretim seviyesini azaltmakta hatta ekspresyonlarına negatif etki etmektedir.

Rhodothermus marinus' un, yüksek hidrofobik sinyal peptid sekansı içeren termostabil Cel12A selüloz, *E.coli*'ye klonlandığında düşük seviyede üretilmiş ve hücre lizisine yol açmıştır. Başarılı bir ekspresyona, hidrofobik sinyal peptid bölgesi içermeyen selüloz geninin bir delesyon mutanı ile ulaşılmıştır (Wicher et al., 2001). Benzer bir yaklaşım serin ve terionince zengin sekansları aracılığıyla katalitik domaine bağlı bir N terminal sinyal peptid taşıyan *Sulfolobus solfataricus*'da bulunan yüksek asit stabil ve termostabil β -endoglukanazı kodlayan *sso 1949* geni için kullanılmıştır. Enzimin ekspresyonu, yalnızca 24 aminoasitlik sinyal peptid çıkarıldığında elde edilmiştir. Bununla birlikte serin ve treonince zengin bölgenin olmadığı N-terminal delesyon mutanın kullanımını içeren bu yaklaşım over-ekspresyonu arttırmak için kullanıldığında başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Huang et al., 2005).

Daha önce bahsedildiği gibi rekombinant selülozlar sıklıkla sitoplazmada birikmektedirler. Bu durum inklüzyon cisimcikleri olarak bilinen insolübl agregatların oluşumuna, hatalı protein katlanmalarına yol açmaktadır (Villaverde ve Carrio, 2003). *C.cellulovorans*' ın PT-bağlayıcısı ve *Clostridium*' un farklı proteinlerinin CBD'leri ile ilgili yapılan çalışmalarda, N ve C-terminal uçları ile birleştirilen çeşitli rekombinant selülozomal proteinlerin çözünürlüğünü arttırmak için çalışılmıştır. En iyi sonuçlar rekombinant kohesin domaini Coh6'nın, C-ucuna birleştirilen EngD PT-bağlayıcısı ile elde edilmiştir (Xu and Foong, 2008).

Bacillus subtilis Cell15 straininden, yeni bir termostabil 1,4- β -endoglukanaz *E.coli BL21(DE3)*' de eksprese edilmiştir. Bunun sonucunda yabani tip straininden üç kat daha fazla üretim gerçekleşmiştir ve tümü ekstraselüler ortamda bulunmuştur (Yang et al., 2010). Bu nedenle, *Bacillus subtilis Cell15*'a ait ekstraselüler sinyal peptitin heterolog konaklarda fonksiyonel olabileceği düşünülmektedir.

E.coli, bakteriyal genlerin ekspresyonu ve izolasyonu için genellikle kullanılan bir konaktır. Alternatif konakların seçimi için, ekstraselüler ortama proteinlerin salgılanma yeteneği, daha verimli ekspresyona izin veren yakın evrimsel ilişkiler ve glikosilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonların varlığı önem kazanmaktadır (Beguin, 1990).

Yüksek oranda selüloz üretimi ve salgılanması için birkaç *Bacillus* genusu konak hücre olarak kullanılmıştır (Zhang et al. 2010). *Clostridium phytofermentans*'a ait selülozomal olmayan, aile 48 selülazının ekspresyonu *E.coli* ve *B.subtilis*' de çalışılmıştır. *Clostridium phytofermentans*' a ait Cel 48, *B.subtilis*'de aktif olarak salgılanmış ve *E.coli*'de C-ucunda bir histidin etiketi birleştirilmeksizin çözünür aktif bir formda intraselüler olarak eksprese edilmiştir. Bu durum, nötral proteaz B (NprB) sinyal peptid kodlayan sekansla, pP43NMK *E.coli*-*B.subtilis* mekik ekspresyon vektörüne CpCel 48 geninin klonlanmasıyla elde edilen *B.subtilis*' de salgı ailesi 48 glikosid hidrolazın ekspresyonu içeren ilk durumdur. Bahsedilen iki başarılı çalışmada, salgı üretim verimi için sinyal peptid sekanslarının öneminin altı çizilmiştir (Avitia et al., 2000).

Bacillus subtilis, birçok klonlama uygulaması için yeterli olabildiği halde, *B. megaterium* ve *B. stearothermophilus*' in plasmid stabilitesini arttırması (Chen et al., 2008) ve daha yüksek sıcaklıkta gelişebilmeleri (Soutschek-Bauer and Staudenbauer, 1987) gibi avantajları nedeniyle ilgi uyandırıcı alternatif sistemler olarak kabul edilmektedirler.

Posttranslasyonel modifikasyonlar, prokaryotik biyosentetik sistemler aracılığıyla elde edilemediğinden bazı selüloz genleri ökaryotik konaklarda eksprese edilmektedir. Posttranslasyonel olgunlaşmanın doğru seviyesinde rekombinant selüloz genlerinin ekspresyonu için çok sayıda yararlı özelliklere sahip bazı maya türleri arasında *Saccharomyces cerevisiae* en ilgi çeken maya türü olmaktadır. Fungal orjinli selülozların çoğu *S.cerevisiae*' da başarılı bir şekilde üretilmesine rağmen başarılı bakteriyel orjinli selüloz üretimine dair çalışma raporları da bulunmaktadır (Van Zyl et al., 2007; Van Rensburg et al., 1998; Parvez et al., 1994).

Selülozun, selülaz tarafından parçalanması prosesinde önemli rol oynayan β -1,4-glikosidik bağların kesilmesinden sorumlu olan endo-1,4- β -D-glukanaz pET-32a aracılığıyla *Trichoderma virens* ZY-01'de başarılı bir şekilde eksprese edilmiştir. Ekspresyon ürününün kinetik parametresi 13.71 mg/mL olarak ölçülmüştür. Rekombinant endoglukanazın CMC'i hidroliz kapasitesinin endüstrideki potansiyel uygulamalar için önemli avantajlar sağlayacağı düşünülmektedir (Zeng et al., 2016).

B. amyloliquefaciens' e ait endoglukanaz ve ekzoglukanazlar denizel *A.niger*' de eksprese edilmiştir. Güçlü glaA promotörü varlığında *A. niger*' de eksprese edilen endoglukanaz ve ekzoglukanazların aktivitelerinde ciddi bir artış gözlenmiştir. Filtre kağıdı aktivitesi yöntemiyle, eksprese selülazların aktivitesindeki artışın 7.1 kat olduğu ve konakçısı gibi selülazlarının tuza tolerant olduğu belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen strain, selüloz substratlarını tuz içermeyen ya da yüksek tuzlu ortamlarda verimli bir şekilde hidrolizelebilmektedir (Xue et al., 2017).

Mayalarda selülaz ve hemiselülazların ekspresyonuna ilişkin birçok raporda, heterolog genlerin ekspresyonunu gerçekleştirmek için güçlü promotörler tanımlanmıştır. Promotör seçiminin, ekspresyon seviyesine büyük bir etkisi olmakla birlikte lider sekanslar da rekombinant protein verimine güçlü bir şekilde etki etmektedir. *S. cerevisiae*'e klonlanan *Trichoderma viride* CICC3038' e ait endoglukanaz Egl1'in ekspresyonu, MF α (mating factor α prepro-leader sequence) sinyal peptidleriyle kendi sinyal sekanslarının değiştirilmesiyle başarılmıştır (Zhu et al., 2010). Spesifik endoglukanaz aktivitesinin %61.5 artışı, tek karbon kaynağı olarak CMC' nin varlığında elde edilmiştir.

Bazı sakkarolitik enzimlerin (Qin et al., 2008; Hong et al., 2003) üretimi dışında, birçok girişim selülozik biyoması etanole doğrudan fermente etmek için *S.cerevisiae* ile gerçekleştirilmiştir. Biyoetanol üretimi için uygun bir teknolojinin bulunmaması, selülozun fermente edilebilir şekerlere hidrolizi için büyük miktarda selülazların eldesini gerektirmektedir. Bu durum ise üretim için yüksek maliyete neden olmaktadır. Bu problemin üstesinden gelmek için selülaz üretimini, selülaz hidrolizini ve şeker fermentasyonunu tekli birleştirilmiş biyoproses (CBP) ile gerçekleştirebilen bütün bir hücre biyokatalizinin geliştirilmesi gerekmektedir.

(Wen et al., 2010; Lynd et al., 2002). CBP gibi bir teknolojinin gerçekleştirilebilmesi için, fonksiyonel bir selüloz sisteminin heterolog ekspresyonun sağlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Etanolojenik mikroorganizmaların mühendisliği, bu sistemin oluşturulabilmesi açısından en umut verici sistem olmaktadır. *S.cerevisiae*, yüksek etanol verimi ve toleransı, endüstriyel fermentasyonlara dayanıklılığı, güvenli oluşu ve genetik mühendisliği araçlarının çokluğu açısından en önemli adaylardan birisidir (Van Zyl et al., 2007). Bazı araştırma grupları karbonhidrat aktif enzimlerin farklı tiplerini *S.cerevisiae*' de eksprese etmişlerdir (Den Haan et al., 2007). Buna rağmen, selülozün zorlu yapısı ile baş etmenin ve en yüksek etanol verimi elde etmenin en iyi yolu farklı enzimlerin sinerjistik olarak çalıştığı bir selülozomdaki hidrolitik enzimlerin ekspresyonudur (Mingardon et al., 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalar selülozomal doğasını kullanarak yapay selülozomlar oluşturmak için rekombinant kimerik bileşenlerinin bir kombinasyonunu oluşturmayı amaçlamaktadır. Opsiyonel bir CBM ve farklı türlerden kohesin içeren kimerik scaffoldinler, uygun bir dokerin domani ile füzyon proteini olarak eksprese edilmiş farklı orjinlerden hibrit selülozlarla inkübe edilmiştir. Bu yolla spesifik pozisyonlarda uygun hidrolitik enzimlerle birleştirilmiş farklı subsuratların biyoprosesi için en iyi performans gösteren selülozomal düzenlemeler elde etmek olasıdır. Kimerik bir scaffoldine entegre edilmiş üç farklı enzimle dizayn edilmiş yeni nesil selülozomların serbest enzimlere göre çok da aktif olduğu gözlenmiştir.

Termotolerant *Aspergillus fumigatus* DBINU-1'den 1383bç içeren endoglukanaz Cel7, *Kluyveromyces lactis*' e klonlanmış, eksprese edilip karakterize edilmiştir. Rekombinant endoglukanaz saflaştırılmış ve maksimum aktivitenin pH 5' de ve 60° C' de olduğu gözlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesi ve spesifik aktivitenin sırasıyla 1,57 U/ml ve 15,39 U/mg protein olduğu belirtilmiştir. Elde edilen bu değerlerin, normal aktivitelere oranla yaklaşık 2 ve 5 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Rungrattanakasin et al., 2017).

Thermobifida alba, *Thermobifida halotolerans*, *Thermobifida cellulositytica*, *Thermobifida fusca* gibi mikroorganizmalar selüloz ve lignoselülozün parçalanmasını sağlayan çoklu hücre-dışı selüler enzimleri ve bazı selülozları salgılayan aktinomisetlerdir. Yapılan çalışmada, komposttan izole edilen *Thermobifida alba* AHK119' un güçlü bir selüloz aktivitesine sahip olduğu

gözenmiştir. Bu nedenle genomu çalışılmış *Thermobifida fusca*'nın sekansları referans alınarak, *Thermobifida alba* AHK119'ın endoglukonazlarını kodlayan AHK119-bMs (1365bç) ve AHK119-E5 (1425bç) bölgeleri PCR aracılığıyla aktarılmıştır. Belirtilen endoglukanazları, klonlamak ve eksprese etmek için *Escherichia coli* DH5 α (Toyobo, Osaka, Japan) ve *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Takara, Shiga, Japan) kullanılarak 50 μ g/ml ampisillin içeren Luria-Bertani (LB) broth ya da agarda geliştirilmiştir. AHK119-E5'ın en yüksek subsurat aktivitesi kristalin selüloz tozunda 16,8 Units/mg spesifik aktivite olarak ölçülmüştür. AHK119-bMs'ın en yüksek subsurat spesifitesini CMC' de, 11,9 Units/mg spesifik aktivite olarak ölçülmüştür (Ohta et al., 2018).

Thermoanaerobacter brockii'den β -glukosidaz enzimini üreten cglT geni *Escherichia coli*'de ifade edilmiştir. Elde edilen rekombinant β -glukosidaz aktivitesinin 0,5 U/ml olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, *Bacillus subtilis*'e cglT geni ve farklı sinyal peptit dizileri içeren plazmidlere aktarıldı. Çalışmalar sonucunda, tüm kütüphaneler içinde lytF sinyal sekansını taşıyan *Bacillus subtilis* transformantlarına ait kültürlerin β -glukosidaz aktivitesinin 0,042 U/ml olarak ölçülmüştür. Bununla birlikte, cglT geni ve lytF sinyal sekansı *Brevibacillus choshinensis*'e aktarılmış ve β -glukosidaz aktivitesinin 0,74 U/ml olduğu belirtilmiştir. Bu elde edilen değer *B.subtilis* transformantlarından 6.2 kat fazla olduğu görülmüştür (Ichikawa et al., 2019)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Örneklerin eldesi

Örnekler, 2012-2013 yıllarında Ege Bölgesi'ndeki (Eski Foça, İzmir) termofilik bakteriler için habitat olabilecek bir mantar çiftliği kompostundan alınmıştır. Komposttan alınan örnekler, steril koşullarda laboratuvara getirilip analize alınmıştır. Her analiz için paralel ekimler yapılmıştır.

3.1.2 Besiyerleri, çözeltiler, solüsyonlar ve reaktifler

Modifiye *Thermoactinomyces* Ortamı (DSMZ Medium 978)

(TA Ortamı)

L-Asparajin	1,0 gr
Gliserol	2,0 gr
K ₂ HPO ₄	1,0 gr
Pepton	30,0 gr
İz element solüsyonu	1,0 mL
Agar	22 gr
Distile su	1000 mL

İz Element Solüsyonu

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 gr
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 gr
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 gr
Distile su	100 mL

Yukarıda belirtilen ortam içeriği (Atlas, R.M., 2010) pH 7,2' ye ayarlanmıştır. 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavlanıp sterilize edilmiştir. Otoklav sonrası soğutulup aseptik koşullar altında petri kaplarına dökülmüştür.

CMC (Karboksimetil-selüloz) eklenmiş modifiye TA ortamı

Bu besiyeri, modifiye *Thermoactinomyces* besiyerinin içerisine %1 Karboksimetil-selüloz (CMC) ilave edilerek hazırlanmıştır. İzolatların selülaz aktivitelerinin taranması işlemlerinde bu modifiye ortam kullanılmıştır.

5X TBE Tamponu (1L)

Tris	54,0 g
Borik Asit	27,5 g
EDTA (Sigma, E5134)	2,95 g

Tartılan kimyasallar distile suda çözülür, pH 8,0'e ayarlanır ve 1L'ye tamamlanır. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında depolanır. Bu tampon, agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez küveti içerisinde kullanılmıştır.

% 0,8'lik agaroz çözeltisi

Agaroz (Sigma A5093)	0,8 gr
1x TBE tamponu	100 mL

Temiz bir erlende karışım, mikrodalga kullanılarak homojen ve berrak oluncaya kadar eritilir. Genomik DNA'nın elektroforezde yürütülmesi için hazırlanmıştır.

% 1,2'lik agaroz çözeltisi

Agaroz	1,2 gr
1x TBE tamponu	100 mL

Temiz bir erlende karışım, mikrodalga kullanılarak homojen ve berrak oluncaya kadar eritilir. PZR ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi için hazırlanmıştır.

Gel Red (Biotium)

Genomik DNA'nın ve PZR ürünlerinin, elektroforez sonucu görüntülenebilmesi için 50-55°C' ye soğutulmuş 100ml agaroz jel ortamına 3 µL (gel red) eklenerek hazırlanmıştır.

Gram'ın Kristal Viyolet boyası

2,0 gr kristal viyolet, 20 ml etanolde çözünmüştür. Bu çözeltiye, 80ml distile suda çözdüğümüz 0,8 gr amonyum oksalat içeren ikinci çözelti eklenmiştir. Elde edilen boya gram boyamalarda kullanılmıştır (Tamer et al., 1989).

Gram iyodür çözeltisi

1,0 gr iyot ve 2,0 gr potasyum iyodür tartılmış ve karıştırılmıştır. Karışım, iyi bir şekilde ezilmiştir. Karıştırma işlemi devam ederken üzerine 300 mL distile su ilave edilmiştir. Çözelti, gram boyamalarda kullanılmıştır (Tamer et al., 1989).

Gram'ın safranin boyası

10 mL etanol içerisinde 0,25 gr safranin iyice çözünmüştür. Çözelti, 1L' ye tamamlanmış ve filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde edilen boya, gram boyama uygulamalarında kullanılmıştır (Tamer et al., 1989).

1 M HCl çözeltisi

%37'lik HCl'den 8,4 mL kullanılmıştır. Son hacim, distile suyla 100 mL' e tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, pH ayarlanmasında kullanılmıştır (Tamer et al., 1989).

1 N NaOH çözeltisi

4 gr NaOH balonjojeye tartılmıştır. 100 mL' ye distile suda çözerek tamamlanmıştır. Çözelti, pH ayarlamasında kullanılmıştır (Tamer et al., 1989).

Kongo Kırmızısı (%0,1)

Katı besiyerinde selülaz ve ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla %0,1'lik kongo kırmızısı tartılmıştır. Tartım, 100 mL distile suda çözülmüştür (Voget et al., 2006).

DNS reaktifi (100mL)

1g DNS, 20 ml 2M NaOH (1,6g) çözeltisinde çözüldü. Ardından 30g K-Na-Tartarat 50mL kaynayan distile suya eklendi. Bu iki çözelti karıştırılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlandı (Miller, 1951).

Bradford reaktifi

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, % 95'lik saflıktaki 50 ml etanolde çözülmüştür. Üzerine % 85'lik 100ml fosforik asit eklenerek distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır. Oluşabilecek tortuları önlemek için Whatman No1 filtre kağıdıyla süzölmüş ve koyu renkli bir şişede saklanmıştır (Bradford, 1976).

Lizis tamponu

10mM Tris-HCl (pH 8,0) içerisinde, 1mM EDTA (etilen diamin tetra asetik asit), 0,1mM PMSF (fenilmetansülfonidflorid) çözeltisi ve % 0,1 Tween 80 ilave edilmiştir (Ko et. al., 2005).

Na₂CO₃ çözeltisi (2M)

Enzim aktivitesi ölçümleri sırasında β-glukosidaz aktivitesini durdurmak amacıyla kullanılmaktadır. 100 ml distile su içersine 21,19 g Na₂CO₃ eklenerek hazırlanmış ve buzdolabında +4°C'de saklanmıştır (Ko et. al., 2005).

Sitrat tamponu (50mM pH 5,0)

1,05g sitrik asit monohidrat 100 ml distile suya eklendi. Ardından 1,07 sodyum sitrat 100ml suya eklenip iki çözelti oluşturuldu. Oluşturulan ilk çözeltiden 20,5 ml, ikinci çözeltiden 29,5 ml alınıp karıştırıldı ve 100 ml'ye tamamlandı (Güler, 2004).

Sitrat tamponu (50mM pH 6,0)

1.05g sitrik asit monohidrat 100 ml distile suya eklendi. Ardından 1.07 sodyum sitrat 100ml suya eklenip iki çözelti oluşturuldu. Oluşturulan ilk çözeltiden 9.5 ml, ikinci çözeltiden 41.5 ml alınıp karıştırıldı ve 100 ml'ye tamamlandı (Güler, 2004).

Fosfat tamponu (50mM pH 7,0)

0,68g KH_2PO_4 100ml distile suya eklendi. Ardından 0,87g K_2HPO_4 100ml distile suya eklendi. İlk çözeltiden 39 ml, ikinci çözeltiden 61ml alınarak 200 mL'ye tamamlandı (Güler, 2004).

Fosfat tamponu (50mM pH 8,0)

0,68g KH_2PO_4 100ml distile suya eklendi. Ardından 0,87g K_2HPO_4 100ml distile suya eklendi. İlk çözeltiden 5,3 ml, ikinci çözeltiden 94,7 ml alınarak 200 ml'ye tamamlandı (Güler, 2004).

Tris-HCl tamponu (100mM pH 8,0)

0,12g Trizma Base 100ml içinde çözülerek Trizma Base çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 50ml alınarak 26,8ml HCl ile karıştırılarak elde edilene çözelti 200ml'ye tamamlandı (Güler, 2004).

Glisin-NaOH tamponu (50mM pH 9,0)

0,375g glisin 100ml distile suya eklenerek 50mM'lık glisin çözeltisi hazırlandı. 0,2g NaOH 100ml suya eklenerek NaOH çözeltisi hazırlandı. İlk çözeltiden 50ml, ikinci çözeltiden 8,8ml alınarak son hacim 200ml'ye tamamlandı (Güler, 2004).

NaOH çözeltisi (1M)

Katı besiyerinde selülaz aktivitesinin belirlenebilmesi için 50 ml distile su içinde 3,025g NaOH çözülerek hazırlanmıştır.

Substrat çözeltisi 1

50Mm'lık 100ml pH 7,2 fosfat tamponu %0,1 CMC substratı ile hazırlandı.

Substrat Çözeltisi 2

50Mm'lık 100ml pH 7,2 fosfat tamponu %0,1 xylan substratı ile hazırlandı.

Substrat Çözeltisi 3

100mM'lık 1ml pH 7,0 fosfat tamponuna 0,0301g p-nitrofenil- β -D-glukopiranosid substratı ile hazırlanmıştır.

1X PBS (tamponlanmış-fosfatlı tuz) (1 litre)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.4 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Tartılan içerikler, distile su ile 1L' e tamamlanmıştır (Sambrook et al., 1989)

% 40' lık Glukoz Stok Solüsyonu

400 g glukoz veya galaktoz 500 ml deiyonize suya eklenir. Karıştırarak çözünmesi sağlanır. Son hacim 1 litreye tamamlanır. Solüsyon, 121°C' de 20 dakika otoklavlanır. Hazırladığımız stok solüsyonu, *K. lactis* kit prosedüründe kullanılmıştır.

5 mM asetamid içeren YCB ortamı (500 ml)

Otoklav şişesinde:

1 M Tris-HCl stok tamponu	15 ml
YCB Ortamı	5.85 g

Bacto agar 10 g

Deiyonize su 480 ml

Bu karışım, 121°C' de 20 dakika otoklavlanır. 60°C' e kadar soğuması için oda sıcaklığında bırakılır. Otoklavlanmış karışıma, 100X asetamid stok solüsyonundan 5 ml eklenir. Asetamid otoklav sonrası eklenmeli ve yüksek sıcaklığa maruz kalmamalıdır.

Ortam, petrilere dağıtılır. Petriler, katılaşıncaya kadar oda sıcaklığında bırakılır. Ardından ters çevrilerek kuruması için 12-18 saat bekletilir.

Yeast carbon base (YCB) ortamı, nitrojen kaynağı dışında *K. Lactis GG799* kompetent hücrelerin büyümesi için gerekli tüm nütrientleri ve glikozu içermektedir. Hücreler, asetamidazın (pKLAC2' de bulunan amdS geninin ürünüdür) asetamidi amonyağa yıkmasıyla nitrojen ihtiyacını karşılayabilmektedirler.

YPGlu ya da YPGal Ortamı (1L)

Yeast ekstrakt 10 g

Bacto Pepton 20 g

Deiyonize su 1L'ye tamamlanır.

Karışım, 121°C' de 20 dakika otoklavlanır ve oda sıcaklığına kadar soğutulur. Aseptik koşullar altında, steril % 40' lık glukoz stok solüsyonundan 50 ml eklenir.

Katı YPG'lu veya YPGal ortamı otoklavlamadan önce 20g Bacto agar eklenerek elde edilebilir. (*K. lactis* klonlama kit prosedüründe kullanılması için hazırlanmıştır).

3.1.3 Kullanılan ticari kitler

ZR Fungal/Bacterial DNA isolation (Zymo Research)

(Fungal/Bakteriyel DNA izolasyon kiti)

Kit içerisinde bulunan reaktifler aşağıda belirtilmiştir:

Fungal-Bakteriyel DNA bağlama tamponu

DNA ön yıkama tamponu

Fungal-Bakteriyel DNA yıkama tamponu

DNA Elution (Ayrıştırma) Tamponu

ZR Bashing Bead (Mekanik parçalayıcı boncuk) liziz tüpleri

Zymo-Spin IV Spin Filtreleri

Zymo-Spin IIC Kolonları

Toplama tüpleri'nden oluşmaktadır.

Kit içerikleri, oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

FastStart taq DNA polymerase, dNTPack (Roche)

Bu kitin içeriği;

1 - FastStart Taq DNA polimeraz (5U/ μ l)

2 - PZR reaksiyon tamponu, 10x, (20 mM MgCl₂'lü)

3 - GC-RICH solüsyonu, 5x (GC-Zengin solüsyonu)

4 - dNTP Mix (dNTP karışımı)'ndan oluşmaktadır.

Kit içerikleri -20°C'de muhafaza edilmiştir.

***Klyuveromyces lactis* protein expression kit (NEB #E1000S)**

- 1) pKLAC2 vektörü, 20µg
- 2) SacII restriksiyon enzimi, 2000 unit
- 3) NE Tamponu 4,10x
- 4) *K.lactis* GG799 komponent hücreler, 5 reaksiyon
- 5) NEB maya transformasyon reaktifi, 5mL
- 6) Maya karbon temelli ortam tozu, 12g
- 7) Asetamid solüsyonu (100x), 10Ml

Restriksiyon enzimleri

NotI (R0189S, NEB)

BamHI (R0136S, NEB)

Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (#K0691)

- 1) Bağlayıcı tampon, 30mL
- 2) Konsantre yıkama tamponu, 9 mL
- 3) Elüsyon tampon (10mM Tris-HCl, pH 8,5), 15 mL
- 4) GeneJET saflaştırma kolonları

GeneJET ekstraksiyon kiti oda sıcaklığında saklanmıştır.

Not: Kit bileşenleri içerisinde presipitasyon görülürse kısa süreliğine 37°C' e kadar ısıtılıp kullanmadan önce oda sıcaklığına kadar soğutulmalıdır.

Thermo Scientific PCR Purification kit (K0701, USA)

- 1) Bağlayıcı tampon, 12 mL
- 2) Konsantre yıkama tamponu, 9 mL

3) Elüsyon tampon (10mM Tris-HCl, pH 8,5), 15 mL

4) GeneJET saflaştırma kolonları 50 adet

GeneJET ekstraksiyon kiti oda sıcaklığında saklanmıştır.

Not: Kit bileşenleri içerisinde presipitasyon görülürse kısa süreliğine 37°C' e kadar ısıtılıp kullanmadan önce oda sıcaklığına kadar soğutulmalıdır.

Quick Ligation Kit (M2200, NEB)

Quick Ligase Reaksiyon Tamponu

Quik Ligaz

Nükleaz içermeyen H₂O

3.1.4 Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

- Santrifüj (Hettich Rotina 35 R soğutmalı santrifüj, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Sigma Mikrosantrifüj 15.000g, Almanya)
- Spektrofotometre (Varian Cary 300 Bio, Avustralya)
- Orbital çalkalayıcı inkübatör (G24 New Brunswick, ABD)
- Elektroforez güç kaynağı (Consort EV265, Belçika)
- PZR cihazı (ABI GeneAmp PZR system 9700, ABD)
- UV translüminatör (254 nm)
- Liyofilizasyon cihazı (Edwards Modulyo)
- Mikroskop (Olympus, Prior 3000)
- Otoklav (Hirayama, HICLAVE)
- 352 nm UV Lamba (Blacklight blue 20W, Sankyo Denky)
- Sıcak su banyoları (Mommert; Kotterman)
- Slice 200 Ultrafiltrasyon cihazı (Sartorius stedim)

- Sartocon Slice cassettes 10 kDa (308144 - Hydrosart)
- Watson-Marlow 323 model peristaltik pompa
- Vorteks (VWR)
- Hassas tartı (Denver instrument)
- Membran filtreler (Sartorius, Cellulose nitrat filter 11407 CAN 0,2 μm ve Cellulose nitrat filter 11406 CAN 0,45 μm por \mathcal{C} apına sahip)
- Mikrodalga fırın (Vestel)
- Manyetik karıştırıcı (Chiltern)
- Derin dondurucu (Bosch)
- Analitik terazi (Precisa XB 220 A)

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakterilerin izolasyonu

Selüloolitik bakteriyel strainler izole etmek için, kompost örneklerinden 10 gram alınarak, 90ml % 1.0 CMC bulunan modifiye *Thermoactinomyces* zenginleştirme ortamlarına eklenmiş 24-48 saat, 55°C'de 180 rpm' de inkübe edilmiştir. Zenginleştirme işlemi, iki defa tekrar edilmiştir. Ardından, % 1.0 CMC içeren modifiye *Thermoactinomyces* agarlarına, zenginleştirme ortamlarından çizgi ekimler gerçekleştirilmiştir. Gelişen termofilik bakteri izolatları, Kongo red ve gram iyodür tarama metodları ile boyanıp incelenmişlerdir.

3.2.2 Selülaz üreticisi bakteri izolatının tanınması

3.2.2.1 Kültürel özellikler

İzolat, modifiye *Thermoactinomyces* ortamına ekilerek 55°C'de 3 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra gelişen koloniler morfoloji, renk ve pigmentasyon açısından incelenmiştir.

3.2.2.2 Mikroskopik özellikler

İnkübasyon sonucu, kültürün gram boyama reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bakteri morfolojileri ve boyutları 1000'lik büyütmede mikroskop altında incelenmiştir.

3.2.2.3 Moleküler tanılama

Genomik DNA izolasyonu

ZR Fungal/Bakteriyel DNA Kiti (ZymoResearch) kullanılarak aşağıdaki talimatlara göre gerçekleştirilmiştir:

1. Modifiye termoaktinomiset ortamında 3 gün boyunca geliştirilen kültürlerden 1ml örnek, steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. 11180 g 'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Üst kısım mikropipet aracılığıyla dikkatlice

uzaklaştırılmıştır. Tüpte kalan pellet kısmına 1 mL bidistile su eklenerek karıştırılmıştır. Tekrar santrifüj edilmiş (11180 x g'de, 10 dak) çöken hücreler üzerine 200 µL bidistile su ilave edilerek karıştırılarak homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücrelerin tamamı mekanik parçalanma için BashingBead lizis tüpüne aktarılmıştır.

2. BashingBead lizis tüpüne aktarılan hücreler vorteks ile 5 dakika boyunca dikkatlice karıştırılmıştır.

3. Karışım, istenmeyen moleküllerin dibe çöktürülmesi ile DNA' dan ayrılması amacıyla 10.000 x g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

4. Santrifüj sonrası elde edilen üst fazdan 400 µL, bir toplama tüpüne oturtulan Zymo-Spin IV spin filtrenin orta kısmına gelecek şekilde aktarılmış ve 7.000 x g'de 1 dk santrifüjlenmiştir.

5. Toplama tüpünde biriken filtrat üzerine 1200 µL Fungal/bakteriyel bağlama tamponu ilave edilmiştir.

6. Elde edilen karışımdan 800 µL alınmıştır. Bu karışım, yeni bir toplama tübüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000 x g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

7. Kalan 400 µL bağlama tampon karışımı, aynı Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000 x g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

8. 200 µl DNA yıkama-öncesi tampon, yeni bir toplama tüpüne oturtulmuş Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve 10.000 x g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

9. 500 µL Fungal/bakteriyel DNA yıkama tamponu Zymo-Spin IIC kolonuna aktarılmış ve yine 10.000 x g'de 1dk santrifüjlenmiştir.

10. Zymo-Spin IIC kolonu, 1,5 mL'lik steril bir ependorf tüpüne yerleştirilmiş ve 100 µL DNA elüsyon tamponu kolonun orta kısmına ilave edilmiştir. Daha sonra

10.000 x g'de 30 sn santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası, ependorf içerisinde DNA elde edilmiştir.

İzolat DNA'ların saflık kontrolü

İzole edilen DNA ölçümleri, ThermoScientific Nanodrop 2000 ile gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel elektroforezde, ekstrakte edilen DNA'lar yürütülmüştür. Böylece DNA bütünlükleri kontrol edilmiştir. Agaroz jel elektroforezi, nükleik asitlerin yük ve büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan bir sistemdir. DNA'lar, agaroz jelde moleküler ağırlıklarına göre farklı hızlarda hareket etmektedirler. DNA büyüklüğüne bağlı olarak jellerde agaroz miktarı, % 0,7 ile % 3 arasındaki oranlarda hazırlanmaktadır (Sambrook, J., et al., 1989; Westermeier, 1997).

Çalışmamızda agaroz jel elektroforezinde, % 0,8 agaroz ve 5 µL Gel Red (Biotium) nükleik asit boyası kullanılmıştır (Rickwood and Hames, 1982; Ausubel et al., 1997). Jel için, 250 ml'lik saf sudan geçirilmiş kuru bir erlen içersine 0,8 g agaroz tartılmış ve 100ml 1X' lik TBE tamponu eklenmiştir. Karışım, tamamen eriyip berraklaşınca kadar mikrodalgada ısıtılmıştır. Homojen çözelti, mikrodalgadan alınarak oda sıcaklığında 45-50 °C'ye kadar soğutulmuştur. Bu sırada jel tepsisi iyice temizlenmiş, kurulmuş ve tepsinin açık uçları otoklav bandı ile boşluk kalmayacak şekilde kapatılmıştır. Agaroz jelin içersine 5 µL gel red eklenmiştir. Kabarcık/köpük oluşmayacak şekilde hafifçe karıştırılmıştır. Agaroz jel, otoklav bandı ile kapatılmış, tarakları uygun şekilde yerleştirilmiş küvete yavaşça hava kabarcığı olmayacak şekilde dökülmüştür. Jelin, donması beklenmiş ve ardından bantlar uzaklaştırılmıştır. Elektroforez tepsi içersinde bulunan jelin yüzeyini kaplayacak biçimde 1X' lik TBE tamponu ilave edilmiş ve kurumuş olan jelden taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. Taraklar tarafından oluşturulan kuyucuklara, steril bir yüzeyde pipetaj yapılarak hazırlanmış 5µl PZR ürünü ve 3 µL BromophenolBlue karışımı yüklenmiştir. Ardından, mikropipet yardımıyla marker DNA yükleme tamponuyla birlikte kuyucuklara yavaşça jel içersinde dağıtmadan yüklenmiştir. Yükleme ardından elektroforez başlatılmıştır. 80 V'da 60 dakika, elektroforezde yürütülmüştür. Elektroforezde, marker olarak O'GeneRuler 1 Kb plus DNA ladder (Fermentas

SM 1163) kullanılmıştır. Jelin üst kısmında gözlenen yüksek moleküler ağırlıklı tek bir bant, genomik DNA'ların bütünlüğünün bozulmadığını göstermektedir (Ausubel et al., 1997).

Genomik DNA'ların saflık ve miktarı, spektrofotometrik yöntemler ile ölçülmüştür. Spektrofotometrede, DNA molekülü en iyi 260nm'de absorblanmaktadır.

DNA ($\mu\text{g/mL}$) miktarı = $A_{260} \times \text{seyreltme faktörü} \times 50$ formülü baz alınarak hesaplanmıştır.

PZR için kullanılacak DNA'ların saflığı, A_{260}/A_{280} oranı ile belirlenmektedir. Bu oran bizim DNAlarımızda elde ettiğimiz gibi 1,8-2,1 civarında olmalıdır (Sarıkaya, 2004; Gonzalez et al.,2006).

16S rDNA polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR reaksiyonu, FastStart Taq DNA Polimeraz dNTPack kiti (Roche) ve 16S rDNA'ya uygun ve birçok bakteri için üniversal primerler olan Primer1: (8 – 27) F ve Primer2: (1492-1510) R (GenMolBiol) (Lane, 1991; Weisburg et al., 1991) ve kalıp DNA ilave edilmiştir. Forward (8-27 F); 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' ve Reverse (1492- 1510 R): 3'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -5' primerler kullanılmıştır. Mikrosantrifüj tüpüne, 31,6 μl bidistile su, 5 μl PZR reaksiyon tamponu, 10 μl GC-RICH solüsyonu, 1 μl nükleotid karışımı, 0,5 μl primer 27 F, 0,5 μl primer 1492 R, 0,4 μl FastStart Taq DNA polimeraz, 1 μl kalıp DNA toplam reaksiyon hacmi 50 μl olacak şekilde eklenmiştir.

PZR koşullarında, primerlerin G-C içeriğine göre bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir. PZR aşamaları şu şekildedir; ilk denatürasyon 5 dk 95°C' de 2 döngü, denatürasyon 1,15dk 95°C'de, primerlerin bağlanması 50sn 49°C ve elongasyon (uzama) 1,35dk 72°C olmak üzere 35 döngü, son uzama 7dk 72°C'de 1 döngü ve soğutma +4°C olarak ayarlanmıştır.

PZR ürünlerinin elektroforezi

PZR ürünlerinin, elektroforezi için % 1,2'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Soğuyan jele, 45-50 °C' de donmadan 5 µL gel red eklenmiştir. Jel üzerini kaplayacak şekilde 1xTBE tampon dökülmüştür. 80V'da 1,5 saat boyunca yürütülmüştür. 9 µL PZR ürünü ve 6 µL jel yükleme tamponu steril bir yüzeyde pipetaj yapılarak yavaşça kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işleminde örneklerle beraber Fermentas 1kb'lık DNA ladder marker olarak jelde yürütülmüştür. Ardından jel, UV translüminatör altında incelenmiştir. Elde edilen PZR ürünleri 16S rDNA, sekans analizi için kullanılmıştır.

PZR ürünlerinin 16S rDNA baz sırası ile tür tayininin yapılması

16S rDNA baz dizisi, RefGen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezi tarafından gerçekleştirilmiştir. RefGen'in göndermiş olduğu baz sırası, Mega 4,0 (Tamura et al., 2007) ve http://bioinfo.hku.hk/services/analyseq/cgi-bin/cap_in.pl web adresindeki yazılım kullanılarak GenBankası'ndaki diğer dizilerle karşılaştırmak için uygun düzene getirilmiştir. Bu diziler, Gen Bankası'nın veritabanındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) diğer dizilerle karşılaştırılmış ve tür tayini yapılmıştır. Filogenetik dendogram, Mega 4,0 programı kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.3 Katı besiyerinde selüloz aktivitesinin belirlenmesi

3.2.3.1 Kongo red yöntemi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, %1 CMC içeren modifiye TA agarlarına spotlama şeklinde ekilerek 55°C'de iki gün inkübe edilmiştir. Ardından, petriye %0,1'lik kongo kırmızısı çözeltisinden dökülmüş ve 15 dakika boyunca boya ile bekletilmiştir. Daha sonra boya dökülmüş, besiyerine 1M NaCl çözeltisi eklenmiştir. Bu aşama ile boyanın petriden geri alınması hedeflenmiştir. Petri, 1M NaCl çözeltisi 15 dakika boyunca bekletilmiştir. İşlemin ardından, koloni etrafında açık renkli hidroliz zonu gözlenen suşların selüloz pozitif olduğu belirtilmiştir (Jung et al., 1998).

3.2.3.2 Gram-İyodür methodu

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, %1 CMC içeren modifiye TA agarlarına spotlama şeklinde ekilerek 55°C'de iki gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından petri kabının yüzeyi gram iyodür ile kaplanıp beş dakika süre ile bekletilmiştir. Yıkama işlemi gerçekleştirilmeden zonlar gözlenmiştir (Kasana et al., 2008)

3.2.4 Farklı parametrelerin selülaz aktivitesine etkisi

3.2.4.1. Selülaz Aktivitesi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, %0,1 CMC içeren modifiye thermoactinomyces broth ortamında geliştirildi. Aktivite ölçümü, dinitrosalisilik asit metodu (DNS) (Miller et al., 1960), baz alınarak gerçekleştirilmiştir. Üreme sonucunda, her gün 1'er ml paralel örnekler alındı. Örnekler 10.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Substrat çözeltisinden 450µl (%1 CMC içeren 50Mm pH 7,2 fosfat tamponu) mikrosantrifüj tübüne alındı. Substrat çözeltisi üzerine 50µl enzim süpernatantı eklendi. Ardından 55°C'de olan su banyosunda test ve kör ependorfları 30dk boyunca inkübe edildi. Ardından tüm ependorflara, 750µl DNS reaktifi eklendi ve 15dk boyunca kaynar suda inkübe edildi. İnkübasyon sonucu ependorflar buzlu suda soğutuldu ve karışımdan 1'er ml küvetlere alınarak 540nm'de okutuldu (Van Wyk et al., 2010).

Glukoz standart grafiğinin hazırlanması

Konsantrasyonu 2mg/ml olacak şekilde 10ml stok glukoz çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti kullanılarak aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda glukoz çözeltileri ve kör deney tüplerinde hazırlandı.

Çizelge 3.1 Glukoz standart grafiğı içeriğı

Standart	Glukoz	Distile su	DNS
Std 1	,05 ml	,95 ml	3 ml
Std 2	,06 ml	,94 ml	3 ml
Std 3	,07 ml	,93 ml	3 ml
Std 4	,08 ml	,92 ml	3 ml
Std 5	,09 ml	,91 ml	3 ml
Std 6	,1 ml	,90 ml	3 ml
Std 7	,11 ml	,89 ml	3 ml
Std 8	,12 ml	,88 ml	3 ml
Std 9	,13 ml	,87 ml	3 ml
Std 10	,14 ml	,86 ml	3 ml
Std 11	,15 ml	,85 ml	3 ml
Kör	---	2 ml	3 ml

Kapakları kapatılmış deney tüpleri 100⁰C’de kaynamakta olan su banyosunda 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda, buzlu su bulunan ortama alınarak hızla soğutuldu. UV-Vis spektrofotometrede standart çözeltilerinin 540nm’deki absorbansı blank’e karşı okutuldu (Ghose, 1987).

Farklı glikoz konsantrasyonlarına karşılık okunan A₅₄₀ değerlerinden yola çıkılarak glikoz standart grafiği çizilmiştir.

Çizelge 3.2 Standartlarda bulunan glukoz miktarı

Standartlar	Glukoz Miktarı (mg/ml)	Absorbanslar (540 nm)
Std 1	0,020	0,2297
Std 2	0,024	0,2572
Std 3	0,028	0,2950
Std 4	0,032	0,3392
Std 5	0,036	0,3675
Std 6	0,040	0,4091
Std 7	0,044	0,4486
Std 8	0,048	0,4864
Std 9	0,052	0,5328
Std 10	0,056	0,5783
Std 11	0,060	0,6369

Bir birim selüloz aktivitesi (unit/ml) reaksiyon koşullarında 1 dakikada 1mg glukoz oluşturan enzim miktarı belirlenir. Bu değer aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hacimsel aktivite (Unit/ml)} = \frac{\Delta A \times V_T}{T_{ink} \times V_E \times E} \times SK$$

ΔA : Örnek ile kör arasındaki absorbans farkı

V_T : Reaksiyon hacmi (mL)

SK: Seyreltme katsayısı

T_{ink} : İnkübasyon süresi

V_E : Enzim hacmi (mL)

E : Absorpsiyon katsayısı

3.2.4.2 Farklı karbon kaynaklarının selüloz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye TA ortamındaki gliserol yerine maltoz, fruktoz, nişasta, gliserol, ksilan, karboksimetil selüloz, avicel ve glikoz ilave edilmiş ve 55°C' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Ortamdan her gün 1'er ml örnek alınarak selüloz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Niel van Wyk ve ark., 2010).

3.2.4.3 Farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının selüloz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye TA ortamında azot kaynağı olarak pepton, yeast ekstrakt, kazein, beef ekstrakt ve amonyum sülfat içeren sıvı ortamlarda 55°C' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her gün 1'er ml örnek alınarak selüloz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Niel van Wyk ve ark., 2010).

3.2.4.4 Farklı pH değerlerinin selüloz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu modifiye TA ortamında 55°C' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her gün 1'er ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler farklı pH'ların selüloz enzim aktivitesine etkisinin araştırılması amacıyla 50mM pH 5,0 sitrat tamponu; 6,0 sitrat tamponu; 7,0 fosfat tamponu; 8,0 fosfat tamponu; 9,0 Glisin-NaOH tamponları kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.4.5 Optimum parametrelerle selüloz aktivitesi

Denemesi yapılan farklı karbon, azot ve pHparametreleri doğrultusunda elde edilecek optimum değerlerin bir arada kullanılarak selüloz enzim aktivitesinin ölçümü yapılmıştır.

3.2.5 Farklı parametrelerin ksilanaz aktivitesine etkisi

3.2.5.1 Ksilanaz aktivitesi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, %0,1 brichwood substratı içeren modifiye *Thermoactinomyces* broth ortamında 55°C' ye ayarlanmış olan çalkalamalı inkübatörde geliştirildi. Üreme sonucunda her gün 1'er ml paralel örnekler alındı. Örnekler 10.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Substrat çözeltisi 2'den 450µl (% 1 birchwood+50Mm pH 7,2 fosfat tamponu) alındı. Test olarak hazırlanacak ependorflarda substrat çözeltisi 2 üzerine 50µl enzim süpernatantı eklendi. Ardından 55°C'de olan su banyosunda test ve kör ependorfları 30dk boyunca inkübe edildi. Ardından tüm ependorflara 750µl DNS reaktifi eklendi ve 15dk boyunca kaynar suda bekletildi (Miller, 1959). Ardından ependorflar buzlu suda soğutuldu ve karışımdan 1'er ml küvetlere alınarak 540nm'de okutuldu.

1 Unit/ml ksilanaz aktivitesi; 1ml ortamda, 1 dakikada 1mg ksiloz oluşturan enzim miktarının belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Bu değer yukarıda belirtilen formül (Başlık 3.2.4.1) yardımıyla hesaplanmıştır.

Ksiloz standart grafiğinin hazırlanışı

Ksiloz stok çözeltisi 1 mL'de 1,6 mg ksiloz içerecek şekilde 10 mL hazırlanmıştır. Yukarıda bahsedilen glukoz standardı, belirlenen glukoz miktarları baz alınarak (Bkz. Tablo 3.1), distile su ve DNS reaktifi miktarı kullanılarak deney tüplerinde on bir standart olacak şekilde hazırlanmıştır. Kapakları kapatılmış deney tüpleri 100° C'de kaynamakta olan su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda, erlenler buzlu su bulunan ortama alınarak hızla soğutulmuştur. UV-Vis spektrofotometrede, standart çözeltilerinin 540nm'deki absorbanları blank'e karşı okutulmuştur (Ghose, T., K., 1987).

3.2.5.2 Farklı karbon kaynaklarının ksilanaz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye TA ortamındaki gliserol yerine maltoz, fruktoz, nişasta, ksilan, karboksimetil selüloz, avicel ve glikoz içeren besiyerlerine ilave edilmiş ve ortamdan her gün 1'er ml örnek alınarak ksilanaz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Niel van Wyk ve ark.,2010).

3.2.5.3 Farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının ksilanaz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye TA ortamında azot kaynağı olarak pepton, yeast ekstrakt, kazein, beef ekstrakt ve amonyum sülfat içeren sıvı ortamlarda 55°C' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her gün 1'er ml örnek alınarak ksilanaz aktivitesi ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Niel van Wyk ve ark.,2010).

3.2.5.4 Farklı pH değerlerinin ksilanaz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye TA ortamında 55°C' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her gün 1'er ml örnek alınmıştır. Alınan örnekler farklı pH'ların ksilanaz enzim aktivitesine etkisinin araştırılması amacıyla 50mM pH 5,0 sitrat tamponu; 6,0 sitrat tamponu; 7,0 fosfat tamponu; 8,0 fosfat tamponu; 9,0 Glisin-NaOH tamponları kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.5.5 Optimum parametrelerle ksilanaz aktivitesi

Denemesi yapılan farklı karbon, azot ve pH parametreleri doğrultusunda elde edilecek optimum değerlerin bir arada kullanılması ile ksilanaz enzim aktivitesinin ölçümü yapılmıştır.

3.2.6 β -glukosidaz aktivitesi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, % 0,1 sellobiyoz, % 0,1 sellobiyoz ve gliserol içeren modifiye termoaktinomiset ortamında geliştirildi. Ortamdan her gün 1'er ml 2 paralel örnek alınmıştır. Örnekler 10.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendi. Süpernatanttan 10 μ l hücre ekstraktı ile 720 μ l 50mM'lık fosfat tamponu oda sıcaklığında karıştırılmış ve üzerine 20 μ l 100mM p-nitrofenil- β -D-glukopironasid eklenmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 250 μ l 2M Na₂CO₃ ilave edilmiştir ve 1'er ml alınarak 400nm'de absorbansları okunmuştur.

3.2.7 Protein miktarının belirlenmesi

Hücre dışı kültür sıvısındaki protein miktarının belirlenmesi için Bradford protein tespit yöntemi kullanılmıştır (Bradford, 1976).

Spektrofotometre küvetine, örnekten 0,1 mL alınmış ardından üzerine 1 mL Bradford reaktifinden ilave edilmiş ve küvet alt üst edilerek karıştırılmıştır. 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından spektrofotomede 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri, Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılarak hazırlanan standart eğriye göre değerlendirilerek protein miktarları belirlenmiştir.

3.2.8 *Thermobifida fusca* EFTS 7A' a ait selülaz geninin klonlanması

3.2.8.1 *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın genomik DNA izolasyonu

CMC içeren modifiye *Thermoactinomyces* ortamında üç gün, 55°C'de 180 rpm' de inkübe *Thermobifida fusca* EFTS 7A'a ZR Fungal/Bakteriyel DNA Kiti kullanılarak (Başlık., 3.2.2.3) izole edilmiştir.

3.2.8.2 *Thermobifida fusca* EFTS 7A' a ait selülaaz geni için primer tasarımı

Primer tasarımı, *Kluyveromyces lactis* protein ekspresyonu kitinde (NEB #E1000S) yer alan klonlama stratejilerine uygun bir şekilde tasarlanmıştır.

3.2.8.3 PZR ile tfu 0901 gen bölgesinin çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonunda DNA Polimeraz olarak Phire Hot Start II DNA polimerase (F122S) kullanılmıştır.

PZR reaksiyonu için gerekli karışımın içeriği, kullanılan DNA polimeraz protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Kit içerikleri -15°C ile -25°C arasında muhafaza edilmiştir.

PZR koşulları, çoğaltılacak gen bölgesinin G-C içeriği ve DNA polimeraz enzimlerinin kullanım koşulları gözetilerek belirlenmiştir. Uzama süresi, polimeraz protokolünde belirtildiği üzere 1kb'lık baz çifti için 15s olacak şekilde düzenlenmiştir. Primer annealing sıcaklıkları, aşağıda verilmiş olan link aracılığıyla belirlenmiştir.

<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html?CID=fl-we120377>

3.2.8.4 PCR ürünlerinin saflaştırılması

PZR reaksiyonundan sonra, klonlama aşamaları için saflaştırma işlemi uygulanmıştır. PZR ürünleri iki şekilde saflaştırılmıştır. PZR ürünlerinin, jelde yürütülmesi sonucu agaroz jelden Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (K0691) ve doğrudan GeneJET PCR Purification Kit (ThermoScientific K0701) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

1) Saflaştırma prosedürü şu şekildedir:

a) Steril mikrosantrifüj tüpüne, PZR ürününden alınan hacme eşit 1:1 oranında bağlanma tamponu ilave edilir.

b) PZR ürünü ve bağlayıcı tampon steril mikrosantrifüj tübünde karıştırılır. Karıştırma sırasında, solüsyonun rengi kontrol edilir.

Not: Solüsyonun renginin turuncudan mora kadar olan bir aralıkta olduğu gözleniyorsa, pH'ı 5.2 olan 3M sodium asetat tamponundan 10 µl karışıma eklenebilir.

c) Karışım, mikropipet yardımıyla saflaştırma kolonuna aktarılır.

d) GeneJET saflaştırma kolonu, 1 dakika santrifüjlenir (12000 rpm) ve geçen sıvı atılır. Kolon aynı koleksiyon tüpüne yerleştirilir.

e) Kolona 700 µl yıkama tamponu eklenir ve 12000 rpm' de 1 dk santrifüj edilir. Toplama tüpüne geçen sıvı atılır ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.

f) Kolon 1 dk daha santrifüj edilmiştir.

g) Saflaştırma kolonu, 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne oturtulur. Filtreye 50 µl toplama tamponu eklenerek, 1 dk 12000 rpm'de santrifüj edilir.

Not: Saflaştırılan PZR ürünlerinin klonlanma aşamasına kadar -20 °C'de saklanması gerektiği belirtilmiştir.

3.2.8.5 PZR ürününün (tfu 0901) pKLAC2 vektörüne klonlanması

Vektör pKLAC2 ve PZR ürününe yapışkan uç oluşturma ve ligasyon için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

Yapışkan uç oluşturma basamakları;

1) 0,5 mikrogram pKLAC2 plazmit DNA'sı

0,5µl BamHI ve 0,5µl NotI restriksiyon enzimleri

10x'lik CutSmart tamponu 5µl

Deiyonize su ilave edilerek toplam 50 µl'ye tamamlanmış ve reaksiyon karışımı 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

2) BamHI 0,5µl

NotI 0,5µl

PZR ürünü	0,5µg
10x CutSmart tamponu	5µl

Toplam hacim deiyonize su ile 50µl'e tamamlanmıştır.

37C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonucunda her iki kesim ürünü de GeneJET Purification Kit ile belirlenen talimatlara göre saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan kesim ürünleri Quick Ligation Kit (Neb M2200, ABD) ile birbirine bağlanmıştır.

Ligasyon karışımı aşağıda belirtilen miktarlara göre ayarlanmıştır:

Vektör (pKLAC2)	(60ng)
İnsert (İlgilenen gen DNA'sı)	(20ng)
2x Quick Ligasyon tamponu	10µl
Quick Ligaz	1µl

İçerik deiyonize su ile 20 µl'e tamamlanır. Karışım, pipet ile alt üst edilerek yavaşça karıştırılıp kısa bir süre santrifüjlenir ve oda sıcaklığında (25 °C) 5 dakika inkübe edilir.

Not: Bir sonraki aşamaya kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.8.6 pKLAC2 lineer ekspresyon kaseti oluşturma basamakları

Lineer ekspresyon kasetinin oluşturulabilmesi için belirlenen restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi yapılmıştır.

Reaksiyon aşağıdaki bileşenlerle gerçekleştirilmiştir:

pKLAC2 DNA	2 µg
Neb tampon 3.1	5 µl (10x)
BstXI (NEB, R0113S) enzimi	2 µl

Deiyonize su ile 50 µl' ye tamamlanmıştır.

37C'de 2 saat inkübe edilmiştir

Lineerleştirilen ve istenilen gen bölgesini içeren pKLAC2 vektörü GeneJET Purification Kit ile belirlenen talimatlarına göre saflaştırılmıştır.

3.2.8.7 Lineer ekspresyon kasetinin kompetent *K. lactis* GG799 hücrelerine aktarılması

Kompotent *K. lactis* GG799 hücrelerine, pKLAC2 vektörü NEB Maya Transformasyon Reaktifi kullanılarak kimyasal transformasyon ile aktarılmıştır.

K. lactis GG799 hücrelerinin transformasyon aşamaları:

- 1) Transformasyonda kullanılacak ve -80°C'de bulunan 1 tüp *K. lactis* GG799 kompetent hücreleri buz üzerinde çözündürülür.
- 2) Aynı tüpe 620 µl NEB Maya transformasyon reaktifi eklenir.
- 3) Reaktifleri içeren tüp homojen olması için alt üst edilerek karıştırılır.
- 4) Hücre karışımına, ilgilenilen geni içeren lineerleştirilmiş pKLAC2 vektöründen 1µg ilave edilir.

Not: Aktarılabak pKLAC2 vektörü 15 µl' yi aşmamalıdır. İçerik vortekslenmemelidir.

- 5) Karışım 30 °C'de 30 dk inkübe edilir.
- 6) Hücre karışımı, 37 °C'deki su banyosunda 1 saat inkübe edilerek ısı şokuna tabi tutulur.
- 7) Hücreler, santrifüj edilerek pellet haline getirilir (~7000 rpm'de 2 dk) ve süpernatant atılır.
- 8) Hücre pelletleri, 1 ml YPG'li ortamda yeniden çözündürülür ve hücre karışımı steril bir tüpe alınır. 30 °C'de karıştırılarak (240 rpm'de) 4 saat inkübe edilir.

Not: Üretici protokolündeki notlarda, transformasyon verimliliğinde düşüşe neden olduğu için 3 saatten az yapılan inkübasyonlar önerilmektedir.

9) Hücre karışımı, steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine transfer edilir.

10) Hücreler, 7000 rpm'de 2 dk pellet haline getirilir ve süpernatant atılır.

11) Hücre pelletleri, 1 ml steril 1X PBS'te yeniden çözündürülür.

12) Hücre süspansiyonundan, içinde 50 µl steril deiyonize su bulunan yeni steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine ayrı ayrı 10 µl, 50 µl ve 100 µl aktarılır.

13) Dikkatlice ve kısa süre karıştırılarak tüplerdeki hücre karışımından 5mM asetamid içeren Yeast Carbon Base (YCB) Agar ortamları üzerine ayrı ayrı aktarılır.

14) Petriler, ters bir şekilde 30°C'de 3-4 gün koloni oluşumu gerçekleşene kadar inkübe edilir.

15) 10-20 tek koloni, 5mM asetamid içeren yeni YCB agar ortamlarına aktarılır.

16) Petriler, 1-2 gün 30 °C'de inkübe edilir.

3.2.8.8 *K. lactis* GG799'un rekombinant selülaz aktivite ölçümü

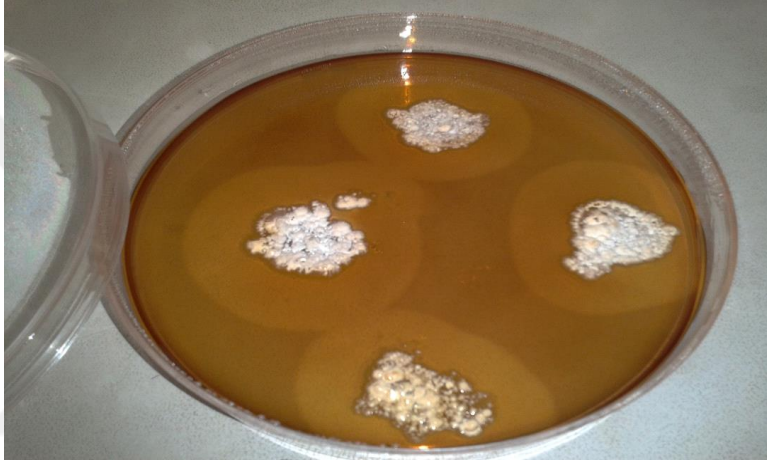
Petrilerde gelişen tek kolonilerden, steril 25ml YPGal bulunan ortama süspansiyon edilmiştir. Kültürler, 30°C'de 250 rpm'de 48 saat inkübe edilmiştir. Gelişen kültürler (1:100 olacak şekilde), %1 CMC içeren YPGal'li ortama aktarılıp ve 30°C'de 250 rpm'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Üreme sonucunda, her gün 1'er ml paralel örnekler alınmıştır. Örnekler 10.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve selülaz aktivite ölçümleri, dinitrosalisilik asit metodu (DNS) (Miller et al., 1960), baz alınarak gerçekleştirilmiştir (Başlık., 3.2.4.1).

4. BULGULAR

4.1 Selülitik termofilik bakterilerin izolasyonu

Yapılan çalışmada elde edilen bakteri izolatı CMC içeren tarama ortamına spotlama şeklinde ekilmiş Kongo red ve Gram iyodür yöntemiyle taranmış ve pozitif sonuca rastlanmıştır. Boyanan petride koloni etrafında daha açık renkli zonlar gözlenmiştir.



Şekil 4.1 CMC içeren modifiye TA ortamında selülaz zonları



Şekil 4.2 CMC içeren modifiye TA ortamında selülaz zonları

4.2 *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın Tanınması

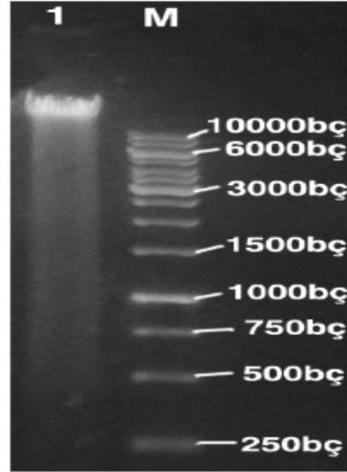
4.2.1 İzolat EFTS 7A'nın morfolojik ve kültürel özellikleri

İzolat EFTS 7A, modifiye TA ortamında 55°C'de 3 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu, beyaz renkli koloni yapısına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Kompost ve mantar üretimi gerçekleştirilen bölgelerdeki gibi tipik bir koku oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca gram boyama sonucunda gram-pozitif özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir.

4.2.2 İzolat EFTS 7A'nın moleküler tanınması

4.2.2.1 İzolat EFTS 7A' dan DNA izolasyonu

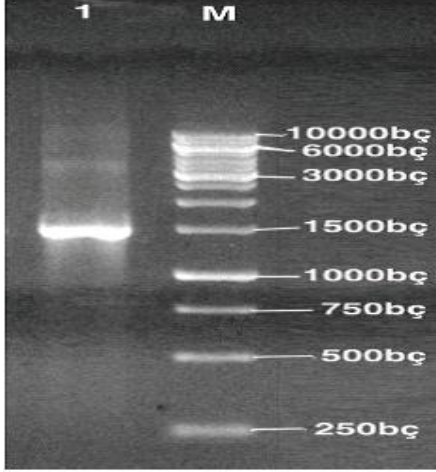
İzolat *EFTS 7A*'nın genomik DNA'sı Fungal/Bakteriyel DNA izolasyon kiti ile izole edilmiş ve elde edilen genomik DNA % 0,8 agaroz jelde yürütülerek bütünlük kontrolü gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3). Genomik DNA'nın izolasyon sonrası saflığı, spektrofotometrede A260/A280 dalga boylarındaki ölçüm oranı baz alınarak 1,85 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3 İzolat EFTS 7A'nın % 0,8 agaroz jeldeki genomik DNA görüntüsü. 1) izolat *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın genomik DNA'sı/ M; 1 Kb O'Gene Ruler DNA Ladder

4.2.2.2 16S rDNA baz sırası ile tür tayininin yapılması

İzolatin genomik DNA'sı, 27 F ve 1492 R primerleri PZR aracılığı ile çoğaltılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünü % 1,2 agaroz jelde yürütülerek UV translüminatör kullanılarak görüntülenmiştir (Şekil 4.4).

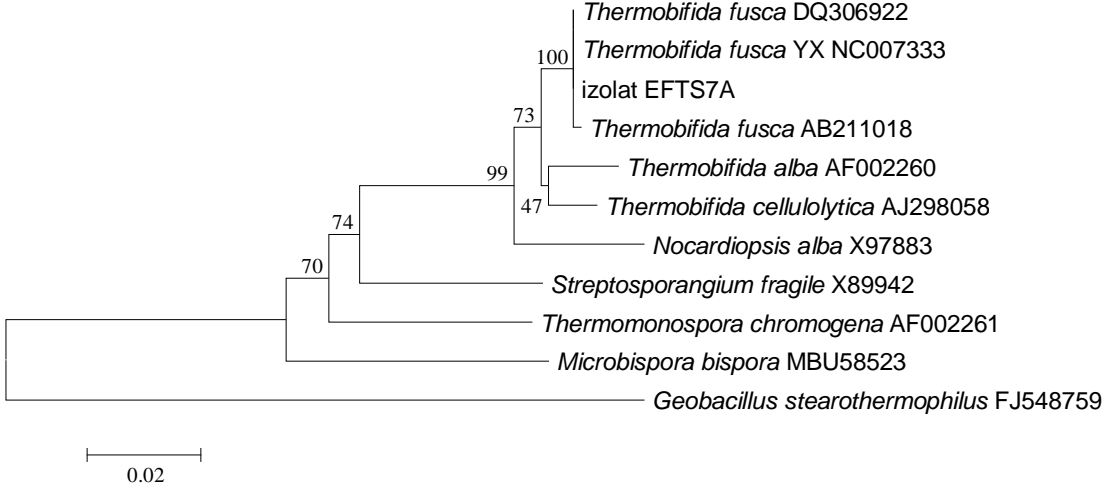


Şekil 4.4 16S rDNA polimeraz zincir reaksiyonu ürünü 1- polimeraz zincir reaksiyonu ürünü / M- 1 Kb O'Gene Ruler DNA Ladder

16S rDNA, polimeraz zincir reaksiyonu ürününün baz dizisi belirlendikten sonra GenBankası'ndaki bilinen baz sıraları ile karşılaştırılmıştır. EFTS 7A'nın, genomu çıkarılmış *Thermobifida fusca* YX suşunun 16S rDNA bölgesi %99 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. İzolat EFTS 7A, *Thermobifida fusca* EFTS 7A olarak adlandırılmıştır. Başvuru sonucu, GenBank kabul numarasının KJ205530 olduğu bildirilmiştir. Karşılaştırmada kullanılan baz dizisi aşağıdaki gibidir;

```
GGGACTGGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCC
CTTCGGGGGTACACGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAAC
CTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGA
TATGACCTCGTGCCGCATGGTGTGGGGTGGAAAGGTGTTTTTCCGGTC
AGGGATGGGCTCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCTAC
CAAGGCGATGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTG
GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTGCGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCGCAATGGGCGGAAGCCTGACGCAGCGACGCCGCGTGGGGGAT
```

GAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTACCACTCACGAAGGCCCTG
GTTTTCTGGGGGTTGACGGTAGGTGGTGAATAAGGACCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGCCTGTCGCGTCTGCTGTGAAAG
TCCGGGGCTTAACTCCGGGTGTGCAGTGGATACGGGCAGGCTTGAGGT
AGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAT
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGCCTTACCTG
ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTG
GTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGGGGACTTTCCACG
GTTTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCCTGGGGAGTACG
GCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG
GCGGAGCATGTTGCTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGG
CTTGACATCACCGGTAATCCTCCAGAGATGGGGGGTCTTCGGGGATC
GGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCCATGTTGCCAGCACG
TGGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGCCTTGGGCTGCAAA
CATGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCGTGCGATGTCGTGAGGCGGA
GCGAATCTCTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCG
ACCCCATGAAGGTGGAGTCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAACGCCGC
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGAA
AGTCGGCGAACACCCGAAACACGTGGCCTAACCTTGTGGGGGGGAG
CGTGTGAAGGTGGGCGGCCT



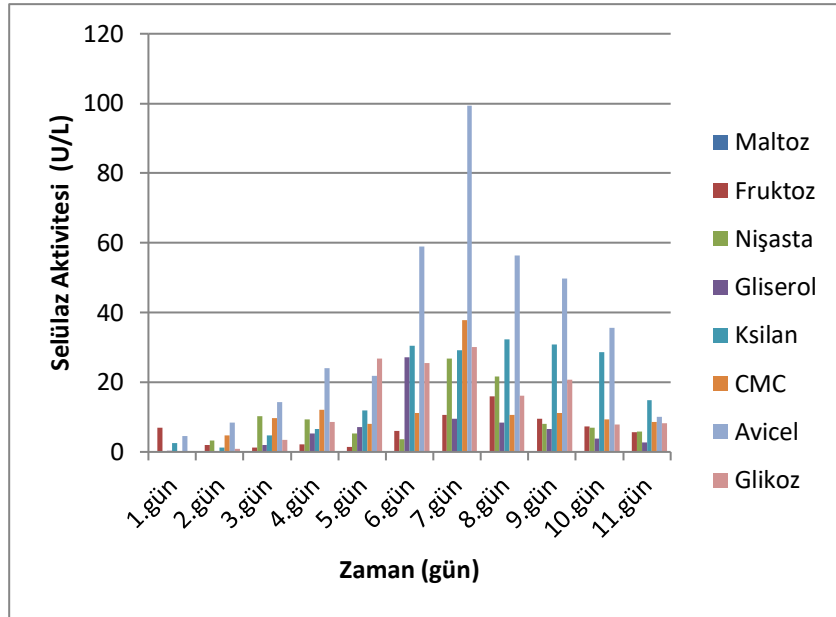
Şekil 4.5 Mega 4,0 programı kullanılarak oluşturulan filogenetik dendrogram

4.3 Hacimsel Enzim Aktiviteleri

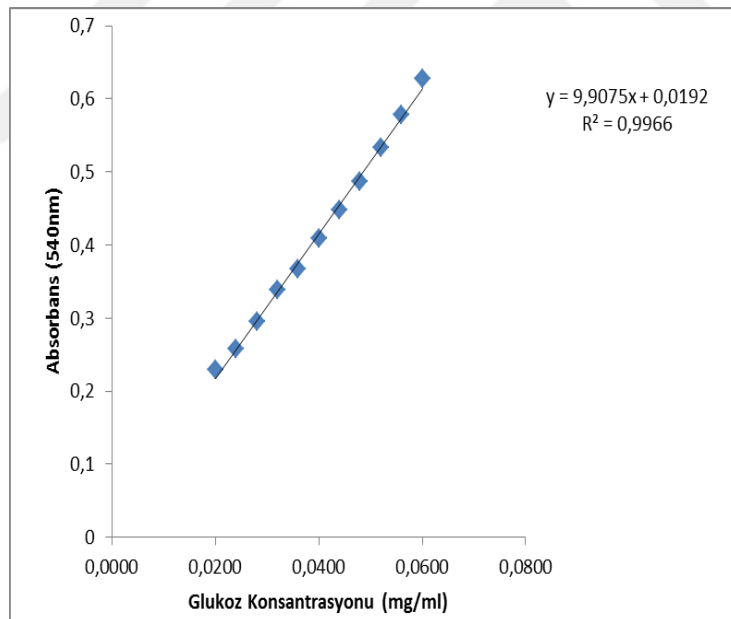
4.3.1 Farklı karbon kaynaklarının selülaz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye TA sıvı ortamında 55°C'deki çalkalamalı inkübatörde diğer karbon kaynaklarının bulunmadığı % 0,1'lik maltoz, fruktoz, nişasta, gliserol, ksilan, karboksimetil selüloz, avicel ve glikoz içeren ortamlarda 10 gün boyunca inkübe edildi. Her gün ortamlardan, 1 ml örnek alındı. Enzim aktiviteleri, 540 nm'de spektrofotometrede köre karşı okunarak absorbansları belirlendi.

Selülozun parçalanmasında görevli selülaz enzimlerinden biri olan endoglukanaz aktivitesine ait verilere göre en yüksek değerler karbon kaynağı olarak avicel ve CMC substratının kullanılmasıyla elde edilmiştir. En yüksek değer avicel varlığında 7. günde 99,3 U/L olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6 Farklı karbon kaynakları varlığında selülaz aktivitelerindeki değişim



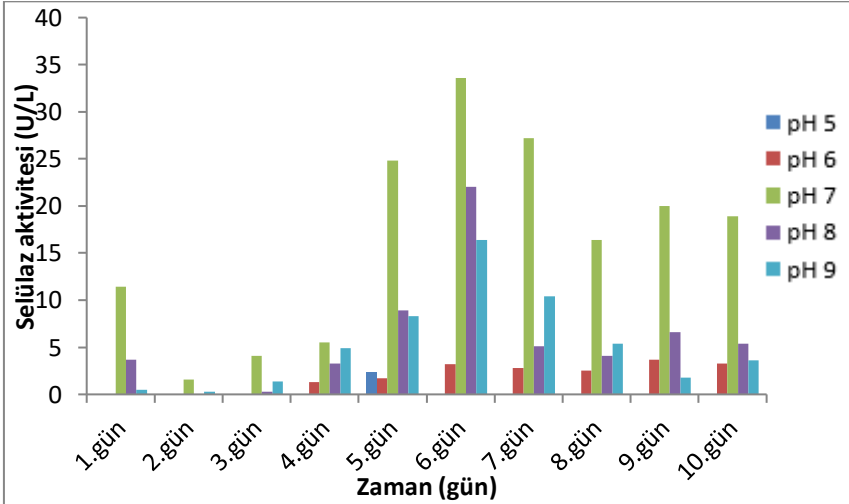
Şekil 4.7 Glukoz standart grafiği

4.3.2 Farklı N kaynaklarının selüloz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye termoaktinomiset ortamında azot kaynağı olarak pepton yerine, yeast ekstrakt, kazein, beef ekstrakt ve amonyum sülfat içeren sıvı ortamlarda 55 °C' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreci boyunca yalnızca modifiye termoaktinomiset ortamı bileşeni olan pepton varlığında aktivite gözlenmiştir

4.3.3 Farklı pH değerlerinin selüloz aktivitesine etkisi

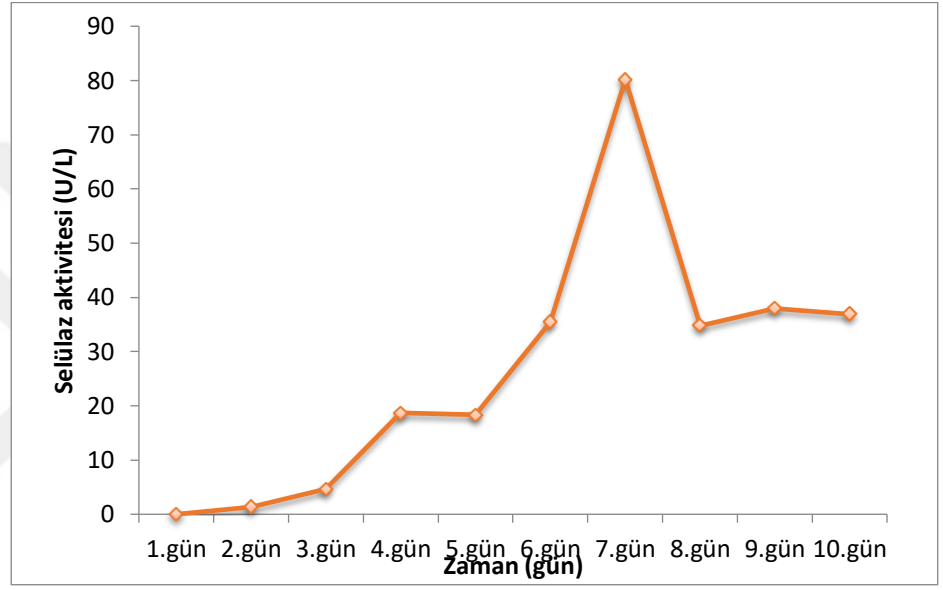
Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye termoaktinomiset ortamında pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0 gibi farklı pH değerlerinde 10 gün boyunca 55°C' de çalkalamalı inkübatörde geliştirilmiştir. Her gün farklı pH ortamlarından 1'er ml örnek alınarak yukarıda bahsedilen spektrometrik yöntemlerle ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda *T. fusca*'nın optimum enzim aktivitesinin pH 7,0'de olduğu belirlenmiştir. Asidik koşullarda, üreme ve aktiviteye bağlı önemli bir gelişme görülmemiştir. Organizmanın en yüksek selüloz aktivitesi, 6. gün'de yapılan denemeler sonucunda pH 7'de 33,6 U/L olarak belirlenmiştir.



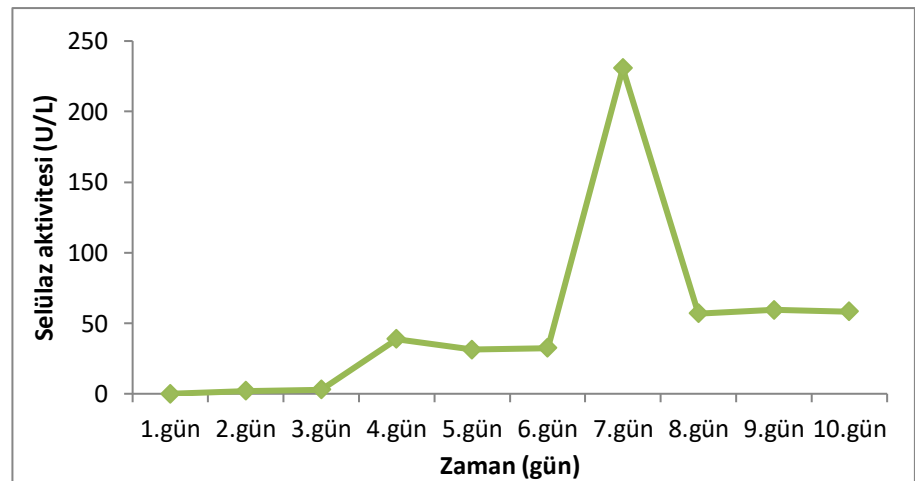
Şekil 4.8 Farklı pH değerlerinin selüloz aktivitesine etkisi

4.3.4 Optimum şartlarda selüloz aktivitesi

T. fusca EFTS 7A, farklı karbon kaynağı, farklı organik ve inorganik azot kaynakları, farklı pH değerlerinde geliştirilmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği parametreler seçilerek, bu değişkenlerin hepsi bir arada kullanılarak hazırlanan bir ortam kullanılmıştır. Bunun sonucunda en yüksek selüloz aktivitesi CMC substratı ile 7. gününde 80,2 U/L ve Avicel substratı varlığında 7.günde 230,6 U/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).



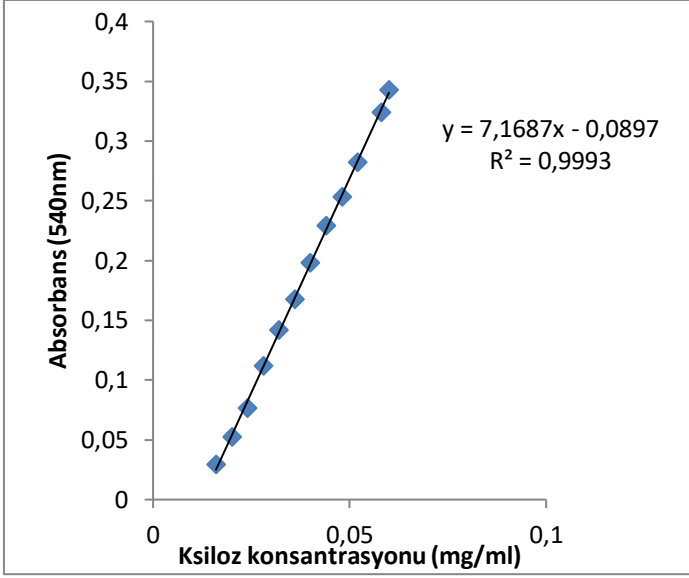
Şekil 4.9 Optimum koşullarda CMC substratı ile selüloz aktivitesi



Şekil 4.10 Optimum koşullarda Avicel substratı ile selüloz aktivitesi

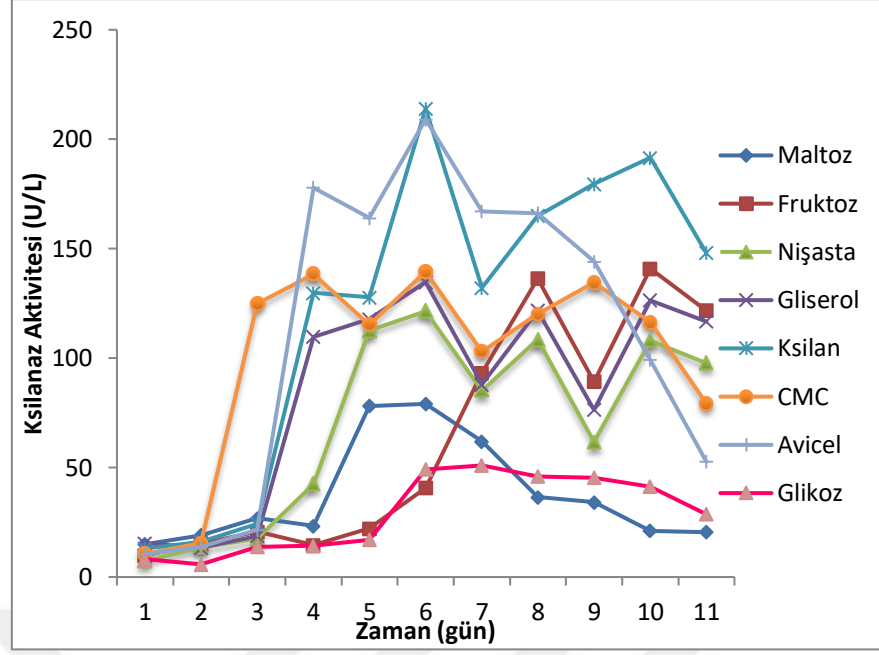
4.3.5 Farklı karbon kaynaklarının ksilanaz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu, modifiye termoaktinomiset sıvı ortamında 55 °C'deki çalkalamalı inkübatörde diğer karbon kaynaklarının bulunmadığı % 0,1'lik maltoz, fruktoz, nişasta, gliserol, ksilan, karboksimetil selüloz, avicel ve glikoz içeren ortamlarda 10 gün boyunca inkübe edildi. Hergün, ortamlardan 1ml örnek alınıp aktiviteleri 540 nm'de spektrometrede köre karşı okunarak absorbansları belirlendi. Elde edilen standart grafik ve aktivite hesaplama formülü aracılığıyla (Başlık 3.2.4.1) aktiviteler hesaplanarak aşağıdaki grafik oluşturuldu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Ksiloz standart grafiği

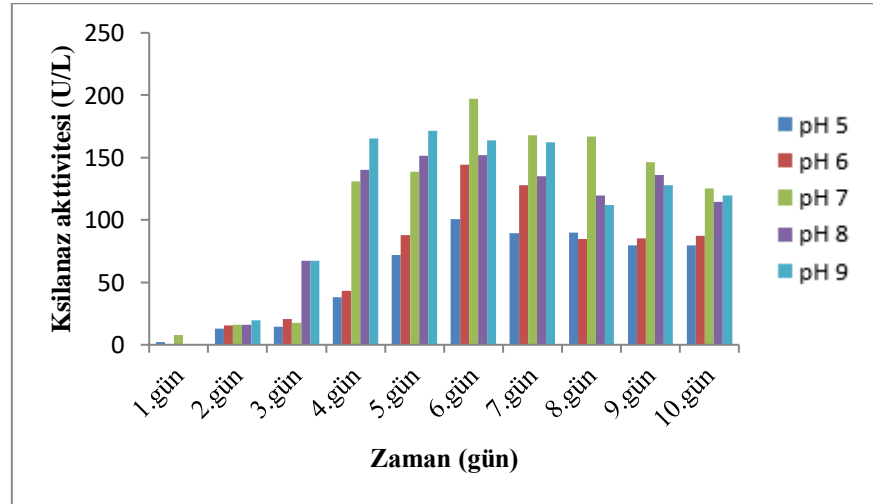
Selüloz homopolimerinden sonra doğada en bol bulunan organik materyal olan hemiselülozların parçalanmasında görevli olan ksilanazın, aktivite ölçümleri sonucu elde edilen verilere göre en yüksek değerini karbon kaynağı olarak birchwood ksilan substratının kullanılmasıyla elde edildiği görülmüştür. Bu değer 6. günde 214 U/L olarak hesaplanmış olup 6. günden itibaren azaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.12)



Şekil 4.12 Farklı karbon kaynakları varlığında ksilanaz aktivitesindeki değişim

4.3.6 Farklı pH değerlerinin ksilanaz aktivitesine etkisi

T.fusca karbon kaynağı olarak ksilan substratı içeren sıvı ortamlarda pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0 gibi farklı pH değerlerinde geliştirilmiştir. En yüksek aktivite, 6. gün pH 7,0'de 197 U/L olarak ölçülmüştür (Şekil 4.13).



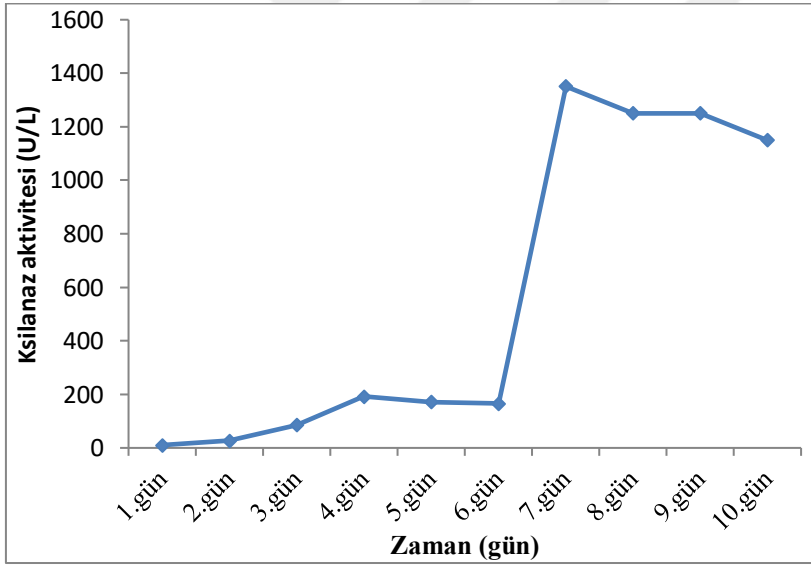
Şekil 4.13 Farklı pH değerlerinin ksilanaz aktivitesine etkisi

4.3.7 Farklı azot kaynaklarının ksilanaz aktivitesine etkisi

Thermobifida fusca EFTS 7A suşu modifiye termoaktinomiset ortamında azot kaynağı olarak pepton, yeast ekstrakt, kazein, beef ekstrakt ve amonyum sülfat içeren sıvı ortamlarda 55 °C' ye ayarlı çalkalamalı inkübatörde 10 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süreci boyunca yalnızca modifiye TA ortamı bileşeni olan pepton varlığında aktivite gözlenmiştir.

4.3.8 Optimum koşullarda ksilanaz aktivitesi

Thermobifida fusca EFTS 7A, farklı karbon kaynağı, farklı organik ve inorganik azot kaynakları, farklı pH değerlerinde geliştirilmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği parametreler seçilerek, bu değişkenlerin hepsi bir arada kullanılarak geliştirilmiştir. Bunun sonucunda en yüksek ksilanaz aktivitesi ksilan substratı ile 7. gününde 1350,6 U/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14).

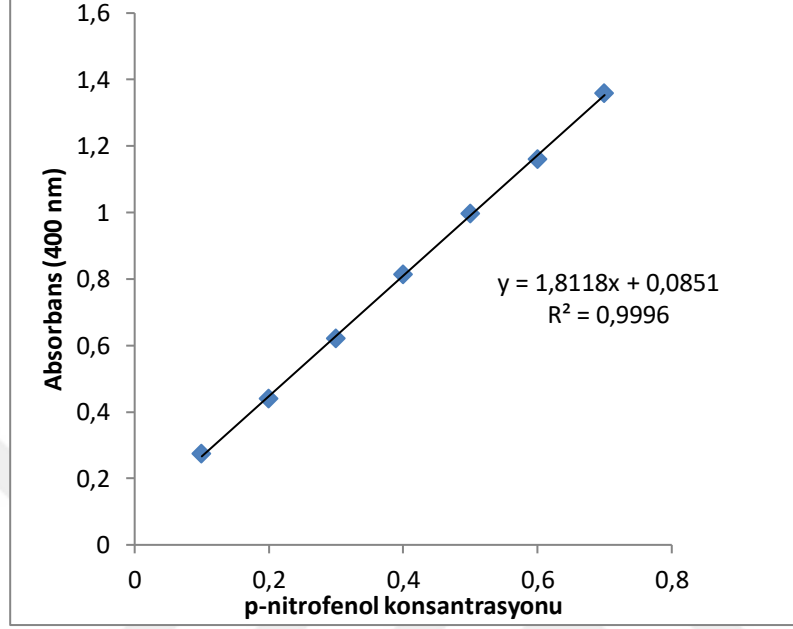


Şekil 4.14 Optimum koşullarda ksilanaz aktivitesi

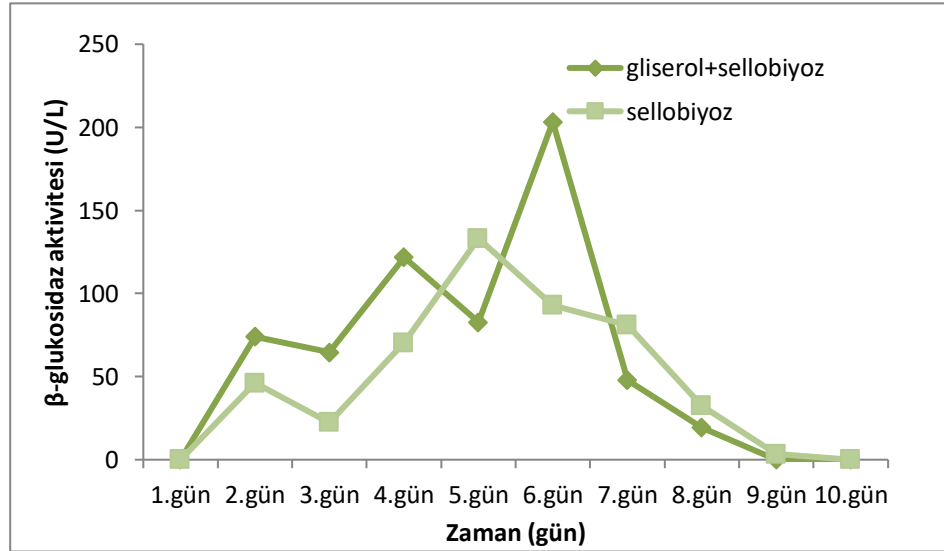
4.3.9 β -Glukosidaz aktivitesi

β -glukosidaz, selüloz homopolimerinin hidroliz son ürünü olan, iki glukoz biriminden oluşan sellobiyoz yapısını parçalayan önemli bir enzimdir. *T. fusca* karbon kaynağı olarak gliserol ve sellobiyoz, sellobiyoz içeren ortamlarda 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu sıvı ortamlardan, her gün 1'er ml örnek alınarak

denemeler gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucunda, gliserol ve sellobiyoz içeren ortamlarda en yüksek aktivite 6. gün de 203,3 U/L, sellobiyoz varlığında ise 5.gün de 133,1 U/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.15 p-nitrofenol standart grafiği

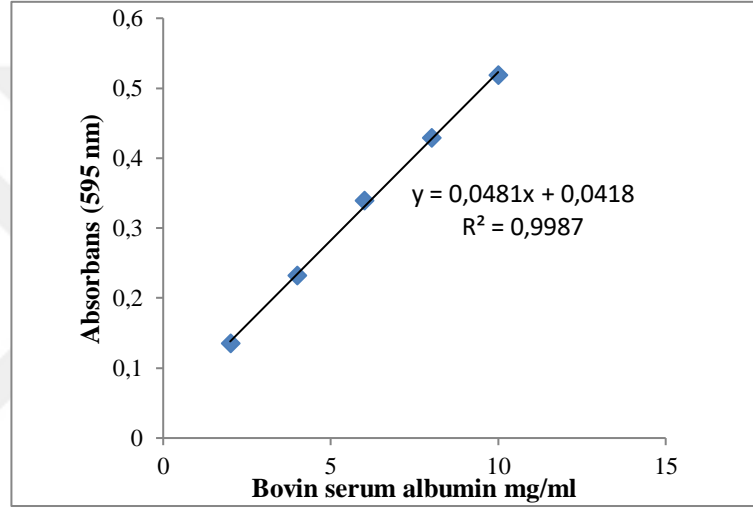


Şekil 4.16 β-glukosidaz aktivitesi

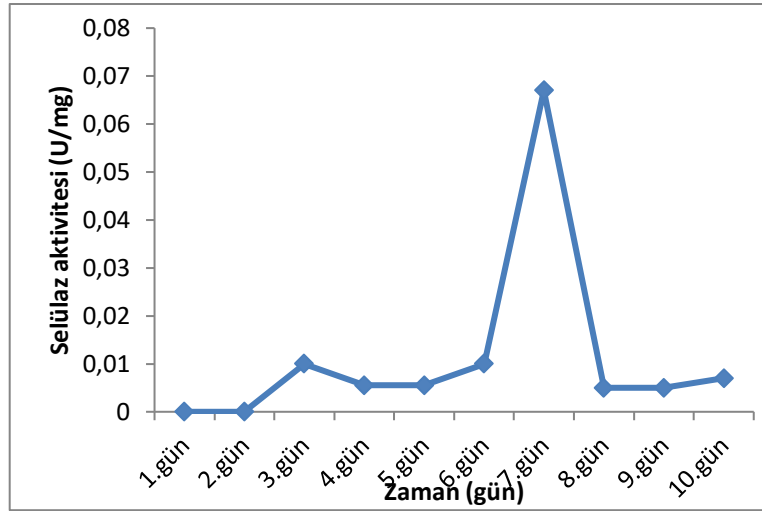
4.4 Optimum Koşullarda Enzimlerin Spesifik Aktiviteleri

4.4.1 Selüloz aktivitesi

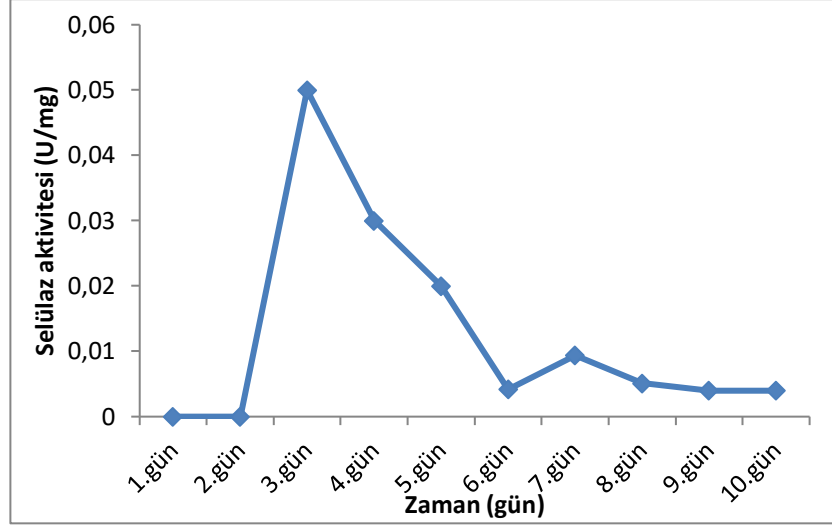
T. fusca EFTS 7A, farklı karbon kaynağı, farklı organik ve inorganik azot kaynakları, farklı pH değerlerinde geliştirilmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği parametreler seçilerek, bu değişkenlerin hepsi bir arada kullanılarak geliştirilmiştir. En yüksek aktivitenin, CMC substratı varlığında 7. gün de 0,067 U/mg ve avicel substratı varlığında 3. Gün de 0,05 U/mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19)



Şekil 4.17 Protein standart grafiği



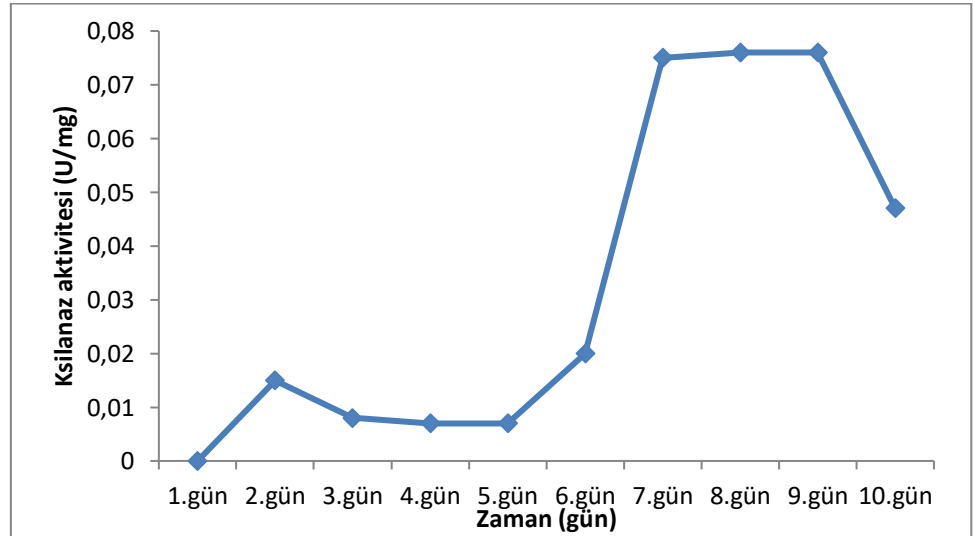
Şekil 4.18 CMC substratı ile selüloz aktivitesi



Şekil 4.19 Avicel substratı ile selülaz aktivitesi

4.4.2 Ksilanaz aktivitesi

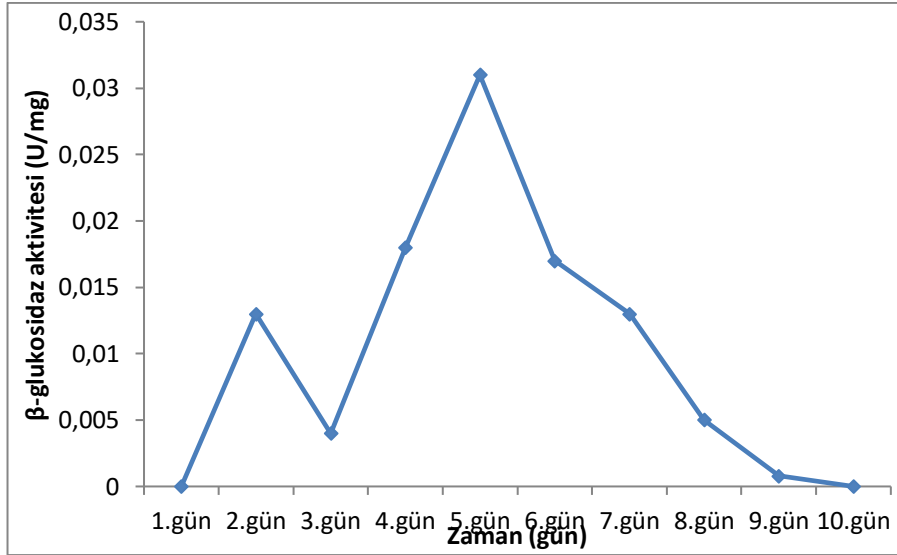
T. fusca EFTS 7A farklı karbon kaynağı, farklı organik ve inorganik azot kaynakları, farklı pH değerlerinde geliştirilmiştir. En yüksek aktivite gösterdiği parametreler seçilerek, bu değişkenlerin hepsi bir arada kullanılarak geliştirilmiştir. Elde edilen verilere göre ksilan substratının kullanımıyla en yüksek değer 7. gün de 0,075 U/mg olarak elde edilmiştir (Şekil 4.20).



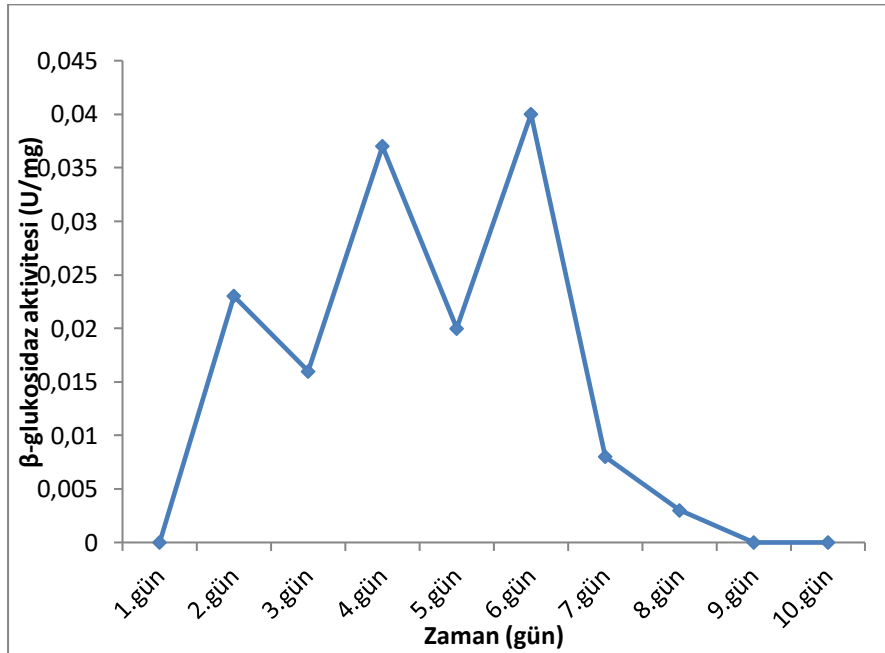
Şekil 4.20 Ksilan substratı ile ksilanaz aktivitesi

4.4.3 β -glukosidaz aktivitesi

En yüksek aktivite sellobiyoz substratı varlığında 5.gün de 0,031 U/mg, sellobiyoz ve gliserol içeren ortamda ise 6.gün de 0,04 U/mg olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).



Şekil 4.21 Sellobiyoz substratı varlığında β -glukosidaz aktivitesi

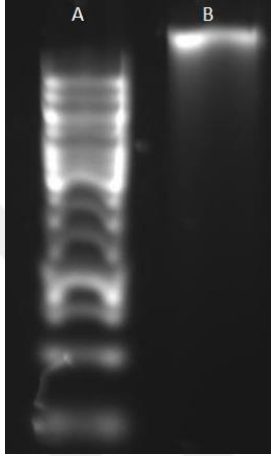


Şekil 4.22 Sellobiyoz ve gliserol varlığında β -glukosidaz aktivitesi

4.5 *Thermobifida fusca* EFTS 7A'a Ait Selülaz Genin Klonlanması

4.5.1 *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın genomik DNA izolasyonu

Modifiye Termoaktinomiset ortamında (Selülitik bakterilerin izolasyonu başlığında bahsedilen şekilde) geliştirilen *Thermobifida fusca* EFTS 7A suşu, Fungal/Bakteriyel DNA izolasyon kiti ile izole edilmiş ve elde edilen genomik DNA % 0,8 agaroz jelde yürütülerek bütünlük kontrolü gerçekleştirilmiştir



Şekil 4.23 *Thermobifida fusca* EFTS 7A' a ait genomik DNA A) 1 Kb O'Gene Ruler DNA Ladder B) *Thermobifida fusca* EFTS 7A genomik DNA'sı

4.5.2 *Thermobifida fusca* EFTS 7A' a ait selülaz geni için primer tasarımı

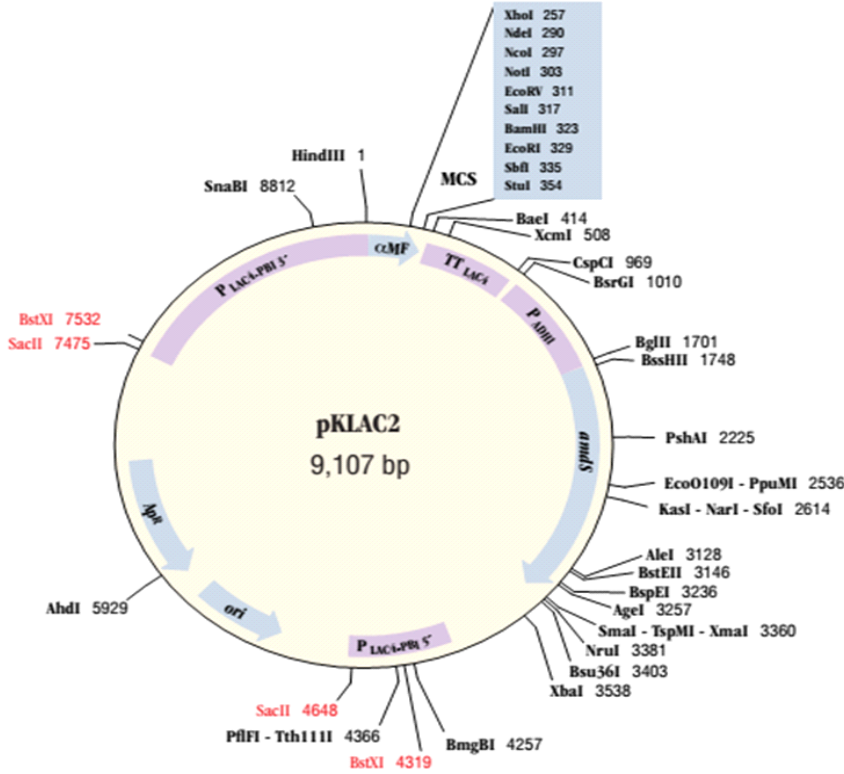
Bu çalışmada, selülaz gen bölgesine özgü primerler, genomu bilinen *Thermobifida fusca* YX suşu ve klonlamada kullanılacak *Kluyveromyces lactis* protein ekspresyonunda yer alan klonlama stratejilerine uygun bir şekilde tasarlanmıştır. Tasarımda esas alınan kısım, *Thermobifida fusca* YX suşunun tfu_0901 bölgesi olmuştur. Bu bölgenin 1400 baz çifti büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir. Primer dimer oluşum durumu çalışmada kullanılan DNA polimeraz üreticisinin aşağıdaki web aracı ile kontrol edilmiştir:

<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/multipleprimer/> (Son erişim tarihi

16 Mayıs 2019)

Optimum annealing sıcaklığı, aşağıda verilen linklerde bulunan hesaplama programı ve kullanılan DNA polimeraz protokol içeriği ve primerler baz alınarak belirlenmiştir:

<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/> (Son erişim tarihi 16 Mayıs 2019)



Şekil 4.24 pKLAC2 plazmidi (9107bp)

pKLAC2 plazmitinde LAC4 promotorunu (P LAC4-PBI) 5' ve 3' uçlarını *E. coli*'de yayılmasını sağlayan pMB1 orijin bölgesi (ori) ve -laktamaz (Ap^R) yer alır. Bunların yanı sıra *K. lactis* α -çoğalma faktörü salgılama dizisi (α -MF), çoklu klonlama bölgesi (MCS) ve LAC4 transkripsiyon sonlandırıcı yer almaktadır. ADH1 promotoru (P_{ADH1}), seçilebilir işaretleyici bir gen olan asetamidazın ifadesini sağlamaktadır. Vektör, SacII ve BSTXI tarafından kesilerek lineer DNA fragmenti haline getirilerek *K. lactis* genomunun doğal LAC4 promotor bölgesine yerleştirilebilmektedir (Kaynak: *K. lactis* protein ekspresyonu kit uygulama prosedürü, 2007).

Şekil 4.24'de pKLACK2 vektörünün çoklu klonlama bölgesine, çeşitli resktirsiyon enzimleri için kesim tanıma bölgeleri belirtilmiştir. Bu tanıma bölgeleri ve klonlanmaya çalışılan selüloz bölgesi olan *tfu_0901*'a ait baz dizisi dikkate alınarak NotI ve BamHI kesim bölgesi içeren primerler tasarlanmış ve aşağıda belirtilmiştir:

tfu_0901 cel5A' nın *K.lactis* için primerleri

0901f-klac 5' **GCGGCCGC**ATGGCGAAATCCCCCGCCCCG NotI

0901R-klac 5' GCCGGAT**CCTCAGG**ACTGGAGCTTGCTCCGCA BamHI

4.5.3 PZR ile tfu_0901 gen bölgesinin çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonunda DNA Polimeraz olarak Phire Hot Start II DNA polymerase (F122S) kullanılmıştır.

PZR reaksiyonu için gerekli karışımın içeriği kullanılan DNA polimeraz protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır. Kit içerikleri -15°C ila -25°C arasında muhafaza edilmiştir. İçerik oda sıcaklığına getirildikten sonra hafifçe spinlenmiş homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. İlgilenilen gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması için kullanılan reaksiyon karışımı

• 5X Phire Reaction Buffer	10 µl
• 10 mM dNTPs	1 µl
• 0901f-klac	1 µl
• 0901R-klac	1 µl
• Kalıp DNA	1 µl (36ng)
• DNA polimeraz	1 µl
• Distile su	35 µl
Toplam hacim	50 µl

Hazırlanan master mix dikkatli bir şekilde PZR tüplerine pipetlenmiştir.

4.5.4 Polimeraz zincir reaksiyonu koşulları

PZR koşulları, çoğaltılacak gen bölgesinin G-C içeriği ve DNA polimeraz enzimlerinin kullanım koşulları gözetilerek belirlenmiştir. Uzama süresi, polimeraz protokolünde belirtildiği üzere 1kb'lık baz çifti için 15s olacak şekilde düzenlenmiştir.

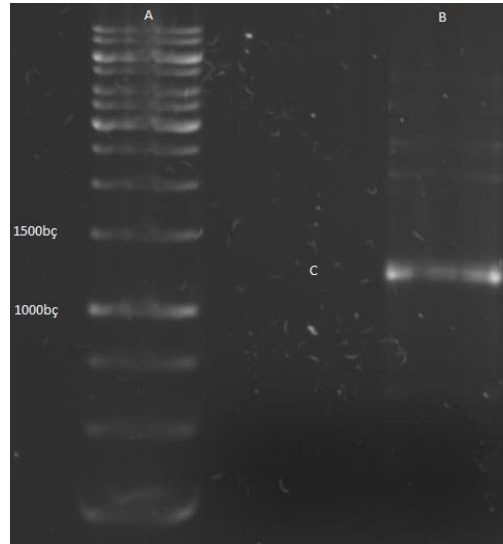
<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html?CID=fl-we120377>

Primer annealing sıcaklıkları, yukarıda belirtilen link aracılığıyla hesaplanmıştır. Ayrıca, polimeraz protokolünde, yüksek T_m sıcaklıklarına ait primerler için iki aşamalı PZR döngüsü önerildiği için çalışmamız bu protokol üzerinden yürütülmüştür.

Oluşturulan PZR ürünleri, % 1,2 agaroz jel elektroforezde yürütülerek UV translüminatör kullanılarak görüntülenmiştir.

Çizelge 4.1 PZR termal döngü tablosu

Reaksiyon koşulları (2 basamaklı)			Reaksiyon koşulları (3 basamaklı)		
Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30s	Başlangıç denatürasyonu	98 °C	30s
Denatürasyon	98 °C	5s	Denatürasyon	98 °C	5s
Annealing			Annealing	72 °C	5s
Uzama	72 °C	21s	Uzama	72 °C	21s
Son uzama	72 °C	1 dk	Son uzama	72 °C	1 dk
Bekleme	4 °C	∞	Bekleme	4 °C	∞



Şekil 4.25 cel5A PZR ürünü (% 1,2 agaroz jelde) A)1Kb O'Gene Ruler DNA Ladder B) ~1400 bp'lik PZR ürünü

4.5.5 PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR reaksiyonundan sonra, klonlama aşamaları için saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin amacı, kullanılan primerlerin, dNTP'lerin uzaklaştırılması, DNA polimerazın inaktive edilmesi ve kontamine DNA'nın uzaklaştırılmasıdır. Kit, 25 baz çiftinden 20kb büyüklüğe kadar DNA fragmentlerine uygulanabilmektedir.

PZR ürünleri iki şekilde saflaştırılmıştır. PZR ürünlerinin, jelde yürütülmesi sonucu agaroz jelden Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (K0691) ve doğrudan GeneJET PCR Purification Kit (ThermoScientific K0701) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Kit; bağlama tamponu, konsantre yıkama tamponu, toplama tampon (10Mm Tris-HCl, pH 8,5), GeneJET saflaştırma kolonları ve toplama tüplerinden oluşmaktadır. Kit içerikleri 15-25°C' de muhafaza edilmiştir.

Not: Bağlayıcı tamponda çökme görülürse, tampon 37 °C' ye kadar ısıtılıp 25 °C' ye kadar soğutulup kullanılmalıdır.

1) Saflaştırma prosedürü şu şekildedir:

a) Steril mikrosantrifüj tüpüne, PZR ürününden alınan hacme eşit 1:1 oranında bağlama tamponu ilave edilmiştir (45 µl PZR ürünü: 45µl bağlama tamponu) aktarılmıştır.

b) PZR ürünü ve bağlayıcı tampon steril mikrosantrifüj tübünde karıştırılmıştır. Karıştırma sırasında, sarı olan karışımın rengi sürekli kontrol edilmiş ve renk değişimi gözlenmemiştir. Karışım renginin sarı olması, DNA bağlanması için optimal bir pH' ın olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bağlama tamponunda bulunan kaotropik bileşenler, proteinleri denatüre ederek DNA'nın kolondaki silika membrana bağlanmasını sağlamaktadır.

Not: Solüsyonun renginin turuncudan mora kadar olan bir aralıkta olduğu gözleniyorsa, pH'ı 5,2 olan 3M sodyum asetat tamponundan 10 µl karışıma eklenebilir.

c) Karışım, mikropipet yardımıyla saflaştırma kolonuna aktarılmıştır.

d) GeneJET saflaştırma kolonu 1 dakika santrifüjenmiş (12000 rpm) ve geçen sıvı atılmıştır. Kolon aynı koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir.

e) Kolona 700 µl yıkama tamponu eklenmiş ve 12000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpüne geçen sıvı atılarak, kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

f) Kolon 1 dk daha santrifüj edilmiştir.

g) Saflaştırma kolonu, 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne oturtulup filtreye değmeyecek şekilde 50 µl toplama tamponu eklenerek, 1 dk 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Jelden, PZR ürünlerinin Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (K0691) izolasyonu için birinci aşama dışındaki tüm aşamalar aynıdır. Sadece, agaroz jel üzerinde yürüttüğümüz PZR ürünlerine ait bantlar UV ışık altında kısa sürede belirlenmiştir. Banta zarar vermeyecek şekilde bistüri ile kesilmiş ve darası alınmış steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, tartılmış 1:1 oranında bağlayıcı tampon eklenip önceden 50 °C'ye ayarlanmış etüvde eriyene kadar inkübe edilmiştir.

Not: Saflaştırılan PZR ürünlerinin klonlanma aşamasına kadar -20 °C'de saklanması gerektiği belirtilmiştir.

4.5.6 PZR ürününün (tfu_0901) pKLAC2 vektörüne klonlanması

Klonlama için, pKLAC2 vektörü ve PZR ürünü tfu_0901 yapışkan uçlar oluşturmak amacıyla restriksiyon enzimleri ile muamele edilmişlerdir. Tasarlanan primerler sayesinde oluşturulan PZR ürünleri, pKLAC2 plazmitinin çoklu klonlama bölgesinde kesim yapabilecek enzimler için tanıma bölgeleri taşıyacak şekilde elde edilmişlerdir.

Vektör pKLAC2 ve PZR ürününe yapışkan uç oluşturma ve ligasyon için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

Yapışkan uç oluşturma basamakları;

1) 0,5 mikrogram (Stok kısmından 0,5µl) pKLAC2 plazmit DNA'sı

10 Unit (0,5 μ l) BamHI ve 10 Unit (0,5 μ l) NotI restriksiyon enzimleri

10x'lik CutSmart tamponu 5 μ l

Deiyonize su ilave edilerek toplam 50 μ l'ye tamamlanmış, reaksiyon karışımı 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Paralelli çalışılmıştır.

2) PZR ürünün, saflaştırıldıktan sonra konsantrasyonunun 14,2 μ l (35ng/ μ l)'de 0,5 μ g olduğu saptandığı için reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

10u BamHI	0,5 μ l
10u NotI	0,5 μ l
0,5 μ g saflaştırılmış PZR ürünü	14,2 μ l
10x CutSmart tamponu	5 μ l

Toplam hacim deiyonize su ile 50 μ l'e tamamlanmıştır.

37C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Paralelli çalışılmıştır

İnkübasyon sonucunda her iki kesim ürünü de GeneJET Purification Kit ile belirlenen talimatlara göre saflaştırılmıştır.

Saflaştırılan kesim ürünleri Quick Ligation Kit (Neb M2200, ABD) ile birbirine bağlanmıştır.

Ligasyon karışımı aşağıda verilen miktarlara göre hazırlanmıştır:

Vektör (pKLAC2)	1,8 μ l (32 ng/ μ l) (60ng)
İnsert (İlgilenen gen DNA'sı)	1 μ l (20 ng/ μ l) (20ng)
2x Quick Ligasyon tamponu	10 μ l
Quick Ligaz	1 μ l

İçerik deiyonize su ile 20 μ l'e tamamlanır. Paralelli çalışılmıştır. Karışım pipet ile alt üst edilerek yavaşça karıştırılıp kısa bir süre santrifüjlenir ve oda sıcaklığında (25 °C) 5 dakika inkübe edilir.

Bu işlemle birlikte PZR ürününün pKLAC2 vektörüne klonlanması tamamlanmıştır.

Not: Bir sonraki aşamaya kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

4.5.7 pKLAC2 linear ekspresyon kaseti oluşturma basamakları

Linear ekspresyon kasetinin oluşturulabilmesi için belirlenen restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi yapılmıştır. pKLAC2 plazmiti SacII veya BstXI kesim bölgeleri içermektedir. Gen bölgesinin taranması sonucunda çalıştığımız gen bölgesinin SacII kesim bölgeleri içerdiğinden pKLAC2 plazmiti BstXI enzimi ile kesilerek lineerleştirilmiştir (düzleştirilmiştir).

Reaksiyon aşağıdaki bileşenlerle gerçekleştirilmiştir:

pKLAC2 DNA 30µl (Ligasyonkarışımı (26 ng/µl))

Neb tampon 3.1 5 µl (10x)

BstXI (NEB, R0113S) enzimi 2 µl

Deiyonize su ile 50 µl' ye tamamlanmıştır.

37C'de 2 saat inkübe edilmiştir

Lineerleştirilen ve istenilen gen bölgesini içeren pKLAC2 vektörü GeneJET Purification Kit ile belirlenen talimatlarına göre saflaştırılmıştır.

4.5.8 Linear ekspresyon kasetinin kompetent *K. lactis* GG799 hücrelerine aktarılması

Kompetent *K. lactis* GG799 hücrelerine, BstXI ile lineerleştirilen ve tfu_0901 gen bölgesini içeren pKLAC2 vektörü, NEB Maya Transformasyon Reaktifi kullanılarak kimyasal transformasyon ile aktarılmıştır.

K. lactis GG799 hücrelerinin transformasyon aşamaları:

1) Transformasyonda kullanılacak ve -80°C'de bulunan 1 tüp *K. lactis* GG799 kompetent hücreleri buz üzerinde çözündürülmüştür.

2) Aynı tüpe 620 µl NEB Maya transformasyon reaktifi eklenmiştir.

3) Reaktifleri içeren tüp homojen olması için hafifçe çalkalanmış ve alt üst edilerek karıştırılmıştır.

4) Hücre karışımına ilgilenilen geni içeren lineerleştirilmiş pKLAC2 vektöründen 14 µl 168 ng(12ng/µl) ilave edilmiştir.

Not: Aktarılacak pKLAC2 vektörü 15 µl' yi aşmamalıdır. İçerik vortekslenmemelidir.

5) Karışım 30 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.

6) Hücre karışımı 37 °C'deki su banyosunda 1 saat inkübe edilerek ısı şokuna tabi tutulmuştur.

7) Hücreler santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir (~7000 rpm'de 2 dk) ve süpernatant atılmıştır.

8) Hücre pelletleri 1 ml YPG'li ortamda yeniden çözdürülmüş ve hücre karışımı steril bir tüpe alınmıştır. 30 °C'de karıştırılarak (240 rpm'de) 4 saat inkübe edilmiştir.

Not: Üretici protokolündeki notlarda 3 saatten az yapılan inkübasyonlar önerilmiyor çünkü transformasyon verimliliğinde düşüşe neden olduğu belirtilmiştir.

9) Hücre karışımı steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiştir.

10) Hücreler 7000 rpm'de 2 dk pellet haline getirilmiş ve süpernatant atılmıştır.

11) Hücre pelletleri 1 ml steril 1X PBS'te yeniden çözdürülmüştür.

12) Hücre süspansiyonundan içinde 50 µl steril deiyonize su bulunan yeni steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine ayrı ayrı 10 µl, 50 µl ve 100 µl aktarılmıştır.

13) Dikkatlice ve kısa süre karıştırılarak tüplerdeki hücre karışımından 5mM asetamid içeren Yeast Carbon Base (YCB) Agar ortamları üzerine ayrı ayrı aktarılmıştır.

14) Petriyer ters bir şekilde 30°C'de 3-4 gün koloni oluşumu gerçekleşene kadar inkübe edilmiştir

15) Birkaç bireysel koloni, 5mM asetamid içeren yeni YCB agar ortamlarına yayılmıştır. Petriler 1-2 gün 30  C'de inkübe edilmişlerdir.

16) Petrilerde zayıf koloni gelişimi gözlenmiştir.

4.6 *K. lactis* GG799'un rekombinant selülaz aktivite lm

K.lactis GG799, %1 CMC içeren YPGal'li ortama aktarılıp ve 30 C'de 250 rpm'de 48 saat inkübe edilmiştir. Üreme sonucunda, her gün 1'er ml paralel örnekler alınmıştır. Örnekler 10.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve selülaz aktivite ölümleri, dinitrosalisilik asit metodu (DNS) (Miller et al., 1960), baz alınarak gerçekleştirilmiştir (Başlık., 3.2.4.1). Selülaz enzim aktivitesi, 2. günde 50,4 U/L, 3. günde ise 44,7 U/L olarak lmlmştir.

5. TARTIŞMA

Çalışmada, Eski Foça mantar çiftliği kompostundan elde etmiş olduğumuz izolat modifiye TA ortamında geliştirilmiştir. Bununla birlikte, elde edilen izolatlar, CMC içeren agarlara spotlama şeklinde ekilmiştir. Kongo red ve gram iyodür tarama metodlarıyla boyanarak koloniler etrafında açık, geniş bir yüzeye yayılmış sarı renkli zonlar gözlenmiştir. Bu zonların varlığı izolatumuzun ekstraselüler selüloz enzimlerini salgıladığının göstergesi olup selüloz pozitif olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızda, kullandığımız izolatum, moleküler tanılaması için ZR Fungal/Bakteriyel DNA Kiti (ZymoResearch, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak genomik DNA'sı izole edilmiştir. İzole edilen DNA, evrensel primerler F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3' ve R: 3'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -5' kullanılarak PZR aracılığıyla çoğaltılmış ve 16S rDNA baz dizisi, Gen Bankası'ndaki 16S rDNA dizileriyle karşılaştırılmış ve % 99 oranında *Thermobifida fusca* YX suşu ile benzerliği saptanmış ve *Thermobifida fusca* EFTS 7A olarak adlandırılmıştır.

Thermobifida fusca YX, kendi kendine ısınma potansiyeline sahip mantar kompostları gibi organik materyallerde ve yaklaşık 55 °C'de optimum gelişme göstermektedir. Ayrıca, bitki hücre duvarını degrade edebilen 36 glikosid hidrolazı eksprese etme kapasitesi bulunmaktadır. Bu gibi biyoteknolojik potansiyelleri nedeniyle, genomu çıkartılmış, altı selüloz tanılanmış ve saflaştırılmıştır. Bunların üçü, ekstraselüler endoglukanaz, Cel9B, Cel6A ve Cel5A; ikisi ekzoglukanaz Cel6B ve Cel48A' dir. Bir diğeri ise, hem endoglukanaz hem de ekzoglukanaz aktivitesi gösteren Cel9A'dır. Bununla birlikte, xy111A ve xy110B olmak üzere iki ksilanaz transkripte etmektedir (Lykidis et, al., 2007). Bu enzimlerin varlığı, özellikle lignoselülozik materyalden, biyoetanol üretimi için oldukça önem taşımaktadır. Çünkü *T. fusca*'daki selülozlar, selülozu sellobiyoza ardından glukoz ve diğere şekerlere çevirebilecek bir potansiyele sahiptir. *T.fusca*, çok sayıda ekstraselüler enzim salgılaması, termostabil olması ve geniş bir pH aralığında aktivite göstermesi nedeniyle kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu gibi potansiyeli nedeniyle, *T. fusca* EFTS 7A suşuna ait selülozların, indüklendiği koşulların belirlenmesi, optimum üreme ve

aktivite gösterdiği parametrelerinin tespit edilebilmesi için farklı koşullar geliştirilmiş ve optimize edilmiştir.

Selüloz üretim çalışmalarında, selüloolitik aktivite taramalarında kullanılan modifiye TA ortamı baz alınmıştır. Bu besiyerinde bulunan tüm karbon kaynakları çıkarılarak, yerlerine aynı oranda maltoz, fruktoz, nişasta, gliserol, ksilan, karboksimetil selüloz, avicel ve glikoz eklenerek selüloz aktivitesindeki değişim araştırılmıştır. Maltoz varlığında, selüloz transkripte eden enzimlerin indüklenmediği görülmüştür. En yüksek değerler, karbon kaynağı olarak avicel ve CMC substratının kullanılmasıyla elde edilmiştir. Aktiviteler, avicel varlığında 7.günde 99,3 U/L , CMC varlığında 7.günde 37,8 U/L olarak hesaplanmıştır. *T.fusca* ER1 suşuna ait bir çalışmada, en yüksek selüloz aktivitesinin %0,5'lik Solka Flocc (yüksek oranda saflaştırılmış çözümlü toz selüloz) ortamında 1,84 U/mL, aynı oranda CMC içeren ortamda ise 0,13 U/mL olduğu ifade edilmiştir (Spiridonov and Wilson, 1998). *T. fusca* BAA-629 suşuna ait en yüksek endoglukanaz aktivitesinin, %1 sellobiyoz içeren 200rpm'lik çalkalamalı erleninde 1,41 U/mL olduğu belirtilmiştir. Çalışmada, yüksek çalkalama hızının aktiviteyi olumsuz etkilediği vurgulanmaktadır (Deng and Fong, 2010).

T. fusca EFTS 7A, farklı karbon kaynakları yanı sıra farklı pH koşullarında geliştirilmiştir. En yüksek aktivite 6.günde pH 7,0' de elde edilmiş olup pH 5' de bir aktivite görülmemiştir. Bununla birlikte en yüksek diğer aktiviteler sırasıyla 6.günde pH 8,0'de 22 U/L, pH 9,0'da 16,4 olarak belirlenmiştir. Böylelikle, bu çalışmamız *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın geniş bir pH spektrumunda aktivite gösterdiğini literatürdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi desteklemektedir (Wang and Xia, 2008).

T. fusca EFTS 7A pepton, yeast ekstrakt, kazein, beef ekstrakt ve amonyum sülfat gibi farklı azot kaynaklarında geliştirilmiş olup pepton varlığı dışında herhangi bir aktivite göstermemiştir. *T. fusca* optimum parametrelerin sağlandığı diğer tüm koşullar varlığında geliştirilmiştir. Bunun sonucunda en yüksek selüloz aktivitesi CMC substratı ile 7.gününde 80,2 U/L ve Avicel substratı varlığında 7.günde 230,6 U/L olarak belirlenmiştir.

T. fusca EFTS 7A, modifiye termoaktinomiset içeren ortamlarda tek karbon kaynağı maltoz, fruktoz, nişasta, gliserol, ksilan, karboksimetil selüloz, avicel ve glikoz olacak şekilde geliştirilip ksilanaz aktiviteleri ölçülmüştür. En yüksek aktivite, 6.günde birchwood ksilan içeren ortamda 214 U/L olarak ölçülmüştür. Ayrıca, farklı pH ortamlarında ksilanaz aktivite ölçülmüş ve en yüksek enzim aktivitesi, 6.günde pH 7,0'de 197 U/L olarak ölçülmüştür. Ardından, *T. fusca* EFTS 7A, optimum parametrelerin sağlandığı diğer tüm koşullar varlığında geliştirilmiştir. Bunun sonucunda, en yüksek ksilanaz aktivitesinin, ksilan substratı varlığında pH 7,0'de 7.günde 1350,6 U/L olduğu görülmüştür. *T. fusca* NTU22 suşu, %2 şeker kamışı posası ve mısır püskülü gibi tarım atıkları içeren ortamlarda geliştirilmiş, ksilanaz aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Aktivitelerin sırasıyla, 14 U/ml ve 1,31 U/ml olarak ölçüldüğü ve karbon kaynağı olarak kullanılan ortamların ksilanaz üretimi üzerinde önemli indükleyiciler olduğu belirtilmiştir (Yang et al., 2007).

T. fusca 'nın literatürden edindiğimiz bilgilere göre intraselüler β -glukosidaz aktivitesi ölçülmüştür (Spiridonov and Wilson, 2001). Fakat uygulamalarımız sonucunda *T. fusca* EFTS 7A suşunda intraselüler β -glukosidaz aktivitesi saptanamamıştır. Bunun sonucunda süpernatanttan alınan örneklerle ekstraselüler β -glukosidaz aktivite denemesi gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucunda gliserol ve sellobiyoz içeren ortamlarda en yüksek aktivite 6.gün de 203,3 U/L, sellobiyoz varlığında ise 5.gün de 133,1 U/L olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, modifiye termoaktinomiset ortamında geliştirilen *Thermobifida* EFTS 7A izolatından, ZR Fungal/Bakteriyal DNA izolasyon kiti (Zymo Research) kullanılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Klonlama için *K.lactis* protein ekspresyon kiti kullanılmıştır. *K.lactis* protein ekspresyon kitinde, protein salgısının gerçekleştirebilmesi için ilgili gen pKLAC2 vektörünün downstreaminde bulunan *K.lactis* α -mating faktör domainine klonlanmalıdır. α -mating domain, maya salgı yolizi aracılığıyla füzyon proteinlerinin verimli bir şekilde taşınmasında görev almaktadır. Bir α -mating füzyon proteini, golgideki Kex proteaz ve endoplazmik retikulumdaki sinyal peptidaz aracılığıyla art arda işlemlerden geçip büyüme ortamına

salgılanmaktadır. Bu nedenle, pKLAC2 kullanılarak protein salgılanabilmesi, vektördeki α -mating sekresyon domain varlığında ve ilgili proteinin arasına bir füzyon oluşturulmasıyla başarılabilir. Bunu gerçekleştirebilmek için ilgili bir gen ya da açık okuma çerçevesi pKLAC2 içine yerleştirilmelidir. Bu durumda, ilgili proteinin N-terminusu ve α -mating faktör domain arasındaki kesişim noktasında bir Kex proteaz işleme bölgesine gereksinim duyulmaktadır. Yani, füzyon proteinlerinin, golgide kex proteaz ile işlenebilmesi ve α -MF domainine birleştirilebilmesi için iki strateji bulunmaktadır. Kit prosedüründe bulunan ikinci stratejinin, klonlanacak gen bölgesine uygunluğu nedeniyle primerlerimiz bu strateji göz önünde bulundurularak dizayn edilmiştir. Primerler, klonlanacak tfu_0901' in XhoI bölgesini içermesi nedeniyle pKLAC2 vektöründe bulunan çoklu kesim bölgesindeki NotI (forward primerdeki /0901f-klac) ve BamHI (reverse primer/ 0901R-klac) kesim bölgelerini içerecek şekilde tasarlanmış ve organizmanın yüksek G-C içeriği göz önünde bulundurulmuştur.

Klonlama stratejileri dikkate alınarak tasarlanan bu primer çiftinin 0901f-klac 5' **GCGGCCGC**ATGGCGAAATCCCCGCCCG(NotI) ve 0901R-klac 5' GCCGGAT**CCTAGG**ACTGGAGCTTGCTCCGCA(BamHI)) kırmızı ile belirlenen kısımları restriksiyon enzimleri tarafından kesim yapılacak bölgeleri içermektedir. Bu primer çifti yardımıyla, *Thermobifida fusca* EFTS 7A' nın genomik DNA' sından klonlanmak istenen gen bölgesi, PZR aracılığıyla çoğaltılmıştır. PZR ürünü, PCR purification kit (ThermoScientific, USA) ile saflaştırılıp jel elektroforezinde yürürtülmüş ve klonlanmak istenen bölgenin büyüklüğüne yakın olduğu gözlenmiştir. PZR ürününü içeren bu bölge jelden GeneJet Gel Extraction Kiti (ThermoScientific) kullanılarak izole edilip RefGen gen araştırmaları ve biyoteknoloji merkezine gönderilmiştir. Yapılan dizi analizi çalışmaları, çoğalttığımız bölgenin klonlamak istediğimiz tfu_0901 ile homoloji gösterdiğini kanıtlamıştır. Elde edilen PCR ürünü ve pKLAC2 vektörü, yapışkan uç oluşturmak için amacıyla NotI ve BamHI ile kesilmiştir. Bu reaksiyon için gerekli olan yaklaşık 0,5 μ g PCR ürün miktarı 14,2 mikrolitre (35ng/ μ l) ile sağlanmıştır. İnkübasyon sonucunda, her iki kesim ürünü de GeneJET Purification Kit ile üretici firmanın kullanım talimatlarına göre saflaştırılmıştır. Saflaştırma ürünlerinin miktarı, nanofotometre ile vektör pKLAC2 32 ng ve PZR ürünü 20 ng olarak ölçülmüştür. Kit içeriğinde, ligasyon aşaması için, pKLAC2 vektöründen

60 ng ve PZR ürününden 20 ng istenmektedir. Bu miktarlar, pKLAC2 vektöründen 1,8 µl (32ng) ve PZR ürününden 1 µl (20 ng) eklenerek sağlanmıştır. Bu işlemle birlikte, PZR ürününün pKLAC2 vektörüne aktarımı tamamlanmıştır. Böylece tfu_0901 gen bölgesini içeren dairesel bir pKLAC2 vektörü elde edilmiştir. Vektör, GeneJET Purification Kit ile tekrar saflaştırılmıştır. Klonu içeren dairesel vektörün, linearizasyonu için, kit protokolünde 2 µg pKLAC2 istenmektedir. Fakat saflaştırma sonucu elde ettiğimiz miktar 0,78 µg vektördür. Bu nedenle, yaklaşık 2,5 kat daha az pKLAC2 vektörü, BstXI endonükleaz ile kesilerek lineerleştirilmiştir.

Klonlama işleminin son basamağında, kompetent *K. lactis* GG799 hücrelerine transformasyon aşaması için gerekli olan, 1µg lineerleştirilmiş pKLAC2 vektörü sağlanamamıştır. Kit protokolünde, aktarılacak lineerleştirilmiş ekspresyon kaseti miktarın 15µl'yi aşmaması istenmiştir. Saflaştırma sonucu, geri kazanım miktarlarının, düşük olması nedeniyle kompetent hücrelere, transformasyon aşaması için lineer pKLAC vektöründen 0,17 µg aktarılabilmiştir. Lineer vektör, *K. lactis* GG799 hücrelerine NEB Maya Transformasyon Reaktifi kullanılarak kimyasal transformasyon ile aktarılmıştır. İnkübasyon sonucu, tüplerde bulunan farklı oranlardaki hücre karışımları, 5mM asetamid içeren Yeast Carbon Base (YCB) Agar ortamları üzerine ayrı ayrı ekilmiştir. Petriler, 30°C'de 3-4 gün koloni oluşumu gerçekleşene kadar inkübe edilmiştir. Gelişen kolonilerden, seçilen birkaç bireysel koloni, 5mM asetamid içeren yeni YCB agar ortamlarına aktarılmıştır. Bu ortamda, zayıf birkaç koloni gelişimi görülmüştür. Asetamid içeren bu ortam, tfu-0901 genini içeren pKLAC2 vektöründe bulunan asetamidaz geni sayesinde ortamdaki asetamidi amonyağa çevirip nitrojen kaynağı olarak kullanabilen mayaların seçilmesine olanak tanımaktadır. Petrilerde gelişmiş *K. lactis* GG799'a ait tek koloniler, CMC içeren zenginleştirme ortamında geliştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucu, selülaz aktivitesinin 2. günde 50,4 U/L, 3. günde ise 44,7 U/L olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen rekombinant enzim aktivitesinin, *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın yabancı enzim aktivitesinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, eksprese edilen rekombinant enzimlerin intraselüler birikiminden kaynaklanabileceği ve rekombinant selülazın *K. lactis* GG799'a ait ekspresyon sistemi tarafından iyi bir

şekilde tanımlanmayan bir sinyal peptid taşıması nedeniyle gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇLAR

Akdeniz' e komsu olan ülkelerin son 30 yıl içerisinde enerji talepleri ikiye katlanmış olup toplam yenilenebilir enerji kapasitelerinin %21'ini biyomas oluşturmaktadır (Faraco and Hadar, 2011). Akdeniz bölgesinde, biyoetanol yakıtının büyük çapta verimli bir şekilde üretiminde hammadde olarak lignoselülozun kullanımı, artan enerji talebi ve küresel iklim değişikliğinin etkilerini azaltmak için önem taşımaktadır. Lignoselülozik biyomas, biyoetanol gibi değerli ürünlerin geniş çaplı üretimi için oldukça ilgi çekici bir materyaldir. Lignoselülozik biyomas, tarım alanları ormanlar endüstriyel kaynaklar ve kentsel atıklardan elde edilen en yaygın bulunan kaynaklardandır. Lignoselülozik materyallerin kullanımı, tarımsal alanların, gıda ve yem üretimi ile enerji ve hammadde üretimi için kullanımı konusundaki ayrışmayı da minimize edecektir (Lynd et, al., 2009). Bu hammaddeler, klasik tarımsal kaynaklara oranla daha az enerji, pestisit ve gübre gereksinimleri nedeniyle daha ucuzdur. Bununla birlikte selülozik biyoyakıtlar, varolan teknolojilerle yüksek fiyatlara üretildikleri için henüz diğer fosil yakıtlara alternatif olarak görülmemektedirler (Lynd et, al., 2008).

Etanol üretimi için selülozun fermente edilebilir şekerlere çevrimi günümüzde çeşitli mikroorganizmalardan elde edilen selülazlar aracılığıyla enzimatik olarak gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle, selülazlar dünya çapında, biyoyakıtlar, gıda işleme endüstrisi, deterjan endüstrisi, pamuk işleme ve kağıt geri dönüşümü gibi kullanım alanları nedeniyle üçüncü en büyük endüstriyel enzim grubudur. Geniş çaplı selülaz üretimi için mantarlar ve bakteriler üzerinde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bugüne kadar, daha büyük çaplı daha az kompleks ekstraselüler fungal selülazların klonlanması ve hızla büyüyen bakteriyel konaklarda rekombinant proteinleri üretmeleri üzerine çalışmalar yürütülmekteydi. Fakat bu çalışmalar günümüzde, hızla büyüyen, biyoçevrim proseslerinde zorlu koşullarda hayatta kalabilen, stabil ve multienzim kompleksleri nedeniyle bakteriler tarafına doğru ağırlık kazanmaktadır. Bakterilerin, üreme kapasitelerinin mantarlardan daha fazla olması onları selülaz üretimi için önemli potansiyeller haline dönüştürmektedir. Selülaz üreten önemli bakteriler, aktinomisetlerden *Thermobifida fusca*, *Streptomyces thermodiastaticus*,

Thermomonospora curvata , *Streptomyces viridosporus* ve *S. setonii* gibi streptomyces sp. diğer turleri gibi aktinomisetler selulolitik aktivite gosteren turler olarak tanımlanmışlardır (Amore et, al., 2012).

Bu çalışmada yeni selulolitik aktinomisetlerin izolasyonu, selulolitik aktivite gosteren potansiyel enzimlerin taranması ve farklı koşullardaki optimum aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Mantar kompostundan izole ettiğimiz *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın aktif bir selülaz üreticisi olduğu görülmüştür. Maksimum aktivite gösterdiği aralıklar belirlenmiştir. Enzim aktivitesini arttırmak ve *Thermobifida fusca* gibi yüksek sıcaklıklarda büyüyen mikroorganizmaları daha düşük sıcaklıkta geliştirmek ve böylece enerji tasarrufu sağlamak için bir mayada ifade edilmesi amaçlanmıştır. Taranmış olan enzim gruplarından, klonlanmak üzere endoglukanaz grubu seçilmiştir. Bu grup, daha önceki çalışmalarda genomu çıkartılmış olan *Thermobifida fusca* YX mikroorganizması, referans alınarak belirlenmiştir. Endoglukanaz olarak tanımlanan 1401 bç büyüklüğündeki tfu-0901 gen bölgesi, ilk defa bu çalışma için sentezlenen primerler ve PZR aracılığıyla başarılı bir izole edilmiştir. İzole edilen gen bölgesi, pKLAC2 vektörü aracılığıyla kompetent bir maya olan *K.lactis* GG799 transforme edilmiştir. Seçici besiyerinde zayıf koloniyel gelişim gözlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucu, elde edilen rekombinant enzim aktivitesinin, *Thermobifida fusca* EFTS 7A'nın yabancı enzim aktivitesinden daha düşük olduğu gözlenmiştir

7. ÖNERİLER

İzolatımızın sahip olduğu çoklu ekstraselüler enzimlerin taranması, optimum aktivite gösterdikleri koşulların belirlenmesi, aktivite arttırımı için yeni konakların ve aktarım sistemlerinin belirlenmesi üçüncü endüstriyel enzim grubu olan selülozların düşük maliyetle elde edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Endüstriyel alanda kullanılması amaçlanan selüloz grubunun, selüloolitik biyoması parçalama kapasiteleri farklı enzim kombinasyonları varlığında araştırılmalı, optimum enzim grupları ve ortam koşulları belirlenmelidir. Kullanılacak endüstriyel alanın, özelliklerine göre aktiviteye etki eden faktörler tespit edilmelidir. Ardından, saflaştırılarak patent alma sürecine gidilmelidir.

Çalışmamızda, ilgili geni içeren vektörün saflaştırma işlemleri sonucunda kit tarafından istenen miktarları karşılayamadığı görülmüştür. Lineerleştirme aşamaları, PZR sonrası ve jelde görüntüleme ardından yapılan saflaştırma işlemlerinden sonra, geri kazanım çalışmalarına alternatif moleküler yöntemlerin geliştirilmesi konusundaki yaklaşımların klonlama çalışmalarındaki başarıyı önemli derecede etkileyeceği düşünülmektedir. Ayrıca, *Thermobifida fusca* EFTS 7A gibi G-C' ce zengin organizmalara, spesifik klonlama kiti tasarımlarının yapılması bu özellikteki organizmalara ait gen bölgelerinin verimli bir şekilde klonlanmasını sağlayacaktır.

İzolatımız tarafından eksprese edilen ekstraselüler beta-glukosidazın aktivitesini arttırmaya yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi, selülozik biyomasın parçalanmasının son aşaması olması açısından da önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdou, L., Boileau, C., De Philip, P., Pagés, S., Fiérobe, H.P. and Tardif, C.,** 2008, Transcriptional regulation of the *Clostridium cellulolyticum* cip-cel operon: a complex mechanism involving a catabolite-responsive element, *J Bacteriol*, 190, 1499-1506p.
- Akmaz, S.,** 2001, Selülozun enzimli hidroliz yoluyla glukoza dönüştürülmesi ve tepkime kinetiğinin incelenmesi, İstanbul Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilimdalı Proses ve Reaktör Tasarımı Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul
- Alfredsson, G.A, Kristjansson, J.K., Hjorleifsdottir, T.S.. and Stetter, K.O.,** 1988 *Rhodothermus marinus*, a thermophilic, halophilic bacterium from submarine hot springs in Iceland, *J Gen Microbiol*, 134, 299-306p.
- Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J.,** 2010, Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review, *Bioresour Technol*, 2010, 101, 4851-4861p.
- Amore, A., Pepe, O., Ventrino, V., Birolo, L., Giangrande, C. and Faraco V.,** 2012, Cloning and recombinant expression of a cellulase from the cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost, *Microbial Cell Factories*, Italy, 11, 164p.
- Anish, R., Rahman, M.S. and Rao, M.,** 2006, Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. *Biotechnol Bioeng* , 96, 48-56p.
- Antonopoulou, G., Gavala, H.N., Skiadas, I.V., Angelopoulos, K., and Lyberatos, G.,** 2008, Biofuels Generation from Sweet Sorghum: Fermentative Hydrogen Production and Anaerobic of the Remaining Biomass, *Bioresource Technology*,(99), 110-11p.
- Armand, S., Drouillard, S., Schulein, M., Henrissat, B. and Driguez, H.,** 1997, A bifunctionalized fluorogenic tetrasaccharide as a substrate to study cellulases, *J Bio and Chem*, 272, 2709-2713p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Atlas, R.M.**, 2010, Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition, CRC Taylor&Francis Group, Washington, 1712p.
- Ausubel, F.M., Brent, R. and Kingston, R.E.**, 1997, Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 3rd ed., N.Y. 1512 p.
- Avitia, C.I., Castellanos-Juárez, F.X., Sánchez, E., Téllez-Valencia, A., Fajardo-Cavazos, P., Nicholson, W.L. and Pedraza-Reyes, M.**, 2000, Temporal secretion of a multicellulolytic system in *Myxobacter* sp. AL-1. Molecular cloning and heterologous expression of cel 9 encoding a modular endocellulase clustered in an operon with cel 48, an exocellobiohydrolase gene. *Eur J Biochem*, 267, 7058-7064p.
- Ayestaran, B., Guadalupe, Z. and Leon, D.**, 2004, Quantification of major grape polysaccharides (*Tempranillo* v.) released by maceration enzymes during the fermentation process, *Anal Chim Acta*, 513, 29-39p.
- Bachmann, S, L., and McCarthy, A.J.**, 1991, Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*, *Appl. Environ. Microbiol*, 57, 2121–2130p.
- Bamforth, C.**, 1994, β -glucan and β -glucanases in malting and brewing: practical aspects, *Brew Dig*, 69,12-16p.
- Bai, Y., Wang, J., Zhang, Z., Shi, P., Huang, H., Feng, Y. and Yao, B.**, 2010, Extremely acidic beta-1,4-glucanase, CelA4, from thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with high protease resistance and potential as a pig feed additive. *J Agric Food Chem*, 58, 1970-1975p.
- Barnard, D., Casanueva, A., Tuffin, M. and Cowan, D.**, 2010, Extremophiles in biofuel synthesis, *Environmental Technology*, 31(8–9) ,871–888p.
- Bauer, M.W., Driskill, L.E., Calen, W., Snead, M.A., Mathur, E. and Kelly, R.M.**, 1999, An endoglucanase, EglA, from the hyperthermophilic archeon *Pyrococcus furiosus* hydrolyzes beta-1,4 bonds in mixed linkage (1–3), (1–4)-beta-D-glucans and cellulose, *J Bacteriol*, 181, 284-290p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bayer, E.A., Lamed, R. and Himmel, M.E.**, 2007, The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management, *Curr Op in Biotechnol*, 18, 237-245p.
- Beguin, P.**, 1990, Molecular biology of cellulose degradation, *Ann Rev Microbiol*, 44, 219-248p.
- Bergquist, P.L., Gibbs, M.D., Morris, D.D., Te'o, V.S.J., Saul, D.J., Morgan, H.W.**, 1999 Molecular diversity of thermophilic cellulolytic and hemicellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, 1999, 28, 99–110p.
- Bhat, M.K.**, 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology, *Biotechnol Adv*, 18, 355-383p.
- Bhat, M.K. and Hazlewood, G.P.**, 2001, Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases, *Enzymes in farm animal nutrition*, Oxon U.K, 1-11p.
- Blanco, J., Coque J. J., Velasco J., and Martin J. F.**, 1997, Cloning, expression in *Streptomyces lividans* and biochemical characterization of a thermostable endo-beta-1,4-xylanase of *Thermomonospora alba* ULJB1 with cellulose-binding ability, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 48, 208–217p.
- Bowman, G.R., Beauchemin, K A. and Shelford, J A.**, 2002, The proportion of the diet to which fibrolytic enzymes are added affects nutrient digestion by lactating dairy cows, *J Dairy Sci*, 85, 3420-3429p.
- 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, 248-254p.
- Brun, E., Moriaud, F., Gans, P., Blackledge, M. J., Barras, F. and Marion, D.**, 1997, Solution structure of the cellulose-binding domain of the endoglucanase Z secreted by *Erwinia chrysanthemi*, *Biochemistry*, 36, 16074-86p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bukhtojarov, F.E., Ustinov, B.B., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Gusakov, A.V., Okunev, O.N. and Sinitsyn, A.P.**, 2004, Cellulase complex of the fungus *Chrysosporium lucknowense*: isolation and characterization of endoglucanases and cellobiohydrolases, *Biochemistry (Mosc)*, 69, 542-551p.
- Cadena, E.M., Vidal, T. and Torres, A.L.**, 2010, Influence of the hexenuronic acid content on refining and ageing in eucalyptus TCF pulp, *Biores Technol*, 101, 3554-3560p.
- Cardona C., Quintero J. and Paz I.**, 2009, Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives, *Bioresour Technol*, 101, 4754-66p.
- Castro, D.A., Albuquerque D.C.M., Leite, S. and Pereira, N.Jr.**, 2010, Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37, 151-158p.
- Chen, B.Y. and Wang, H.T.**, 2008, Utility of enzymes from *Fibrobacter succinogenes* and *Prevotella ruminicola* as detergent additives, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2008, 35, 923-930p.
- Chesson, A. and Forsberg, C.**, 1997, Polysaccharide degradation by rumen microorganisms,. The Rumen Microbial Ecosystem, *Elsevier Applied Science*, London, 251-284p.
- Collmer, A. and Wilson, D.**, 1983, Cloning and expression of a *Thermomonospora YX* endocellulase gene in *E. coli*, *Biotechnology*, 1, 594-601p.
- Coughlan, M.**, 1985, Cellulases: production, properties and applications, *Biochem, Soc.Trans*, 13, 405.406p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Coutinho, P. and Henrissat, B.**, 1999, The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: Ohmiya K, Hayashi K, Sakka K, Kobayashi Y, Karita S, Kimura T editors. Genetics, biochemistry and ecology of cellulose degradation, Uni Publishers Co., Tokyo, Japan, 15–23p.
- Covert, S., Wymelenberg, A. and Cullen, D.**, 1992, Structure, organization, and transcription of a cellobiohydrolase gene cluster from *Phanerochaete chrysosporium*, Appl Environ Microbiol, 58, 2168-2175p.
- Den Haan, R., Rose, S.H., Lynd, L.R. and Van Zyl, W.H.**, 2007, Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Metab Eng, 9, 87–94p.
- Deng., Y. and Fong, S.**, 2010, Influence of culture aeration on the cellulase activity of *Thermobifida fusca*, Appl Microbiol Biotechnol, Richmond, USA, 85, 965–974p.
- Din, N., Gilkes, N., Tekant, B., Miller, R., Anthony, J., Warren, R.**, 1991, Nonhydrolytic disruption of cellulose fibres by the binding domain of a bacterial cellulose, Bio/Technology, 9, 1096-9p.
- Doi, R.H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y., and Han, S.O.**, 2003, Cellulosomes from mesophilic Bacteria, Journal of Bacteriology, 185, 5907-5914p.
- Driguez, H.**, 1997, Thiooligosaccharides in glycobiology, Topics Curt Chem, 187:85-116p.
- Dubordieu, D., Ribereau-Gayon, P., Fournet, B.**, 1981, Structure of the exocellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*. Carbohydr Res, 93,294-9p.
- Ducasse, M., Canal-Llauberes, R., de Lumley, M., Williams, P., Souquet, J., Fulcrand, H., Doco, T. and Cheynier, V.**, 2010, Effect of macerating enzyme treatment on the polyphenol and polysaccharide composition of red wines, Food Chem, 118, 369-376p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dülger, S.,** 2003, Gönen, Kestanbul ve Diyadin kaplıcalarından termofilik bakterilerin izolasyonu, moleküler yöntemlerle karakterizasyonu ve tanımlanması, K.T.Ü, Fenbilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon
- Ebringerová, A.,** 2005, Structural diversity and application potential of hemicelluloses, *Macromolecular Symposia*, Vol. 232, 1-12p.
- Eckert, K., Zielinski, F., Lo Leggio, L. and Schneider, E.,** 2002, Gene cloning, sequencing, and characterization of a family 9 endoglucanase (CelA) with an unusual pattern of activity from the thermoacidophile *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC27009, *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 428-436p.
- Galante, Y., De Conti, A. and Monteverdi, R.,** 1998, *Application of Trichoderma* enzymes in food and feed industries, In: Harman GF, Kubicek CP, editors, *Trichoderma and Gliocladium-Enzymes*, biological control and commercial applications, London: Taylor & Francis, 327-342p.
- Gama, F., Teixeira, J. and Mota, M.,** 1994, Cellulose morphology and enzymatic reactivity: a modified solute exclusion technique, *Biotechnol Bioeng*, 43, 381-387p.
- Ghangas, G. S., Y, J, Hu. and Wilson D.,** 1989, Cloning of a *Thermomonospora fusca* xylanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*, *J. Bacteriol*, 171, 2963–2969p.
- Ghangas, G. S. and Wilson. D.,** 1988, Cloning of the *Thermomonospora fusca* endoglucanase E2 gene in *Streptomyces lividans*: affinity purification and functional domains of the cloned gene product, *Appl. Environ. Microbiol*, 54, 2521–2526p.
- Ghose, T.K.,** (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268p.
- Gilkes, N., Kilburn, D., Miller, R. and Warren, R.,** 1991, Bacterial cellulases, *Bioresour Technol*, 36, 21-35p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, R. C. J. and Warren, R. A. J.**, 1991, Domains in microbial b-1,4-glycanases: Sequence conservation, function, and enzyme families, *Microbiol. Rev.* 55, 303-315p.
- Gnansounou, E.**, 2008, Fuel ethanol, In: Pandey A, editor, *Handbook of plant-based biofuels*, CRC Press, 57–72p.
- Gomes, I., Sarkar, P.K., Rahman, S.R., Rahim, M.A. and Gomes, D.J.**, 2007, Production of Cellulase from *Talaromyces emersonii* and evaluation of its application in eco-friendly functional finishing of jute-based fabrics. *Bangladesh J Microbiol*, 24, 109-114p.
- Gonzalez, I.N., Wanga, E.T., Ramirez, F., Romeroc, J.M. and Hernandez-Rodriguez, C.**, 2006, Characterization of Bacterial Community Associated to Biofilms of Corroded Oil Pipelines from The Southeast of Mexico, *Anaerobe*, 12, 122-133p.
- Grabber, JH.**, 2005, How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies, *Crop Sci* ,45, 820–31p.
- Graham, H. and Inborr, J.**, 1992, Application of xylanase-based enzymes in commercial pig and poultry production, *Xylan and Xylanases; Progress in Biotechnology*, Elsevier, Amsterdam, 535-538p.
- Guadalupe, Z., Palacios, A. and Ayestaran, B.**, 2007, Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines, *J Agric Food Chem*, 55, 4854-4862.
- Guo, Q., Zhang, W., Ma, L., Chen, Q., Chen, J., Zhang, H., Ruan, H. and He, G.**, 2010b, A food-grade industrial arming yeast expressing β -1,3-1,4-glucanase with enhanced thermal stability, *J Zhejiang Univ Sci B*, 11,41-51p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo, R., Ding, M., Zhang, S.L., Xu, G.J. and Zhao, F.K.,** 2008, Molecular cloning and characterization of two novel cellulase genes from the mollusk *Ampullaria crosseana*. *J Comp Physiol [B]*, Vol 178, 209-215p.
- Guo, X.M., Trably, E., Latrille, E., Carrere, H. and Steyer, J.P.,** 2010a, Hydrogen Production from Agricultural Waste by Dark Fermentation: A Review, *International Journal of Hydrogen Energy*, (35), 10660-10673p.
- Faraco, V. and Hadar, Y.,** 2011, The potential of lignocellulosic ethanol production in the Mediterranean basin, *Renew Sust Energ Rev*, 15, 252–266p.
- Haight, K.G. and Gump, B.H.,** 1994 The use of macerating enzymes in grape juice processing, *Am J Enol Vitic*, 45, 113-116p.
- Hakamada, Y., Hatada, Y., Ozawa, T., Ozaki, K., Kobayashi, T. And Ito, S.,** 2001, Identification of thermostabilizing residues in a *Bacillus* alkaline cellulase by construction of chimeras from mesophilic and thermostable enzymes and site-directed mutagenesis, *FEMS Microbiology Letters*, 195 (1), 67-72p.
- Hamelinck, C.N., Van Hooijdonk, G. and Faaij, A.P.C.,** 2005, Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term, *Biomass Bioen*, 28, 384-410p.
- Han, SO., Yukawa, H., Inui, M. and Doi, RH.,** 2003, Transcription of *Clostridium cellulovorans* cellulosomal cellulose and hemicellulase genes, *J Bacteriol*, 185, 2520-2527p.
- Haney, P.J., Badger, J.H., Buldak, G.L., Reich, C.I., Woese, C.R. and Olsen, G.,** 1999, Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic methanococcus species, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 3578-3583p.
- Henriksson, A. and Gatenholm, P.,** 2002, Surface properties of CTMP fibers modified with xylans, *Cellulose*, 2002, 9, 55-64p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Henrissat, B.**, 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem J*, 280, 309-316p.
- Henrissat, B. and Bairoch, A.**, 1993, New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem J*, 293, 781-788p.
- Henrissat, B. and Bairoch, A.**, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochem J*, 316, 695-696p.
- Henrissat, B., Teeri, TT. and Warren, RAJ.**, 1998, A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants, *FEBS Lett*, 425, 352-354p.
- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. and Tiffany, D.**, 2006, Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11206-11210p.
- Hinz, S.W.A., Pouvreau, L., Joosten, R., Bartels, J., Jonathan, M.C., Wery, J. and Schols, H.A.**, 2009, Hemicellulase production in *Chrysosporium lucknowense* C1, *J Cereal Sci*, 50, 1-6p.
- Hong, J., Tamaki, H., Yamamoto, K. and Kumagai, H.**, 2003, Cloning of a gene encoding a thermostable endo-beta-1,4-glucanase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast, *Biotechnol Lett*, 25, 657-661p.
- Hongpattarakere T.**, 2002, Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications, *J Sci Technol*, 24, 481-491p.
- Hreggvidsson, G.O., Kaiste E., Holst, O., Eggertsson, G., Palsdottir, A., Kristjansson, J.K.**, 1996, An extremely thermostable cellulase from the thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*, *Appl Environ Microbiol*, 62, 3047-3049p.
- Hu, Y. J. and Wilson, D.**, 1988, Cloning of *Thermomonospora fusca* genes coding for beta-1-4 endoglucanases E1, E2 and E5. *Gene*, 71, 331-337p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, G., Heitmann, J.A. and Rojas O.J.,** 2008, Feedstock pretreatments strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues, *BioResources*, 3, 270-94p.
- Huang, H.J., Ramaswamy, S., Tschirner, U.W. and Ramarao, B.V.,** 2008, A review of separation technologies in current and future biorefineries, *Separation and Purification Technology*, 62 (1), 1-21p.
- Huang, Y., Krauss, G., Cottaz, S., Driguez, H. and Lipps G.A.,** 2005, Highly acid-stable and thermostable endo-beta-glucanase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *Biochem J*, 385, 581-588p.
- Ichikawa, S., Ichihara, M., Ito, V., Isozaki, K., Kosugi, A. and Karita, S.,** 2019, Glucose production from cellulose through biological simultaneous enzyme production and saccharification using recombinant bacteria expressing the β -glucosidase gene, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol 127 (No. 3), Japan, 340-344p.
- Irwin, D.C., Spezio, M., Walker, L.P. and Wilson, D.B.,** 1993, Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects, *Biotechnol Bioeng*, 1993, 42, 1002–1013p.
- Irwin, D., Jung, E. and Wilson, D.,** 1994, Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase, *Appl. Environ. Microbiol*, 60, 763–770p.
- Irwin, D. C., S. Zhang. and Wilson, D.,** 2000, Cloning, expression and characterization of a family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*, *Eur. J. Biochem*, 267, 4988–4997p.
- Jagtap, S. and Rao, M.,** 2005, Purification and properties of a low molecular weight 1,4-beta-d-glucan glucohydrolase having one active site for carboxymethyl cellulose and xylan from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp., *Biochemist and Biophysics Resource Communication*, 329 (1), 111-116p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jervis, E. J., Haynes C.A. and Kilburn D.G.**, 1997, Surface diffusion of cellulases and their isolated binding domains on cellulose, *J. Biol. Chem.*, 272, 24016–24023p.
- Jorgensen H., Kristensen J.B. and Felby C.**, 2007, Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities, *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 119–134p.
- Jung, H. C., Park J. H., Park S. H., Lebeault J. M. and Pan, J. G.**, 1998, Expression of carboxymethylcellulase on the surface of *Escherichia coli* using *Pseudomonas syringae* ice nucleation protein, *Enzyme Microb. Technol.*, 22, 348–354p.
- Kachlany, S. C., P. J. Planet., DeSalle, R., Fine, D. H. and Figurski. D. H.**, 2001, Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plague to pond scum, *Trends Microbiol.*, 9, 429–437p.
- Karboune, S., Geraert, P.A. and Kermasha, S.**, 2008, Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*, *J Agric Food Chem.*, 56, 903-909p.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Hena, D., Dutt, S. and Gulati, A.**, 2008, A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine, *India*, 57, 503–507p.
- Kashefi, K. and Lovley, D.R.**, 2003, Extending the upper temperature limit for life, *Science*, 301 (5635) ,934p.
- Kim, K.C., Seung-Soo, Y., Oh Young, A. and Seong-Jun, K.**, 2003, Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase. *J Microbiol Biotechnol.*, 13, 1-8p.
- Kim, J. H., Irwin, D. and Wilson, D.**, 2004, Purification and characterization of *Thermobifida fusca* xylanase 10B, *Can. J. Microbiol.*, 50, 835–843p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, H.W. and Ishikawa, K.**, 2010, Complete saccharification of cellulose at high temperature using endocellulase and beta-glucosidase from *Pyrococcus* sp., *J Microbiol Biotechnol*, 20, 889-892p.
- Kim, J.O., Park, S.R., Lim, W.J., Ryu, S.K., Kim, M.K., and An, C.L.**, 2000, Cloning and characterization of thermostable endoglucanase (Cel8Y) from the hyperthermophilic *Aquifex aeolicus* VF5, *Biochem Biophys Res Commun*, 279, 420-426p.
- Kim, S. and Dale, B.E.**, 2004, Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass Bioen*, 26, 361-375p.
- Klarskov, K., Piens, K., Stahlberg, J., Hoj, P., Beeumen, J. and Claeysens, M.**, 1997, Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: identification of an active-site nucleophile and additional information on sequence including the glycosylation pattern of the core protein, *Carbohydr Res*, 304, 143-154p.
- Klemm, D., Schmauder, HP. and Heinze, T.**, 2002, In: *Biopolymers: Polysaccharides II*; Vandamme E, De Baets A, Steinbüchel A, editors, Weinheim, Wiley-VCH, 275-319p.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. and Bohn, A.**, 2005, Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material, Review. *Polym Sci*, 44, 3358-3393p.
- Klyosov, A.**, 1990, Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation, *Biochemistry*, 29,10577-10585p.
- Ko, H., G., Park, S., H., Kim, S., H., Park, H., G. and Park, W., M.**, 2005, Detection and Recovery of Hydrolytic Enzymes from Spent Compost of Four Mushroom Species *Folia Microbiol.* 50 (2), 103–106p.
- Kobayashi, Y., Shinkai, I.T. and Koike, S.**, 2008, Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion, *Folia Microbiol*, 53, 195-200p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, R., Singh, S. and Singh, O.V.**, 2008, Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35, 377–391p.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S.S. and Gupta, R.**, 2005, Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3, *Protein Expression and Purification*, 41, 38-44p.
- Lane, D. J.**, 1991, 16S / 23S / rRNA sequencing, *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., (Eds.), Wiley, New York, 115-117p.
- Lao, G., Ghangas, G.S., Jung, E.D. and Wilson, D.B.**, 1991, DNA sequences of three β -1,4-endoglucanase genes from *Thermomonospora fusca*, *J Bacteriol*, 173, 3397-3407p.
- Lee, M.H., Lee, C.H., Oh, T.K., Song, J.K. and Yoon, J.H.**, 2006, Isolation and characterization of a novel lipase from a metagenomic library of tidal flat sediments: Evidence for a new family of bacterial lipases, *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (11), 7406-7409p.
- Leschine, S.B.**, 1995, Cellulose degradation in anaerobic environments, *Annu Rev Microbiol*, 49, 399-426p.
- Lewis, G.E., Hunt, C.W., Sanchez, W.K., Treacher, R., Pritchard, G.T. and Feng, P.**, 1996, Effect of directfed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steer, *J Anim Sci*, 74, 3020-3028p.
- Liebl, W.**, 2001, Cellulolytic enzymes from *Thermotoga* species, *Methods Enzymol*, 330, 290-300p.
- Lin, Y. and Tanaka, S.**, 2006, Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, 627-642p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., Richardson, P., Wilson, D.B. and Kyrpides, N.,** 2007, Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX, *J Bacteriol*, 189, 2477–2486p.
- Lynd, L., Weimer, P., VanZyl, W. and Pretorius, I.,** 2002, Microbial cellulose utilization, Fundamentals and Biotechnology, *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 506-577p.
- Lynd, L.R., Larson, E., Greene, N., Laser, M., Sheehan, J., Dale, B.E., McLaughlin, S. and Wang, M.,** 2009, The role of biomass in America's energy future: framing the analysis, *Biofuels Bioprod Bioref*, 3, 113–123p.
- Lynd, L.R., Laser, M.S., Bransby, D., Dale, B.E., Davison, B., Hamilton, R., Himmel, M., Keller, M., McMillan, J.D., Sheehan, J. and Wyman, C.E.,** 2008, How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol* 26(2), 169–172p.
- Mandels M.,** 1975, Microbial sources of cellulases, In: Wilkie CR, editor, *Cellulose as a Chemical and Energy Resource*, New York: John Wiley and Sons, 81–105p.
- Marques, S., Pala, H., Alves, L., Amaral-Collaco, M.T., Gama, F.M. and Girio, F.M.,** 2003, Characterisation and application of glycanases secreted by *Aspergillus terreus* CCMI 498 and *Trichoderma viride* CCMI 84 for enzymatic deinking of mixed office waste papers, *J Biotechnol*, 100, 209-219p.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R. and et al.,** 2000, Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains, *J. Biotechnol*, 83 (3), 177-87p.
- Mayende, L., Brendan S.W. and Brett I.P.,** 2006, Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost, *Soil Biology & Biochemistry*, Vol 38, 2963-2966p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McGrath, C. E. and Wilson, D.**, 2006, Characterization of a *Thermobifida fusca* -1,3-glucanase (Lam81A) with a potential role in plant biomass degradation, *Biochemistry*, 45, 14094–14100p.
- Miettinen-Oinonen, A., Londesborough, J., Joutsjoki, V., Lantto, R. and Vehmaanperä, J.**, 2004, Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH, *Enzyme Microb Technol*, 34, 332-341p.
- Miller., G.L.**, 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal Chem*, 31, 426–428p.
- Miller, G.L.**, 1951, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*, 426-428p.
- Miller G.L., Blum R., Glennon W.E. and Burton A.L.**, 1960 Measurement of carboxymethyl cellulase activity, *Anal Biochem* 2, 127–132p.
- Mingardon, F., Chanal, A., Lopez-Contreras, A.M., Dray, C., Bayer, E.A. and Fierobe, H.P.**, 2007, Incorporation of fungal cellulases in bacterial minicellulosomes yields viable, synergistically acting cellulolytic complexes, *Appl Environ Microbiol*, 73, 3822–3832p.
- Morana, A., Maurelli, L., Ionata, E., Cara, La F., and Rossi, M.**, 2011, Cellulase Types and Action, Mechanism and Uses, *Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine*, Chapter 1, 26-27p,
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M.**, 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresour Technol*, 96, 673-686p.
- Münir, T.**, 2009, Potansiyel, endüstriyel ve biyoteknolojik uygulamaları, *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Lakkaz, Kısım 2, 22 ,65-103p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Notenboom, V., Birsan, C., Warren, R., Withers, S.G. and Rose, D.R.,** 1998, Exploring the cellulose/xylan specificity of the β -1,4-glycanase Cex from *Cellulomonas fimi* through crystallography and mutation, *Biochemistry*, 37, 4751-4758p.
- Obembe, O.O., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. and Vincken, J.P.,** 2006, Cellulosehemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres, *Biotechnology and Molecular Biology*, (1), 76-86p.
- O'Dwyer, J.P.,** 2005, Developing a fundamental understanding of biomass structural features responsible for enzymatic digestibility, University of Louisiana-Lafayette.
- Ohta, T., Horie, H., Matsu-ura, A., Kawai, F.,** 2018, Cloning, expression, and characterization of novel GH5 endoglucanases from *Thermobifida alba* AHK119, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 127 (5), Japan, 554-562p.
- Oksanen, J., Ahvenainen, J. and Home, S.,** 1985, Microbial cellulase for improving filtrability of wort and beer, *Proc Eur Brew Chem Helsinki*, 419-25p.
- Olawole, O.O., Evert, J., Richard, G.F., and Jean-Paul V.,** 2006, Cellulose-hemicellulose networks as target for in planta modification of the properties of natural fibres, *Biotechnology and Molecular Biology, Review*, Vol. 1 (3), 76-86p.
- Ouyang, J., Yan, M., Kong, D. and Xu, L.,** 2006, A complete protein pattern of cellulase and hemicellulase genes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Biotechnol J*, 1, 1266-1274p.
- Ozkose, E., Akyol, I., Kar, B., Comlekcioglu, U. ve Ekinci, MS.,** 2009, Expression of fungal cellulase gene in *Lactococcus lactis* to construct novel recombinant silage inoculants, *Folia Microbiol*, 54, 335-342p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parvez, S., Rajoka, M.I., Fariha, F. and Malik, K.A.,** 1994, Cloning of endoglucanase genes from *Cellulomonas biazotea* into *E. coli* and *S. cerevisiae* using shuttle vector YEp24, *Folia Microbiol*, 39, 251-254p.
- Payen, A.,** 1938, Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux, *CR Hebd Seances Acad Sci*, Vol 7, 1052–1056p.
- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J. M. and O'Neill, MA.,** 1996, Structural characterization of red wine RhamnoGalacturonan II, *Carbohydr Res*, 290,183–197p.
- Pellinen, J., Abuhasan, J. and Chang, H.M.,** 1989, Biological delignification of pulp by *Phanerochaete chrysosporium*, *J Biotechnol*, 10, 161-170p.
- Pendleton, B.,** 2000, Direct-fed microbial, enzyme, and forage additive compendium, The regulatory environment, In: Muirhea S, editor, Minnetonka, MN: The Miller Publishing Co.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., Rubia, T., Martinez, J.,** 2002, Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin, An Overview.
- Perlack, R.D., Wright, L., Turhollow, L.A., Graham, R.L., Stokes, B. and Erbach, D.C.,** 2005, Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply, Oak Ridge National Laboratory Report ORNL/TM-2005/66, Oak Ridge, TN: US Dept. of Energy.
- Pitulle, C., Yang, Y., Marchiani, M., Moore, E.R., Siefert, J.L., Aragno, M., Jurtschuk, P.J. and Fox, G.E.,** 1994, Phylogenetic position of the genus *Hydrogenobacter*. *Int J Syst Bacteriol*, 44, 620-626p.
- Plank, P.F.H. and Zent, J.R.,** 1993, Beer and wine production analysis, characterisation, and technological advances, Washington, American Chemical Society DC, 191-196p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qin, Y., Wei, X., Liu, X., Wang, T. and Qu, Y.**, 2008, Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability, *Prot Express Purific*, 58, 162-167p.
- Rainey, F.A., Donnison, A.M., Janssen, P.H., Saul, D., Rodrigo, A. and Bergquist, P.L.**, 1994, Description of *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* gen. nov., sp. nov: an obligately anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium. *FEMS Microbiol Lett*, 120, 263–266p.
- Ramalingam, C. and Harris, D.A.**, 2010, Xylanases and its Application in Food Industry: A Review, *Journal of Experimental Sciences*, Vol. 1(7), 01-11p.
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S.B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A., Rebello, S. and Pandey, A.**, 2018, Application of microbial enzymes in food industry, *Food technology and biotechnology*, 56(1), 16-30.
- Rickwood, D. and Hames, B.D.**, 1982, Gel Electrophoresis of Nucleic Acids a Practical Approach, IR Pres, Washington DC, 242 p.
- Rungrattanakasin, B., Premjet, S., Thanonkeo, S., Klanrit, P. and Thanonkeo, P.**, 2017, Cloning and expression of an endoglucanase gene from the thermotolerant fungus *Aspergillus fumigatus* DBINU-1 in *Kluyveromyces lactis*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, Thailand, 647-655p.
- Ryu, D.D.Y. and Mandels, M.**, 1980, Cellulase biosynthesis and applications, *Enzyme Microb. Technol*, 2, 91-102p.
- Sacchi, K.L., Bisson, L.F. and Adams, D.O.**, 2005, A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 197-206p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sadhu S., Maiti T.K.**, 2013, Cellulase production by Bacteria: A Review, *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 235-258p.
- Saha, B.C.**, 2003, Hemicellulose bioconversion, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 279–91p.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis T.**, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Vol 3, apendix B.12.
- Sarıkaya, A.**, 2004; DNA izolasyonu ve analizi, 55-80, Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler, Temizkan, G. ve Arda, N. (Eds), İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEEM), 2, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 342s.
- Shpigel, E., Roiz, L., Goren, R. and Shoseyov, O.**, 1998, Bacterial cellulose-binding domain modulates in vitro elongation of different plant cells, *Plant Physiol*, 117, 1185- 1194p.
- Shufang, W., Shaojun, D. and Zhongzheng, L.**, 2005, Function of endocellulase in the deinking process of mixed office waste paper, *Chem Ind Forest Prod*, 25, 87-90p.
- Soutschek-Bauer, E. and Staudenbauer, W.L.**, 1987, Synthesis and secretion of a heat-stable carboxymethylcellulose from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis* and *Bacillus stearothermophilus*, *Mol Gen Genet*, 208, 537-541p.
- Spink, C.H. and Chaires, J.B.**, 1999, Effects of hydration, ion release, and excluded volume on the melting of triplex and duplex DNA, *Biochemistry*, 38, 496-508p.
- Spiridonov, N. A. and Wilson, D.**, 1998, Regulation of Biosynthesis of Individual Cellulases in *Thermomonospora fusca*, *Journal of Bacteriology*, Vol 180(14), 3529-32p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Spiridonov, N. A. and Wilson, D.,** 1999, Characterization and cloning of celR, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*, *J. Biol. Chem*, 274,13127–13132p.
- Spiridonov, N. A. and Wilson, D.,** 2000, A celR mutation affecting transcription of cellulase genes in *Thermobifida fusca*, *J. Bacteriol*, 182, 252–255p.
- Spiridonov, N.A. and Wilson, D.,** 2001, Cloning and biochemical characterization of BglC, a beta-glucosidase from the cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca*, *Curr. Microbiol*, 42, 295–301p.
- Suhre, K. and Claverie J. M.,** 2003, Genomic correlates of hyperthermostability, an update, *J. Biol. Chem*, 278, 17198–17202p.
- Suurnakki, A., Oksanen, T., Kettunen, H. and Buchert, J.,** 2003, The effect of mannan on physical properties of ECF bleached softwood kraft fibre handsheets, *Nord Pulp Paper Res J*, 18, 429-435p.
- Takai, K., Nakamura, K., Toki, T., Tsunogai, U., Miyazaki, M., Miyazaki, J et al.,** 2008, Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 10949 10954p.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursahoğlu, M. ve Oğultekin, R.,** 1989, Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu, 3. Baskı, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teksirler Serisi No:55, İzmir, 260s.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S.,** 2007, MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599p.
- Temme, P., Warren, R., Miller, R.C., Kilburn, D.G. and Gilkes, N.R.,** 1995, Cellulose binding domains-classification and properties. In *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides*. Edited by Saddler JM, Penner MH. Washington, DC: American Chemical Society, 142-161p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tolner, B., Poolman, B. and Konings, W.N.**, 1997, Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures, *Comp. Biochem. Physiol*, 118A/3,423-428p.
- Tormo, J., Lamed, R., Chirino, A.J., Morag, E., Bayer, E.A., Shoham, Y. and Steitz, T.A.**, 1996, Crystal structure of a bacterial family-III cellulose-binding domain: a general mechanism for attachment to cellulose, *EMBO J*, 15, 5739- 5751p.
- Tsao, G.T.**, 1978, Fermentation substrates from cellulosic materials: production of fermentable sugars from cellulosic materials, *Ann. Rep. Ferment. Proc*, 21-21p.
- Ugwuanyi, J.O., Harvey, L.M. and McNeil, B.**, 2004, Protease and xylanase activities and thermophilic populations as potential process monitoring tools during thermophilic aerobic digestion, *J Chem Technol Biotechnol*, 79, 30–38p.
- Ulbrik, T.Y.L.**, 1991, Cellulolytic fermentation by *Clostridium thermocellum*, The Degree Master of Science in Chemical Engineering, Georgia Institute of Technology.
- Van Rensburg, P. and Van Zyl, W.H.**, 1998, Pretorius, IS. Engineering yeast for efficient cellulose degradation, 14, 67-76p.
- Van Wyk N., Den Haan R. and Van Zyl H.W.**, 2010, Heterologous co-production of *Thermobifida fusca* Cel9A with other cellulases in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 87(5), 1813-1820p.
- Van Zyl, W.H., Lynd, L.R., Den Haan, R. and McBride, J.E.**, 2007, Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*, *Adv Biochem Engin Biotechnol*, 108, 205–235p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M. and Pellerin, P.**, 2003, The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization, *Carbohydr Polym*, 54,439-447p.
- Villaverde, A. and Carrio, M.M.**, 2003, Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies, *Biotechnol Lett*, 25, 1385-1395p.
- Villetaz, J.C., Steiner, D. and Trogus, H.**, 1984, The use of a β -glucanase as an enzyme in wine clarification and filtration, *Am J Enol Vitic*, 35, 253-6p.
- Voget, S., Steele, H.L. and Streit, W.R.**, 2006, Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulose, *J Biotechnol*, 126, 26-36p.
- Wang, Q. and Xia, T.**, 2008, Enhancement of the activity and alkaline pH stability of *Thermobifida fusca* xylanase A by directed evolution, *Biotechnology Letters*, Vol 30, 937-44p.
- Watanabe, H. and Tokuda, G.**, 2001, Animal cellulases, *Cell Mol Life Sci*, 58, 1167-1178p.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.J. and Lane, D.J.**, 1991, 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *Journal of Bacteriology*, 173 (2): 697-703p.
- Wen, F., Sun, J. and Zhao, H.**, 2010, Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol, *Appl Environ Microbiol*, 76, 1251-1260p.
- Westermeier, R.**, 1997, *Electrophoresis in Practice: a Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separation*, VCH, Weinheim.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wicher, K.B., Abou-Hachem, M., Halldórsdóttir, S., Thorbjarnadóttir, S.H., Eggertsson, G. and Hreggvidsson, G.O.**, 2001, Deletion of a cytotoxic, N-terminal putative signal peptide results in a significant increase in production yields in *Escherichia coli* and improved specific activity of Cell12A from *Rhodothermus marinus*, *Appl Microbial Biotechnol*, 55, 578-584p.
- Williamson, G., Belshaw, N.J. and Williamson, M.P.**, 1992, O-glycosylation in *Aspergillus* glucoamylase, Conformation and role in binding, *Biochem. J*, 287,423-428p.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P.Jr., Fox, G.E., Deinhard, G. and Poralla, K.**, 1992, Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov., *Int J Syst Bacteriol*, 42, 263-269p.
- Wolfenden, R. and Snider, M. J.**, 2001, *Acc. Chem. Res*, 34, 938-945p.
- Woyengo, T.A., Sands, J.S., Guenter, W. and Nyachoti, C.M.**, 2008, Nutrient digestibility and performance responses of growing pigs fed phytase- and xylanase-supplemented wheat-based diets, *J Anim Sci*,86, 848-857p.
- Wyman, C.**, 1994, Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation, *Appl. Biochem Biotechnol*, 45/46, 897-915p.
- Xu, Y. and Foong, F.C.**, 2008, Characterization of a cellulose binding domain from *Clostridium cellulovorans* endoglucanase-xylanase D and its use as a fusion partner for soluble protein expression in *Escherichia coli*, *J Biotechnol*, 135, 319-325p.
- Xue, D., Lin, D., Gong, C., Peng, C. and Yao, S.**, 2017, Expression of a bifunctional cellulase with exoglucanase and endoglucanase activities to enhance the hydrolysis ability of cellulase from a marine *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, Hangzhou, Wuhan, China, Vol. 52, 115-122p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, H.C., Yang, F.S. and Liu, H.W.,** 2007, Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3955-59p.
- Yang, D., Weng, H., Wang, M., Xu, W., Li, Y. and Yang, H.,** 2010, Cloning and expression of a novel thermostable cellulose from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15, *Mol Biol Rep*, 2010, 37, 1923-1929p.
- Yang, Q., Zhan, H., Wang, S., Li, K. and Fu, S.,** 2008, Bio-modification of eucalyptus chemithermomechanical pulp, *Front. Chem Eng China*, 28-33p.
- Yingjuan, F., Menghua, Q. and Huiren, H.,** 2005, Effect of types and properties on the deinkability of wastepaper. *Trans Chin Pulp Paper*, 20, 155-159p.
- Zakpaa, H.D., Mak-Mensah, E.E. and Johnson, F.S.,** 2009, Production of bio-ethanol from corncobs using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and fermentation, *Afr J Biotechnol*, 8, 3018-3022p.
- Zambare, V., Zambare, A., Muthukumarappan, K. and Christopher, L.P.,** 2011, Biochemical characterization of thermophilic lignocellulose degrading enzymes and their potential for biomass bioprocessing, *International Journal of Energy and Environment*, 2(1): 99–112p.
- Zeng, R., Hu, Q., Yin, Huang, H., Yan, J., Gong, Z. and Yang, Z.,** 2016, Cloning a novel endo-1,4- β -D-glucanase gene from *Trichoderma virens* and heterologous expression in *E. coli*, *AMB Expr*, Wuhan, 6, 108p.
- Zhang, S., Lao, G. and Wilson, D,** 1995, Characterization of a *Thermomonospora fusca* exocellulase, *Biochemistry*, 34 (10), 3386–3395p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

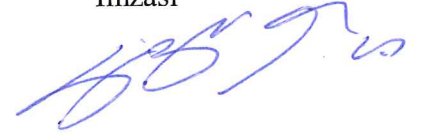
- Zhang, X.Z., Zhang, Z., Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Yang, Y and Zhang, Y.H.P.**, 2010, The noncellulosomal family 48 cellobiohydrolase from *Clostridium phytofermentans* ISDg: heterologous expression, characterization, and processivity, *Appl Microbiol Biotechnol*, 86, 525-533p.
- Zhang Y-H.P. and Lynd L.R.**, 2004, Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems, *Biotechnol. Bioeng*, 88, 797 – 824p.
- Zhang, Y.-H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R.**, 2006, Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, 24, 452-481p.
- Zhang, Y-HP., Hong. J. and Ye, X.**, 2009, Cellulase assays Methods, *Mol Biol*, 581:213–231p.
- Zhu, H., Yao, S. and Wang, S.**, 2010, MFA Signal peptide enhances the expression of cellulase eg1 gene in yeast, *Appl Biochem Biotechnol*, 162, 617-624p.
- Zhu, Y., Nishino, N., Kishida, Y. and Uchida, S.**, 1999, Ensiling characteristics and ruminal degradation of Italian ryegrass and lucerne silages treated with cell wall degrading enzymes, *J Sci Food Agric*, 79, 1987-1992p.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince öneri ve yardımlarıyla desteğini sürdüren danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail KARABOZ' a, konu seçiminde ve denemelerim süresinde desteklerini görüşlerini aldığım Sayın Doç. Dr. Ali KOÇYİĞİT'e çok teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca her zaman desteklerini hissettiğim sevgili aileme şükranlarımı sunarım.

12/07/ 2019

İmzası



Adı-Soyadı

Gizem VAR

ÖZGEÇMİŞ

24 Haziran 1985 yılında İzmir’ de doğmuştur. Orta öğrenimini, Bornova Anadolu Lisesi Almanca Fen/Matematik bölümünde tamamlamıştır. Lisans öğrenimini, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda tamamlamasının ardından Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. Yüksek lisans öğrenimi boyunca, İnenura Gıda Analiz Laboratuvarı bünyesinde; mikrobiyoloji laboratuvarı, kimyasal analizler laboratuvarında analist, moleküler biyoloji laboratuvarında birim yöneticiliği ve Ferrero’ da laboratuvar uzmanlığı yapmıştır.