RİZE AYDER KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, KSİLANAZ ENZİMİNİN *Geobacillus galactosidasius* BS61 BAKTERİSİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Bilge SARI

Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL
2016
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RİZE AYDER KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, KSİLANAZ ENZİMİNİN *Geobacillus galactosidasius* BS61 BAKTERİSİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Bilge SARI

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

RİZE AYDER KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, KSİLANAZ ENZİMİNİN *Geobacillus galactosidasius* BS61 BAKTERİSİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL danışmanlığında, BİLGE SARI tarafından hazırlanan bu çalışma 29./.06./.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı -Mikrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/~~oy çokluğu~~ (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL *İmza* :

Üye : Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU *İmza* :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ *İmza* :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 21.../07.../2016 tarih ve 29../..15..... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RİZE AYDER KAPLICALARINDAN ALINAN SU ÖRNEKLERİNDEN TERMOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU, İDENTİFİKASYONU, KSİLANAZ ENZİMİNİN *Geobacillus galactosidasius* BS61 BAKTERİSİNDEN SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Bilge SARI

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Mikrobiyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

Bu çalışmada, Rize Ayder kaplıcalarından alınan su örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen 11 suşun, *Bacillus licheniformis, Aeribacillus pallidus, B. thermoamylovorans, Brevibacillus borstelensis, B. brevis* ve *Geobacillus galactosidasius* türlerine ait olduğu belirlendi. Daha sonra ksilan katı besiyerinde, izolatların ksilanaz enzimi üretip üretmediklerine bakıldı ve sonuçta *G. galactosidasius* BS61 suşunun en büyük zona sahip olduğu görüldü. Bu bakteriden aseton çöktürmesi, DEAE- Selüloz ve Sephadeks-G100 kromatografisi yötemleri kullanılarak ksilanaz enzimi saflaştırıldı. SDS-PAGE sonucunda, enzimin moleküler ağırlığı 55 kDa olarak tespit edildi. K_m değeri 3,18 mg/mL, V_{max} değeri ise 123 U/mg protein olarak hesaplandı. Enzimin optimum pH'sı 7, sıcaklığı ise 60ºC olarak belirlendi. Enzimin çeşitli metal iyonları ve inhibitörlere karşı dayanıklılığı araştırıldı. Saf enzimin 4°C'de ki 168 saatlik inkübasyon sonrasında çalışılan tüm pH değerlerinde aktivitesini %50'nin üzerinde koruduğu tespit edildi. Ayrıca bazı metal iyonlarının enzim aktivitesini farklı şekillerde etkilediği belirlendi. *G. galactosidasius* BS61 suşundan saflaştırılan ksilanaz enziminin, optimum sıcaklık ve pH kararlılık verileri dikkate alındığında endüstriyel uygulamalarda kullanılabilme potansiyelinin yüksek olduğu sonucuna varıldı.

2016, 87 sayfa

Anahtar Kelimeler: Termofilik bakteri, 16S rRNA sekans analizi, BOX PCR, Klonlama, Ksilanaz, Saflaştırma, Karakterizasyon

ABSTRACT

Master Thesis

ISOLATION, IDENTIFICATION OF THERMOPHILIC BACTERIA TAKEN FROM RİZE AYDER THERMAL SPRINGS, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF XYLANASE ENZYME FROM *Geobacillus galactosidasius* BS61

Bilge SARI

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics
Department of Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL

In this study, isolation,identification and molecular characterization of thermophilic bacteria from water samples taken from Rize Ayder was carried out. The isolated 11 strains were determined as belonging to strains of *Bacillus licheniformis, Aeribacillus palidus, Bacillus thermoamylovorans, Brevibacillus borstelensis, Brevibacillus brevis* and *Geobacillus galactosidasius*. Then in the xylan medium, it is checked if the isolates produce xylanase enzymes or not and as a result, *G. galactosidasitus* BS61 strain were found to have the largest zone. Following, enzyme was purified by acetone precipitation, DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G100 chromatography. The molecular weight of the xylanase protein was determined 55kDa by the result of SDS-PAGE. K_m value was calculated as 3.18 mg/ml, while V_{max} was 123 U/mg protein. Optimum pH and temperature of the enzyme were 7 and 60°C. Attempts were made by various metal ions and inhibitors. When the optimum temperature and pH stability data are taken into consideration, it was concluded that the xylanases enzyme which is purified from *G. galactosidasitus* BS61 strain has high potential for industrial applications.

2016, 87 pages

Keywords: Thermophilic bacteria, 16S rRNA sequencing, BOX PCR, Cloning, Xylanase, Purification, Characterization

TEŞEKKÜR

Öncelikle gerek lisans, gerekse yüksek lisans öğrenimim boyunca bana inanan, engin bilgi ve deneyimleri ile bu yolda bana öncü olan, büyüklüğünü her alanda hissettiğim hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ADIGÜZEL'e,

Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN'a, deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Melda ŞİŞECİOĞLU'na, Sayın Yrd. Doç. Dr. Özlem FAİZ'e, Sayın Arş. Gör. Berna GENÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Lisans öğrenimimde danışmanlığımı yapmış, ailem gibi gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. Yağmur ÜNVER'e, Sayın Arş. Gör. Melike YILDIZ'a ve kurtarıcımız Sayın Yeliz DEMİR'e,

Sevincimde ve hüznümde sıkılmadan beni dinleyen, en zor anımda yardımlarını benden esirgemeyen Sayın Selma TARAKÇIOĞLU'na, Sayın Sümeyya ARSLAN'a, Sayın Damla RÜZGAR'a,

Arkadaşlık kelimesinin az kaldığı, can dostlarıma teşekkür ederim.

Son olarak her zaman cesaretini, kişiliğini, başarılarını örnek aldığım saygıdeğer babam Sayın Osman SARI'ya, anne-kız olmanın verdiği güçle, o güzel yüreğine sığındığım birtanecik annem Sayın Behice SARI'ya, gelip gidilen şehirler arasında beraber büyüyüp, beraber öğrendiğim canım kardeşim Sayın Ömer Necati SARI'ya ve başarılarıyla her zaman bizi gururlandıran biricik küçüğüm Sayın Gökalp SARI'ya her şey için teşekkür ederim.

Bilge SARI

Temmuz, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1.GİRİŞ 1
1.1. Termofilik Bakteriler 1
1.2. Enzimler ve Sınıflandırılması 3
1.3. Hücre Duvar Yapısı 5
1.3.1. Selüloz, hemiselüloz ve lignin 7
1.3.2. Ksilan 9
1.3.3. Ksilanazlar 11
1.3.4. Ksilanaz enziminin endüstriyel uygulama alanları 13
2. KAYNAK ÖZETLERİ 16
3. MATERYAL ve YÖNTEM 25
3.1. Materyal 25
3.1.1. Kullanılan cihazlar 25
3.1.2. Kullanılan çözeltiler 26
3.1.3. Kullanılan besiyerleri 31
3.1.4. Kullanılan kitler 33
3.2. Yöntem 33
3.2.1. Örneklerinin toplanması ve termofilik bakterilerin izolasyonu 33
3.2.2. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 34
3.2.2.a. Gram boyama 34
3.2.2.b. Endospor varlığının belirlenmesi 35
3.2.2.c. Bakterilerin yaşayabildikleri tuz konsantrasyonlarinin belirlenmesi 35
3.2.2.d. Bakterilerin yaşayabildikleri pH değerlerinin belirlenmesi 35

3.2.2.e.Bakterilerin Yaşayabildikleri Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi 36
3.2.2.f. Oksidaz testi 36
3.2.2.g. Katalaz testi 36
3.2.2.h. Nitrat testi 36
3.2.2.ı. Amilaz testi 37
3.2.2.i. Proteaz testi 37
3.2.2.j. Ksilanaz testi 37
3.2.2.k. Selülaz testi 38
3.2.3. Moleküler testler 38
3.2.3.a. Genomik DNA izolasyonu 38
3.2.3.b. 16S rRNA PCR işlemi 39
3.2.3.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi 40
3.2.3.d. Kompotent hücre hazırlanması 40
3.2.3.e. Ligasyon basamağı 41
3.2.3.f. Transformasyon basamağı 41
3.2.3.g. Kolonilerin seçilmesi ve sivi kültüre alinmasi 41
3.2.3.h. Koloni PCR 42
3.2.3.ı. Plazmit izolasyonu 43
3.2.3.i. Plazmit konsantrasyonunun belirlenmesi 44
3.2.3.j. BOX-PCR ile gen profillerinin belirlenmesi 44
3.2.3.k. BOX-PCR ürünlerinin elektroforezi 45
3.2.4.Enzim saflaştirilmasi ve karakterizasyonu çalışmaları 45
3.2.4.a.Ksilanaz enzimini üreten izolatlarin belirlenmesi 45
3.2.4.b. Sıvı besiyerinde enzim aktivitesinin belirlenmesi 46
3.2.4.c. Protein tayini 46
3.2.4.d.Saflaştırma Basamakları 47
3.2.4.e. Ksilanaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu 50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI 53
4.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu İle İlgili Sonuçlar 53
4.2. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 53
4.3. Moleküler Test Sonuçları 56

4.3.1. 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları 56
4.3.2. Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması 56
4.3.3. İzolatların 16S rRNA sekans analizine göre benzerlik oranları 58
4.3.4. Bakterilerin BOX- PCR analizleri 59
4.4. Ksilanaz Üretimi ve Saflaştırılması 60
4.4.1. Petride ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi 60
4.4.2. Ksilanaz enzim aktivitesinin hesaplanmasinda kullanilan ksiloz standart grafiği 61
4.4.3. Aseton çöktürmesi sonuçları 62
4.4.4. DEAE-Selüloz iyon değişim grafiği 62
4.4.5. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi grafiği 63
4.4.6. SDS-PAGE ile enzimin saflik kontrolü, molekül ağirliğinin tayini ve zimogram 64
4.5. Ksilanaz Enzimin Karakterizasyon Çalışmaları 66
4.5.1. Ksilanazın farklı substratlara karşi olan özgünlüğünün belirlenmesi 66
4.5.2. Ksilanaz enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi 66
4.5.3. Ksilanaz enzimin pH kararlılığı 67
4.5.4. Ksilanaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 68
4.5.6. Ksilanaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi 69
4.5.7. Ksilanaz enzimine metal iyonlarinin ve inhibitörlerinin etkisi 70
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 72
KAYNAKLAR 79
ÖZGEÇMİŞ 88

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	Absorbans
APS	Amonyum Persülfat
bç	Baz çifti
DEAE	Dietilaminoetil
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNS	Di nitro salisilikasit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EU	Enzim Ünitesi
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten sabiti
LB	Luria-Bertani
LB-A	Luria-Bertani Agar
M	Molarite
mA	Miliamper
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	Polimerase Chain Reaction
PER	Amonyum per sülfat
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
rpm	Santrifirüj rotorunun ve kanştırıcıların dakikadaki devir hızı
SDS-PAGE	Sodyumdodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
tRNA	Transfer RNA
µg	Mikrogram

µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Bitkilerin hücre çeper yapısı 6
Şekil 1.2. Selülozun moleküler yapısı 7
Şekil 1.3. Ligninin moleküler yapısı 8
Şekil 1.4. Ksilan molekülünün yapısı 10
Şekil 1.5. Ksilanın yapısının tam hidrolizinden sorumlu ksilanolitik enzimlerin etki bölgeleri 10
Şekil 1.6. Hücre çeperinde ksilan- selüloz bağlanma yapısı 14
Şekil 4.1. İzolatların 16S rRNA PCR agaroz jel görüntüsü 56
Şekil 4.2. Petride mavi-beyaz koloni görüntüsü 57
Şekil 4.3. İzolatların koloni PCR görüntüsü 57
Şekil 4.4. İzolatların filogenetik ağacı 59
Şekil 4.5. Bakterilerin BOX PCR jel görüntüleri 60
Şekil 4.6. Petride *G. galactosidasius* BS61 bakterisinin ksilanaz zon görüntüsü 61
Şekil 4.7. Ksiloz şekeri standart grafiği 62
Şekil 4.8. Ksilanaz enziminin DEAE-Selüloz iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırılması 63
Şekil 4.9. Ksilanaz enziminin Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması 64
Şekil 4.10 *Geobacillus galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüsü 65
Şekil 4.11. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz aktivitesinin substrat spesifikliği 66
Şekil 4.12. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz aktivitesinin pH ile değişimi 67
Şekil 4.13. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enziminin pH kararlılığı 68
Şekil 4.14. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi 69
Şekil 4.15. Ksilanaz aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği 69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bazı önemli endüstriyel enzimler ve kullanım alanları 5
Çizelge 1.2. Farklı lignoselülozik materyaldeki bileşenlerin oranları 6
Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları..... 55
Çizelge 4.2 Test izolatlarının 16S rRNA sekans analiz sonuçları 58
Çizelge 4.3. Ksilanaz enziminin Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatogarfisi sonucu elde edilen saflaştırma basamakları sonuçları 64
Çizelge 4.3. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi 70
Çizelge 4.4. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enzimi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi 71

1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalarda çoğunluğu protein yapısında olan, ihtiyaç duyulan tüm reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan, spesifik bölgeler içeren biyokatalizörlerdir (Pekin 1983). Reaksiyon sonrasında kimyasal yapılarında hiçbir değişiklik olmadan reaksiyonun olduğundan çok daha hızlı gerçekleşmesini sağlarlar (Lerner 2003). Doğal ortamları dışında ya da 'in vitro' olarak da fonksiyon gösterebilirler (Temiz 1999).

Enzim terimi ilk olarak Kuhne (1878) tarafından kullanılmış ve Eduard Buchner hücreden enzimi 19 yıl sonra ancak ekstrakte edebilmiştir (Paule and Gübitz 2003). İnsanlık çok eski yıllardan beri ekmek, peynir, yoğurt, sirke gibi fermente ürünlerin üretiminde enzimlerden faydalanmıştır. Daha sonra gelişen teknikler ve oluşan bilinçlenme ile birlikte bilim insanları enzimleri saflaştırmaya ve biyoteknolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanmaya başlamışlardır (Sarıkaya 1995). Kullanım alanlarının geniş olmasının yanı sıra enzimler, bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan kolayca elde edilebilmektedir. Özellikle önemli enzim rezerverleri olarak kullanılan mikroorganizmalar kısa sürede çok hızlı büyümeleri, gelişim için ortam şartlarının kolay kontrolü, daha az maliyet ve son ürün oluşturmalarından dolayı bilim insanları tarafından yaygın bir şekilde tercih edilmektedir (Temiz 1999). Ayrıca immobilize enzim çalışmalarında kullanılan mikrobiyal enzimlerin daha uzun süre suda çözünmeyen matrikslerle kullanılabildiği görülmüştür (Gümüşel 2002).

1.1. Termofilik Bakteriler

Mikroorganizmalardan enzim kaynağı olarak en çok tercih edilen bakteriler, yaşayabildikleri optimum sıcaklık aralıklarına göre psikrofil, mezofil ve termofil olarak üç gruba ayrılırlar. -10°C'ye kadar yaşayabilen psikrofillerin optimum gelişim sıcaklığı 15°C dir. İkinci grup olan mezofiller 20-45°C aralığında yaşamakta iken son grup olan termofilikler ise 50°C ve üstünde yaşayabilme kapasitesine sahip olan türlerdir (Brock 2013). Termofiller olarak bahsettiğimiz bakteriler ekstremofilik ailesine dâhildir.

Ekstremofilik ailesi, canlı için en zor koşul denilebilecek şartlara ayak uyduran canlı gruplarını içerirler. 0-3 veya 9-12 gibi zorlayıcı pH değerlerinde, 100-120°C gibi protein yapısını bozabilecek sıcaklıklarda, hatta %5-30 tuz konsantrasyonlarında yaşayabilirler (Niehaus *et al.* 1999). Bu canlılar termofilik, asidofilik, halofilik, alkolifik gibi isimler alırlar. Biyoteknolojik amaçlı kullanılmak istenen enzimlerin dayanıklı olması gerektiği düşünüldüğünde termo-asidofiliklerin ve -alkalifiklerin önemi daha kolay anlaşılır (Kindle 1983). İlk iki gruba dahil bakterilerin yanında, yüksek sıcaklık, yüksek basınç, değişken pH gibi ekstrem koşullarda yaşayabilen termofilik mikroorganizmaların ürettikleri enzimler daha değerlidir. Nedeni ekstremofilik canlılardan elde edilen enzimlerin, standart enzimlerin çalışamadıkları koşullarda uzun süre aktivitelerini koruyabilmesidir (Karaağaç 2002; Aehle 2004).

Termofilik canlıların kökeni uzun süre tartışılmış ve Güneş'e en yakın gezegen olan Venüs'ten basınç yolu ile Dünya'ya geldikleri yönünde bir fikir ortaya konulmuştur (Babich and Stotzky 1987). Yine dünya üzerinde yaşayan tüm mikroorganizmaların atalarının termofiller olduğu, bunun delili ise bazı termofiller mezofilik ortamlara kolaylıkla ayak uydurabilirken, mezofiliklerin termofilik ortamlarda yaşayamamasıdır. Bu bilgiler ışığında termofiller temelde atasal ve sonradan termofilik olarak ikiye ayrılmış, atasal termofil olanlar sürekli olarak termofilik ortamlarda yaşamsal faaliyetlerini sürdürmüşlerdir. *Thermotoga* ve *Aquifex* örnek verilebilir. Diğer yandan *Bacillus* ve *Clostridium* gibi cinsler ise mezofilik durumlara rahatlıkla ayak uydurabilirler (Madigan *et al.* 2000). Bu bakteriler dünya üzerinde geniş bir alana yayılmış olup, deniz diplerinden, kaplıcalardan, volkanik alanlardan, kompostlardan izole edilebilmektedirler. Özellikle bilimsel çalışmaların yoğunlaştığı jeotermal alanlar arasında İzlanda, Rusya, Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, Venezüela ve İtalya yoğunluklu bölgeler olarak gösterilebilir (Kristjanson and Stetter 1992; Hjorleifsdottir 2002). Ülkemizde ise termal sıcaklığı 40°C'nin üzerinde olan 100 den fazla sıcak su kaynağı vardır. Bu termofilik bakterilerin izolasyonu, identifikasyonu, biyoteknolojik önemi olan enzimlerin saflaştırılması, karakterizasyonu ve endüstriyel uygulanabilirliğinin araştırılmasına yönelik çalışmalarda ön plana çıkarmaktadır (Baltacı *et al.* 2016).

Termofilik bakteriler, anaerob veya fakültatif anaerob olan, çubuk, disk veya eliptik morfolojiye sahip canlılardır (Brock 2013). Yapılan çalışmalar, 19. yüzyılda hız kazanmış ve termal sulardan identifiye edilmeye başlanmışlardır. İlk termofilik bakteri 1879 tarihinde izole edilmiş ve optimum üreme sıcaklığının 72°C olduğu görülmüştür (Jenkins 1999). Bilim insanları tarafından gerçekleştirilen enzimolojik çalışmalarda en çok *Bacillus, Clostridium* ve son zamanlarda *Geobacillus* cinsine ait mikroorganizmalar kullanılmaktadır. Isıya dayanıklı olmalarındaki sebepler ele alındığında, ilk olarak incelenecek kısım hücre membran yapısıdır ki, içerikte bulunan doymuş yağ asitlerinin canlıya hidrofobik ortam sağladığı görülür (Herbert and Sharp 1992). Mezofiliklere bakıldığında sahip oldukları çift katlı lipit tabakası, termofillerinkinden daha zayıftır (Daniel and Cowan 2000). Bu heliks yapı bazı aminoasitlerin yer değiştirilmesi ile de kazanılmaktadır. Bu değişimle iç hidrofobisite artar (Menendez *et al.* 1988).Yine aspartik ve glutamik asit sayesinde, heliks yapısı daha kuvvetlidir (Rinia *et al.* 2002). Bağ yapılarındaki halkalarda glisin miktarının azalıp, prolin miktarının artmış olması ve tuz köprülerinin optimizasyonu da bu mekanizmada etkilidir (Querol *et al.* 1996). Termofiller diğer canlılara göre daha fazla şaperon üretirler, bu da denatüre olan proteinin geri dönüşümünü hızlandırır (Everly and Alberto 2000). Süper sarmal DNA yapısını oluşturan DNA giraz enzimi ile, canlının optimum sıcaklığı artmış olur. Disülfür köprüleri de yine önemli etkenler arasında yer alır (Lopez 1999).

1.2. Enzimler ve Sınıflandırılması

Enzimler, metabolizmanın gerçekleştirmesi gerektiği her türlü reaksiyonu hızlandıran, protein ana yapısında bulunan katalizörlerdir. Elektron taşıma sisteminde, genetik materyalin sentezi ve tamirinde, apoptozis gibi çeşitli metabolik olaylarda görev alırlar ve görev aldıkları tepkimelere spesifiktirler (Whitford 2005).

Enzimlerin Uluslararası Komisyonda sınıflandırılmaları; mekanizmaları ve görev aldıkları reaksiyonlara göre yapılmıştır;

1. *Oksidoredüktazlar*: Oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerinde görev alan enzimlerdir.
2. *Transferazlar*: Alıcı ve verici iki molekül arasında hidrojen hariç açil gibi grupların taşınmasından sorumlu enzim ailesidir.
3. *Hidrolazlar*: Moleküllerin sulu ortamda ayrı bileşiklere ayrılmasından sorumludurlar. Eter, peptid, ester gibi bağların yıkımlarında hidrolazlar görev alır.
4. *Liyazlar*: C-C, C-O, C-S, C-N gibi bağların oluşumunu hidrolitik olmayan yoldan gerçekleştirir.
5. *İzomerazlar*: Moleküllerin birbiri içlerinde izomerlerine dönüşmelerini katalizleyen enzim grubudur.
6. *Ligazlar*: ATP gibi bünyesinden fosfat koparılması ile enerji sağlayan yapılarla beraber moleküller arası bağ oluşumunu sağlarlar (Keha ve Küfrevioğlu 2009).

Endüstriyel alanda özellikle kimyasal katalizörlerin yerine enzimlerin kullanılma sebepleri;

- Substratına spesifiktir ve işlemler sırasında kimyasal katalizörlere göre daha az yan ürün oluşmasını sağlar, hatta bazen sıfıra indirir.
- Reaksiyon hızı oldukça yüksektir, bu da zaman ve maliyet tasarrufu sağlar.
- Uygulamalar sırasında oluşabilecek olumsuz substrat kayıplarının önüne geçilmesini sağlar.
- *İn vitro* koşullarda çalışabilir olması, aynı zamanda toksik ve alerjen etkiler yaratmaması, bilim insanlarının çalışmalarında enzimleri kimyasallara karşı kullanımda öncü kabul eder (Önal 2010).

Başta ksilanaz enzimi olmak üzere bazı endüstriyel enzimler ve kullanım alanları Çizelge 1.4'te verilmiştir.

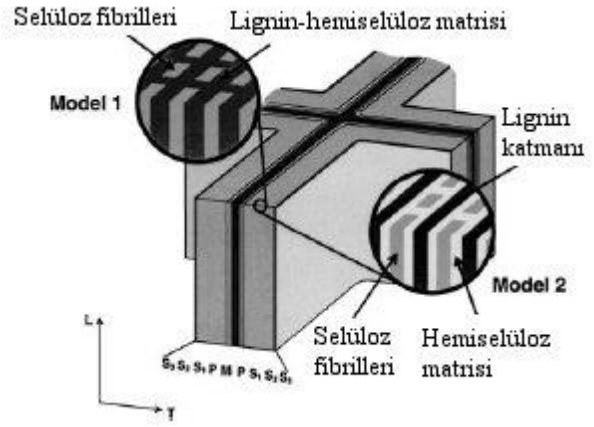
Çizelge 1.1. Bazı önemli endüstriyel enzimler ve kullanım alanları (Önal 2010).

Enzim	**Endüstri**
Ksilanaz	Kâğıt hamuru Gıda Fırıncılık Nişasta ve yakıt Hayvan yemi Tekstil
Selülaz	Kâğıt hamuru Gıda Hayvan yemi Deterjan Tekstil
Amilaz	Fırıncılık Deterjan Nişasta ve yakıt Meşrubat Tekstil
Lipaz	Deterjan Gıda Kâğıt
Proteaz	Deterjan Gıda Fırıncılık
Fitaz	Hayvan besleme
Pektinaz	Meşrubat
Glukoz oksidaz	Fırıncılık
Amiloglukozidaz	Nişasta ve yakıt
Glukozizomeraz	Nişasta ve yakıt
Pektat liyaz	Tekstil

1.3. Hücre Duvar Yapısı

Bitkinin sahip olduğu duvar yapısı incelendiğinde, iki ana yapı ele alınır. Bunlar, karbonhidrat temel yapısındaki hemiselüloz ve selülozdur. Sahip oldukları kovalent çapraz bağlar sayesinde karbonhidrat yapısında olmayan lignin ile iç içe girmişlerdir.

Endüstriyel uygulamalarda verimli sonuçlar alabilmek için lignoselülotik yapıların birbirinden ayrıştırılması gerekir (Juturu and Wu 2012).



Şekil 1.1 Bitkilerin hücre çeper yapısı

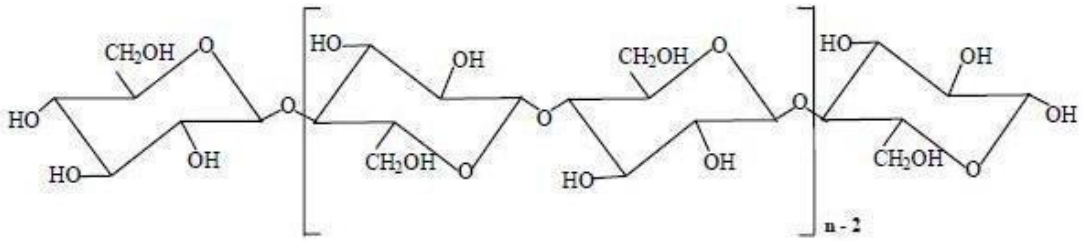
Bitkilerin sahip oldukları selüloz ve hemiselüloz içerikleri farklılık gösterir. Bu farklılıkların bitkide yumuşak veya sert odun olma üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Kromus *et al.* 2006). Sert odunlardaki selüloz ve hemiselüloz oranları, genelde yumuşak odunlardakinden daha yüksek olmakla birlikte, yumuşak odunlardaki lignin içeriği sert odunlardakinden daha yüksektir. Otlar, odunsu bitkilere oranla hemiselüloz bakımından zengin (%25-50 a/a), lignin (%10-30 a/a) ve selüloz (%25-40 a/a) bakımından ise daha fakir olmaktadır (Çizelge 1.5) (Betts *et al.* 1992).

Çizelge 1.2. Farklı lignoselülozik materyaldeki bileşenlerin oranları (Betts *et al.* 1992)

Materyal	Lignin (%)	Selüloz (%)	Hemiselüloz (%)
Yumuşak odun	25-35	45-50	25-35
Sert odun	18-25	45-55	24-40
Otlar	10-30	25-40	25-50

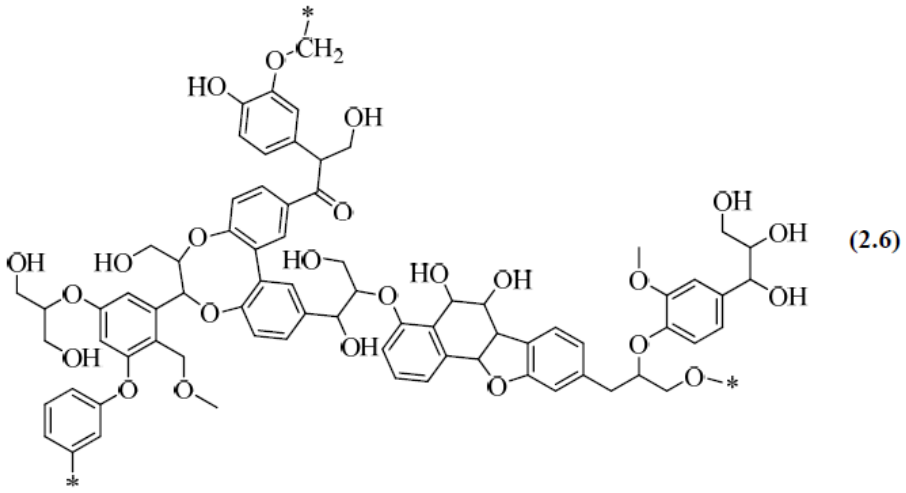
1.3.1. Selüloz, hemiselüloz ve lignin

Selüloz, bitki ve alglerin hücre duvar yapısında bulunan bir organik moleküldür, aynı zamanda bazı bakteriler ve hayvanlar tarafından da üretilebilmektedir (Lynd *et al.* 2002). Yapısal olarak düz bir polimerdir, bitkideki kuru ağırlığın %20-45'ini oluşturmaktadır (Slonoker 1971). Selülozun homopolimer yapısı lineer β-1,4-glikozid bağları ile oluşmuştur ve sahip olduğu mikrofibriler yapı sayesinde, hücre duvarında gerilim kuvveti oluşturur (Sukumaran *et al.* 2005). Selüloz çeperdeki boşluklar ise bitkiye göre, lignin, pektin ve suberin ile doldurulabilir (Pallardy 2008). Selülozun moleküler yapısı Şekil 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. Selülozun moleküler yapısı

Hücre duvar yapısının diğer bir üyesi olan lignin, ilk olarak 1819 yılında keşfedilmiştir. Selüloz ve hemiselüloz dokunun arasını doldurur. Selülozda olduğu gibi, ligninde hücre duvar yapısının daha kararlı olmasını sağlar. Hidrofobik özelliği vardır, kovalent bağ yaparak diğer yapılara tutunur. Sarı- esmer renkte olan yapısı özelikle kâğıt hamuru iyileştirme açısından ele alınır (Grabber 2005). Şekil 1.3'te liginin moleküler yapısı gösterilmiştir.



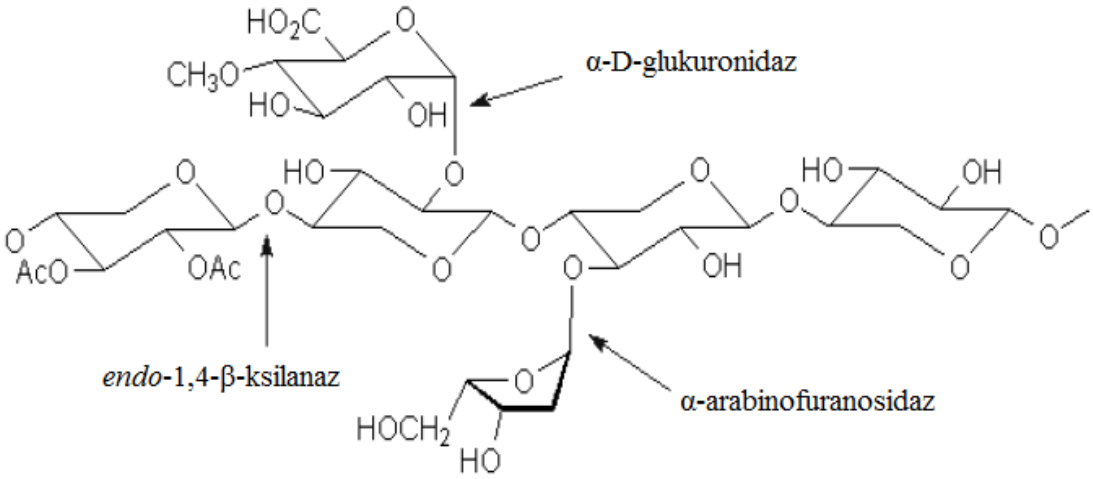
Şekil 1.3. Ligninin moleküler yapısı

Hemiselülozlar, sert odunsu bitkilerin hücre duvar yapısında selülozdan sonra bulunan en önemli yapıdır. Birçok farklı şeker birimin yapısında bulunduran bir heteropolisakkarittir (Kulkarni *et al.* 1999). Bu birim içerisinde glikoz, mannoz, galaktoz, arabinoz, glukuronik, galakturonik ve metil galakturonik asit gibi yapılar bulunur. Ancak en önemlisi %90'a kadar artan oranıyla ksilozdur. Ksiloz birimleri ise ksilanı oluşturur. Hemiselüloz, selülozun aksine kristalin yapıda değildir ve daha şekilsizdir, çeperin yaklaşık %20-35'ini oluştururlar. 260°C'ye kadar yapının dayanabildiği gözlemlenmiştir (Saha 2003; Jaybhaye and Bhalerao 2016). Ayrıca alkalide ve kaynayan çözeltilerde çözünebilen heteropolisakkaritlerdir. Düz veya dallanmış olan bu yapı β-1,4-ksilopiranosidaz omurgasına, *α*-D-glukuronik asit ya da 4-*O*-metil-*α*-D-glukuronik asit ve *α*-L-arabinofuranoz birimlerinin bağlanması ile oluşur (Joseleau *et al.* 1992). Selüloz ile karşılaştırıldığında diğer bir farkı molekül ağırlığı daha azdır. Selüloz ve lignin tabakası arasında bağlantı oluştururken, aynı zamanda üçlü bütünlük sayesinde hücre duvarına sertlik kazandırır (Hendriks and Zeeman 2009). Selülozik olmayan bu materyal, yaklaşık %40 oranında pentoz ihtiva eder (Magge and Kosaric 1995). Ayrıca bu yapının monomerleri antibiyotik, alkol, hayvan yemi, çeşitli kimyasal ve biyoyakıt üretiminde kullanılır (Heck *et al.* 2002).

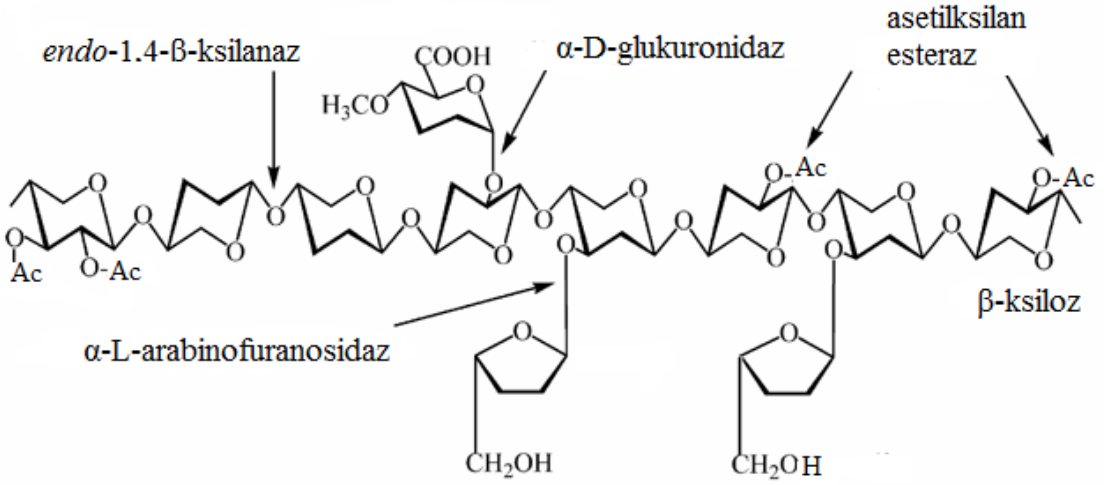
1.3.2. Ksilan

Ksilan, odunsu bitkilerin hücre duvarında yer alan, hemiselülotik yapının içerisinde temel bileşen olan, selülozik yapıda olmayan yenilenebilir bir polisakkarittir (Christov *et al.* 1996). Lignoselülotik yapıda bulunan selüloz ve lignin ile ksilanın omurgasını oluşturduğu hemiselüloz yapı arasında kovalent ve kovalent olmayan bağlar vardır. Bu şekilde hem bitki duvarı daha sert ve kararlı bir hal alırken, diğer yandan selülozun parçalanması adına bir koruyuculuk üstlenmektedir. Aynı zamanda hücre duvarı dışında, bitkilerin orta lamellerinde de ksilana rastlanılmıştır (Beg *et al.* 2001).

Alkali ortamlarda çözünebilen ksilanlar, düz veya dallanmış şekilde bulunur. Sulu çözeltileri ise alkolle çöktürülürken, bazı asitlerle de kolaylıkla hidrolize olurlar. Omurgasını, doğrusal olarak β-1,4 glikozidik bağları ile bağlanmış, ksiloz şekerleri oluşturur. Ana omurgaya bağlı 70-130 kadar β-ksilopiranoz, D-ksilopiranozil üniteleri vardır ve bunların uzunluğu sert odunsu bitkide, yumuşak odunsu bitkiye göre daha uzundur. Sert odundaki ksilan moleküllerinde β-1,4-glikozidik bağlarla bağlı asetil-4-o-metilglukuronoksilan bulunmaktadır (Uffen 1997). Sert odunun sahip olduğu C-2 karbonundan çok, C-3 karbonunda ki asetilasyon ve ortalama polimerizasyon derecesinin 150-200 olması, yumuşak odunla arasındaki temel farklardan biridir. Yumuşak odunda asetillenme daha az olduğundan, suda daha rahatça çözünür ve yine ksilan içerisindeki dallanma miktarı da daha azdır (Dhiman *et al.* 2008). Bazı deniz alglerinde β-1,3 bağlı ksiloz şeklinde bir ksilan omurgasının, çimenlerde de ksilanın arabinoksilan şeklinde bulunduğu görülmüştür. Heteropolisakkarit olarak bahsettiğimiz ksilanın hasırotu, tütün sapı ve tohum kabuğunda sadece ksilozil birimlerinden oluştuğu, bunun da homojenik bir yapı sağladığı görülmüştür (Beg *et al.* 2001). Ksilanın parçalanma ürünlerinin yanında ksilitol ve furfuralda bulunur. Furfural başlıca tarımsal atıklardan elde edilirken, ksilitol odun atıklarından elde edilebilir. Şekil 1.4'te ksilanın yapısı, Şekil 1.5'te ise ksilanaz enziminin etki ettiği noktalar verilmiştir.



Şekil 1.4. Ksilan molekülünün yapısı



Şekil 1.5. Ksilanın yapısının tam hidrolizinden sorumlu ksilanolitik enzimlerin etki bölgeleri

Ksilan ve diğer içeriklerin miktarları bitkiden bitkiye değişiklik göstermektedir. Bunlara örnek olarak; birchwood ksilan içerisinde %89,3 ksiloz, %1 arabinoz, %1,4 glikoz, %8,3 anhidrouronik asit bulunur. Rice bran ksilan içeriğini %46 ksiloz, %44,9 arabinoz, %6,1 galaktoz, %1,9 glukoz, %1,1 anhidrouronik asit, wheat bran arabinoksilan içinde de %65,8 ksiloz, %33,5 arabinoz, %0,1 mannoz, %0,1 galaktoz, %0,3 glikoz bulunur (Adhikari and Satyanarayana 2007).

1.3.3. Ksilanazlar

Ksilanazlar; ksilanda bulunan β-1,4-D-ksilozidik bağlarını koparan glikosidazlardır. Bir yandan hücre metabolizması için gerekli karbon kaynağını sağlarken, diğer yandan bitki hücre enfeksiyonu sağlayan gerekli bir enzim grubudur (Collins *et al.* 2005). Bu enzim, doğrudan veya dolaylı olarak ksilana ulaşabileceği ortamlarda, mikroorganizmalarca üretilebilirler. Çalışmalarda besi ortamına eklenilen glukoz sonrası, ortamda ksilanaz üretiminin azaldığı görülmüştür (Pham *et al.* 1998). Bu enzimin üreticileri, funguslar, protozoalar, antropodlar, algler ve bakteriler olup, aynı zamanda gen mühendisliği çalışmaları ile biyoteknolojik anlamda birçok ticari ksilanaz elde edilmiştir. Bu canlılara örnek olarak *Thermomyces lanuginosus, B. subtilis*, *Aureobasidium* (Beg *et al.* 2001). Ksilanaz üretebilen termofilik mikroorganizmalar, termal kaplıcalardan, çöp birikintilerinden, çöl toprağından elde edilebilirler (Collins *et al.* 2005).

Ksiloz, L-sorboz, lignoselüloz, ksilooligosakkarit gibi bileşiklerin parçalanması için, geniş ve fonksiyonel bir enzim işbirliğine ihtiyaç vardır (Gilbert and Hazlewood 1993). Böylece enzimi üreten canlı, bitkinin hücre duvarında ulaşmak istediği besin kaynağına rahatça ulaşabilir (Shallom and Shoham 2003). Bu enzimlerdeki farklılık, ksilan ve selüloz bağlanma bölgeleri, ısıl kararlılık bölgeleri gibi parçalanmanın ana sebebi olabilecek yerlere göre değişmektedir. 1988 yılında yapılan ilk sınıflamada ksilanaz enzimi, fizikokimyasal özelliklerine göre iki gruba ayrılır. İlk grup düşük molekül ağırlıklı olup, 180-240 aminoasit birimlik ve 30 kDa'dan küçük olanlardır. Diğeri ise yüksek molekül ağırlıklı olup, 270-800 aminoasit birimlik ve 30 kDa'dan büyük olan ksilanazlardır. Fakat fungusların bir kısmında molekül ağırlığına göre sınıflandırma yetersiz kalmıştır. Bunun sonucunda da, enzimlerin katalitik bölgeleri de dikkate alınarak yeni enzim aileleri oluşturulmuştur (Collins *et al.* 2005). Ksilanazların sınıflandırılması şu şekildedir:

1. Ksilan iskeletindeki iç glikozid bağları rast gele kıran β-1,4-endoksilanazlar (β-1,4–D-ksilanazlar; β-1,4-D-ksilan ksilanohidrolazlar; E.C. 3.2.1.8),

2. Ksilobiyozu ksiloza hidrolize eden, başka bir deyişle ksilooligosakkaritleri indirgen olmayan uçlarından kıran β-D-ksilosidazlar
(β-1,4-D- ksilozioksilohidrolazlar; E.C.3.2.1.37),
3. Ksilandaki arabinoz yan zincirlerini hidrolize eden α-L-arabinofuranosidazlar
(E.C. 3.2.1.55),
4. Ksiloz gruplarından glukuronik asit yan zincirlerini ayıran α-D-glukuronidazlar
(E.C. 3.2.1.139),
5. Asetat gruplarını serbestleştiren asetil-ksilan esterazlar (E.C.3.1.1.72),
6. Ferulik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.73),
7. p-kumarik asit esterazlar (E.C. 3.1.1.),
8. Ekzo-β-1,4-ksilanazlar (α - 1,4-D-ksilan ksilohidrolazlar) (Collins *et al.* 2004).

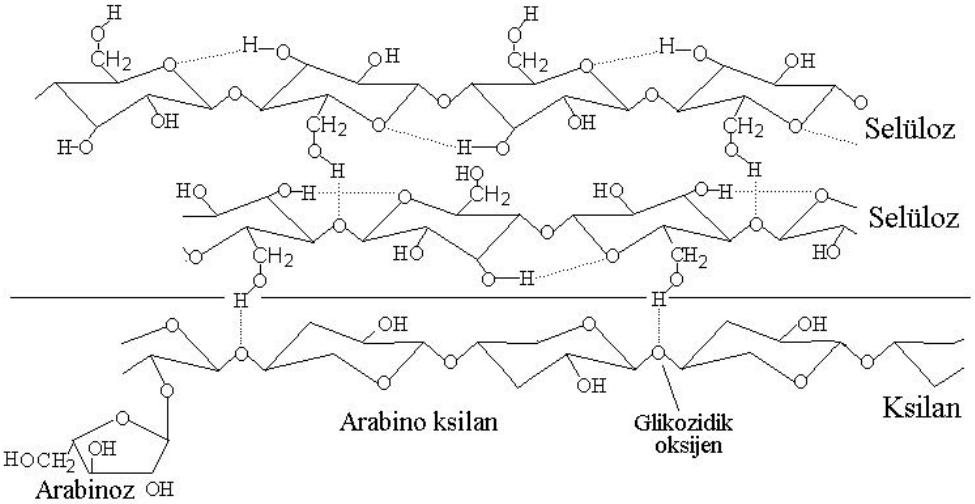
Ksilanaz enzimi kendi içerisinde farklılık göstermekle birlikte, aynı canlı içerisinde birden fazla yapısal farklılık gösterebilen ksilanazın bulunduğu belirlenmiştir. Buna örnek olarak, *Trichoderma viride'*nin 13 ksilanaz izoenzimi, *Aspergillus niger*'in 15 tane ekstraselüler, *Cochliobolus carbonum'*un 3 tane intrasellüler ksilanaz ürettiği görülmüştür. ine bu enzim ürünlerinden bazılarının aynı canlı içinde farklı sekanslar ile eksprese edildiği gözlemlenmiştir (Collins *et al.* 2004).

Ksilanaz enzimlerinin katalitik kısımlarının, termal kararlılıktan sorumlu, katalitik görevi olmayan kısımları da mevcuttur. Uyumlu biçimde çalışan bu yapı, bakteriyel ksilanazların 100°C üstünde bile stabilite göstermesini mümkün kılar (Beg *et al.* 2001). Miktarsal olarak düşük amonyum sülfat tuzu ihtiva eden çözeltilerde bile ksilanaz enzimleri çöktürülebilir. Enzimlerin aktivitelerinin zincir boylarıyla da bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Buna göre; zincir uzunluğu arttıkça ksilanaz aktivitesi artarken, β-ksilosidaz aktivitesi azalır. Aynı şekilde dallanan ksiloz şekerleri, ksilanaz aktivitesini zora sokar. Belirlenen diğer bir nokta ise düşük molekül ağırlığı olan ksilanaz enzimi genelde bazik, yüksek molekül ağırlığı olan ise genelde asidiktir (Wong *et al.* 1988).

1.3.4. Ksilanaz enziminin endüstriyel uygulama alanları

Ksilanı parçalayan bu enzimler, endüstriyel açıdan oldukça sık tercih edilmektedirler. Başta kâğıt hamuru olmak üzere, yem endüstrisi, gıda endüstrisi gibi birçok alanda büyük önem taşırlar (Motta *et al.* 2013). 1980'lerde başlanan kağıt endüstrisi çalışmalarında, ksilanazlar 1990'lardan sonraki yıllarda kullanılmıştır. Böylelikle kâğıt hamuru beyazlatmada kullanılan zararlı kimyasallar (oksijen, hidrojen peroksit, ozon gibi) yerine, biyolojik beyazlatma yöntemi olan enzimler önem kazanmıştır. Çalışmalar ilk olarak selülaz enzimi ile başlamıştır. Liflerin birbiriyle bağlantıları üzerine kullanılan selüloz enzimi, lif kararlılığında azalmaya sebep olmuştur, bu nedenle bilim insanları ksilanaz enzimlerine yönelmiştir. Ancak halen selülaz enzimi bazı ülkelerde su drenaj hızını arttırmak için kullanılmaktadır (Tamerler 2001). Kâğıt üzerine yapılan işlemler esnasında, yapışkan maddeler tıkanmalara sebep olabilir, enzimlerle bu maddeler uzaklaştırılabilir. Atık suların geri dönüşümü sağlanabilir (Kenealy and Jeffries 2003).

Temelde kâğıt hamurunun koyu renkte olmasının sebebi yapısında bulunan lignin polimeridir. Koyu renkli bu kalıntıların uzaklaştırılması, kâğıt hamurunun beyazlatılmasının temelini oluşturur. Ksilan, lignin ve selülozun oluşturduğu yapıdan ötürü kimyasal beyazlatıcılar gerektiği şekilde içeriye nüfus edemez. Ksilanaz ile muamele edildiğinde, lignin arası sıkı yapı açılır, beyazlatma işi kolaylaşır. Bir sonraki basamakta lignin tamamen uzaklaştırılır (Rıfaat *et al.* 2005). Ksilanaz grupları içinde en çok endo-ksilanazlar tercih edilir (Techapun *et al.* 2003). Ayrıca β-1,4 bağlarını kıran ksilanazlar, yan dallara etki eden glukronidaz gibi enzimlere göre çok daha güçlüdür (Georis *et al.* 1999). Ortamdaki ksilanın yaklaşık %20 kadarını uzaklaştırabilir (Sevastyanova 2005). Maddi açıdan düşünüldüğünde, kimyasal harcamasını kayda değer bir şekilde azaltır (Tamerler 2001).



Şekil 1.6. Hücre çeperinde ksilan- selüloz bağlanma yapısı

Gıda endüstrisi ele alındığında, özellikle fırıncılık ve meyve suyu durultma alanı oldukça ilgi çeken çalışmalardır. Hemiselüloz yapının ana maddesi olan ksilana etki eden ksilanaz enzimi, hamur yapısına pozitif katkıda bulunurlar. Hamurun işlenebilirliğini kolaylaştırır (Baillet *et al.* 2003). Eklendikten sonra ekmeğin ürün hacmini arttırarak, kullanılan un ve kepek ürünlerinin kalite farklarından doğabilecek sorunları en aza indirger (Aehle 2004). 1997 yılında ilk ksilanaz enzim preparatları hamura eklenmiş ve ekmeğin bayatlamasını geciktirdiği görülmüştür. Ancak 2000'li yıllarda yapılan çalışmalar bayatlama değil de, enzimin hamur sertliğinin yumuşattığını göstermiştir. Aynı zamanda hamur yapısında bulunan diğer karbonhidratları parçalayan enzimlerle birlikte kullanıldığında daha verimli sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Örneğin amilaz enzimiyle birlikte verildiğinde hamur verimi daha da artmıştır (Maat *et al.* 1992). Enzim işbirliklerine diğer bir örnek şarap, bira ve meyve suyu durultmada verilebilir. İçecekte meyvenin daha fazla berraklaştırılması ve sıvılaştırılması için ksilanaz enzimi, selülaz ve pektinaz gibi enzimlerle beraber kullanılır (Gilbert and Hazlewood 1993). Kraker hamurunda ise su drenajının artması, fırınlamada sürede ve maliyette tasarruf sağlanır (Kulkarni *et al.* 1999).

Hayvan yemi endüstrisinde kullanılan ksilanaz enzimleri, besinsel anlamda herhangi bir değeri bulunmayan bazı bileşiklerin uzaklaştırılarak, yem kalitesinin attırılmasını sağlar.

Böylece hayvanda kilo artışı, dolayısıyla et veriminde artış sağlanır. Kâğıt hamuru endüstrisinde olduğu gibi, yem endüstrisinde de daha çok endo-1,4-β-ksilanazlar kullanılmaktadır (Aehle 2004). Ksilanın kısmi parçalanması, sindirim sisteminin işini kolaylaştırır, hayvan selüloza daha kolay ulaşır, hayvan daha çok besinden yararlanmış olur. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta, ksilanın tamamen uzaklaştırılmaması gerektiğidir. Çünkü ksilanın eksikliği intestinal sistemde çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilir. Ksilanazla ilgili diğer çalışmalar ele alındığında biyoyakıt üretiminde etkili biçimde kullandıkları görülür. Etanol ve ksilitol gibi alkol türevleri üretilebilir. Ayrıca ligninaz, glukosidaz gibi enzimlerle beraber kullanılarak farklı biyolojik ürünler elde edilebilir. Hücre çalışmalarında da, hücre duvar yapısını zayıflatarak protoplast elde edilir (Beg *et al.* 2001).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Endüstriyel olarak hayvanlardan, bitkilerden ve mikroorganizmalardan elde edilen enzimler, yıllarca içecek, ekmek ve peynir yapımı gibi işlemlerde kullanılmıştır. Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmalardan üretilmektedir.

Hidrolazlardan selülozik enzimler (selülaz ve ksilanaz) doğada en fazla bulunan yenilenebilir karbonhidrat kaynağı olan selülozu şekerlere dönüştürerek özellikle biyo-etanol gibi biyolojik temelli yakıt katkı maddelerinin üretiminde önemli bir yer tutmaya başlamışlardır. Ksilanaz enziminin en etkin uygulamalama alanları ise kağıt ve kağıt hamuru beyazlatılması, içecek endüstrisi, hayvan besleme, tekstil ve fırıncılıktır. Özellikle termofilik mikroorganizmalardan elde edilecek ksilanaz enzimi, ekstrem koşullara dayanıklılığı ile daha da elzemdir.

Yang *et al.* (1995), kâğıt hamurundan *Bacillus* sp. (V1-4) bakterisini izole etmiş ve bu bakterinin pH 9'da ksilanaz enzimini ürettiğini, maksimum enzim aktivitesini ise aynı pH'ya sahip %2 birchwood ksilan ve %1 içeren karışımda gösterdiğini belirtmişlerdir . Ayrıca enzimin pH'sı 10 olan glisin tamponu içerisinde de aktivite verdiğini optimum sıcaklığının 55°C olduğunu tespit etmişlerdir. Biobleaching çalışmalarında kâğıt hamuru üzerinde en iyi aktivitesinin pH 7 ve pH 9 arasında olduğunu bulmuşlardır ki, zaten kâğıt hamuru da alkalin bir yapıya sahip olduğundan,elde ettikleri veriler bu şekilde doğrulanmıştır.

Blanco *et al.* (1995), *Bacillus* sp. BP-23 suşundan ksilanaz enzimini saflaştırmış ve birchwood ksilanın, ksilotetraz ve ksilobiyoza hidroliz olduğunu gözlemlemişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığını 32 kDa ve izoelektrik noktasını ise 9,3 olarak olarak belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin optimum sıcaklık ve pH ını sırasıyla 50°C ve 5,5

olduğunu tespit etmişlerdir. Enzimin *N*-bromosuccinimid ile tamamen inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir.

Archana and Satyanarayana (1997), solid state adı verilen bir fermentasyon yöntemi ile, termofilik *B.licheniformis* A99 bakterisinde ksilanaz enzimini üretmişler ve enzimin karakterizasyon çalışmaları sonunda; optimum pH değerinin 6,0-7,0, optimum sıcaklığın ise 50°C olduğunu bulmuşlardır.

Gessesse and Gashe (1997), Etiyopya'da bulunan bir soda gölünden alkalifilik *Bacillus* sp. AR-009 suşunu izole etmişler ve bu bakteriye alkalin ksilanaz ürettirmişlerdir. Karakterize edilen enzimin optimum pH'sı 9,0, optimum sıcaklığı ise 60-65°C'dir. 55°C'de pH 8 ve pH 9'da yapılan denemelerde, enzimin aktivitesini 2,5 saat boyunca %80 oranında korurken, 60°C ve pH 9'da yapılan denemede ise aynı süre sonunda enzim aktivitesini %54 seviyesinde koruduğu görülmüştür.

Lopez *et al.* (1998), *Bacillus* sp.'den saflaştırdıkları ksilanaz enziminin pH 9 ve 45°C'de 5 saatlik inkübasyonun sonunda, başlangıç aktivitesini koruduğunu göstermişlerdir. Ayrıca ksiloz ve ksilan varlığında maksimum ksilanaz üretiminin 42°C ve pH 7,8'de gerçekleştiğini bulmuşlardır.

Gessesse (1998), *Bacillus* sp. AR-009 suşundan 2 farklı ksilanaz enzimini saflaştırmıştır. XylA ve XylB şeklinde isimlendirdiği bu enzimlerin, SDS-PAGE analizinde molekül ağırlıklarının sırasıyla; 23 kDa ve 48 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Karakterize edilen XylA enziminin optimum aktivitesini pH 9,0, XylB'nin ise pH 9.0-10.0 aralığında gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmanın devamında, optimum sıcaklıkları ise her ikisinin de 60°C olarak gözlemlemişlerdir.

Breccia *et al.* (1998), *B. amyloliquefaciens* bakterisinden ksilanaz enzimini üretip saflaştırmışlardır. Karakterize edilen enzimin optimum pH aktivitesini 6.8-7.0'de ve pH stabilitesi ise 9,0 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin optimum sıcaklığı ise 80°C'de olduğu ve 50°C'de stabil kaldığını olduğu göstermişlerdir. SDS-PAGE jel elektroforezi

sonunda ise; enzimin, molekül ağırlıkları 18.4 ve 19.6 kDa olan 2 alt birimden oluştuğunu belirlemişlerdir.

Gessesse and Mamo (1999), *Bacillus* sp. AR-009 bakterisine, buğday kepeğini kullanarak katı hal fermentasyonu ile ksilanaz ürettirerek, % 5'lik ksiloz, sükroz, laktoz ve glikoz substratlarının enzim üzerindeki etkilerini araştırılmışlardır. Aynı konsantrasyonda olan sükroz ve glukoza kıyasla, ksiloz ve laktoz varlığında daha fazla enzim üretilebildiğini, besiyeri ortamına eklenen tripton ve peptonda belirgin bir fark görülmediğini, ortama eklenen maya ekstratı ise ksilanaz üretiminde azda olsa artış sağladığını tespit etmişlerdir. Ayrıca canlının yüksek pH ve sıcaklıkta enzimin aktivitesini koruması ile çeşitli kontaminasyonların ortamdan elemine edilmesine olanak sağladığını belirtmişlerdir.

Duarte *et al.* (1999), tek karbon kaynağı mısır ksilanı olan besiyerlerinde ksilanaz aktivitesi bakarak, 500'den fazla bakteri kolonisi belirlemiştir. Bunlardan kayın ağacı ksilanında aktivite veren 22 suş ile çalışmaya devam etmiştir. Çalıştığı pH 5-10 aralığında ise, ksilanaz enzim aktivitesini pH 10'da gösterebilen suşların varlığı görülmüş ve litaretüre kazandırılmıştır.

Dhillon *et al.* (2000), *B. circulans* AB16 zayıf selüloz aktivitesine sahip olan bakteriden ksilanaz enzimini üretip karakterize etmişlerdir. Canlıdan 2 farklı ksilanaz enzimi üretilerek, A ve B olarak adlandırılmıştır. Ksilanaz A enziminin molekül ağırlığı 30 kDa, Ksilanaz B enziminin ise 22 kDa olarak tespit edilmiştir. Yine ksilanaz A enziminin optimum aktivite gösterdiği pH 6,0, optimum sıcaklığı 75°C'dir. Ksilanaz B nn ise optimum pH'sının 6, optimum sıcaklığının ise 65°C olduğunu gözlemlemişlerdir.

Sa-Pereira *et al.* (2002), termal su kaynaklarından izole ettikleri *B. subtilis* bakterisinden, ksilanaz enzimini üretmişler ve selüloz free (selüloz aktivitesi olmayan) özellik taşıyan bu enzimi karakterize etmişlerdir. Üretilen enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Enzim üretimini 50°C ve 18 saat süreyle ve 55°C'de 11 saatlik fermentasyon işlemlerine tabi tutularak, enzim verimlerini karşılaştırmışlardır.

Tseng *et al.* (2002), *B. firmus* bakterisinden, selüloz enzimini üretmeyen 2 farklı alkali ksilanaz enzimi üretmişlerdir. Enzim karakterizasyonu sonucunda, optimum sıcaklıklarının 37°C olduğu ve pH 5,0-11,0 gibi geniş bir pH aralığında enzimin aktivite verebildiğini tespit etmişlerdir. Enzimlerden birinin molekül kütlesinin 45 kDa, diğerinin ise 23 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca reaksiyon sonucunda ksiloz, ksilohekzos ve ksilotriozun oluştuğunu yapılan bu çalışma sonucu gözlemlemişlerdir.

Saha (2002), tarafından *Fusarium proliferatum* (NRRL 26517) küfünü toprak örneklerinden izole etmiş ve karbon kaynağı olan mısır lifi ksilanını kullanarak, ksilanaz enzimini saflaştırmışlardır. Saflaştırmada amonyum sülfat çöktürmesi, DEAE Bio-Gel A kolon, Oktil-Sepharoz ve Bio-Gel A-0.5 m jel filtrasyon kromatografisi kullanmışlardır. Karakterizasyon sonucunda optimum pH'sı 5.0–5.5, sıcaklığı 55°C olarak bulunmuştur. Ksilanı hidrolizi sonucunda ortamda ana ürün olarak ksilobiyoz ve kısa zincirlerden oluşan ksilooligasakkaritlerin oluştuğu görülmüştür.

Wejse *et al.* (2003), yeni bir bakteri olan *Eubacterium* SX15 suşunun besiyeri ortamını optimize ederek, ekstraselüler ksilanaz enzim üretiminde 20 kat artışa ulaşmışlardır. Bu yöntemin özellikle bu türün suşları için ksilanaz üretimini kolaylaştırdığını ifade etmişlerdir. Yöntem optimizasyonda ksilan, tuz ve azot kaynaklarının farklı konsantrasyonları kullanmışlardır.

Wainq and Ingvorsen (2003), ekstrem halofilik arkea olan *Halorhabdus utahensis*'den β β-ksilanaz ve β-ksilozidaz enzimlerini üretmişlerdir. β-Ksilanaz enziminin optimum olarak üretilme sıcaklığının 55°C ve 70°C olduğunu belirlemişlerdir. β-ksilozidazın optimal sıcaklığı ise 65°C olduğunu, her iki enziminde %0-%30 arasında NaCl içeren geniş bir aralıkta üretilebildiğini gözlemlemişlerdir.

Lama *et al.* (2004), termofilik *B. thermantarcticus* bakterisini Melbourne dağı yakınlarında ki toprak sahadan izole ederek, bu bakteriden ekstraselüler ksilanaz ve β-ksilosidaz enzimini jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmışlardır. Ksilanaz enziminin optimum üretiminin pH 5,6'da ve 80°C'de, β-ksilosidaz enziminin ise pH

6'da ve 70°C'de olduğunu bulmuşlardır. Yine ksilanaz enziminin molekül ağırlığını 45 kDa, β-ksilosidaz enziminin ise 150 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Kumar *et al.* (2004), alkalifik *Bacillus* NCL (87-6-10) suşundan alkali ksilanaz enzimini üreterek, bu enzimi ticari olarak satılan diğer ticari ksilanaz enzimleriyle birlikte deterjanlar üzerinden kıyaslamalı olarak denemişlerdir. Diğer enzimler 1 saat içerisinde %50'ye kadar aktivite kaybederken, *Bacillus* NCL (87-6-10) suşundan elde edilen ksilanaz enziminin ise aktivitesini 40°C'de koruduğu bulunmuştur.

Gallardo *et al.* (2004), *Bacillus* sp. BP-7 suşunun ksilanaz enzimini kodlayan *xynA* genini, *Escherichia coli'*ye klonlayıp ekspresyon çalışması yapmışlardır. Sonuçta rekombinant ksilanaz A'nın yüksek oranda ksilana karşı aktivite gösterdiğini, enzimin pH 7, 50°C'de 3 saat boyunca stabilitesini muhafaza ettiğini belirlemişlerdir. Ayrıca zimogram analizi yapılan enzim bandının, SDS-PAGE analizi ile enzimin molekül ağırlığını 24 kDa olarak tespit etmişlerdir.

Avcıoğlu vd (2005), topraktan izole etmiş oldukları *Bacillus* sp. suşundan ksilanaz enzimini saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Bu amaç için tarımsal atık ürünleri olan buğday samanı, buğday kepeği, mısır koçanı ve pamuk küspesini substrat olarak kullanmışlardır. Enzimin moleküler ağırlıkları 22, 23 ve 40 kDa'dan oluşan üç endoksilanaz içerdiğini, optimum 70°C ve pH 6.5'de aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Damiano *et al.* (2006), yaptıkları çalışmada selüloz aktivitesi göstermeyen, fakat kslanaz enzimini üretebilen *B.licheniformis* 77-2 suşunu izole etmişlerdir. SDS-PAGE analizi sonucunda enzimin 17 kDa ve 40 kDa moleküler ağırlıklarına sahip, iki alt birimden oluştuklarını tespit etmişlerdir. Saflaştırdıkları alt birimlerin karakterizasyonu sonucunda sırasıyla optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla; 7, 70°C ve 11, 75°C olduğunu saptamışlardır. Ayrıca enzimi 50°C ve 60°C'de bir saat inkübe ettiklerinde aktivitesini %90 oranında koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Ayyachamy *et al.* (2007), *B. subtilis* C 01 suşundan tarım atıklarını kullanarak selüloz free ksilanaz enzimi ürettirip saflaştırmışlar ve enzimi biyolojik ağartma ajanı olarak kullanılmışlardır. Bu çalışmanın ipeksi pamuk ve pamuk özleri ile , muz liflerinin ağartıldığı ilk araştırma olması bakımından oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Böylece otsu bitki liflerinin kağıt üretimi için ham madde olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Başbülbül (2009), Aydın ili ve çevresinden topladığı termal su kaynaklarından termofilik bakterileri izole etmiş ve 16S rRNA sekans analizi sonucunda; test izolatlarının %99 oranında *Geobacillus toebii, Bacillus licheniformis, Brevibacillus brevis, Geobacillus pallidus, B. borstelensis* ve *B. pumilus*'a benzerlik gösterdiğini tespit etmiştir.

Savaş *et al.* (2009), Van-Erciş Hasanabdal kaplıcasından aldıkları su örneklerinden termofilik bakteri izole ederek, fenotipik ve genotipik yöntemlerle karakterize etmişlerdir. Yaptıkları bu çalışma ile, 5 farklı bakteriyal tür (*Geobacillus pallidus, Bacillus licheniformis, B. pumilus, Brevibacillus brevis* ve *B. borstelensis)* elde etmiş ve bunlar arasında ki genetik polimorfizmi tespit için rep-PCR yöntemini kullanmışlardır. Sonuçta tür ve alt tür taspitinde rep-PCR yönteminin oldukça başarılı olduğunu belirlemişlerdir.

Adıgüzel *et al.* (2009) yaptıkları çalışmada Türkiye'nin farklı jeotermal aldıkları su ve çamur örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirmişlerdir. Sonuçta elde 16S rRNA sekans analizi verilerine göre ettikleri izolatların %97-99 oranında *Geobaillus, Anoxybacillus* ve *Bacillus* cinslerinin üyelerine benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Daha sonra yaptıkları genomik parmak izi analizi sonucunda GTG_5 ve BOX-PCR yöntemlerinin bu cinslere ait strainlerin identifikasyonunda oldukça başarılı olduğunu belirlemişlerdir.

Yanmış *et al.* (2009) yaptıkları bir çalışmada Kırşehir- Terma; Şırnak- Güçlükonak , Ağrı- Diyadin, Kayseri-Hacıveli, Erzurum- Ilıca, Urfa-Karaali, Rize-Ayder, Adıyaman-

Kuruçay ve Ankara-Kızılcehennem termal tesislerden aldıkları su örneklerinde toplam 15 bakteriyal strain izole ederek, konvansiyonel ve moleküler testler ile karakterize etmişlerdir. Sonuçta izolatlar arasındaki farklılıkları ortaya koymada BOX-PCR yönteminin oldukça başarılı olduğunu tespit etmişlerdir.

Aygan ve Arıkan (2009), *Bacillus* sp. X13 suşuna ksilanaz enzimini ürettirip, saflaştırmışlardır. SDS-PAGE analizi molekül kütlesi belirlenen enzimin aslında dört izoenzimden meydana geldiğini ve kütlelerinin sırasıyla; 68,5 kDa, 80,6 kDa, 95,5 kDa ve 108,4 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca karakterize etikleri enzimin optimum pH'ını 6,0 ve optimum sıcaklığını ise 40°C olarak tespit etmişlerdir. Enzim bantlarını zimogram analizi ile de desteklemişlerdir.

Azeri *et al.* (2010), *Bacillus* cinsine ait suşlarına ait suşlarrı izole etmişler ve aralarında selüloz içermeyip, ksilanaz enzim aktivitesi gösterenleri belirlemişlerdir. Sonuçta tamamının 25–50°C aralığında üreyebildiklerini, enzim sentezini ise optimum 40°C yaptıklarını, 55°C'de ise üremenin olmadığını gözlemlemişlerdir.

Shrinives *et al.* (2010), *Bacillus* sp. JB 99 suşundan alkalin selülaz içermeyen ksilanaz enzimini saflaştırmışlar ve enzimin pH 9,0'da %90, pH 10,0'da %85 oranında aktivitesini koruduğunu tespit etmişlerdir.

Yasinok *et al.* (2010), *B. pumilus* SB-M13 suşunu topraktan izole ederek , identifiye etmişlerdir. Daha sonra ksilanaz enzimin üretiminden sorumlu gen bölgesini PCR ile amplifiye etmişler ve blastlama çalışması sonucunda, bu genin diğer *B. pumilus* strainlerinin ksilanaz enzimlerine %89-94 oranında benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Enzimin hidrofobik interaksiyon kromatografisi ile 180 kat saflaştırmışlar ve biyokimyasal olarak karakterize etmişlerdir. Sonuçta moleküler ağırlıklarını 24,8 kDa olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca ksilanalitik aktivitenin alkali pH'ta stabil olduğunu, 60°C ve pH 7,5'de enzimin en yüksek aktiviteyi verdiğini, Km değerinin 1,9 mg/mL olduğunu bulmuşlardır.

Gopalakrishnan *et al.* (2010), bir haloalkalitolerant ksilan üreticisi olan *B. pumilus* GESF1 suşunu izole ederek, buğday samanı bulunan kültür ortamına inoküle etmiş, ve 3 farklı besiyerine substrat olarak birch wood ksilan, ksiloz ve karboksimetilselüloz (CMC) ilave etmişlerdir. Sonuçta ilk iki substrat ile ksilanaz enzim üretiminin maksimum seviyeye çıktığını, CMC ilavesi sonucunda ise herhangi bir aktivite gözlemlenmediği tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışma ile enzimi 112,42 U/mg protein aktivitede, 21,21 kat saflaştırmışlardır. Enzimin optimum aktiviteyi pH 8 ve 40°C'de gösterdiğini, pH 6 ve pH 10'da ise aktivitesini sırasıyla %50 ve 30 oranında koruduğu belirlenmiştir. Daha sonra gerçekleştirdikleri kinetik çalışma sonucunda K_m ve V_{max} değerleri 5.3 mg/mL ve 0.42 μmol/min/mL olarak tespit etmişlerdir.

GangGuo *et al.* (2012), *B. subtilis* bakterisinden zayıf asidik, selülaz içermeyen ksilanaz enzimini üretmiş, saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Enzimin yüksek spesifik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiş (36,633.4 U/mg), molekül ağırlığı 23,3 kDa olarak bulunmuştur. Optimal aktivite değerleri ise pH 5,8 ve 60°C'dir. Aynı zamanda 60°C'de pH 4.6-6.4 değerleri arasında %80 üzerindeki aktivitesi ile maksimal aktiviteye yakın değerler vermiştir.

Choong *et al.* (2015), biyobütanol üretiminde yeni bir suş olan *Clostridium beijerinckii* G117 bakterisini %1 lik huş ağacı ksilanı ile indükleyerek ksilanaz enzimini üretmişlerdir. Medyum içerisinde enzim aktivitesi 14 saatlik fermantasyon sonrasında 2,66 U/ml olarak bulunmuştur. Salting out ve size-exclusion kromatografisi ile ksilanaz enzimini saflaştırmışlardır. Molekül ağırlığı 22,6 kDa'dur , bu da belirlenen en küçük klostridal ksilanaz enzimidir.

Goluguri *et al.* (2016), *Thielaviopsis basicola* MTCC 1467 suşundan, pirinç samanı varlığında alkali termostabil ksilanaz enzimini saflaştırmışlardır. SDS-PAGE jel elektroforezi ile molekül ağırlığı~32 kDa olarak belirlenmiştir. Maksimum enzim aktivitesini pH 5,5 ve 60°C'de göstermiştir. 5 saat boyunca pH 5,0 ve pH 10,0 aralıklarında enzim stabilitesini %70 in üzerinde koruduğu görülmüştür. Yine 30–50°C aralıklarında 5 saat boyunca aktivitesini % 85 üzerinde korumuştur.

Harris (2016), *Bacillus weihenstephanensis* ANR1 bakterisinden, karpuz kabuğunu substrat olarak kullanarak ksilanaz enzimini kısmi saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir. Bu toprak bakterisini 37°C'de 72 saat boyunca inkübe ederek enzimi ürettirmiş; amonyum sülfat, diyaliz ve DEAE-Sefaroz ile kısmi saflaştırmışlardır. Molekül ağırlığını belirlemek amacıyla SDS-PAGE analizini kullanmışlardır. Bunun sonucunda moleküler ağırlığını 45 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 7,0 ve 37°C'dir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Steril Kabin (Telstar AV -100)
Spektrofotometre (Beckman Coulter DU'730 Life science UV/Vis spectrophotometer)
Santrifüj (Hettich)
Magnetik Karıştırıcı (Stirrer HS31)
Etüv (Termo Scientific Heraus Incubator)
Vorteks (WiseMix)
Çalkalayıcı (Midıi Dual 14)
İnkübatör (Sanyo)
Deep-Freeze (Harris, -20 ºC)
Hassas Terazi (Geg, Avery)
Otoklav (Hiclave Hv-50L)
Su Banyosu (Grant 6G)
Sterilizatör (Heraus)
pH metre (Metler Toledo)
Kar makinesi (Scotsman AF-20)
Saf su cihazı (Bamstead Pure Easy)
Peristaltik pompa (Ismatec)
Elektroforez tankı (Biorad (dikey))
Güç kaynağı (1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135)
Buzdolabı (Siemens)

Kullanılan kimyasallar

Ksilan, Karboksimetilseloz (CMC) (Sigma), K_2HPO_4 (Sigma), KH2PO4 (Sigma), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma), NH_4NO_3 (Sigma), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Sigma), $CaCl_2$ (Sigma), Nişasta, NaCl, Congo Red, Gliserol, HCl, NaOH, H_2O_2, DMSO, $MgCl_2$, dNTP, TAE, Amfisilin, IPTG, X-gal, Dimetilformamid (Sigma), Soya pepton (Oxoid), Tripton (Oxoid), Agar (Oxoid) kazein (Sigma), Bovin serum albumin, diyaliz torbası, Metanol (CH_3OH), Glisin, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED), N,N-metilen-bisakrilamid, Ditioeritritol ($C_4H_{10}O_2S_2$), Asetik asit (CH_3COOH), Sodyum karbonat (Na_2CO_3), Akrilamid, Tris (trihidroksimetilaminometan), Amonyum persülfat ($(NH_4)_2S_2O_8$), Commassie Brillant blue G-250, Etanol (C_2H_5OH), Fosforik asit (H_3PO_4), Sodium bisfosfat (Na_2HPO_4), Hidroklorik asit (HCl), Sodyum hidroksid (NaOH), Amonyum sülfat $(NH_4)_2SO_4$, Sephadex G-100, Sefakril S 200, Commassie Brillant blue R-250, H_2O_2, $BaCl_2$, $CuCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$, $FeCl_2$, $CaCl_2$, $NiCl_2$ $HgCl_2$, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sodium bikarbonat ($NaHCO_3$) ve Sodium asetat (CH_3COONa) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler

1X TAE / TBE tamponu: 100 mL 10XTAE / TBE tamponu 900 mL saf su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

%0,9 Sodyum Klorür Çözeltisi: 100 mL saf su içerisinde 0,9 g NaCl tuzu çözüldü, ve kullanım için sterilize edildi.

Amfisilin çözeltisi: 1 mL ddH_2O'da 20 mg amfisilin çözüldü. 0,22 µm çaplı milipor filtreden geçirilerek sterilizasyonu gerçekleştirildi. Kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Kalsiyum klorür çözeltisi: 1,11 gr $CaCl_2$, 100 mL ddH_2O'da çözüldü ve otoklavlandı. Kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

X-gal solüsyonu: 1 mL dimetilformamid içinde 40mg X-gal çözüldü. Hazırlanan çözelti -20°C'de saklandı.

IPTG: 1 mL ddH_2O'da 23,8 mg IPTG çözüldü. 0,22 µm çaplında milipor filtreden geçirilerek sterilize edildi. Çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Kristal violet çözeltisi: 2 g kristal violet, 80 ml ddH_2O ve 20 ml EtOH (%96) içerisinde çözüldü.

Lügol Çözeltisi: 2 g KCl ve 1g iyot tartıldı, son hacim 100 mL olacak şekilde saf su içerisinde çözüldü.

Safranin Çözeltisi: 20 ml EtOH (%96) içerisinde 1 g safranin çözüldü, hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

KOH Çözeltisi: 100 mL saf suda, 3 g KOH çözüldü ve otoklavlandı.

Asetat Tamponu (50 mM, pH 4,0): 45 mL saf suda, 0,205 g sodyum asetat çözüldü . 1 N asetik asit ile pH'sı 4,0'e ayarlandı. Hacim 50 mL'ye tamamlandı.

Asetat Tamponu (50 mM, pH 5,0): 45 mL saf suda 0.205 g sodyum asetat çözüldü. 1 N asetik asit ile pH'sı 5,0'e ayarlandı. Hacim 50 mL'ye tamamlandı.

Sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 6,0): 90 mL saf suda 0,04 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ ve 0,29 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ çözüldü. pH'sı 6,0'ya ayarlandı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Sodyum fosfat tamponu (20 mM, pH 7,0): 90 mL saf suda 0,27 g $Na_2HPO_4.12H_2O$ ve 0,19 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ çözüldü. pH'sı 7,0'ye ayarlandı ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 8,0): 45 mL saf suda 0,3028 g Tris çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 8,0'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (50 mM, pH 9,0): 45 mL saf suda 0,3028 g Tris çözüldü. 1 N HCl ile pH'sı 9,0'a ayarlandı ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 10,0): 45 mL saf suda 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH'sı 10,0'a ayarlandı ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 11,0): 45 mL saf suda 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH'sı 11,0'e ayarlandı ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Glisin-NaOH Tamponu (50 mM, pH 12,0): 45 mL saf suda 0,187 g glisin çözüldü. 1 N NaOH ile pH'sı 12,0'ye ayarlandı ve son hacim saf su ile 50 mL'ye tamamlandı.

%5'lik Ksilan subsrat çözeltisi: 10 mL saf su içerisinde, 5 g beechwood ksilan çözüldü.

%1'lik Kongo Kırmızısı Çözeltisi: 100 mL saf su içerisinde toz halde olan Congo Red boyasından 1 gram çözüldü.

1 M NaCl Tuz Çözeltisi: 100 mL saf su içerisinde, 5,8 g NaCl tuzu çözülerek hazırlandı.

Protein Tayini Çözeltileri

Bovin Serum Albümin (BSA): Konsantrasyonu (1mg/mL) olacak şekilde, 10 mg BSA saf suda çözülüp, hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

Lowry A Çözeltisi (0,1 N NaOH içinde %2 (a/h) Na2CO3): 0,4 g NaOH ve 2 g Na2CO3 saf suda çözülüp, hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve çözelti kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Lowry B Çözeltisi (%1 CuSO4.5H2O çözeltisi): 1 g CuSO4.5H2O, saf suda çözüldü ve hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. Kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Lowry C Çözeltisi (%2 Na-K Tartarat Çözeltisi): 2 g Na-K tartarat saf suda çözülüp hacmi 100 mL'ye tamamlandı ve çözelti +4°C'de muhafaza edildi.

Lowry D Çözeltisi: Lowry B ve Lowry C karıştırılarak hazırlandı.

Lowry E Çözeltisi: 0,5 mL Lowry D ile 25 mL Lowry A karıştırılarak hazırlandı.

Ayırma Jeli Tamponu: 5,422 g Tris (1,5 M Tris-HCl olacak şekilde), 200 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 8,8'e ayarlandı. Hacmi saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Yığma Jeli Tamponu: 0,285 g Tris (1 M Tris-HCl olacak şekilde), 200 mL saf suda çözüldü ve pH'sı 6,8'e ayarlandı. Hacmi 250 mL'ye tamamlanarak kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Sodyum dodesil sülfat (%10, SDS) : 70 mL saf suda 10 g SDS çözüldü ve hacmi saf su 100 mL'ye tamamlandı.

Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10): 1 g APS 7 mL saf suda çözülüp, hacmi 10 mL'ye tamamlandı ve -20°C'de muhafaza edildi.

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (TEMED): Hazır olarak satın alındı.

Akrilamid/Bisakrilamit Çözeltisi (%30): 29,20 g akrilamid ve 0,80 g N,N'-metilenbisakrilamid, saf suda çözüldü ve hacim 100 mL'ye tamamlandı. Kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Gliserol Çözeltisi (%80): 80 mL gliserolün hacmi, saf suyla 100 mL'ye tamamlandı.

Bromofenol Mavisi: 10 mg bromofenol mavisi, bir miktar saf suda çözüldü ve son hacim 10 mL'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Yürütme Tamponu: 14,4 g Tris ve 3 g glisin yaklaşık 900 ml saf suda çözüldükten sonra, üzerine 20 ml SDS (%10) çözeltisi eklendi. pH'sı 8,3'e ayarlandı ve son hacmi 1000 mL'ye tamamlandı.

SDS-PAGE Yükleme Çözeltisi: 1 M Tris-HCl (pH 6,8'den) 150 µL, %10 SDS'den 400 µL, %0,1'lik bromofenol mavisinden 100 µL, %80'lik gliserolden 250 µL ve 2-merkaptoetanol'den 60 µL karıştırıldı ve küçük kısımlara ayrılarak, -20°C'de muhafaza edildi.

Jel Boyama Çözeltisi: 62,5 mL glasiyel asetik asit ve 93,5 mL metanol içerisinde, 1 g Coomassie Brillant Blue-R250 çözülerek hazırlandı.

Boya Uzaklaştırma Çözeltisi: 50 mL glasiyel asetik asit, 200 mL metanol ve 300 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3. Kullanılan besiyerleri

Triptic Soy Agar (TSA):

Kimyasal	g/L
Agar	15
Tripton	15
Soya Pepton	5
NaCl	5

Triptic Soy Broth (TSB):

Kimyasal	g/L
Glukoz	2,5
Dipotasyum fosfat	2,5
Enzymatic digest of soybean meal	3
Kazein	17

Luria Bertani (LB) Broth

Kimyasal	g/L
Tripton	10
NaCl	10
Maya ekstratı	5

Luria Bertani Agar

Kimyasal	g/L
Tripton	10
NaCl	10
Maya ekstratı	5
Agar	15

Ksilan Besiyeri

Kimyasal		g/L
Beechwood Ksilan		**10**
Tripton		**2**
KH_2PO_4		**4**
Na_2HPO_4		**4**
$MgSO_4.7H_2O$		**0,2**
$CaCl_2.2H_2O$		**0,001**
$FeSO_4.7H_2O$		**0,004**
Agar		**15**

Selülaz Besiyeri

Kimyasal	g/L
Karboksimetilselülaz	**10**
Maya özütü	**10**
NaCl	**10**
Tripton	**10**
Agar	**15**

Amilaz Besiyeri

Kimyasal	g/L
Nişasta	**10**
Pepton	**3**
Na_2HPO_4	**6**
K_2HPO_4	**3**
1 gr NH_4Cl	**1**
NaCl	**0,5**
$MgSO_4$	**0,24**
$CaCl_2$	**0,24**
Agar	**15**

Proteaz Besiyeri

Kimyasal	g/L
Pepton	**10**
Maya özütü	**3**
NaCl	**5**
Agar	**15**

Proteaz besiyeri hazırlanıp otoklavlandıktan sonra, ayrı olarak hazırlanmış ve sterilize edilmiş 11 gr/L Skim Milk Powder ile karıştırıldı.

Nitrat Besiyeri

Kimyasal	g/L
Pepton	**10**
NaCl	**5**
KNO3	**2**
Agar	**3**

3.1.4. Kullanılan kitler

Promega Wizard^{R} genomic DNA purification kit (A2360), pGEM-T Easy Vector System (Promega-A1360); Wizard plus JV minipreps DNA purification System: (Promega-A1330)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerinin toplanması ve termofilik bakterilerin izolasyonu

Rize Ayder kaplıcasından aseptik koşullar altında alınan su örnekleri laboratuvar ortamına getirilerek, TSB (Tripton soy broth) besiyeri üzerinde yazan miktara uygun

olarak karışım hazırlandı ve 55°C'ye ayarlanmış çalkalayıcıda 1 gece inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda % 0,85'lik fizyolojik su (NaCl) kullanılarak bu örneklerden bir seri dilüsyon hazırlandı. Daha önce hazırlanmış ve sterilize edilmiş 10^{-1}'den 10^{-7}'ye kadar kodlanmış olan petrilerin üzerine, her bir tüpten 100 µl alınarak yayma ekim yapıldı ve 55°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilerde bulunan farklı koloni morfolojisine sahip bakteriler seçilerek, saflaştırma işlemine geçildi. Saf olarak elde edilen her bir koloni, TSB sıvı besiyerine inoküle edilerek, 55°C'de 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda test suşlarının bulunduğu tüpler çalkalamalı inkübatörden çıkarılarak, stok kültürleri hazırlandı ve kullanılıncaya kadar -86°C'de muhafaza edildi.

3.2.2.İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

3.2.2.a. Gram boyama

Bakteri hücre duvar yapısındaki temel farklılıkları, gram testi ile anlaşılır. Temelde gram özellikler, 2 farklı yöntemle belirlenir. İlki KOH testi olup, bu testte hazırlanan steril %3'lük KOH çözeltisinden bir damla boş bir petriye konur ve üzerine, katı besi yerinde büyütülen kültürlerden bir öze dolusu bırakılarak iyice homojenize olması sağlanır. Bakteriler, eğer gram negatif ise, özenin yukarı aşşağı hareketi sonunda sakız gibi yukarı uzarken, Gram pozitif bakterilerde herhangi bir uzama görülmez (Bamarouf *et al.* 1996).

İkinci yöntem olan gram boyama ise, 4 basamakta uygulandı. Katı besi yerinde büyütülen genç kültürden alınan bir öze dolusu bakteri, temiz bir lam üzerine fikse edilerek, smear hazırlandı. İlk basamakta kristal violet boyası ile 1 dk boyandı ve sonrasında saf su ile yıkandı. Bu boya her türlü hücreyi doğrudan mora boyamaktadır. Ardından preparatlar, Lügol ile 1 dk kadar muamele edildi ve %96'lık etil alkol ile dikkatlice yıkandı. Gram (+) bakteriler, bünyesindeki kristal violet-lügol kompleksi ile mor kalırken, Gram negatifler ise, bu boyayı tutamaz ve rengini kaybederler. Tekrar örneklerin yer aldığı preparatlar saf sudan geçirilip, son kez safranin boyası ile

boyandıktan sonra, yıkandı ve kurutuldu. İmmersiyon objektifinde bakıldığında, Gram pozitif bakteriler mor, gram negatifler ise pembe renkli olarak görüldü (Özkan 2009).

3.2.2.b. Endospor varlığının belirlenmesi

Endospor, bakterilerin yaşam koşullarını zorlayan ekstrem şartlara karşı kendilerini korumak amaçlı oluşturdukları bir yapıdır. Bu amaçla yaşlı bakteri kültürlerinden öncelikli olarak smear hazırlandı ve bu smearlar kaynar su üzerine konuldu. İlk boya olarak malaşit yeşili kullanıldı ve preparatlar üzerine kurutma kâğıdı konuldu. Bu şekilde üzerine sürekli malaşit yeşili dökülerek, kuruması engellendi. Bu işlem yaklaşık 5 dk sürdürüldü. Süre sonunda, üzerindeki kâğıt alındı ve dikkatlice saf su ile yıkama yapıldı. Karşıt boya olarak 20-30 sn süre ile safranin ile preparatlar muamele edildi. Preparat saf su ile yıkanarak immersiyon objektifinde incelendi (Harley and Prescott 2002).

3.2.2.c. Bakterilerin yaşayabildikleri tuz konsantrasyonlarinin belirlenmesi

Bakterilerin en iyi gelişebildikleri tuz konsantrasyonlarının tespiti için TSB besi yerlerinin içerisine, tuz konsantrasyonları %2-%10 olacak şekilde NaCl ilave edildi. Daha sonra bakteriler bu tüplere steril öze ile inoküle edildi ve 55°C'de inkübasyona 24-48 saat süre ile bırakıldı. Süreç sonunda spektrofotometrik olarak 600 nm dalga boyunda köre (TSB) karşı okundu (Baltaci *et al.* 2016).

3.2.2.d. Bakterilerin yaşayabildikleri pH değerlerinin belirlenmesi

İzolatlar farklı pH değerlerine (3-3,5-4-4,5-5-5,5-6-6,5-7-7,5-8-8,5-9-9,5-10-10,5-11) sahip TSB besi yerlerlerine inoküle edildi ve 55°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda bakterilerin gelişebildiği minimum, maksimum ve optimum pH değerleri 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi (Harley and Prescott 2002).

3.2.2.e.Bakterilerin Yaşayabildikleri Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

TSB besi yerleri içerisine inoküle edilen bakteriler; 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ve 90°C sıcaklıklarda 24-48 saat inkübe edildi ve 600 nm'de spektrofotometrik ölçümlerle, minumum, maksimum ve optimum gelişim sıcaklıkları belirlendi (Baltaci *et al.* 2016).

3.2.2.f. Oksidaz testi

Yapılan oksidaz testleri, canlının sitokrom C proteinlerine sahip olup olmadığını gösterir. Eğer oksidaz sistemi bulunuyorsa, enzimin reaksiyon vermesi sonucunda ortamda mavi renk oluşumu gözlenir. Test için %1 tetra metil-p-fenilendiamin dihidroklorid içeren hazır kit kullanıldı. Üzerine bir damla saf su damlatılarak aktifleşmesi sağlandı, daha sonra bir miktar bakteri ile muamele edildi. Oksidaz pozitif bakteriler mavi-mor renk oluşumu verirken, oksidaz negatifler ise renk oluşumu gözlemlenmedi (Acar 2009).

3.2.2.g. Katalaz testi

ETS sisteminde reaksiyonlar sonucunda oluşan hidrojen peroksitin parçalanmasından sorumlu olan enzim katalaz enzimidir. Katalaz enzimi hidrojen peroksiti parçalayarak, su ve oksijen açığa çıkarır. Oksijen açığa çıkışı sırasında hava kabarcıkları gözlenir. Temiz bir lam üzerine steril bir öze dolusu bakteri alındı ve üzerine %5'lik hidrojen peroksit damlatıldı. Hava kabarcığı çıkan bakteriler; katalaz pozitif, çıkartmayanlar ise; negatif olarak değerlendirildi (Adıgüzel 2006).

3.2.2.h. Nitrat testi

Nitrat besiyeri 121°C'de 15 dk otoklavlandıktan sonra, besiyerinden 10 ml'lik steril test tüplerine 3'er ml aktarıldı. Besiyeri donduktan sonra test edilecek strainler saplama ekim yöntemiyle besi yerine inoküle edildi. Tüplerin üstü otoklavlanarak, sıcaklığı

50°C'ye düşürülen % 3'lük su agar ile kaplandı. 55°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı Bakterinin ortamda gelişmesi nitrat pozitif, gelişmemesi ise negatif olarak değerlendirildi (Klement *et al.* 1990). Bakterilerin gelişim katmanlarına bakarak ise aerop, fakültatif veya anaerob şeklinde gruplama yapıldı (Adıgüzel 2006).

3.2.2.ı. Amilaz testi

Bakterilerin nişasta molekülünü parçalayan amilaz enzimini içerip içermediklerini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen bir testtir. Bu amaçla bakteriler amilaz katı besiyerine ekildi ve 55°C'de 2-3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilerin üzerine lugol solüsyonundan 5 ml kadar döküldü ve mavi renk verenler negatif, mavi renk vermeyip, ekim çizgileri etrafında açık zon oluşturanlar ise pozitif olarak değerlendirildi (Klement *et al.* 1990).

3.2.2.i. Proteaz testi

Skim Milk Powder eklenmiş steril hale getirilen besi yeri petrilere döküldü ve donması beklendi. Daha sonra her bir örnekten steril öze ile çizgi ekim yapıldı. Petriler 55°C'de 3-4 gün süre ile bekletilerek, test izolatlarının proteaz aktiviteleri belirlendi (Adinarayana *et. al.* 2003).

3.2.2.j. Ksilanaz testi

Ksilanaz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, petride katı ksilan besiyeri hazırlandı ve otoklavladı. Stoktan canlandırılan her bir izolat, ksilan petrilerine çizgi ekim yöntemiyle ekilip, 55°C'de 3-4 gün boyunca inkübe edildi. Etüvden çıkarılan % 0,1'lik Kongo Red boyasından döküldü ve 15 dk bu şekilde bekletildi. Ardından petrilere hazırlanan 1 M NaCl tuz çözeltisinden bir miktar eklenerek 15 dk yıkanması sağlandı. Süre sonunda zon oluşup oluşmadığı gözlendi (Voget *et al.* 2006).

3.2.2.k. Selülaz testi

Selülaz aktivitesini belirlemek amacıyla selülaz besiyeri hazırlandıktan sonra, bakteriler steril öze ile katı besiyerine ekildi. 55°C'lik etüvde 3-4 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petrilerin üzerine % 0,1 lik Kongo Red boyası döküldü ve 15 dk bekletildi. Daha sonra 1 M NaCl ile yıkanarak, oluşan zon gözlemlendi (Voget *et al.* 2006).

3.2.3. Moleküler testler

3.2.3.a. Genomik DNA izolasyonu

Sıcak su örneklerinden izole edilen termofilik bakteriler ilk önce stoktan TSA besiyerine ekilerek canlandırıldı. Daha sonra bu petrilerden tek bir koloni alınarak, TSB sıvı besiyerine aktarıldı ve bir gece 55°C 150 rpm de inkübe edildi. Süre sonunda kültürlerden Promega wizard^{R} genomic DNA purification kit (A2360) protokolü ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi.. Bunun için; bir gece inkübasyona bırakılan TSB besiyerleri içerisindeki bakteri kültürü santrifüj ile çöktürüldü. Süpernatant atıldıktan sonra, çökelti üzerine 480 µl 50 mM EDTA ve 120 µl 10 mg/ml lizozim ilave edilerek, 1 saat 37°C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 14000 rpm'de 2 dk santfirüj yapılıp, süpernatant uzaklaştırıldı. Üzerine 600 µl Nüklei Lizis eklendi ve homojen hale getirmek için pipetajlandı. Elde edilen karışım 5 dk boyunca 80°C'de inkübe edildi, soğuduktan sonra üzerine 3 µl RNase A eklendi. Alt üst edilen karışım yarım saat 37°C'de inkübe edildi. Tekrar oda sıcaklığında soğutulan karışıma Protein Presipitasyon solüsyonundan 200 µl eklendi ve 20 sn vortekslendi. Bu karışım buza alındı ve burada 5 dk bekletildikten sonra, 14000 rpm'de 30 sn santfirüj edildi. Elde edilen süpernatant, içinde 600 µl izopropanol ile oda sıcaklığında beklemiş ependorf içerisine alındı. Pellet oluşumu gözle görünür bir şekle gelene kadar, ependorflar alt üst edildi. Tekrar 14000 rpm'de 2 dk santfirüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Kurutma kâğıdı üzerinde içindeki sıvının tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Yıkama amaçlı üzerine %70'lik etanolden 600 µl eklendi. 14000 rpm de 2 dk santfirüjlendi, süpernatantı uzaklaştırılıp

20 dk 37°C'de inkübe edildi. Ependorflara 100'er µl DNA Rehidrasyon solüsyonu eklenerek 1 saat boyunca 65°C'de bekletildi. Daha sonra tüpler kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.3.b. 16S rRNA PCR işlemi

16S rRNA bölgesi, evrimsel açıdan korunmuş bölge özelliği içerdiğinden, bakteri sistematiği açısından oldukça önemli olup, bu bölge test izolatlarında evrensel primerler kullanılarak çoğaltıldı. Bu amaçla 30µl'lik bir PCR karışımı hazırlandı.

REAKTİFLER	**STOK KONSANTRASYON**	**(µL)**	**MİKTAR (µL)**
PCR Buffer	10X		3
Dntp	10 mM		0,6
$MgCl_2$	25 mM		1,8
Forward primer	5 pmol		3
Reverse primer	5 pmol		3
DMSO	%99		1,2
ddH_2O	-		14
Taq DNA polimeraz	5 u/µl		0,4
Kalıp DNA	100 ng		3
Toplam			**30**

PCR programı:

Ön denatürasyon	**95°C**	**2 dk**
Denatürasyon	**94°C**	**1 dk**
Bağlanma	**49°C**	**1 dk**
Uzama	**72°C**	**2 dk**
Son uzama	**72°C**	**5 dk**
Saklama	**4°C**	**-**

İkinci denatürasyon sıcaklığı olan 94°C, bağlanma sıcaklığı olan 49°C ve uzama basamağı olan 72°C, 36 döngüde gerçekleştirildi (Adıgüzel 2009).

3.2.3.c. 16S rRNA PCR ürünlerinin elektroforezi

1X TAE tamponu kullanılarak %1'lik agaroz jel hazırlandı, donma sıcaklığına yakın bir aşamada üzerine 0,4 µl etidyum bromür eklendi ve tarakları yerleştirilmiş olan küvete karışım döküldü. Yaklaşık yarım saat donması beklendi. Donan jelden dikkatlice taraklar çıkartıldı ve ilk kuyuya 10 kb'lık DNA markır (Sigma D-7058) konuldu. Diğer PCR ürünleri 1 µl 6X yükleme boyası + 3 µl ile PCR ürün karışımı karıştırılarak yüklendi ve jel 100 voltta 1 saat süreyle yürütüldü. Süre sonunda yürüyen jel üzerindeki PCR ürünleri Quantum Vilber Laurnat Gel Documantation System ile görüntülendi (Adıgüzel 2006).

3.2.3.d. Kompotent hücre hazırlanması

Kompotent hücre hazırlamak amaçlı *Escherichia coli* JM101 suşu kullanıldı. Bakteri, stoktan katı besiyerine 3 faz ekim yapılarak canlandırıldı. Tek bir koloni LB broth (4 ml) içerisine inoküle edildi ve 1 gece boyunca 37°C'de çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı. 2700 µL su üzerine 300 µL kültür konularak spektorofotometrik olarak 600 nm'de ölçüm yapıldı. Böylece kültürden ne kadar alınması gerektiği hesaplandı. Ayrı bir erlende hazırlanan 30 ml LB sıvı besi yeri üzerine, hesaplama sonucu eklenmesi gereken kültür miktarı bırakıldı ve 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 50-90 dk süre ile inkübe edildi. İstenilen değere ulaşılınca, kültür 4000 rpm'de 10 dk çöktürüldü ve süpernatant atıldı. Çökelti üzerine 10 ml 100 mM $CaCl_2$ soğuk olarak eklendi ve 40 dk buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda tüpler +4°C'de, 4400 rpm'e ayarlı santifrüjde 10 dk boyunca çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve üzerine 2 ml 100 mM $CaCl_2$ eklenerek buzdolabında 1 gece bekletildi.

3.2.3.e. Ligasyon basamağı

PCR tüplerine, aşağıdaki karışım hazırlandı ve 1 gece 16°C kadar bekletildi ve sonra inkübatörden çıkarılarak, kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edildi

Reaktif	**Miktar (µl)**
2X Ligasyon buffer	5
PCR Ürünü	3
Vektör	1
T_4 DNA Ligaz	1
Toplam	**10**

3.2.3.f. Transformasyon basamağı

Buzdolabında muhafaza edilen kompotentten 200 µl alınarak, örnek sayısı kadar ependorflara bölündü. Üzerine yine buzdolabında bekletilen ligasyon ürününden 2,5 µl eklendi ve yarım saat buzda bekletildi. Buradan tüpler alınarak 42°C'ye ayarlı olan sıcak su banyosuna bırakıldı ve 2 dk süre bekletildi ve ısı şokuna tabi tutuldu. Karışımın üzerine 200 µl LB besi yeri konularak, 37°C'de 100 dk boyunca inkübe edildi. Diğer yandan amfisilinli katı besiyerine, 40 µl X-gal ve 40 µl IPTG yayıldı ve besiyeri üzerine emilimi sağlandıi. Daha sonra kompotent + ligasyon ürünü karışımından 150 µl alınarak, petriye bırakıldı ve steril drigalski özesi ile petriye dikkatlice yayıldı. Karışımın emdirildiği petriler, 37°C'lik etüvde 18 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.g. Kolonilerin seçilmesi ve sivi kültüre alinmasi

37°C'de inkübe edilen petriler, süre sonunda +4°C'ye alındı ve bir gece bekletildi. Böylece mavi beyaz kolonilerin oluşumu gözlendi. İstenen gen bölgesinin aktarıldığını gösteren beyaz koloniler, steril bir kürdan ile alındı ve içinde 3 µl amfisilin bulunduran LB sıvı besi yeri içeren tüplere inoküle edildi. Daha sonra tüpler bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

3.2.3.h. Koloni PCR

İnkübe edilen kültürden 4 µl alınıp, içinde 16 µl steri saf su bulunan tüplere konuldu. Daha sonra bu tüpler kaynar halde bulunan su banyosuna alınarak, burada 10 dk bekletildi ve hemen ardından 2 dk buz şokuna maruz bırakıldı. Süre sonunda karışım 12000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj edildi. Daha sonra bu örneklerden süpernatant kısmından 3 µl alınarak, reaksiyon koşulları aşağıdaki gibi oluşturuldu.

Reaktif	**Miktar (µl)**
dH_2O	16,1
Tampon	3
dNTP miks	0,6
$MgCl_2$	1,8
T7 primer	2
SP6 primer	2
DMSO	1,2
Taq polimeraz	0,3
Süpernatant	3
Toplam	**30**

Reaksiyon koşulları ;

Ön denatürasyon	**94°C**	**2 dk**
Denatürasyon	**94°C**	**30 sn**
Bağlanma	**55°C**	**30 sn**
Uzama	**72°C**	**2 dk**
Son uzama	**72°C**	**10 dk**
Saklama	**4°C**	**-**

Hazırlanan %1'lik agaroz jele; ilk kuyuya markır olmak üzere, negatif ve pozitif kontroller yüklendi. Jel 110 voltta 1 saat yürütüldü. Görüntülenme sonrası geni taşıyan koloniler seçildi ve petri üzerindeki strail kolonilerden alınarak 4 ml amfisilin bulunduran LB sıvı besi yerine inokülasyonu yapıldı.

3.2.3.ı. Plazmit izolasyonu

Promega A1330 plazmit izolasyon kitine ait protokol uygulanarak, plazmit izolasyonu yapıldı. Protokole göre;

- LB sıvı besi yerindeki kültür, 11000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Çökelti üzerine, 250 µl Cell Resuspension solüsyonu eklendi ve pipetajlanarak homojen hale getirildi.
- Üzerine Cell Lysis solüsyonundan 250 µl eklendi ve alt üst edilip, oda sıcaklığında 5 dk beklemeye bırakıldı.
- Süre sonunda üzerine, Alkaline Protease Solution'dan 10 µl ilave edildi ve yine 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Nötralizasyon çözeltisinden 350 µl eklendi ve 13000 rpm'de 10 dk santfirüj yapıldı.
- Kullanılacak olan süpernatanttan 700 µl alındı, içinde kolon olan ependorf tüpüne aktarıldı ve 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolonun üstte kalan kısmına, 750 µl Wash Solution eklendi ve 13000 rpm'de santfirüjlendi.
- Yine kolonun üzerine Wash Solution dan 250 µl eklendi ve 13000 rpm'de 2 dk santfirüj edildi.
- Alttaki sıvı uzaklaştırılıp, 1 dk 13000 rpm'de tekrar santfirüjlendi.
- Kolon yeni bir ependorfa aktarıldı ve 100 µl Nuclease-Free Water ilave edildi. 1 dk 13000 rpm'de santfirüjlendi.
- Kolon uzaklaştırıldı ve tüpler -20°C'de saklandı. Sonuçların kesin olması için *EcoRI* ile kesilerek, agaroz jelde yürütüldü ve sonunda sonuçların doğruluğu kontrol edildi (Baltacı 2015).

3.2.3.i. Plazmit konsantrasyonunun belirlenmesi

- 2 µl plazmit üzerine, 998 µl saf su eklendi ve 260 nm'de spekrofotometrik ölçümü yapıldı.
- Plazmit konsantrasyonu 150-200 ng olacak şekilde hesaplandı.
- İstenilen konsantrasyondan 50 µl alınarak, sekans analizi için Macrogen (Hollanda)'e gönderildi.

Sekans sonuçları BioEdit programı ile analiz edilip Fasta formatına döndürüldü. Primerler bulundu. Diziler anlamlı hale getirildi.

3.2.3.j. BOX-PCR ile gen profillerinin belirlenmesi

BOX A1R (5`-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3`) üniversal primeri kullanılarak, rep-PCR analizi gerçekleştirildi (Adıgüzel *et al.* 2006). (Denatürasyon, bağlama ve uzama 35 döngüdür.)

Reaktif	**Miktar (µl)**
dH_2O	10,7
G- Buffer	5
DMSO	2,5
BSA	1,25
dNTP	1,25
Primer	5
Taq polimeraz	0,3
DNA	4
Toplam	**30**

Ön denatürasyon	**95°C**	**7 dk**
Denatürasyon	**94°C**	**1 dk**
Bağlanma	**53°C**	**1 dk**
Uzama	**65**	**8 dk**
Son uzama	**72°C**	**16 dk**
Saklama	**4°C**	**-**

3.2.3.k. BOX-PCR ürünlerinin elektroforezi

%1'lik agaroz jel hazırlandı ve donması için jel tankına döküldü. Küçük tankta yapılan yürütme işlemi için 0,4 µl etidyum bromür eklendi. Donan jelden dikkatlice taraklar çıkartıldı. İlk kuyuya 10 kb'lık DNA markırdan (Sigma D-7058) 3 µl konuldu. Kuyulara ise 3 µl PCR ürünü+ 1 µl 6X yükleme tamponudan oluşan karışım yüklendi. Jel 90 voltta 2 saat yürütüldü. Jelde yürüyen PCR bantları Quantum Vilber Laurnat Gel dökümantasyon sistemi ile görüntülendi (Adıgüzel 2006) .

3.2.4.Enzim saflaştirilmasi ve karakterizasyonu çalışmaları

3.2.4.a.Ksilanaz enzimini üreten izolatlarin belirlenmesi

Ksilanaz enzim üreten bakteri izolatlarının belirlenmesi amacıyla stoktaki bakteriler, TSA katı besiyerine 3 faz ekim yapıldı ve 55°C'deki etüvde bir gece inkübasyona bırakıldı. Gelişen saf bakteriyal kolonilerden steril öze ile az bir miktar alınarak daha önce hazırlanmış katı ksilan besiyerlerine çizgi ekim yöntemiyle aktarıldı (Behera *et al.* 2014) ve 55°C'deki 3 - 4 gün süre ile inkübe edildi. Petrilerde ksilanaz enzimin üretilip üretilmediğinin belirlenmesi için ilk önce petriler, %1'lik Congo Red ile 15 dk daha sonra ise hazırlanan 1 M NaCl tuz çözeltisi ile 25 dk muamele edildi. Zon oluşumu pozitif, oluşmaması ise negatif olarak değerlendirildi (Voget *et al.* 2006).

3.2.4.b. Sıvı besiyerinde enzim aktivitesinin belirlenmesi

Katı besiyerinde ksilanaz enzim üretim zonu en geniş olan bakteri seçildi ve sıvı besiyerinde büyütüldü. Ksilanaz üretimi %2 Ksilan içeren LB besiyeri içinde gerçekleştirildi. Sıvı besiyerine bir öze dolusu bakteri inoküle edildi ve 3 gün 55°C'de 150 rpm'de çalkalandı. İnkübasyon sonunda besi yerinden 2 ml ependorfa alınarak 13000 rpm'de 10 dk santfirüj edildi. Süpernatant ayrı bir ependorfa aktarılarak çökelekten uzaklaştırıldı. Ayrı bir tüp içerisinde aktivite ölçümü için, 300 µl 50 mM (pH 8) Tris tamponu ve 200 µl %5'lik ksilan substrat karıştırıldı. En son üzerinde santfirüj sonrası elde edilen homojenattan 500 µl eklendi. Karşılığı olan kör tüp ise farklı olarak enzim yerine saf su konularak hazırlandı. Bu karışım 55°C su banyosunda 15 dakika inkübe edildi. Ardından üzerine 1 ml DNS çözeltisi ilave edilerek 90°C'deki su banyosunda 5-10 dk inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometre cihazında köre karşı 540 nm dalga boyunda renk değişimi ölçüldü (Miller 1959; Arıkan 2008). İstenilen aktivite değeri elde edildiğinde, besiyerinin tamamı 13000 rpm'de 10 dk çöktürüldü ve sonraki basamaklara geçene kadar +4°C'de muhafıza edildi.

Ksiloz standart grafiğini elde edebilmek için 1 mg/mL ksiloz 50 mM pH 7 fosfat tamponu içerisinde hazırlandı. Bu stok çözelti aynı tampon ile seyreltilerek 20-40-60-80-100 µg/ml konsantrasyonlarında standart çözeltiler hazırlandı. Herbir çözeltiden 500 µl alınarak ayrı ayrı tüplere aktarıldı. Sonra tüplere sırası ile 300 µl 50 mM fosfat tamponu (pH 7) ve 200 µl %5'lik ksilan substratı eklendi ardından 1 ml DNS çözeltisi eklendi. Hazırlanan karışımlar 90°C'deki su banyosunda 5-10 dk inkübasyona bırakıldı. Spektrofotometre cihazında köre karşı 540 nm dalga boyunda renk değişimi ölçüldü.

3.2.4.c. Protein tayini

Lowry metodu ile protein tayini yapıldı. Bu yöntemde protein standardı olarak Sığır Serum Albümini (BSA) tercih edildi. Protein standardının grafiğini çizmek amaçlı ilk 5 tüpe 10, 20, 30, 40 ve 50 µl BSA çözeltisinden konuldu. Bunun yanında ise alınan homejenat örneğinden ayrı bir deney tüpüne 10 µl ilave edildi. Tüplerin son hacimleri

500 µl olacak şekilde 0,1N NaOH içindeki %0,1 SDS çözeltisi eklendi ve vortekslendi. Her bir tüpe 1 ml Lowry E çözeltisi (%2 sodyum-potasyum tartarat, %1 CuSO4.5H2O ve 0.1N NaOH içerisinde %2 Na_2CO_3) eklendi. Tüpler vortexlendi ve oda sıcaklığındaki karanlık ortamda 10 dakika bekletildi. Folin Reaktifi saf su ile 1:1 oranında seyreltildi ve tüplere 100 µl eklendi. Tüpler vortekslenip, oda sıcaklığındaki karanlık ortamda yarım saat bekletildi. 650 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve grafik çizilerek protein konsantrasyonu hesaplandı (Lowry *et al.* 1951).

3.2.4.d.Saflaştırma Basamakları

1. Aseton çöktürmesi

Ksilanaz besiyerinin çöktürülmesinden sonra kalan ham homojenatın hacmi ölçüldü. Bulunan hacme göre 1:1 oranında aseton çöktürmesi yapıldı. -20°C'de bekletilen aseton pastör pipeti ile damla damla, yavaş bir şekilde homojenata eklendi. Eklenme işlemi sırasında manyetik karıştırıcı kullanıldı ve işlem +4°C'de yapıldı. Asetonun tamamının eklenmesi ile karışım 30-60 dk arasında -20°C'de bekletildi. Ardından 13000 rpm'de 30 dk santrfirüj yapıldı. Oluşan çökelek, oda sıcaklığında ağzı açık bir şekilde bekletilerek asetonun uçması sağlandı. Çökelek en az miktarda olacak şekilde çözünebildikleri tampon içinde çözüldü.

2. Dietilaminoetil-Selüloz (DEAE-selüloz) kolonu

İyon değişim kromatografisi olan DEAE-Selüloz kolonu ile ayrıştırılmak istenen moleküllerin diğer tüm moleküllerle önce kolona tutulması, daha sonra ortama verilen farklı iyon şiddetleri ile kademe kademe birbirinden ayırıp istenilenin proteinin daha saf elde edilmesi sağlanır. Bu yöntem ile peptitler, polinükleotidler, nükleik asitler sıkça saflaştırılır (Wilson and Walker 2010).

Aseton ile çöktürme sonrasında, enzimin aktivite verdiği çökelek 24 saat 50 mM Tris pH 8 tamponu içerisinde diyalize bırakıldı. Daha sonra kolona doldurulan reçine 20

mM'lık Tris-HCl pH 8 tamponu ile dengelendi. Dengelenen kolona enzim yüklendi. Kolon reçinesine bağlanmayan bileşenlerin uzaklaştırılması için kolon 20 mM Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Daha sonra kolona bağlanan proteinlerin elüsyonuna geçildi. Bu amaçla 100-200-300-400-500 mM lık NaCl içeren Tris-HCl tamponlarından 50'şer ml verildi ve kolon fraksiyonları 5 ml'lik hacimlerle tüplere toplandı. İlk olarak 280 nm'de protein yoğunluğuna bakılan fraksiyon tüplerine, aktivite tayini yapıldı.

3. Sefadeks G-100 kolonu

Jel filtrasyon kromatografisi olan Sefadeks G-100 kolon materyali, 60 cm x 3 cm ebatlarındaki kolona doldurulduu. Bunun için ilk olarak 0,1 M $NaHCO_3$ pH 10,0 tamponu ile şişirilen reçine, 50 mM fosfat tamponuna (pH 7,5) alındı. Kolon ve kullanılan çözeltilerin havası alındıktan sonra, Sefadeks G-100 pastör pipeti ile yavaşça doldurulduu. Dengeleme işlemi ise pH 7,5 olan 50 mM fosfat tamponu ile yapıldı. Dengelendiği spektrofotometrik olarak belirlenen kolona üstten, önceki iyon değişim kromatografisinde aktivite veren örnekler yüklendi. Proteinlerin ayrımı için ise üstten tampon verildi. Bu sırada 5 ml'lik elüsyonlar toplandı. Her bir elüatın 280 nm'de absorbans ölçümü yapılarak absorbans gösteren tüplerde aktivite tayini yapıldı.

4. SDS-PAGE İle enzim saflığının kontrolü ve enzim molekül ağırlığının tayini

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılacak aparatların temizliğine dikkat edildi, leke kalmayacak şekilde yıkanmasına özen gösterildi. Kalın ve ince olan iki cam tabaka üst üste getirilip, kıskaçlı aparatın içine geçirilerek sıkıştırıldı. Kıskaçlı aparat jel hazırlama aparatına yerleştirildi. Jel hazırlamak için aşağıdaki oranlar kullanıldı.

Kimyasallar	%8 lik Ayırma Jeli	%5 lik Yükleme Jeli
Su	4600 µl	3400 µl
%30Akrilamid/bisakrilamid	2700 µl	830 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	2500 µl	-
1.0 M Tris (pH 6.8)	-	630 µl
%10 SDS	100 µl	50 µl
% 10 APS	100 µl	50 µl
TEMED	6 µl	5 µl

İlk olarak hazırlanan ayırma jeli, enjektörler yardımı ile 2 cam plaka arasına enjekte edildi. Üstten kullanılacak tarağın alanı adar boşluk bırakıldı. Hava kabarcıklarının oluşma olasılığına karşın, üst hizaya kadar izopropanol eklendi. Jelin donması yarım saat kadar beklendi. Donduğundan emin olunduğunda ise izopropanol uzaklaştırıldı. Üst tarafa dökülecek olan yükleme jeli hazırlandı ve enjekte edildi. Hemen ardında iyice temizlenmiş tarak yerleştirildi. Yine yarım saat kadar jelin donması beklendi. Donan jelden tarak dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Jel hazırlama aparatından çıkarılan jel, tankın içerisine yerleştirildi. Yürütme tamponu tankın içerisine döküldü. Diğer yandan yüklenip yürütülecek örnekler hazırlandı. Bunun için 20 µl protein örneği, 10 µl yükleme boyası ile karıştırıldı. Bu karışım proteinlerin denatüre olması amacıyla 90°C su banyosunda 5 dk bekletildi. Kuyulardan ilkine proteinin molekül ağırlığını belirlememize yardımcı olacak olan 4 µl markır yüklendi. Diğer kuyulara ise denatüre edilen karışımdan 22 µl yüklendi. Cihaz 30 mA'de, boya hizası camın en alt sınırına gelene kadar yürütüldü. Yürütmesi biten jel, boyama için cam plakalardan dikkatlice çıkartıldı. Commasie Blue boyaması ile jel boyandı. İlk olarak Commasie Brillant Blue'nun hazırlandığı çözeltide 2 saat bekletildi. Ardından boyayı uzaklaştırma çözeltisinde bantlar görünene kadar yıkamaya bırakıldı.

5. Zimogram analizi

Kimyasallar	%8 lik Ayırma Jeli	%5 lik Yükleme Jeli
%5 lik xylan substrat	500 µl	-
Su	4600 µl	3400 µl
%30Akrilamid/bisakrilamid	2700 µl	830 µl
1.5 M Tris (pH 8.8)	2500 µl	-
1.0 M Tris (pH 6.8)	-	630 µl
%10 SDS	100 µl	50 µl
% 10 APS	100 µl	50 µl
TEMED	6 µl	5 µl

Jel yukarıdaki gibi hazırlandıktan sonra SDS-PAGE yürütmesinde olduğu gibi tank hazırlandı, örnekler kuyuya verildi ve jel yürütüldü. Ancak jele yüklenecek örnekler 45°C'de 10 dk inkübe edilerek yüklendi. (Laemmli 1970). Tanktan alınan jel hazırlanan %2,5 luk Triton X-100 çözeltisinde yarım saat bekletildi. Ardından hazırlanan sodyum fosfat pH 7 tamponunda yarım saat yıkandı. Enzim ve subsrat arasında tepkimenin gerçekleşeceği ortam olan 55°C'de aynı sodyum fosfat tamponu ile 15-30 dk arasında inkübe edildi. Reaksiyonun gerçekleştiği ortam %0,1 lik Congo Red boyası ile 15 dk muamele edildi ve ardından 1 M NaCl çözeltisinde reaksiyonun gerçekleştiği yerde açılma olana kadar yıkamaya bırakıldı.

3.2.4.e. Ksilanaz enziminin biyokimyasal karakterizasyonu

1. Ksilanaz enziminin farklı substratlara karşı spesifitesinin belirlenmesi

Farklı substratlar olarak kayın ağacı (beechwood), huş ağacı (birchwood), yulaf kepeği (oat bran) ve karboksimetilselüloz (CMC) kullanıldı. Her bir substratın %5'lik çözeltisi hazırlandı. Tayinde substratlar ayrı şekilde körleri ile hazırlandı ve 540 nm de aktiviteler ölçüldü. Substratların parçalanma oranları birbiri aralarında değerlendirildi.

2. Ksilanaz enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi ve pH kararlılığı

Optimum pH ve pH kararlılığın belirlenmesi amacıyla çözeltiler hazırlandı. pH 4,0-5,0 için asetat tamponu, pH 6,0-7,0 için sodyum fosfat tamponu, pH 8,0-9,0 için Tris-HCl tamponu, son olarak pH 10,0 Glisin- NaOH tamponları hazırlandı.

Ksilanaz aktivitesi pH'nın bir fonksiyonu olarak, pH 4,0-10,0 arasındaki pH'larda herbir pH için yukarıdaki ilgili tamponlar kullanılarak belirlendi.

pH kararlılığını incelemek için, elde edilen saf enzim elüatı, pH 4,0-10,0 arasındaki pH'lardaki tamponlar ile 1:1 oranında karıştırıldı ve 4°C'de 24 saat ve 168 saat inkübe edildi. Karışımlar hazırlanır hazırlanmaz ve inkübasyon sonrasında optimum koşullarda ksilanaz aktivitesi ölçüldü (Burhan *et al.* 2003; Aygan and Arikan 2009).

3. Ksilanaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Ksilanaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla ile 30-90°C sıcaklık aralığında, sıcaklık 10°C artırılarak aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Bu aşamada 200 µl substrat, 300 µl tampon ve 500 µl enzim karışımı sırasıyla yukarıda verilen sıcaklık değerlerinde 15'er dakika inkübe edildi ve her aralıkta aktivite bakıldı (Burhan *et al.* 2003).

4. Ksilanaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

Saflaştırılan ksilanaz enziminin Km ve Vmax değerlerini belirlemek amacıyla grafiği çizmek için önce %0,4-0,5-0,75-1-2,5-5-10-25-50-75-100 olarak 11 farklı konsantrasyona sahip ksilan subsratı hazırlandı. Her bir substrattan 200 µl alınarak aktivite tayin yönteminde olduğu gibi, 300 µl tampon ve 500 µl enzim ile karıştırıldı ve aktivite ölçümü sonrasında Lineweaver-Burk grafik çizilerek K_m ve V_{max} değerleri hesaplandı.

5. Bazı metal iyonlarının ve inhibitörlerin ksilanaz enzim aktivitesi üzerine etkisi

İzole edilen ksilanaz enziminin Na^{+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}, Al^{3+} gibi katyonlar ve CN^{-}, HSO_3^{2-}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, HCO_3^{-}, HPO_4^{2-}, $B_4O_7^{2-}$ gibi anyonlar ile aktivitesinin nasıl değiştiği incelendi. Öncelikle bu iyonların 100 mM'lık çözeltileri hazırlandı. Aktivite tayini için reaksiyon karışımında, metal iyonunun nihai konsantrasyonu 5 mM olacak şekilde hazırlandı. Asıl olarak kullanılan aktivite miktarlarından farklı olarak, bu sefer tüplere 200 µl substrat, 250 µl tampon, 50 µl metal iyonu ve 500 µl enzim kullanıldı. Kör tüpüne enzim yerine saf su konuldu. Tüpler 55°C'de 15 dakika inkübe edildi ve ardından üzerine 1 ml DNS eklendi. 5-10 dakika inkübe edildikten sonra, spektrofotometrede 540 nm dalgaboyunda ölçüm yapıldı. Metal iyonu konulmayan bir tüp %100 aktivite olarak kabul edilip, diğer örneklerdeki aktivite düşüşleri buna göre hesaplandı.

Enzim aktivitesine etkisi olup olmadığının anlaşılması amacıyla, EDTA, β-merkaptoetanol, sülfonamid inhibitörleri de kullanıldı. Bu maddelerin yine 100 mM'lık çözeltileri hazırlandı, reaksiyon karışımında 5 mM olacak şekilde ayarlandı. Aktivite tayini yapıldı ve bağıl aktivite hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Termofilik Bakterilerin İzolasyonu İle İlgili Sonuçlar

Rize-Ayder kaplıcalarından alınan su örneklerinden izole edilen 11 termofilik izolatın tür seviyesinde identifikasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra bu bakterilerin petri üzerinde ksilanaz enzim üretilme potansiyelleri araştırıldı. En geniş zonu veren BS61 suşu ile çalışmaya devam edildi. Ayrıca izole edilen tüm strainler (BS11, BS12, BS13, BS14, B15, BS16, BS17, BS18, BS19, BS20, BS61) kullanılıncaya kadar, stoklanarak -86°C'de muhafaza edildi.

4.2. İzolatların Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Rize-Ayder kaplıca sularından elde edilen 11 izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla bazı testler uygulandı.

Yapılan Gram testleri sonucunda 11 suşun hepsinin Gram pozitif olduğu, endospor testlerinde ise 11 suştan BS19 hariç tamamının endospor oluşturduğu ve morfolojik analizler sonucunda ise tüm izolatların çubuk hücre morfolojisine sahip olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.1).

İzolatların fizyolojik özelliklerini belirlemek amacıyla gelişebildikleri tuz konsantrasyonları, pH değerleri ve sıcaklık aralıkları belirlendi. BS11- BS16 ve BS20'nin: %2-8 tuz konsantrasyonunda, pH 6,5-9,5 aralığında ve 30-60°C sıcaklıklarda; BS17'nin %2-8 tuz konsantrasyonunda, pH 6,5-8,5 aralığında ve 40-60°C sıcaklıklarda; BS18'in %2-10 tuz konsantrasyonunda, pH 7-8 aralığında ve 30-70°C sıcaklıklarda; BS19'un %2-6 tuz konsantrasyonunda, pH 5,5-8,5 aralığında ve 45-60°C sıcaklıklarda; BS61'in %2-4 tuz konsantrasyonunda, pH 6-8 aralığında ve 50-60°C sıcaklıklarda gelişebildikleri belirlendi (Çizelge 4.1).

İzolatların biyokimyasal özellikleri tespit etmek amacıyla yapılan testler sonucunda; izolatların tamamının oksidaz, katalaz ve nitrat pozitif olduğu görüldü. Ayrıca bazı endüstriyel önemi olan enzimleri üretebilme potansiyelleri de araştırıldı. Buna göre 11 suştan; 8'inin amilaz (BS17, BS18, BS20 hariç) , 8'inin proteaz (BS18, BS19, BS61 hariç), 9'unun ksilanaz (BS18 ve BS20 hariç) ve 9'u nun ise selüloz pozitif (BS17 ve BS18 hariç) olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1).

Ayrıca izolatların oksijen isteklerini tespit etmek amacıyla yapılan analiz sonucunda tüm izolatların fakültatif özellik gösterdiği belirlendi.

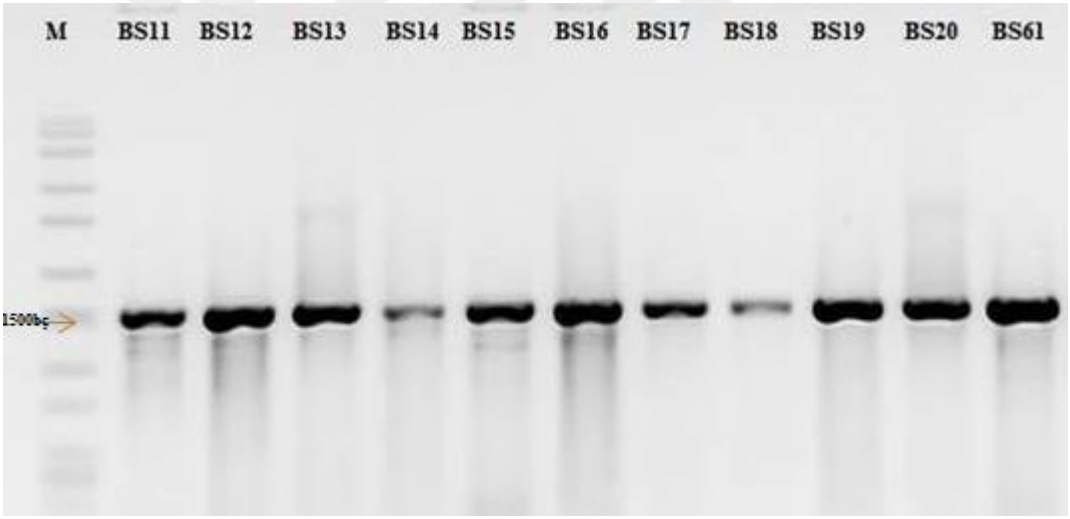
Çizelge 4.1. İzolatların morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal test sonuçları

İzolat kodu	Gram testi	Endospor testi	Hücre Morfolojisi	%Tuz konsantrasyonu	pH aralığı	Sıcaklık (°C)	Oksidaz	Katalaz	Nitrat	Amilaz	Proteaz	Ksilanaz	Selülaz
BS11	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 9,5	30-60	+	+	+	+	+	+	+
BS12	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 9,5	30-60	+	+	+	+	+	+	+
BS13	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 9,5	30-60	+	+	+	+	+	+	+
BS14	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 9,5	30-60	+	+	+	+	+	+	+
BS15	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 9,5	30-60	+	+	+	+	+	+	+
BS16	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 9,5	30-60	+	+	+	+	+	+	+
BS17	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 8,5	40-60	+	+	+	-	+	+	-
BS18	+	+	Çubuk	2-10	7-8	30-70	+	+	+	-	-	-	-
BS19	+	-	Çubuk	2-6	5,5-8,5	45-60	+	+	+	+	-	+	+
BS20	+	+	Çubuk	2-8	6,5- 9,5	30-60	+	+	+	-	+	-	+
BS61	+	+	Çubuk	2-4	6-8	50-60	+	+	+	+	-	+	+

4.3. Moleküler Test Sonuçları

4.3.1. 16S rRNA PCR amplifikasyon sonuçları

Yapılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testlerden sonra, izolatların moleküler karakterizasyonu aşamasına geçildi ve bu amaçla ilk olarak test suşlarının genomik DNA'ları izole edildi. Daha sonra evrensel primerler kullanılarak evrimsel olarak korunmuş olan 16S rRNA bölgesi çoğaltıldı ve %1'lik agaroz jelde 100 voltta 1 saat süre ile örnekler yürütüldü. Süre sonunda çıkarılan jel, görüntülenme sisteminde incelendiğinde tüm örneklerin 1500 bç uzunluğunda tek bant verdikleri belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İzolatların 16S rRNA PCR agaroz jel görüntüsü

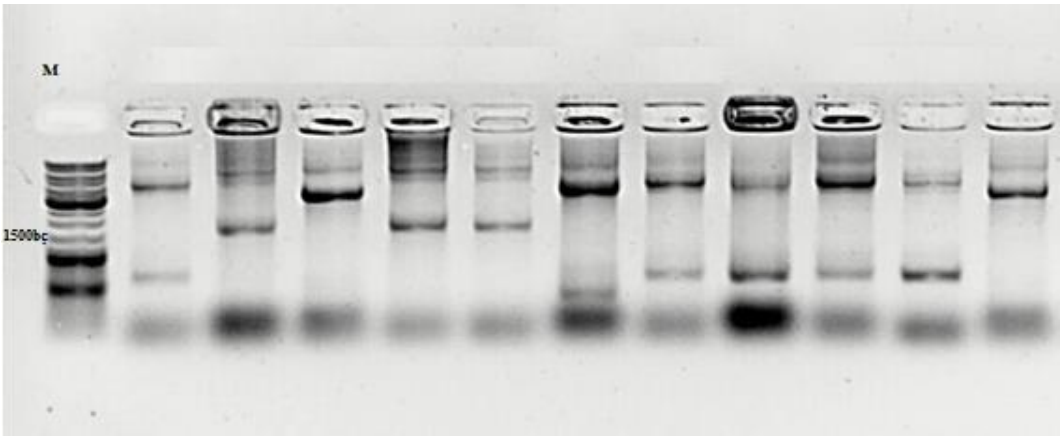
4.3.2. Amplifiye edilen 16S rRNA gen bölgesinin klonlanması

Bakterilerde korunmuş olan 16S rRNA gen bölgesinin sekans verilerini elde edebilmek için klonlama aşamasına geçildi. İlk olarak; transforme edilen bakterilerin PCR ürünleri, X-Gal ve IPTG içeren petrilere yayıldı ve mavi beyaz koloni oluşumu gözlemlendi (Şekil 4.2). Daha sonra istenilen geni aldığı düşünülen beyaz kolonilerden rastgele seçilerek koloni PCR'ları yapıldı.



Şekil 4.2. Petride mavi-beyaz koloni görüntüsü

1500 bç'lik DNA marker (Şekil 4.3) hizasında bant veren koloniler alınarak, antibiyotikli besiyerlerine aktarıldı ve plazmit izolasyonu aşamasına geçildi. Plazmit izolasyonunun ardından örnekler sekans analizi için Macrogen'e (Hollanda) gönderildi.



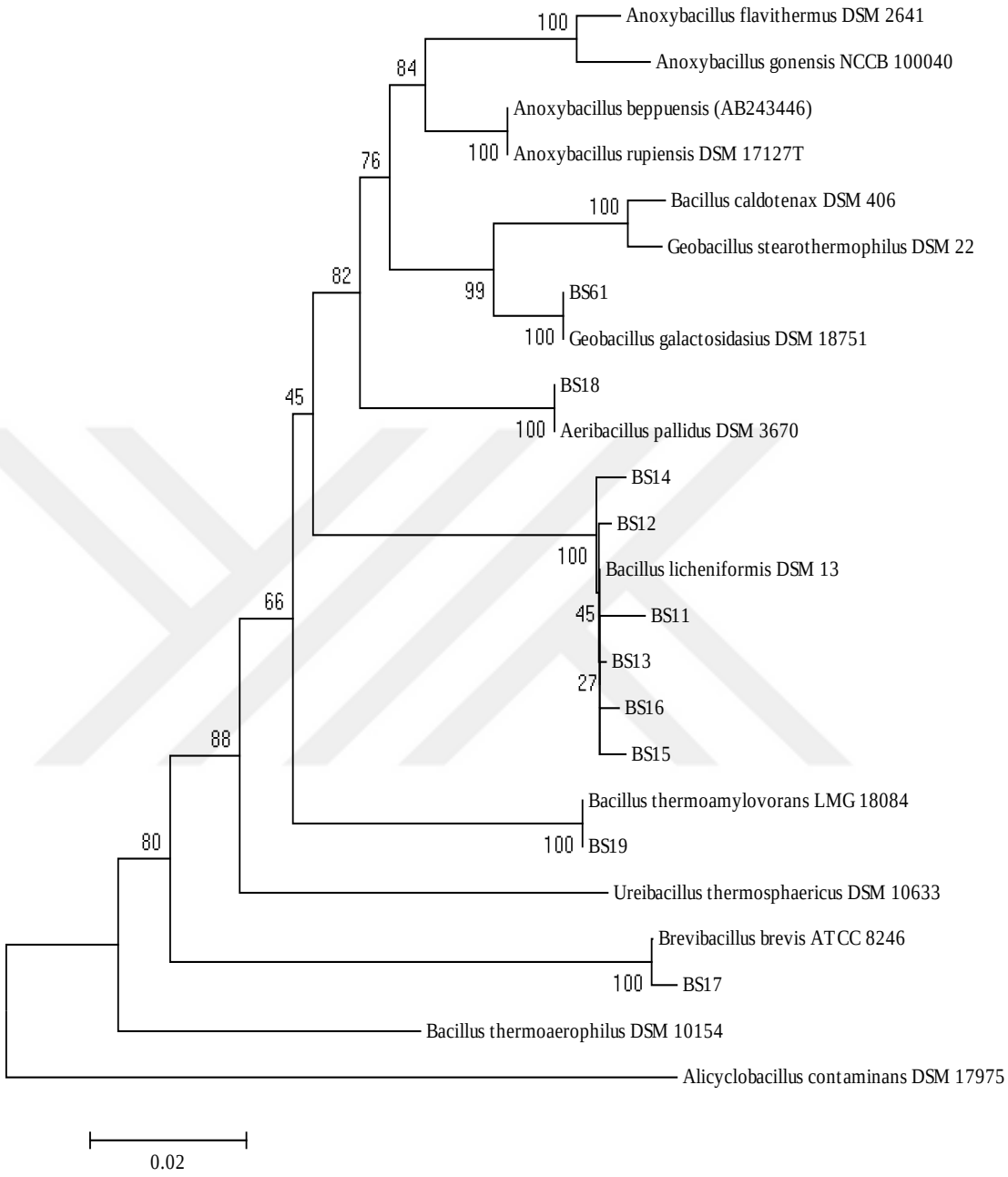
Şekil 4.3. İzolatların koloni PCR görüntüsü

4.3.3. İzolatların 16S rRNA sekans analizine göre benzerlik oranları

İzolatların sahip oldukları baz dizileri, GenBank'ta bulunan diğer bakterilerin 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırıldı. Analiz sonuçlarına göre BS11, BS12, BS13, BS14, BS15 ve BS16 suşlarının *Bacillus licheniformis*'e, BS17'nın *Brevibacillus brevis*'e, BS18 'nın *Aeribacillus pallidus*'a, BS19'nın *Bacillus thermoamylovorans*'a, BS20'nın *Brevibacillus borstelensis*'e ve BS61'nın *Geobacillus galactosidasius'*a %99 oranında benzerlik gösterdiği belirlendi. Daha sonra elde edilen bu veriler EzTaxon programı kullanılarak doğrulandı. Test izolatlarının 16S rRNA sekans analizi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ayrıca bakterilerin 16S rRNA genleri açısından akrabalık derecelerini göstermek amacıyla filogenetik ağaç çizildi (Şekil 4.4).

Çizelge 4.2 Test izolatlarının 16S rRNA sekans analiz sonuçları

İzolat kodu	**Benzediği tür**	**Genbank numarası**	**Benzerlik oranı**	**Baz uzunluğu**
BS11	*Bacillus licheniformis*	KX447652	%99	1425 bç
BS12	*Bacillus licheniformis*	KX447653	%99	1425 bç
BS13	*Bacillus licheniformis*	KX447654	%99	1420 bç
BS14	*Bacillus licheniformis*	KX447655	%99	1425 bç
BS15	*Bacillus licheniformis*	KX447661	%99	1511 bç
BS16	*Bacillus licheniformis*	KX447656	%99	1425 bç
BS17	*Brevibacillus brevis*	KX447657	%99	1411 bç
BS18	*Aeribacillus pallidus*	KX447658	%99	1515 bç
BS19	*Bacillus thermoamylovorans*	KX447659	%99	1426 bç
BS61	*Geobacillus galactosidasius*	KX447660	%99	1516 bç

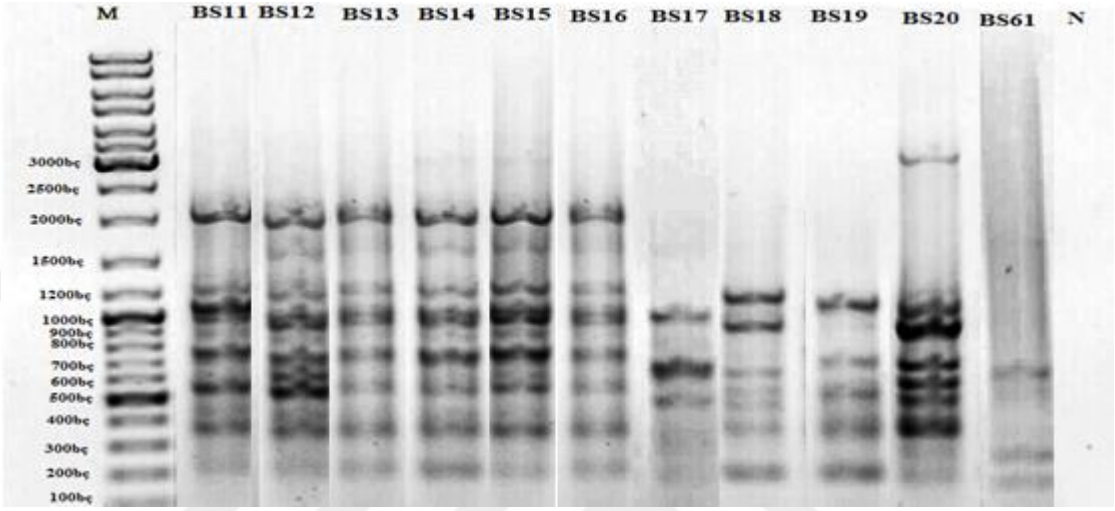


Şekil 4.4. İzolatların filogenetik ağacı

4.3.4. Bakterilerin BOX- PCR analizleri

16S rRNA analizi sonucunda elde edilen türler arasındaki genetik polimorfizmi tespit etmek amacıyla BOX-PCR analizi yapılmıştır. Yapılan bu test sonucunda; BS11-BS16 izolatlarının 200-2100 bç büyüklüğünde 11; BS17'nin 200-1000 bç büyüklüğünde 6;

BS18'in 200-1200 bç büyüklüğünde 7; BS19'un 200-1100 bç büyüklüğünde 5; BS20'nin 200-3000 bç büyüklüğünde 10 ve BS61'in ise 200-1700 bç büyüklüğünde 5 bant içerdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

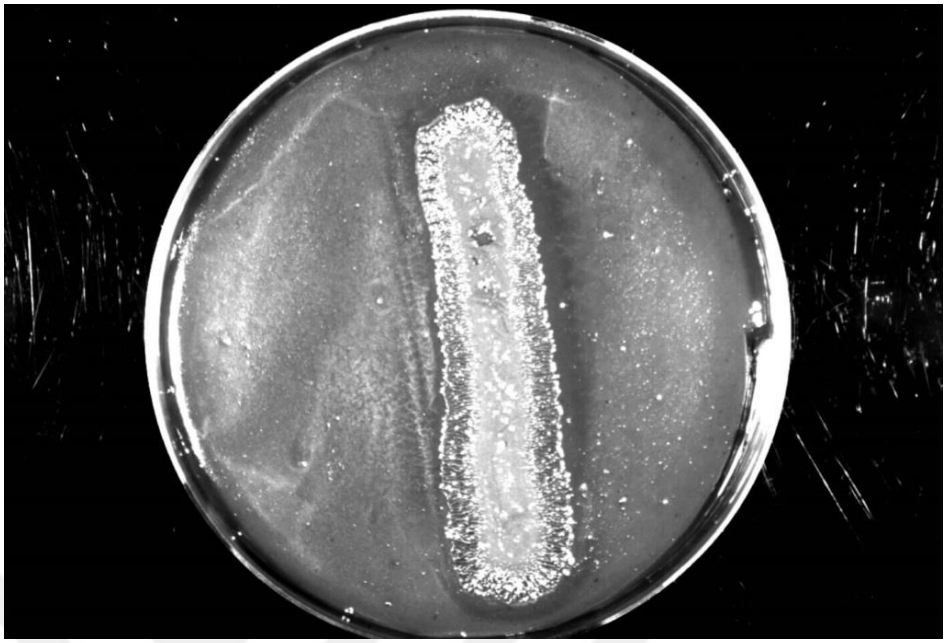


Şekil 4.5. Bakterilerin BOX PCR jel görüntüleri

4.4. Ksilanaz Üretimi ve Saflaştırılması

4.4.1. Petride ksilanaz aktivitesinin belirlenmesi

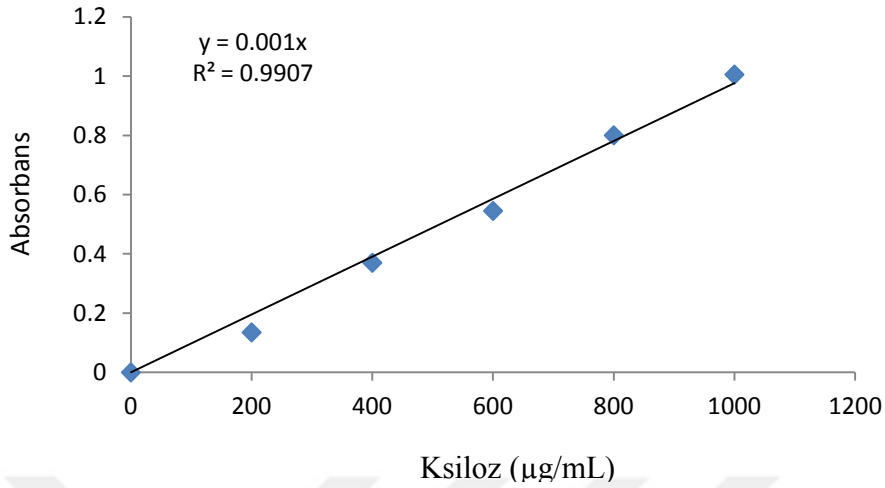
Katı olarak hazırlanan ksilanaz besiyerine, *G.galactosidasius* BS61 bakterisi çizgi ekim yöntemiyle aktarıldı ve 3-4 gün süre ile 55°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petri inkübatörden çıkarılarak, oluşan görüntü Congo Red boyası ile boyandı ve NaCl ile yıkanmaya tabi tutuldu. Daha sonra zon oluşumu görüntülenme cihazı ile fotoğraflandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Petride *G. galactosidasius* BS61 bakterisinin ksilanaz zon görüntüsü

4.4.2. Ksilanaz enzim aktivitesinin hesaplanmasinda kullanilan ksiloz standart grafiği

Ksiloz standart grafiğini 20-40-60-80-100 µg/mL konsantrasyonlarında ksiloz çözeltileri kullanılarak elde edildi. Tampon, substrat, DNS ilavesi ve 90°C'deki su banyosunda 5-10 dk inkübasyondan sonra 540 nm dalga boyunda absorbanlar ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri ile, ksiloz konsantrasyonuna karşı absorbans grafiği çizildi (Şekil 4.7)



Şekil 4.7. Ksiloz şekeri standart grafiği

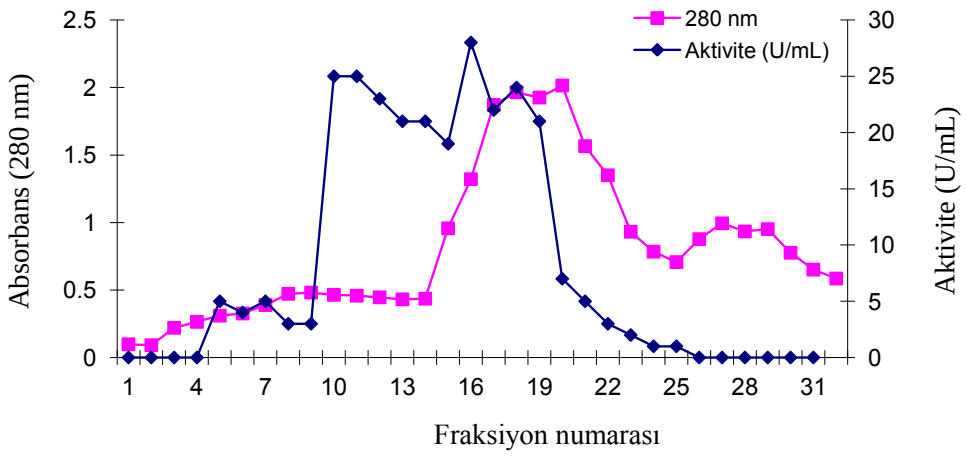
4.4.3. Aseton çöktürmesi sonuçları

Bakteri LB+ %2 Ksilan sıvı besiyerinde 55°C'de 3 gün çalkalanarak inkübe edildi. Elde edilen homojenata 1:1 oranında aseton çöktürmesi yapıldı. Santrfüj sonrası oluşan çökelek uygun tamponda çözüldü. Elde edilen çözeltiden çözünmeyen maddelerin uzaklaştırılması için santrfüj işlemi tekrarlandı ve berrak bir enzim çözeltisi elde edildi. Enzim çözeltisindeki protein miktarı ve aktivite tayini spektrofotometrik yöntemlerle gerçekleştirildi .

4.4.4. DEAE-Selüloz iyon değişim grafiği

Geobacillus galactosidaus BS61 bakterisinden elde edilen ksilanaz enziminin DEAE-Selüloz iyon değişim kromotografisine (3,0x50 cm) yüklenebilmesi için, reçine ilk olarak pH'ı 8 olan 50 mM Tris-HCl ile dengelendi. Akış hızı 12 mL/saat olarak ayarlandı. Spektrofotometrik olarak dengelendiği belirlenen kolona sırasıyla 100-200-300-400-500 mM lık tampon içinde çözülen NaCl tuzu çözeltisi verildi ve kolon yıkandı. Elüsyonlar toplandı ve 280 nm de protein yoğunluklarına bakıldı. Ölçülen protein değerleri aktivite ölçümü (540 nm dalga boyunda) ile desteklendikten sonra,

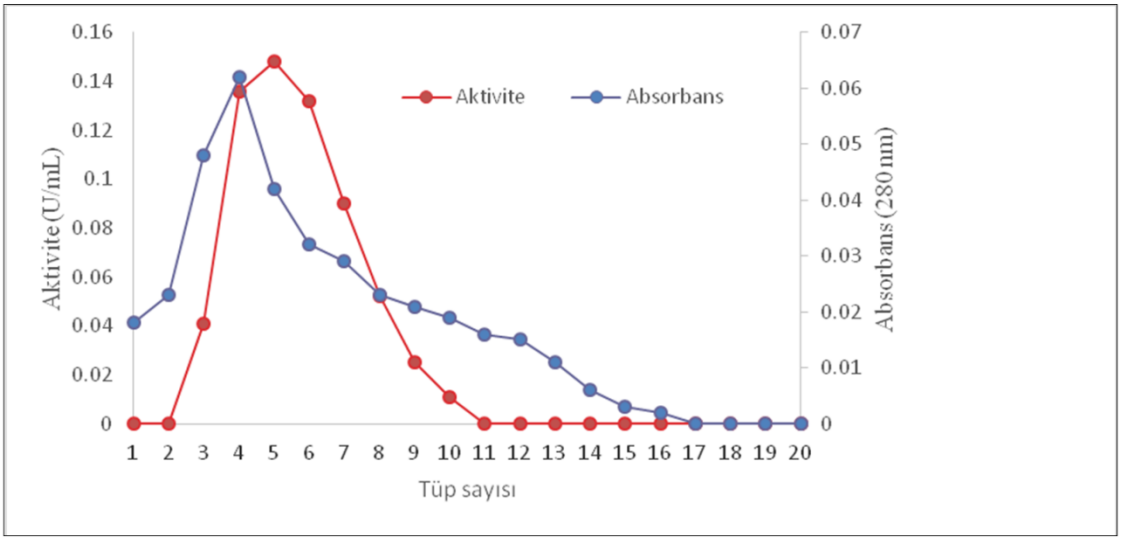
belirlenen aralıktaki sonuçlar ile grafik çizildi. Değerler ve elde edilen grafik Şekil 4.8'de verildi.



Şekil 4.8. Ksilanaz enziminin DEAE-Selüloz iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırılması

4.4.5. Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi grafiği

G. galactosidaus BS61 bakterisinden elde edilen ksilanaz enziminin iyon değişim kolonunda aktivite veren elüsyonları, Sefadeks G-100 kolununa yüklendi. 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,0) ile yıkanan kolonun akış hızı peristaltik pompayla 3 ml/saat'e ayarlandı. Dengeye getirilmiş olan Sefadeks G-100 kolonuna Q-Sepharose kolonunda aktivite gösteren fraksiyonlarını birleştirilmesiyle elde edilen 4 mL enzim çözeltisi yüklendi. Kolondan protein çıkışı sona erene kadar tampon ile geçirilerek proteinler elüe edildi. Elüatlar 1'er ml şeklinde ayrı ayrı tüplere toplandı. 280 nm dalga boyunda elüatlara ölçüm yapıldı. Ardından, tüm fraksiyon tüplerinde ksilanaz enzim akitivitesine bakıldı. Enzim %74,6 verimle 29,8 kat saflaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9 ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Ksilanaz enziminin Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılması

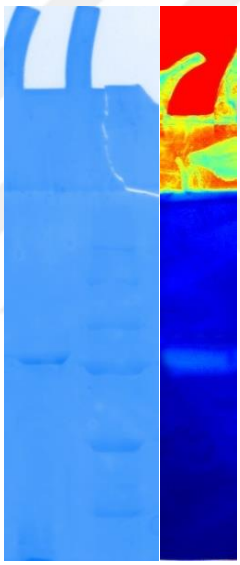
Çizelge 4.3. Ksilanaz enziminin Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatogarfisi sonucu elde edilen saflaştırma basamakları sonuçları

Numune türü	Total Hacim (mL)	Total Aktivite (U/mL)	Total Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (U/mg)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Ham ekstrakt	9900	21780	538,6	40,4	100	1
Aseton çöktürmesi (%40-80)	15	16375	92,25	177,5	75,2	4,4
Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi	15	16250	13,5	1203,7	74,6	29,8

4.4.6. SDS-PAGE ile enzimin saflik kontrolü, molekül ağirliğinin tayini ve zimogram

%5'lik yığma jeli ve %8'lik ayırma jeli ile hazırlanan SDS-PAGE jel elektroforezi ile yürütülen *G. galactosidaus* BS61 bakterisinden elde edilen ksilanaz enzimi, Commasie Brillant Blue R-250 boyama yöntemi ile boyandı. Jel görüntüsünde tek bant elde edildi.

BS61'den Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi sonunda saflaştırılan ksilanaz enziminin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile 55 kDa olarak belirlenmiş olup protein molekülü tek band protein olarak gözlenmiştir (Şekil 4.10.1). Elde edilen bandın ksilanaz enzimine ait olup olmadığını anlamak amacıyla yeniden aynı şekilde hazırlanan ayırma jeline 500 µl %5 lik ksilanaz substrat çözeltisi eklendi. Yürütülen SDS-PAGE jeline zimogram analizi yapıldı. Enzim bant verdiği bölgede ksilanaz substratı ile tepkime verdi. Tepkime Congo Red boyası ile boyanan jelin, bandın olduğu yerde renginin açılması ile anlaşıldı (Şekil 4.10).

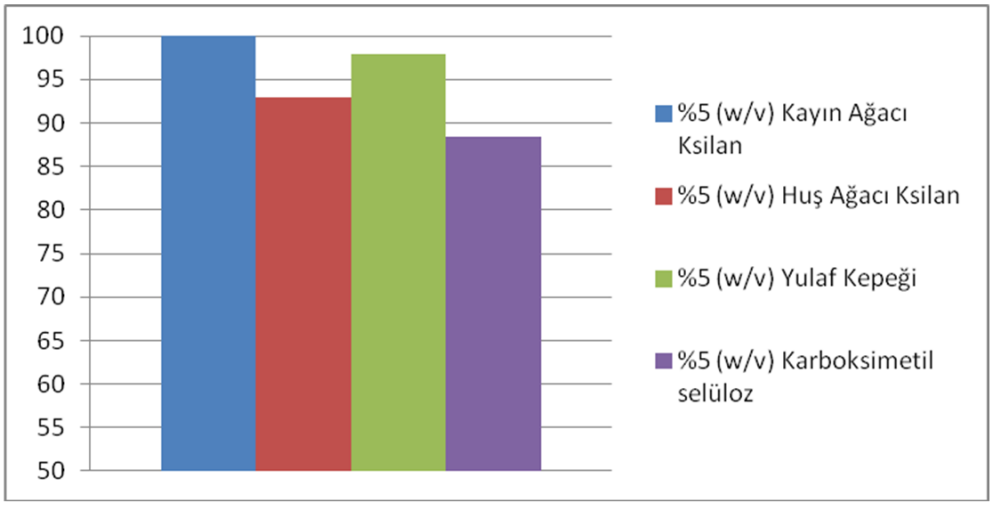


Şekil 4.10 *Geobacillus galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enziminin SDS-PAGE ve zimogram analizi görüntüsü
Sefadeks G-100 jel filtrasyon kromatografisi a) Elüat b) Protein marker (BioRad: (10–250 kDa), 2) Zimogram analiz sonucu

4.5. Ksilanaz Enzimin Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. Ksilanazın farklı substratlara karşı olan özgünlüğünün belirlenmesi

G. galactosidasius BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enziminin substratlara karşı özgünlüğünün belirlenmesinde, 4 farklı ksilan kullanıldı (kayın ağacı ksilan, huş ağacı ksilan, yulaf keğeği, karboksimetil selüloz (CMC)). %5'lik olarak hazırlanan bu substrat çözeltilerinin aktivite tayinleri yapıldı ve değerler 540 nm'de ölçüldü. En fazla aktiviteyi veren substratın bağıl aktivitesi 100 kabul edilerek, diğer substrat değerleri bunun üzerinden grafiğe döküldü (Şekil 4.11).

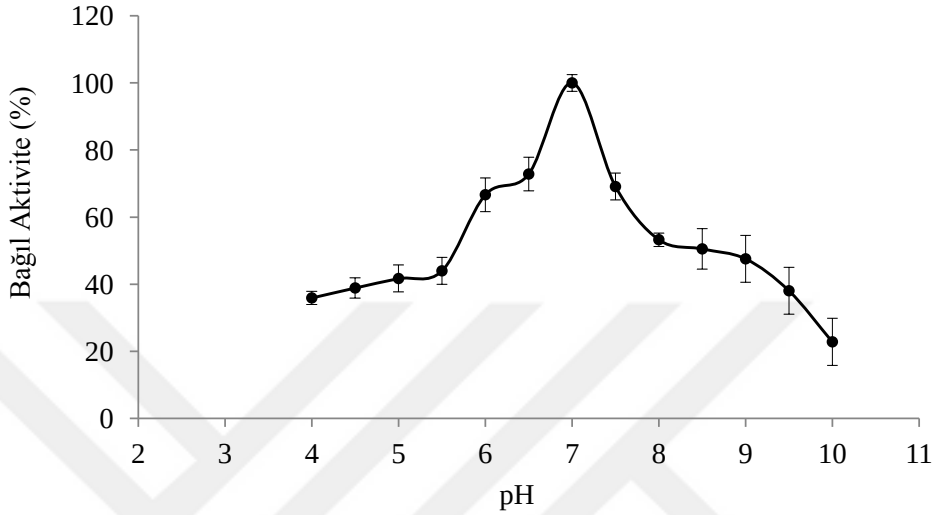


Şekil 4.11. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz aktivitesinin substrat spesifikliği

4.5.2. Ksilanaz enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi

G.galactosidasius BS61 bakterisiden elde edilen ksilanaz enziminin optimum pH değeri belirlendi. Bunun için 7 farklı pH (pH 4,0-5,5 aralığı için asetat tamponu, pH 6,0-7,5 aralığı için sodyum fosfat tamponu, pH 8,0-9,5 aralığı için Tris-HCl tamponu, son olarak pH 10,0 için Glisin-NaOH tamponu) değerine sahip çözeltiler, aktivite reaksiyon

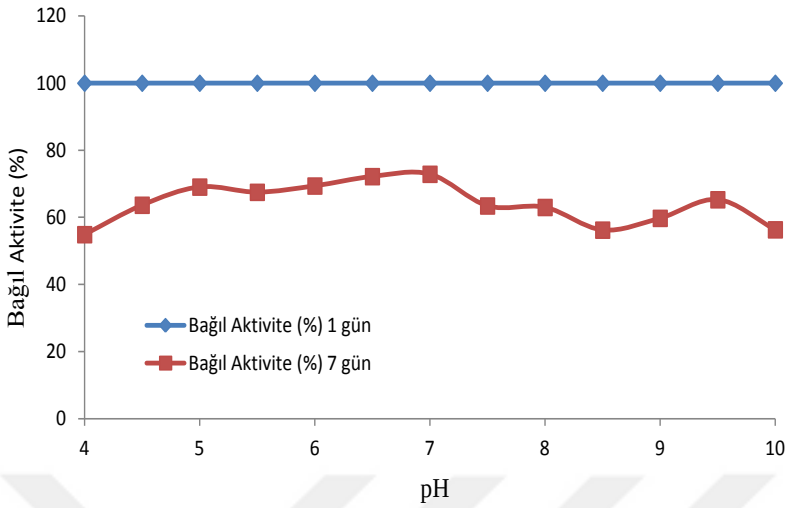
karışımının tamponu olarak kullanıldı. Optimum pH 7,0 olarak belirlendi. pH 6,0- 6,5 ve 7,5 değerlerinde ise aktivite % 60 üzerinde görüldü (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz aktivitesinin pH ile değişimi

4.5.3. Ksilanaz enzimin pH kararlılığı

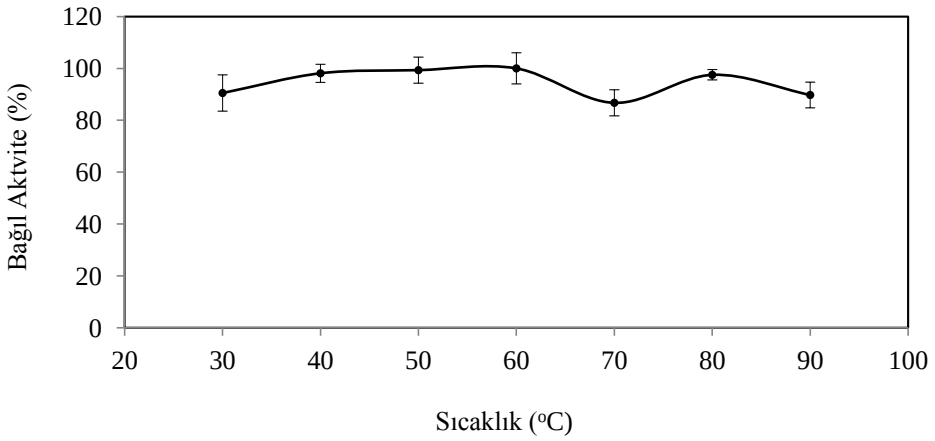
G. galactosidaus BS61'den saflaştırılan ksilanazın pH kararlılığını incelemek için, enzim pH 4.0-10.0 aralığındaki farklı tamponlar içerisinde, 4°C'de 24 saat ve 168 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında ölçülen aktivite, inkübasyona tabi tutulmadan ölçülen aktiviteye oranlanarak yüzde kalan aktivite belirlendi. 1 günün sonunda enzin aktivitesinin tüm pH değerlerinde tamamiyle korunduğu belirlendi. 68 saatlik inkübasyon sonunda ise, enzimin aktivitesini %50'nin üzerinde koruduğu, *G. galactosidaus* BS61'den saflaştırılan ksilanazın optimum pH değeri olan 7.0 de ise yaklaşık %70 aktivitesini koruduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enziminin pH kararlılığı

4.5.4. Ksilanaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

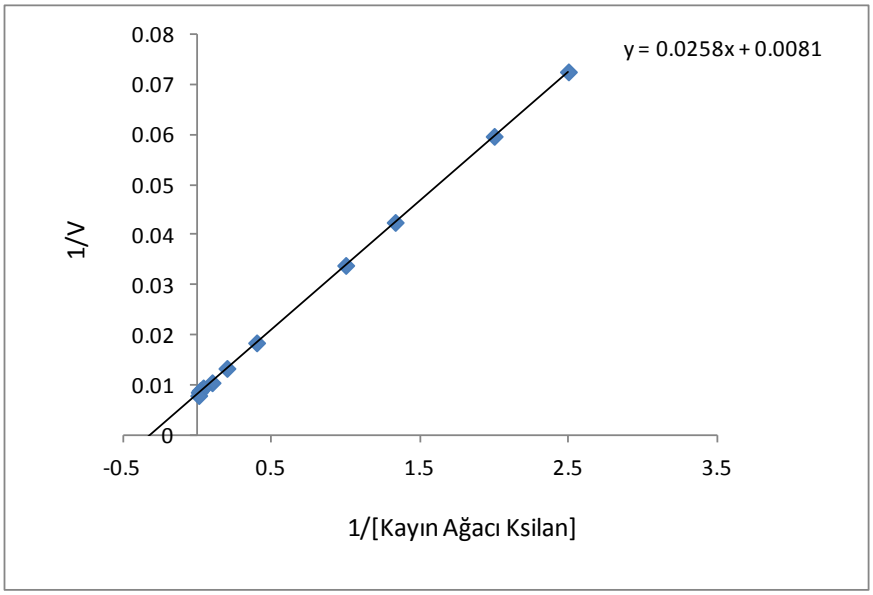
G. *galactosidasius* BS61 bakterisiden saflaştırılan ksilanaz enziminin optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Bunun için her bir aktivite tayininin inkübasyon sıcaklıkları, 30-90°C aralığında 15'er dk olarak uygulandı. Her bir aktivite tayini spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Bu sonuçlara göre, optimum sıcaklık değerinin 60°C olduğu görüldü. En yüksek aktivite %100 olarak kabul edildi ve diğer sıcaklık sonuçları buna göre değerlendirildi. Aktivitenin 30-90°C aralığında %80'nin üzerinde koruduğu gözlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz aktivitesinin sıcaklık ile değişimi

4.5.6. Ksilanaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

G. *galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enziminin ksilan substratı ile K_M ve V_{max} değerleri belirlendi ve grafik çizildi. Buna göre K_m değeri 3.18 mg/mL, V_{max} değeri ise 123 U/mg protein olarak belirlendi. Şekil 4.15'de hazırlanan substratların konsantrasyonları ile çizilen Lineweaver- Burk grafiği verilmiştir.



Şekil 4.15. Ksilanaz aktivitesi için Lineaweaver-Burk grafiği

4.5.7. Ksilanaz enzimine metal iyonlarinin ve inhibitörlerinin etkisi

G. galactosidasius bakterisinden izole edilen ksilanaz enziminin , nihai konsantrasyonu 5 mM olan Na^{+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}, Al^{3+} gibi katyonlar ve CN^{-}, HSO_3^{2-}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, HCO_3^{-}, HPO_4^{2-}, $B_4O_7^{2-}$ gibi anyonlara karşı davranışı incelendi. Kontrol tüpteki ksilanaz enzim aktivitesinin %100 olarak kabul edildi, diğer tüplerdeki aktivite değerleri belirlendi. Aktivite sonuçları Çizelge 4.2'de belirtildi.

Çizelge 4.3. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enzimi üzerine bazı metal iyonlarının etkisi

Katyon	**Bağıl aktivite (%)**	**Anyon**	**Bağıl aktivite (%)**
Kontrol	100 (%)	Kontrol	100 (%)
Ca^{2+}	98,11	HSO_3^{2-}	124,78
Mn^{2+}	21,58	CN^{-}	79,17
Na^{+}	93,68	Na_2SO_4	85,39
Mg^{2+}	78,22	Na_2CO_3	78,98
Al^{3+}	89,72	$NaHCO_3$	96,32
Cd^{2+}	86,61	Na_2HPO_4	124,22
Ni^{2+}	76,53	$Na_2B_4O_2$	78,32
Zn^{2+}	88,21		
Cu^{2+}	71,06		

Nihai konsantrasyonu 5 mM lık olarak hazırlanan 3 farklı inhibitör etkisi, kontrol tüpündeki enzim aktivitesinin 100 olarak kabul edilmesine göre değerlendirildi. Aynı şekilde sonuçlar Çizelge 4.3'de belirtildi.

Çizelge 4.4. *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enzimi üzerine bazı inhibitörlerin etkisi

İnhibitörler	**Bağıl aktivite**
Kontrol	100
B-merkaptoetanol	98
Sülfonamid	96
EDTA	40

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel önemi olan yeni enzim kaynaklarının keşfini, bunların literatüre ve ekonomiye kazandırılmasını amaçlayan çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, özellikle biyoteknoloji alanında, yeni araştırma ve geliştirme faaliyetlerine her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Bu hedef doğrultusunda; hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklı enzimlerin saflaştırılması ve endüstriyel uygulanabilirliğinin ortaya konulmasına dönük çalışmalarda son on yıl içerinde ciddi bir artış görülmesine karşın, araştırıcılar enzim kaynağı olarak daha çok mikroorganizmaları tercih etmektedirler. Bunun temel sebebi; mikrobiyal kaynakların daha kararlı oluşu, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları ve ekstrem koşullarda (sıcaklık, pH gibi) yüksek aktivite gösterebilmeleridir. Bilim insanları tarafından bilimsel çalışmalarda yaygın olarak mantarlar kullanılsa da, özellikle bakterilerin ihtiyaç duydukları besin miktarının az olması ve daha kısa sürede üreyebilmelerinden dolayı biyoteknolojik proseslerde bakteriler daha avantajlıdırlar (Horikoshi 1999; Gözükara 2009; Maki *et al.* 2009).

Bitki hücre duvarında bulunan hemiselülotik yapıyı parçalayan ksilanaz enzimi, kağıt hamurunun ağartılması, hayvan yemi üretimi, gıda endüstrisi, tekstil endüstrisi, etanol ve ksilitol gibi ürünlerin sentezinde büyük rol oynar (Monisha *et al.* 2009). Bu kadar önemli olan ksilinaz enziminin, termal karalılığı yüksek olan termofilik mikroorganizmalardan saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliğinin araştırılması, biyoteknolojik açıdan oldukça önemlidir. Tüm bu veriler dikkate alınarak, Rize-Ayder Kaplıcalarından alınan su örneklerinden izole edilen toplam 11 bakteriyal izolatın fenotipik ve genotipik karakterizasyonu gerçekleştirildi. 16S rRNA sekans analizi sonucunda; BS11, BS12, BS13, BS14, BS15 ve BS16 izolatlarının *Bacillus licheniformis*'e; BS17'nin *Brevibacillus brevis*'e; BS18'in *Aeribacillus pallidus*'a; BS19'un *B. thermoamylovorans*'a; BS20'nin *Br borstelensis*'e ve BS61'in ise %99 oranında *Geobacillus galactosidasius*'a benzerlik gösterdiği belirlendi. Daha sonra tüm izolatların ksilanaz ön enzim aktiviteleri, ksilan içeren petrilerde incelendi ve BS61 izolatının en büyük zonu verdiği gözlemlendi. En son aşamada ise bu bakteriden ilgili enzim saflaştırılarak, karakterizasyonu yapıldı.

Savaş *et al.* (2009), Adıgüzel *et al.* (2009), Adıgüzel *et al.* (2011) ve Yanmış *et al.* (2015) yaptıkları çalışmalar sonucunda; *Brevibacillus, Üreibacillus, Aeribacillus, Geobacillus, Anoxybacillus* ve *Bacilus* cinslerine ait test izolatlarının tür ve alt tür seviyesinde ki identifikasyonlarında, rep-PCR yönteminin oldukça başarılı olduğunu belirlemişlerdir. Biz de yapmış olduğumuz analizler sonucunda, rep-PCR yönteminin literatür verilerine paralel olarak tür ve tür altı seviyede test suşlarının moleküler karakterizasyonunda oldukça başarılı olduğunu gözlemledik.

Acar (2009) yaptığı bir çalışmada, Van-Erciş Hasanabdal kaplıcasından aldığı su ve çamur örneklerinden termofilik bakterilerin izolasyonu ve identifikasyonunu gerçekleştirmiştir. 16S rRNA dizi analizi sonucunda; test suşlarının %99 oranında *B. licheniformis, B. pumilus, B. bre1vis, B. borstelensis* ve *G. pallidus*'a *(Aeribacillus pallidus*) benzerlik gösterdiğini bulmuş ve bu türlerin Türkiye'de ki termal kaynaklarda yaygın olarak bulunduğunu belirtmiştir. Literatür verilerine paralel olarak, bizde termal kaynağımızda benzer türleri baskın flora olarak tespit ettik.

Nazina *et al.* (2001), Rusya, Kazakistan ve Çin'de ki petrol rezervleri yakınında bulunan su kaynaklarından termofilik bakterilerileri izole ederek, fenotipik ve genotipik karakterizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. 16S rRNA sekans analizleri sonucunda test izolatlarının %99 oranındaGeobacillus ve Bacillus cinslerine ait olduklarını tespit etmişlerdir. Yaptıkları konvensiyonel testler sonucunda; Bacillus ve Geobacillus cinsine ait bakterilerin, çubuk, gram ve endspor pozitif olduklarını, gelişim sıcaklıklarının 35-75°C, pH'larının ise 6,0-9,0 olduğunu belirlemiştir. Tüm bu bilgiler dikkate alındığında, sonuçlarımızın literatür verilerine benzerlik gösterdiğini belirledik.

Pirinççioğlu (2010) yaptığı çalışmada Mardin ili Dargeçit ve Şırnak ili Güçlükonak'tan su ve çamur örnekleri alarak bakteri izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirmiştir. Güçlükonak'tan izole ettikleri GE1 ve GE2 bakterilerinin, üreyebilmeleri için gerekli olan sıcaklık aralıklarının sırasıyla 30-65ºC ve 35-65ºC olduğunu belirlemiştir. İzolatların gelişebildikleri optimum pH'ı GE1 için 9,0; GE2 için 9,5 olarak bulmuş ve izolatların %1'lik NaCI'ye tolerans gösterdiklerini tespit etmiştir. Dargeçit'den izole

ettiği AH1 ve AH2 kodlu bakterilerin üreme aralıklarının sırasıyla 30-65°C ve 35-70°C olarak belirlenmiştir. Gelişebildikleri optimum pH'yı ise her iki izolat içinde 7,5 olarak bulmuştur. 16S rRNA analizine göre %99 oranında GE1'in *Geobacillus* sp.'a, GE2'nin *G. kaue*'a, AH1 ve AH2'nin ise *Anoxybacillus flavithermus*'a benzediği gözlemlenmiştir. Literatür verisi ile mukayese edildiğinde bizim izolatlarımızın gelişebildikleri sıcaklık, pH ve tuz aralıklarının daha geniş olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda da izolatlar; morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik bazı testlere tabi tutuldu. Gram ve endospor testlerinde göre, tüm izolatlar gram ve endospor pozitiftir. Yapılan diğer testlerle de, *B. licheniformis* suşlarının (BS11-BS16) üreyebildikleri optimum sıcaklığın 30-60°C, pH'ın 6,5-9,5 ve tuz konsantrasyonun %2-8; *B.brevis* suşunun (BS17) üreyebildiği optimum sıcaklığın 40-60°C, pH'ın 6,5-8,5 ve tuz konsantrasyonun %2-8; *A. pallidus* suşunun (BS18) üreyebildiği optimum sıcaklığın 30-70°C, pH'ın 7-8 ve tuz konsantrasyonun %2-10; *B.thermoamylovorans* suşunun (BS19), *B. borstelensis* suşu (BS20), üreyebildiği optimum sıcaklık 30-60°C, pH'ın 6,5-9,5 ve tuz konsantrasyonun %2-8; *G.galactosidasius* suşunun (BS61) üreyebildiği optimum sıcaklığın 50-60°C, pH'ın 6-8 ve tuz konsantrasyonunun %2-4 olduğu tespit edildi.

Çalışmanın enzim saflaştırma kısmına geçebilmek için, izole edilen suşlar için kayın ağacı ksilanı besiyeri kullanarak zon bakıldı. Katı besiyerinde bakılan zonlarda, pozitif sonuç veren 9 suş arasında en büyük zonu BS61 verdi. Saflaştırma basamaklarına bu bakterinin ürettiği enzimle devam edildi.

BS61 bakterisinden hazırlanan ham enzim özütü aseton çöktürmesi ve ardından sırası ile iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi işlemlerine tabi tutuldu (Şekil 4.8, 4.9). Enzim %74,6 verimle 29,8 kat saflaştırıldı (Çizelge 4.3). Gerçekleştirilen saflaştırma basamakları sonunda elde edilen enzim çözeltisi, saflaştırma işleminin başarısını ortaya koymak amacı ile poliakrilamit jel elektroforezinde yürütüldü. Markır ile yürütülen enzim bandı, zimogram analizi ile desteklendi. Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı SDS-PAGE ile yaklaşık 55 kDa olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Benzer bir çalışmada, termofilik bakteri olan

Geobacillus sp.'den ksilanaz enzimi saflaştırılımıştır. SDS-PAGE jel elektroforezi ile molekül ağırlığı 40,1 kDa olarak tespit edilmiştir. Saraçoğlu (2010) tarafından çalışmada izole edilen 271 *Bacillus* sp. suşunu, selülaz ve ksilanaz enzim üretimini görmek için katı besiyerine ekmiştir. Bu suşların 63'ü hem selülaz hem ksilanaz enzim aktivitesi verirken, 10 tanesi selüloz free ksilanaz zonu vermiştir. İçlerinden X6 numaralı izolat ile çalışmalarına devam etmiştir. Saflaştırma basamaklarında kromatografik yöntemler olarak DEAE-Selüloz iyon değişim kromatografisi ve Sephadeks-G100 iyon değişim kromatografisi kullanıldı. Ham homojenatta ölçülen özgün aktivite 40,4 iken, kolonlar sonucunda özgün aktivite 1203,7 bulunmuştur. Benzer çalışmalarda Güder (2014), anyon değişim kolonu olarak HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR, jel filtrasyon kolonu olarak HiPrep Q XL 16/10 nu kullanmıştır. Chen *et al.* (1997) *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 baktersinden ksilanaz enzimi üreterek, katyon değişim ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırmış ve %5,1 verimle 56 kat saflaştırdıklarını bildirmişlerdir. Düsterhöft *et al. (*1997) yapılan çalışmada *Humicola insolens* ksilanaz saflaştırılmış ve SDS-PAGE jel elektroforezi ile 2 bant elde etmişlerdir. Molekül ağırlıkları 6 ve 21 kDa olarak bulmuşlardır. *B. amyloliquefaciens* bakterisinden izole edilen ksilanaz enziminin yine molekül ağırlığı tayinini SDS-PAGE jel elektroforezi ile yapmış ve 2 ayrı alt birim ağırlıklarını 18,4 ve 19,6 kDa olarak bulmuşlardır. Sanghi *et al.* (2010), *Bacillus subtilis* ASH suşundan selülaz free ksilanaz enziminin molekül ağırlığının belirlenmesi için yapılan SDS-PAGE sistemi, jelde tek bant görüntüsü vermiştir ve molekül ağırlığını 23 kDa olarak tespit etmişlerdir. Tseng *et al.* (2002), *Bacillus firmus* 'tan saflaştırdıkları selüloz free ksilanaz enzimi ile yapılan zimogram analizinde 45 ve 23 kDa ağırlığında 2 bant bulmuşlardır. Balakrisnan *et al.* (2002), alkalofilik *Bacillus* (NCL 87-6-10) tan yine selülaz free alkaline ksilanaz enzimini saflaştırmış, SDS-PAGE ile 25 ve 45 kDa birbirinden bağımsız iki bant bulmuşlardır.

G. galactosidasius BS61 bakterisinden saflaştırılan ksilanaz enzimin için biyokimyasal karakterizasyon çalışması gerçekleştirildi.

Enzimin optimum pH tayini için aktivite tayinleri pH 4,0-10,0 için gerçekleştirildi. Enzimin optimum pH'ı 7,0 olarak belirlendi (Şekil 4.12). %Bağıl aktivite- pH grafiği incelendiğinde enzim aktivitesinin nötral pH ya yakın pH değerlerinde daha yüksek olduğu gözlendi. Asidik ve bazik pH'larda aktivitenin belirli oranlarda korunduğu tespit edilmiştir.

pH kararlılığı çalışmaları, pH 4-10 aralığında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13). 1 gün sonunda çalışılan bütün pH'larda enzimin aktivitesini tamamiyle koruduğu gözlenmiştir. 1 hafta sonunda tüm pH'larda aktivitenin %50'nin üzerinde korunduğu (>%50) tespit edilmiştir.

BS61'den saflaştırılan ksilanazın optimum sıcaklığını belirlemek amacılya yapılan çalışmalarda optimum sıcaklığın 60°C olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Çalışılan diğer sıcaklıklarda da enzimin etkili bir şekilde ksilanı hidrolizlediği belirlendi. Bu yönüyle değerlendirildiğinde BS61'den saflaştırılan ksilanazın geniş bir sıcaklık aralığında kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak BS61 ksilanazı 30-90°C aralığındaki tüm sıcaklıklarda rahatlıkla kullanılanilir bir enzimdir. Bu kadar geniş bir aralıkta çalışabilecek ksilanaz enzimine gerçekleştirilen literatür taraması sonucu ratslanılmamıştır. Bhalla *et al.* (2015), *Geobacillus* WSUCF suşun ksilanaz enziminin optimum pH değerini 70°C olarak belirlemişlerdir. Liu ve arkadaşları ise *Geobacillus* sp. TC-W7 ksilanazının optimum sıcaklık değerini 75°C olarak belirlemişlerdir (Liu *et al.* 2012). Gerasimova and Kuisiene (2012) ise *Geobacillus thermodenitrificans* JK1 ksilanazının optimum sıcaklığını 70°C olarak bildirmişlerdir.

BS61'den saflaştırılına ksilanaz aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile değişimini incelemek amacı ile daha önceden belirlenen optimum şartlarda, farklı substrat konsantrasyonları kullanılarak reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, kayın ağacı ksilanının konsantrasyonu %0,4- 0,5- 0,75- 1- 2,5- 5- 10- 25- 50- 75- 100 olacak şekilde aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve elde edilen veriler kullanılarak çizilen Linewear-Burk eğrisinden (Şekil 4.15) V_{maks} ve V_{max} değerleri sırasıyla 3,18 mg/mL , 123 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Gopalakrishnan *et al.* (2011), *B. pumilus*

GESF1 suşu bir haloalkalitoleranttır ve selüloz free ksilanaz enzimi üretmektedir. Optimum enzim üretim koşulları pH 8 ve 40°C dir. K_m ve V_{max} değerleri 5,3 mg/mL ve 0,42 µmol/min/mL olarak bulunmuştur. Chen *et al.* (1997) *Trichoderma longibrachiatum* CS-185'e yulaf ksilanı bulanan ortamda ksilanaz ürettirilmiş, K_m 10,14 mg/mL ve V_{max} 4,025 IU/mg olarak protein kinetik sabitlerini bildirmişlerdir. Literatür verileri ile karşılaştırıldığında, BS61'dan saflaştırılan enzimin substrata ilgisinin daha fazla olduğu görüldü.

Bu çalışmada *G.galactosidasius* BS61 bakterisinden üretilen ve çeşitli yöntemlerle saflaştırılan ksilanaz enziminin bazı anyon ve katyonların varlığında davranışı araştırılmıştır. Başlıca kullanılan katyonlar Ca^{2+} , Na^{+}, Al^{3+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} , Cu^{2+}, Mn^{2+} tür. Bu çalışma için her bir metal iyonunun 100 mM'lık stok çözeltisi. Reaksiyon karışımına 5 mM olacak şekilde katıldı ve kontrol ile aktivite kıyaslandı. % kalan aktiviteler sırasıyla %98, %93, %93, %89, %88, %86, %78, %76, %71 ve %21 olarak belirlendi (Çezelge 4.4). Metal iyonlarının koordinasyon sayıları, oluşturdukları bileşiklerde koordinasyon geometrileri ve Lewis asidi potansiyelleri birbirinden farklıklık gösterebilmektedir. Bu yüzden metaller proteinler karşısında birbirlerinden farklı özellikler sergileyebilirler, ve proteinlerin metal iyonlarına karşı davranışları farklılık gösterebilir (Ditusa 2001). *G.galactosidasius* BS61'den saflaştırılan ksilanazın CN^{-}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, HCO_3^{-}, $B_4O_7^{2-}$ gibi anyonlara karşı aktivitesini büyük oranda koruduğu tespit edildi (>%70). Kontrol tüpteki ksilanaz enzim aktivitesinin %100 olarak kabul edildi, diğer tüplerdeki aktivite değerleri belirlendi. Aktivite sonuçları çizelge 4.2'de belirtildi. HSO_3^{2-}, HPO_4^{2-} iyonları varlığında ise BS61 ksilanazının aktivitesinin stimüle olduğu saptanmıştır. Saraçoğlu (2010), *Bacıllus* sp. ile yapılan bir ksilanaz enzim karakterizasyonu çalışmasında, $CaCl_2$ %69, $ZnCl_2$ ile %71, NaCl ile %67, ve $BaCl_2$ ile %70 oranında enzim aktivitesinin korunduğu görülmüştür. Khandeparker *et al.* (2006) yine benzer bir çalışmada *Arthrobacter* sp. MTCC 5214 ile çalışılmış ve enzim aktivitesinin 1 mM $MnCl_2$ ile %177 oranında sitümüle olduğunu görülmüştür. Sanghi *et al.* (2010), alkalofilik *Bacillus subtilis* ASH suşundan yapılan çalışmada 1 mM lık çözeltilerle katyon denemesi yapılmış ve $ZnCl_2$ ile %86.3, $CaCl_2$ ile %84, NaCl ile %88.5, $MgCl_2$ ile %84.5, $MnCl_2$ ile %185 kalan aktivite olarak

bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçları bu açıdan değerlendirildiğinde, enzimin genel olarak aktivitesini yüksek oranlarda koruduğu görülmüş ve diğer çalışmalarla bağlantılı olarak özellikle Ca^{2+} ve Na^{+} iyonlarının varlığında enzim aktivitesinin benzer değerlere sahip olduğu belirlenmiştir.

β-merkaptoetanol, sülfonamid ve EDTA gibi kimyasalların BS61 ksilanaz aktivitesi üzerine etkileri çalışılmıştır. β-merkaptoetanol (%2 inhibisyon) ve sülfonamid (%4 inhibisyon) enzim aktivitesini anlamlı ölçüde etkilemezken EDTA çalışılan konsantrasyonda %60 inhibisyona sebep olmuştur. EDTA şelatlayıcı bir ajandır ve pekçok ksilanazın aktivitesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Juturu ve wu, 2011). Enzimlerim EDTA tarafından inhibisyonu metal bağımlı olduklarının bir göstergesidir.

Sonuç olarak; Rize-Ayder kaplıcasından izole edilen ve karakterizasyon işlemi tamamlanan izolatların, üreyebildikleri sıcaklık, pH ve tuz aralıklarının, literatürde belirtilen birçok organizmaya göre daha geniş olduğu gözlemlendi. Bu da bu bakterilerin farklı enzimlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu için önemli bir kaynak olabileceğini bize göstermektedir. Bu veriler dikkate alınarak, *G. galactosidasius* BS61 bakterisinden ksilanaz enzimi başarılı bir şekilde saflaştırılmış ve biyokimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan enzimin optimum pH değerinin 7 olduğu, 30–90ºC aralığında aktivitesini yüksek oranda koruduğu tespit edilmiştir. Bu da bize, test suşumuzdan saflaştırdığımız ksilinazın, kağıt hamuru ağartma işlemlerinin yanısıra, özellikle meyve suyu durultma, tahıl kaynaklı gıdaların üretimi ve tarımsal atıkların şekerlenmesi gibi endüstriyel alanlarda başarılı birşekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Acar, S., 2009. Hasanabdal Köyü Termal Tesislerinden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Adhikari, S. ve Satyanarayana, T., 2007. Structure and Composition of Xylan.

Adıgüzel, A., 2006. Bazı Termal Tesislerden Alınan Su Örneklerinden İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.

Adiguzel, A., Agar, G., Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., & Sengul, M. 2006. RAPD and FAME analyses of Astragalus species growing in eastern Anatolia region of Turkey. Biochemical systematics and ecology, 34(5), 424-432.

Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., & Sahin, F. 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. Journal of microbiological methods, 79(3), 321-328.

Adinarayana, K., P. Ellaiah and D. S. Parasad 2003. "Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease rom a newly isolated Bacillus subtilis PE-11." AAPS PharmSciTech 4(4): 440-448.

Aehle, W. 2007. Enzymes in Industry: Production and Applications.

Aehle, W.,2004. Enzymes in Industry Production and Application. Wiley-VCH Verlag,Weinheim, 484s.

Algan, M., (2015). Purification and Biochemical Characterizatıon Of Xylanase Expressed In Thermophilic Geobacillus sp. A Thesis Submitted to the Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master Of Science.

Archana, A. and Satyanarayana,T., 1997. Xylanase production by thermophilic Bacillus licheniformis A99 in solid-state fermentation. Enzyme.Microbial.Technol.,21: 12-17.

Arikan, B. (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic Bacillus sp. isolate A3-15. Bioresource Technology, 99(8), 3071-3076.

Avcıoglu, B., Eyupoglu,B.And Bakır,U., 2005. Production and characterization of xylanase of a Bacillus strain isolated from soil. World Journal of Microbiology&Biotechnology,21:65-68.

Aygan, A. ve Arıkan, B., 2009. Production and characterization of multifunctional endoxylanase by Bacillus sp. X13. Turk J. Biol, 33:231237.

Ayhan, K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, Sim Matbaacılık Ltd. Ankara, 43–44.

Ayyachamy, M., Vatsala, T.M., 2007. Production and partial characterization of cellulase free xylanase by Bacillus subtilis C 01 using agriresidues and its application in biobleaching of nonwoody plant pulps. Lett Appl Microbiol. 45 (5):467-472.

Azeri, C., Tamer, A.U., and Oskay, M., 2010. Thermoactive cellulase-free xylanase production from alkaliphilic Bacillus strains using various agroresidues and their

potential in biobleaching of kraft pulp. African Journal of Biotechnology. 9(1): 63-72.

Babich, H. and Stotzky, G., 1987. Adv. Appl. Microbiol., 23, 55-117.

Baillet E, Downey G, Tuohy M. 2003. Imp. of texture and volume in white bread rolls by incorp. of microbial hemicellulase preparations, in: Courtin C.M., Veraverbeke W.S., Delcour J.A. s: 255–259.

Baltaci, O., Genc, B., Arslan, S., Adiguzel, A. 2016. "Isolation, characterization of thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary." Research an biotechnological enzyme potential 10.1080/01490451.2015.1137662.

Bamarouf, A., Eley, A., & Winstanley, T. 1996. Evaluation of methods for distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. Anaerobe, 2(3), 163-168.

Banat, I. M., Marchant, R., & Rahman, T. J. 2004. Geobacillus debilis sp. nov., a novel obligately thermophilic bacterium isolated from a cool soil environment, and reassignment of Bacillus pallidus to Geobacillus pallidus comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54(6), 2197-2201. doi:10.1099/ijs.0.63231-0.

Başbülbül, G., 2009. Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu Ve Saflaştırılması. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Beg, Q., Kapoor, M., Mahajan, L., & Hoondal, G. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. Applied Microbiology and Biotechnology, 56(3), 326-338. doi:10.1007/s002530100704

Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., & Kumar, S. 2014. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 36, 91-106.

Betts, W. B., Dart, R. K., Ball, A. S., & Pedlar, S. L. 1991. Biosynthesis and Structure of Lignocellulose. In W. B. Betts (Ed.), Biodegradation: Natural and Synthetic Materials (pp. 139-155). London: Springer London.

Bhalla, A., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. 2015. Highly thermostable xylanase production from A thermophilic Geobacillus sp. Strain WSUCF1 utilizing lignocellulosic biomass. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 3.

Bin, L., Zhao, C., & Xie, L. H., 2012. haracterization of a Recombinant Thermostable Xylanase from Hot Spring Thermophilic Geobacillus sp. TC-W7. Journal of microbiology and biotechnology, 22(10), 1388-1394.

Blanco, A., Vıdal, T., Colom, J. F .and Pastor, F. I. J.,1995. Purification and Properties of Xylanase A from Alkali-Tolerant Bacillus sp. Strain BP-23. Appl. Environ.Microbiol.,61: 4468-447

Boone, D. R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. 2001. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Springer.

Breccıa, J.D., Sıfıerız, F,. Baıgorı, M. D., Castro, G. R. And Hattıkaul, R.,1998. Purification and characterization of a thermostable xylanase from Bacillus amyloliquefaciens. Enzyme.Microb.Tech.,22:4249.

Brock biology of microorganisms, 9th ed. 2000. (Vol. 24, pp. 62). Portland: Ringgold Inc.

Buchanan, R. E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology (Vol. 8th).

Baltimore: Williams & Wilkins Co.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6. Process Biochemistry, 38(10), 1397-1403.

Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., & Sultan, M. T. 2008. Xylanases and their applications in baking industry. Food Technology and Biotechnology, 46(1), 22-31.

Chen, C., Chen, J.L. ve L., T.Y., 1997. Purification and Characterization of a Xylanase from Trichoderma longibrachiatum for Xylooligosaccharide Production. Enzyme and Microbial Technology, 21 (2), 91-96.

Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews, 29(1), 3-23. doi:10.1016/j.femsre.2004.06.005

Damıano, V.B., Ward, R., Gomes, E., Alves-Prado, H.F., And Da Sılva, R., 2006. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic Bacillus licheniformis 77-2. 129-132:289302

Daniel, R. M., & Cowan, D. A. 2000. Biomolecular stability and life at high temperatures. Cellular and Molecular Life Sciences, 57(2), 250-264. doi:10.1007/PL00000688

Dhillon, A., Gupta, J.K., Kahna, S., 2000. Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from Bacillus circulans AB16. Process Biochem.,35:849-856

Dhiman, S. S., Sharma, J., & Battan, B. 2008. Pretreatment processing of fabrics by alkalothermophilic xylanase from Bacillus stearothermophilus SDX. Enzyme and Microbial Technology, 43(3), 262-269.

Di Tusa, C. A., Chiristensen, T., McCall, K. A., Fierke, C. A., & Toone, E. J., 2001. Thermodynamics of Metal Ion Binding.1.Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase, Biochemistry, 40, 5338-5344.

Duarte, M.C.T., Portugal, E.P., Ponezı,A.N., Bım, M.A., Taglıarı, C.V., Franco, T.T., 1999. Production and purification of alkaline xylanase. Bioresource Tech.,68:49-53.

Düsterhöft, E. M., Linssen, V. A. J. M., Voragen, A. G. J., & Beldman, G. 1997. Purification, characterization, and properties of two xylanases from Humicola insolens. Enzyme and Microbial Technology, 20(6), 437-445.

Erem, F. Küçükçetin, A., Certel, M. 2013. Bacillus türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmesi. Gıda, 38 (4), 247-254.

Everly, C., Alberto, J. 2000. Stressors, stress and survival: overview. Front. Bioscien., Vol. 5, pp. 780–786.

Gallardo, O., Diaz, P., & Pastor, F. J. 2004. Cloning and characterization of xylanase A from the strain Bacillus sp. BP-7: comparison with alkaline pI-low molecular weight xylanases of family 11. Current microbiology, 48(4), 276-279.

Gallordo, O., Dıaz, P., Pastor,F.I.J., 2004. Cloninig and characterization of xylanase A from the strain Bacillus sp.BP-7: Comparison with alkaline pI-low molecular weight xylanase of family 11. Current Microbiology, 48:276-279.

Georis, J., Giannotta, F., De Buyl, E., Granier, B., & Frère, J.-M. 2000. Purification and properties of three endo-β-1,4-xylanases produced by Streptomyces sp. strain

S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. Enzyme and Microbial Technology, 26(2-4), 178-186.

Gerasimova, J., & Kuisiene, N. 2012. Characterization of the novel xylanase from the thermophilic Geobacillus thermodenitrificans JK1. Microbiology, 81(4), 418-424.

Gessesse, A. and Mamo,G.,1999. High level xylanase production by an alkaliphilic Bacillus sp. by using solid state fermentation. Enzyme.Microb.Technol.,25:68-72.

Gessesse, A., 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic Bacillus sp. Appl.Environ.Microbiol.,64: 3533-3535.

Gessesse, A., and Gashe. B.A., 1997. Production of Alkaline Xylanase by an alkaliphilic Bacillus sp. Isolated from an Alkaline Soda Lake. Journal of Applied Microbiology., 83:402-406.

Gilbert, H. J., & Hazlewood, G. P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. Journal of General Microbiology, 139(2), 187-194.

Goluguri, B. R., Thulluri, C., Addepally, U., & Shetty, P. R. (2016). Novel alkali-thermostable xylanase from Thielaviopsis basicola (MTCC 1467): Purification and kinetic characterization. International journal of biological macromolecules, 82, 823-829.

Gopalakrishnan, M., Kalpana, M., Jitendra, K., & Bhavanath, J. (2010). Isolation, Purification, and Characterization of Haloalkaline Xylanase from a Marine Bacillus pumilus. Strain, GESF-1. Biotechnol. Bioprocess Eng, 15, 998-1005.

Gözükara, F., 2009. Termofil Bacillus sp. Bakterisinden Lichenaz (B-1,3 Ve 1,4 Glucanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Kullanılabirliği. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Grabber, J. H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. Crop Science, 45(3), 820-831.

Guo, G., Liu, Z., Xu, J., Liu, J., Dai, X., Xie, D., ... & Cheng, L. (2012). Purification and characterization of a xylanase from Bacillus subtilis isolated from the degumming line. Journal of basic microbiology, 52(4), 419-428.

Güder, S., 2014. Scytalidium thermophilum Ksilanazının Kromatografik Yöntemlerle Saflaştırılması Ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Gümüşel, F. 2002. Biyoteknoloji, genetik ve sağlık sektörü. Kocaeli Sanayii için teknolojik uzgörü ortak projesi, 73-135 s.

Harley, J.P. and Prescott, L.M. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology 4th Edition. The McGraw−Hill Companies : New York

Harris, S. A. D. 2016. Partial Purification and Characterization of Xylanase from Bacillus weihenstephanensis Strain ANR1 using Watermelon Rind. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm, 10(1).

Hendriks, A. T. W. M., & Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 100(1), 10-18. doi:10.1016/j.biortech.2008.05.027

Herbert, R. and Sharp, R. 1992. Molecular Biology and Biotechnology of

Extremophiles, Blackie & Son Ltd, New York.
Hjorleifsdottir, S., 2002. Diversity of thermostable DNA enzymes from Icelandic hot springs, Fjölritunarstofa Daniels Halldorssonar, Department of Biotechnology Lund University, Sweden, pp.2-6.
Horıkoshı, K., 1996. Alkaliphiles-from an industrial point of view. FEMS Microbiology Reviews, 18:259-270
Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some apllications of their products for biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews Vol. 63 (4), pp. 735-750.
Jaybhaye, M. M., & Bhalerao, S. A., 2016. Role of bıoınoculants ın the bıodegradatıon of lıngo-cellulosıc waste (bagasse).
Jenkins, J., 1999. The Humanure Handbook (Chapter 3. Thermophilic Microorganisms) 143 Forest Lane, Grove City, PA.
Joseleau, J.P., Comtat, J., Ruel, K., 1992. Chemical structure of xylans and their interactions in the plant cell walls. In: Visser J, Beldman G, vanSomeren MAK, Voragen AGJ (eds) Xylans and xylanases. Elsevier, Amsterdam: 1–15.
Juturu, V., & Wu, J. C. 2012. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. Biotechnology advances, 30(6), 1219-1227.
Karaağaç, S. 2002. Bir Thermobrachium celere suşunun ekstraselüler enzimlerinin bazı özelliklerinin belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
Kenealy, W. R., & Jeffries, T. W. 2003. Enzyme processes for pulp and paper: A review of recent developments.
Kindle, K.L., 1983.Characterization and Production of thermostable α-Amylase.Appl. Biochem. Biotechnol. 8,153.
Klement, Z., Rudolph, K. And Sands, D.C. 1990. “Methods in Phytopathology.” 153-180.
Kristjansson, J.K., Stetter, K.O., 1992. Thermophilic bacteria. In: Kristjansson, JK (ed). Thermophilic bacteria. London, CRC Press, Inc., Boca Raton. pp 1-18.
Kuhne, W., 1878. Ersahrungen und Bemerkungen uber Enzyme und Fermente. Unters. a.d. physiol. Inst. der Univ. Heidelberg, 1, 291.
Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiology Reviews, 23(4), 411-456. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00407.x
Kumar, B.K., Balakrıshnan, H. And Rele, M.V., 2004. Comptibility of alkaline xylanases from an alkaliphilic Bacillus NCL (87-6-10) with commercial detergents and proteases. J.Ind.Microbiol.Biotechnol.,31: 8387.
Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature, 227, 680-685.
Lama, L., Calandrellı, V., Agata, Gambacorta, A., Nıcolaus, B.,2004. Purificaion and characterization of thermostable xylanase and b-xylosidase by the thermophilic bacterium Bacillus thermantarcticus. Research in Microbiology,155: 283-289.
Lan Pham, P., Taillandier, P., Delmas, M., & Strehaiano, P. 1998. Production of xylanases by Bacillus polymyxa using lignocellulosic wastes. Industrial Crops & Products, 7(2), 195-203. doi:10.1016/S0926-6690(97)00048-4
Lennette, E. H., & Microbiology, A. S. f. 1985. Manual of Clinical Microbiology: American Society for Microbiology.
Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects, Ed: R.C. Kuhad and Ajay Singh. I. K.

International Pvt. Ltd., New Delhi, India, 275-277.

Lopez, C., Blanco, A. and Pastor, F.I.J., 1998., Xylanase production by a new alkali tolerant Bacillus. Biotechnology Letters,20:243-246.

López-García, P. 1999. DNA Supercoiling and Temperature Adaptation: A Clue to Early Diversification of Life? Journal of Molecular Evolution, 49(4), 439-452. doi:10.1007/PL00006567

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of biological chemistry, 193(1), 265-275.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(3), 506-577. doi:10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

Madigan, M.T. and Martinco, J.M. and Parker, J., 2000. Procaryotic diversity the Archaea. Brock Biology of Microorganisms, 546-571.

Magge, R.J.; Kosarıc, M., 1995. Bioceonversion of hemicellulose. Adv. Biochem Eng Biotech., 32: 61-93.

Maki, M., Leung, K. T., & Qin, W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. Int J Biol Sci, 5(5), 500-516.

McMullan, G., Christie, J. M., Rahman, T. J., Banat, I. M., Ternan, N. G., & Marchant, R. 2004. Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus Geobacillus. Biochemical Society Transactions, 32(2), 214-217. doi:10.1042/BST0320214

Menéndez-Arias, L., & Argosf, P. 1989. Engineering protein thermal stability. Sequence statistics point to residue substitutions in α-helices. Journal of Molecular Biology, 206(2), 397-406. doi:10.1016/0022-2836(89)90488-9

Miller G.L., 1959, Use of dinitro-salicylic acid reagent for determination of reducing sugars, Analitic Chemistry, Nq. 31, 426-428.

Monısha.R., Uma, M.V., Murthy, V.K., 2009. Partıal Purıficatıon And Characterızatıon Of Bacıllus pumilus Xylanase From Soıl Source. Kathmandu Unıversıty Journal Of Scıence, Engıneerıng And Technology. 5 (2): 137-148.

Motta, F.L., Andrade, C.C.P. ve Santana, M.H.A., 2013. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization, Ed: Anuj Chandel. Intech, Brezilya, 251274.

Nazina, T. N., Tourova, T.P., Poltaraus, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. ve Ivanov, M.V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of Geobacillus subterraneus gen. nov., sp.nov. and Geobacillus uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermoglucosidasius and Bacillus thermodenitrificans to Geobacillus as the combinations G. stearothermophilus, G. thermocatenulatus, G. thermoleovorans, G. kaustophilus, G. thermoglucosidasius and G. Thermodenitrificans, International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 433-446.

Ng, C. H., He, J., & Yang, K. L. 2015. Purification and Characterization of a GH11

Xylanase from Biobutanol-Producing Clostridium beijerinckii G117. Applied biochemistry and biotechnology, 175(6), 2832-2844.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., & Antranikian, G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. Applied Microbiology and Biotechnology, 51(6), 711-729. doi:10.1007/s002530051456

Önal, S., 2010.Enzimler, Bölüm 8. Moleküler biyoloji, Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. Ankara, 249-296.

Özkan, H., 2009. Erzurum çevresinde biyolojik bozulmaya neden olan heterotrofik bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi.

Pallardy, S. G., 2008. Phsiology of woody plants. Third edition. America. 199 215p.

Paulo, A. C., and Gubıtz, G. M., 2003. Textile processing with enzymes. CRC press, Cornwall, England. ISBN 1 85573 610 1.

Pekin, B. 1983. Biyokimya Mühendisliği (Biyoteknoloji) 2. Kitap (in Turkish), Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Yayını No.3,Mas Ambalaj Press.

Practical handbook of microbiology, 2d ed. 2008. (Vol. 32). Portland: Ringgold Inc.

Querol, E., Perez-Pons, J. A., & Mozo-Villarias, A. 1996. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. Protein Engineering, 9(3), 265-271.

Rifaat, H. M., Nagieb, Z. A., & Ahmed, Y. M. 2006. Production of xylanases by Streptomyces species and their bleaching effect on rice straw pulp. Applied Ecology and Environmental Research, 4(1), 151-160.

Rinia, H. A., Boots, J. W. P., Rijkers, D. T., Kik, R. A., Snel, M. M., Demel, R. A., ... & de Kruijff, B. 2002. Domain formation in phosphatidylcholine bilayers containing transmembrane peptides: specific effects of flanking residues. Biochemistry, 41(8), 2814-2824.

Saha, B. C. 2002. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated Fusarium proliferatum. Process Biochemistry, 37(11), 1279-1284.

Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30(5), 279-291.

Sanghı, A., Garg, N., Gupta, V.K., Mıttal, A., Kuhad, R.C., 2010. One Step Purıfıcatıon And Characterızatıon Of Cellulase-Free Xylanase Produced By Alkalophılıc Bacıllus Subtılıs Ash. Brazilian Journal of Microbiology. 41: 467-476.

Sa-Pereıra, P., Mesquıta, A., Duarte, J.C., Barros, M.R.A., Costaferreıra,M., 2002. Rapid production of thermostable cellulase-free xylanase by a strain *Bacillus* subtilis and its properties. Enzyme.Microb.Technol.,30: 924-933.

Saraçoğlu, Z. N., 2010. Cellulase-Free Alkalıne Xylanase Enzim Üreticisi *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Kullanım Olanaklarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Sarıkaya, E. 1995. α-Amilaz üreten bazı Bacillus suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. Doktora Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Savıtha, S.D., Raviranjan,K, Naık,G.R., 2010. A Highly Thermostable Alkaline Cellulase-Free Xylanase from Thermoalkalophilic Bacillus sp. JB 99 Suitable for Paper and Pulp Industry: Purification and Characterization. Appl Biochem

Biotechnol.

Sevastyanova O., 2005. On the importance of oxidizable structures in bleached kraft pulps, Doctoral Thesis, Fibre and Polymer Technology, Royal Institute of Technology, KTH SE100 44 Stockholm Sweden. 2005.

Shallom, D., & Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology, 6(3), 219-228. doi:10.1016/S1369-5274(03)00056-0

Sloneker, J. H. 1971. Determination of cellulose and apparent hemicellulose in plant tissue by gas-liquid chromatography. Analytical Biochemistry, 43(2), 539-546. doi:10.1016/0003-2697(71)90285-5

Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. 2005. Microbial cellulases - Production, applications and challenges. Journal of Scientific and Industrial Research, 64(11), 832-844.

Şahin, İ., & Başoğlu, F. 2011. Gıda mikrobiyolojisi. Dora Yayınları.

Tamerler C.B., 2001. Kâğıt Sektöründe Enzim Talebi, Biyotek Biyoteknoloji sektör dergisi, temmuz-agustos 2001, 3, yıl 1, 22-26.

Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M., & Sasaki, K. 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. Process Biochemistry, 38(9), 1327-1340. doi:10.1016/S0032-9592(02)00331-X

Temiz, A., 1996. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.

Tseng, M-J., Yap,M-N., Ratanakhanokchaı, K., Kyu, K.L., Chen, S-T., 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanase from an alkaliphilic Bacillus firmus. Enzyme.Mibrob.Technol.,30: 590595.

Uffen, R. L. 1997. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 19(1), 1-6. doi:10.1038/sj.jim.2900417

Voget, S., Steele, H. L., & Streit, W. R. 2006. Characterization of a metagenome-derived halotolerant cellulase. Journal of biotechnology, 126(1), 26-36.

Vos, P. D. 2007. Enzymes in Industry: Production and Applications.

Waınq, M. And Ingvorsen, K.,2003. Production of b-xylanase and b-xylosidase bt the extremely halophilic archaeon Halorhabdus utahensis. Extremophiles, 7:87-93.

Wejse,P.L., Ingvorsen, K., Mortensen, K.K., 2003. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. Enzyme.Microb.Technol., 32: 721-727.

Whitford, D., 2005, Protein structure and function, 212 p.

Wilson, K., & Walker, J. (Eds.). 2010. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge university press.

Wong, K. K., Tan, L. U., & Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. Microbiological Reviews, 52(3), 305-317.

World of Microbiology and Immunology. 2003. (Vol. 99, pp. 1502). Chicago: American Library Association.

Yang, V.W., Zhuang, Z ., Elegır, G., and Jeffrıes, T.W., 1995. Alkalineactive xylanase produced by an alkaliphilic Bacillus sp. isolated from kraft pulp. Journal of Industrial Microbiology, 15: 434-441.

Yasinok, A. E., Biran, S., Kocabas, A., & Bakir, U. 2010. Xylanase from a soil isolate, Bacillus pumilus: gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(9), 1641-1652.

Yılmaz, M. 2006. Bazı Bacillus türlerinin ekzopolisakkarid (EPS) üretimi. Niğde Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında İstanbul Kartal'da doğdu. İlk ve orta öğretimine Bolu'da başlayıp Trabzon Cumhuriyet İlköğretim Okulu'nda tamamladı. 2010 yılında Akçaabat Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. Aynı sene kazandığı Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2014'te bitirdi. Yine aynı sene Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.