

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

**CANİK TUZLASI'DAN (VAN) İZOLE VE KARAKTERİZE EDİLEN
Bacillus flexus T1 İZOLATI TARAFINDAN ÜRETİLEN SELÜLAZ ENZİMİNİN
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ORTAM BİLEŞİMİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Tuğba BÖREKÇİ
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN

VAN-2019

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

**CANİK TUZLASI'DAN (VAN) İZOLE VE KARAKTERİZE EDİLEN
Bacillus flexus T1 İZOLATI TARAFINDAN ÜRETİLEN SELÜLAZ ENZİMİNİN
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ORTAM BİLEŞİMİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Tuğba BÖREKÇİ

VAN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN danışmanlığında, Tuğba BÖREKÇİ tarafından sunulan “**Canik Tuzlasından (Van) İzole ve Karakterize Edilen *Bacillus flexus* T1 İzolatı Tarafından Üretilen Selüloz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ortam Bileşiminin Etkisi**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 07/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç.Dr. Emre EREZ

İmza:

Üye: Dr.Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN

İmza:

Üye: Dr.Öğr.Üyesi Metin ERTAŞ


İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16./08./2019 tarih ve 2019.144-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



TEZ BİLDİRİMİ

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



TGba BÖREKÇİ

(İmza)

(Adı Soyadı)

ÖZET

CANIK TUZLASI'DAN (VAN) İZOLE VE KARAKTERİZE EDİLEN *Bacillus flexus* T1 İZOLATI TARAFINDAN ÜRETİLEN SELÜLAZ ENZİMİNİN AKTİVİTESİ ÜZERİNE ORTAM BİLEŞİMİNİN ETKİSİ

BÖREKÇİ, Tuğba

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN

Ağustos 2019, 67 sayfa

Bu araştırmada; Canik Tuzlası'ndan izole edilen, halofilik bakterilerin, selülaaz enzimi yönünden, taranması hedeflendi. Ayrıca, farklı ortam bileşenlerinin enzim aktivitesine üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. İlave olarak, selülaaz enzimi yönünden pozitif izolatların, klasik ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Halofilik bakterilerin izolasyonunda % 20 oranında NaCl içeren halofilik besiyeri kullanıldı. İzolatların selülaaz enzimi yönünden taranmasında, % 1 oranında karboksimetil selüloz (CMC) içeren, halofilik agar, kullanıldı. Bu besiyerine izolatlar yoğun bir şekilde ekildi ve 35°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra, plakların yüzeyini kapatacak şekilde, kongo kırmızısı boyası ilave edilerek ve 15 dakika sonra 1M'lık NaCl çözeltisi ile yıkandı. Biyomasın etrafında şeffaf zon oluşumu, selülaaz enzimi yönünden pozitif olarak değerlendirildi. Koloni morfolojisine göre, farklılık gösteren üç izolattan, sadece bir tanesi selülaaz enzimi yönünden, pozitif bulundu. Bu izolatın farklı sıcaklık aralıkları, farklı pH ve farklı tuz konsantrasyonlarında gösterdiği aktivite belirlendi. Ayrıca farklı karbon kaynaklarının, organik ve inorganik azot kaynakları ile farklı amino asitlerin enzim aktivitesi üzerine etkisi belirlendi. Bu izolat tarafından üretilen, selülaaz enziminin, 48 saatlik sabit inkübasyon aralığında sırasıyla; 25°C'de (48,79 IU/ml), pH 8 (39,78 IU/ml) değerinde, %5 NaCl (36,07 IU/ml), fruktoz (37,04 IU/ml), pepton (37,04 IU/ml), ve ornitin (36,98 IU/ml) amino asiti'nin varlığında yüksek (aktivite gösterdiği tespit edildi. Ayrıca, bu izolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri belirlendi. İlave olarak, selülaaz pozitif izolatın, 16S rRNA diziliş analizine göre *Bacillus flexus* suşuna mensup olduğu tespit edilerek, bakteriyel taksonomideki durumunu belirlendi.

Anahtar kelimeler: *Bacillus flexus*, Canik Tuzlası, Halofilik bakteri, Selülaaz aktivitesi.



ABSTRACT

THE EFFECT OF ON THE ACTIVITY OF CELLULASE ENZYME PRODUCED BY *Bacillus flexus* T1 ISOLATE ISOLATED AND CHARACTERIZED FROM CANIK SALTERN (VAN)

BÖREKÇİ, Tuğba

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

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Erdal ÖĞÜN

August 2019, 67 page

In this study; It was aimed to screen the halophilic bacteria isolated from Canik Saltern for cellulase enzyme. It was also aimed to determine the effect of different media components on enzyme activity. In addition, classical and molecular characterization of the cellulase-positive isolates was performed.

Halophilic medium containing 20 % NaCl was used for isolation of halophilic bacteria. For the detection of cellulase enzyme, halophilic agar containing 1% carboxymethyl cellulose (CMC) was used. The isolates were intensively planted on this medium and allowed to incubate at 35 ° C for 48 hours. After incubation, they were washed with 1M NaCl solution after 15 minutes by adding kongo red dye to cover the surface of the plates. The formation of clear zones around the biomass was evaluated as positive for cellulase enzyme. According to colony morphology, only one of the three isolates was found positive for cellulase enzyme. The activity of this isolate at different temperature ranges, different pH and different salt concentrations were determined. In addition, the effects of different carbon sources, organic and inorganic nitrogen sources and different amino acids on enzyme activity were determined. The cellulase produced by this isolate, respectively, at a fixed incubation interval of 48 hours; At 25°C (48,79 IU/ml) pH 8 (39,78 IU/ml), 5% NaCl (36,07 IU/ml), fructose (37,04 IU/ml), peptone (37,04 IU/ml) and ornithine (36,98 IU/ml) showed high activity in the presence of amino acid. In addition, morphological, physiological and biochemical properties of this isolate were determined. In addition, it was determined that the cellulase positive isolate belonged to *Bacillus flexus* strain according to 16S rRNA sequencing analysis and its status was determined in bacterial taxonomy.

Keywords: *Bacillus flexus*, Canik Saltern, Cellulase activity, Halophilic bacteria.



ÖN SÖZ

Endüstriyel uygulamalarda kullanılan enzimler mikroorganizmalar tarafından elde edilir. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin, katalitik etkilerinin yüksek olması istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, ekonomik ve daha stabil olmaları, fazla miktarda elde edilebilmelerinden dolayı tercih edilir. Endüstriyel alanda kullanılan enzimler mikrobiyal kökenli olduklarından dolayı mikroorganizma kullanımını artmıştır. Ekstremofilik mikroorganizmalar, aşırı sıcaklıkta, yüksek ve düşük pH değerlerinde, aşırı tuz konsantrasyonlarında yaşamaya adapte olmuşlardır. Farklı şekilde ekolojik şartlarda yaşayan mikroorganizmalar halofilik, termofilik, alkalifilik ve asidofilik bakteriler olarak sınıflandırılır. Halofilik bakteriler yüksek oranda tuz içeren bakteri gruplarıdır. Tuz madenlerinde, tuz göllerinde, tuzlalarda, tuzlu besinler gibi alanlarda yoğun bir şekilde bulunurlar. Halofilik mikroorganizmalar ve halotolerantlar biyoteknolojik öneme sahiptir

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bana böyle bir çalışma için imkan sağlayan, konumun belirlenmesinde beni yönlendiren çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan kıymetli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN'e şükranlarımı sunarım.

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hocalarıma lisans eğitimim boyunca bana kazandırdıkları herşey için ve beni gelecekte söz sahibi yapacak bilgilerle donattıkları için tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan her türlü fedakarlığı yapan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

2019
Tuğba BÖREKÇİ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
EKLER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Canik Tuzlası.....	3
2.2. Selüloz.....	3
2.3. Bakteriyel Selülaz.....	4
2.4. Selülazların Sınıflandırılması	7
2.4.1. Endoglukanazlar	7
2.4.2. Ekzoglukanazlar	7
2.4.3. β - Glikosidazlar	7
2.5. Selülazların Özellikleri ve Karakterizasyonu.....	7
2.6. Selülazın Kullanım Alanları.....	8
2.6.1. Kağıt endüstrisi.....	8
2.6.2. Deterjan endüstrisi	9
2.6.3. Gıda endüstrisi	9
2.6.4. Tekstil endüstrisi	10
2.6.5. Yem endüstrisi	10
2.7. Selülaz Üretimini Etkileyen Faktörler.....	10
2.7.1. İnkübasyon sıcaklığı	11
2.7.2. pH etkisi.....	11
2.7.3. Substrat konsantrasyonu ve nem içeriği	11
2.7.4. Azot kaynağı.....	11
2.7.5. Karbon kaynağı.....	12

	Sayfa
2.8. Halofilik Mikroorganizmalar	12
2.9. Bacillus Cinsi	13
2.9.1. Bacillus cinsinin önemi.....	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Halofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyerler ve araçlar	17
3.1.1.1. Halofilik besiyeri	17
3.1.2. Kullanılan çözelti ve boyalar	18
3.1.2.1. Kristal viyole	18
3.1.2.2. Lügol çözeltisi	18
3.1.2.3. Kongo kırmızısı	18
3.1.2.4. NaOH çözeltisi	18
3.1.2.5. Safranin boyası	18
3.1.2.6. % 3'lük H ₂ O ₂ çözeltisi.....	18
3.1.2.7. Sülfanilik asit çözeltisi.....	18
3.1.2.8. Alfa -naftol çözeltisi	19
3.1.2.9. Rhodamin B boyası	19
3.1.2.10. Sülfirik asit	19
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Tuzlu su ve tuzlu toprak örneklerinin toplanması	19
3.2.2. Tuzlu su ve tuzlu toprak örneklerinden halofilik bakterilerin izolasyonu	19
3.2.3. Halofilik bakterilerin saf kültürlerin elde edilmesi.....	19
3.2.4. Selülaz üreten izolatların tespiti.....	20
3.3. Selülaz Enzim Aktivitesinin Tespiti.....	20
3.3.1. Selülaz enziminin spektrofotometrik ölçümü	20
3.3.2. Selülaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktivitenin tespiti.....	20
3.3.3. Selülaz enziminin farklı zaman aralıklarında gösterdiği aktivitenin tespiti.....	21
3.3.4. Selülaz enziminin farklı karbon kaynaklarında gösterdiği aktivitenin tespiti.....	21
3.3.5. Selülaz enziminin farklı azot kaynaklarında gösterdiği aktivitenin tespiti..	21
3.3.6. Selülaz enziminin farklı amino asit kaynaklarında gösterdiği aktivitenin tespiti.....	22

3.3.7. Selülaz enziminin farklı tuz konsantrasyonlarda gösterdiği aktivitenin tespiti.....	22
3.3.8. Selülaz enziminin farklı pH aralıklarında gösterdiği aktivitenin tespiti ...	22
3.4. Kültürün Koloni ve Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi	23
3.4.1. Bakteri Suşlarının Gram Boyama Yöntemi İle Boyanması.....	23
3.5. Biyokimyasal Testler.....	23
3.5.1 Sitrat testi	23
3.5.2. Metil red (MR) testi	24
3.5.3. İndol testi	24
3.5.4. Karbonhidrat oksidasyonu (Fermantasyon testleri).....	24
3.5.5. Aminoasit dekarboksilasyon testi	24
3.5.6. Nitrat indirgenmesi testi	25
3.5.7. Fenilalanin deaminaz testi	25
3.5.8. Voges - Proskauer (VP) testi	25
3.5.9. Üreaz testi	25
3.5.10. Katalaz testi	26
3.5.11. Oksidaz testi (Microbact Oxidase Strips MB0266).....	26
3.5.12. Tween 80 hidroliz testi	26
3.5.13. Nişasta hidroliz testi	27
3.5.14. Kazein hidrolizi testi.....	27
3.5.15. Eskulin hidroliz testi	27
3.6. Moleküler Yöntemler	27
3.6.1. Genomik DNA izolasyonu	27
3.6.2. 16S rRNA'nın PZR amplifikasyonu.....	29
3.6.3. Analiz edilen gen bölgesi.....	31
4. BULGULAR	33
4.1. Halofilik Bakterlerin Saf Kültürlerinin Elde Edilmesi.....	33
4.2. Halofilik Bakterilerin Selülaz Aktivitesi.....	33
4.3. Farklı Ortam Bileşenlerinin Selülaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	34
4.4. Selülaz Enzimi Standart Grafiği.....	35
4.4.1. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı karbon kaynaklarının belirlenmesi.....	36

4.4.2. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı azot kaynaklarının belirlenmesi.....	36
4.4.3. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı amino asit kaynaklarının belirlenmesi.....	37
4.4.4. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı tuz konsantrasyonlarında belirlenmesi	37
4.4.5. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı sıcaklık belirlenmesi.....	38
4.4.6. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı zaman aralıklarının belirlenmesi	38
4.4.7. Selülaz enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi	39
4.5. Halofilik Bakteri Suşlarının Koloni ve Hücre Morfolojilerinin İncelenmesi.....	39
4.6. Halofilik İzolatın Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	40
4.7. Moleküler Değerlendirme	46
4.7.1. Gen bölgelerinin çoğaltılması.....	46
4.7.2. Dizi verilerinin tanımlanması	47
4.7.3. Çoklu dizi analizi.....	48
4.7.4. 16S rRNA gen bölgesinin analizi	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	57
EKLER	63
ÖZ GEÇMİŞ.....	67

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Selülaz üretiminde kullanılan bakteri ve mantar türleri	6
Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar	30
Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları.....	30
Çizelge 4.1. Farklı parametrelerin selülaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.	34
Çizelge 4.2. T1 İzolatının morfolojik, fizyolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri	41





ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Selülozun yapısı.	4
Şekil 3.1. Canik Tuzlası'dan görüntü.	17
Şekil 4.1. İzolatın halofilik besiyerindeki görüntüsü.....	33
Şekil 4.2. Selülaz enzimi üreten T1 izolatu.....	33
Şekil 4.3. Standart eğri grafiği.....	35
Şekil 4.4. Farklı karbon kaynaklarının selülaz aktivitesi üzerine etkisi.	36
Şekil 4.5. Farklı azot kaynaklarının selülaz aktivitesi üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.6. Farklı amino asit kaynaklarının selülaz aktivitesi üzerine etkisi.....	37
Şekil 4.7. Farklı tuz konsantrasyonunda selülaz aktivitesi üzerine etkisi.	37
Şekil 4.8. Sıcaklığın selülaz aktivitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.9. Zamanın selülaz aktivitesi üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.10. Farklı pH değerlerin selülaz aktivitesi üzerine etkisi.	39
Şekil 4.11. İzolatın gram boyama görüntüsü.....	39
Şekil 4.12. T1 Oksidaz testi.....	42
Şekil 4.13. T1 Katalaz testi.....	42
Şekil 4.14. Nitrat testi.....	42
Şekil 4.15. Sitrat testi.....	42
Şekil 4.16. Fenilalanin testi.	43
Şekil 4.17. Üreaz testi.....	43
Şekil 4.18. İndol testi.....	43
Şekil 4.19. Metil red (MR) testi.....	43
Şekil 4.20. Karbonhidrat oksidasyon testi sonuçları.	44

Şekil	Sayfa
Şekil 4.21. Aminoasit dekarboksilasyon testi sonuçları.....	44
Şekil 4.22. Nişasta hidroliz testi.....	45
Şekil 4.23. Kazein hidroliz testi.....	45
Şekil 4.24. Tween 80 hidroliz testi.....	45
Şekil 4.25. Eskulin hidroliz testi.....	45
Şekil 4.26. İzolatın gelişebildiği tuz aralığı.....	46
Şekil 4.27. İzolatın gelişebildiği pH aralığı.....	46
Şekil 4.28. Agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	46
Şekil 4.29. 16S rRNA gen bölgesine ait kromatogram görüntüsü.....	47
Şekil 4.30. 16S rRNA gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.....	48
Şekil 4.31. 16S rRNA bölgesine ait Maksimum Likelihood (ML) metodu ile oluşturulan filogenetik ağaç göre (<i>Lactobacillus casei</i> dış grup).....	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
bç	Baz çifti
g	gram
kDa	Kilo dalton
M	Molar
mg	Miligram
ml	Miligram
mM	Milimolar
nt	Nükleotit
sp.	Tür (tek)
spp.	Türler
µ	Mikron

Kısaltmalar	Açıklama
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetat
STE	Sodium Chloride-Tris-EDTA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TE	Tris EDTA
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kısaltmalar

Açıklama

ML

Maximum Likelihood

MCL

Maximum Compasit Likelihood

CTAB

Cetyltrimethylammonium bromür

TSA

Tryptic Soy Agar

TSB

Tryptic Soy Broth

CMC

Karboksimetil Selülaz

IU

Enzim Ünitesi

CFU

Koloni Oluşum Birimi



EKLER DİZİNİ

	Sayfa
Ek 1. Besiyerleri	63
Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponları	64





1. GİRİŞ

Enzimler, canlı organizmalardaki metabolizmayı oluşturan, biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan biyolojik katalizörlerdir. Enzim terimi ilk kez Kuhne tarafından kullanılmıştır. 1897 yılında Eduard Buchner hücrelerden fonksiyonel enzimlerin özütlediğini bildirmiştir (Paulo ve Gübitz, 2003). Enzimler, kimyasal reaksiyonlarda değişiklik geçirmeden reaksiyon hızını yükselten maddelerdir. Enzimler besin üretimi, gen klonlama ve gelişmiş tedavi teknikleri gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmıştır (Lerner, 2002).

Hücre içi ve hücre dışında sentezlenen enzimler, aktivasyon enerjisini azalatarak hücre içerisindeki reaksiyonların hızlanmasında katkıda bulunur. Hücre dışında da çoğunlukla bu etkinliklerini korumaktadırlar (Zoppas ve ark., 2013). Enzimler, ilk dönemlerden günümüze kadar farklı alanlarda kullanılmaktadır. Teknolojinin gelişmesi ile beraber saf enzimler elde edilmeye başlanarak, daha geniş çapta üretimler gerçekleştirilmektedir. Bu gelişmelerle beraber enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımı artmıştır. Endüstriyel enzimler dünya genelinde deterjan, fırıncılık, biracılık, meyve suyu üretimi ve tekstil gibi çeşitli alanlarda kullanılmıştır. Endüstriyel enzimler, genellikle ekstrasellüler yapıya sahiptirler (Vroemen, 1983). Endüstride kullanılan enzimler mikroorganizmalardan üretilmektedir

Mikroorganizmalar enzim üretebilme, toksik ve patojen olmamasına göre tercih edilir. Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimler, mikrobiyal kökenli olduğundan dolayı mikroorganizma kullanımı artmıştır (Demain ve Solomon, 1981). Ekstremofilik mikroorganizmalar aşırı sıcaklıklarda, aşırı soğuk ortamlarda, pH değerlerinin çok küçük ve çok büyük olduğu aralıklarda (pH 0-3 ya da pH 10-12) ya da aşırı tuz konsantrasyonlarına uyum sağlamışlardır (Niehus ve ark., 1999). Böylelikle farklı ekolojik ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar halofilik, termofilik, alkalifilik ve asidofilik bakteriler olarak gruplandırılır. Ticari olarak önemli olan enzimlerin çoğu hidrolazlar olarak bilinmektedir. Hidrolazlar, mikrobiyal kökenli enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ekstrasellüler yapıda bulunur ve yüksek moleküler ağırlığı özelliğine sahip substratlarla görev yapabilirler. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre çeperi ile ilişkili olan enzimlerdir (John ve ark., 1998).

Günümüze kadar 2000'den fazla enzim tespit edilmiş ve bunların ortalama 100 tanesinin ticari kullanıma uygun olduğu saptanmıştır. Fakat bu enzimlerden yalnızca 18 tanesi endüstriyel amaçla üretilmektedir (Zeman ve McCrea, 1985). Ticari kullanıma uygun olan enzimlerin % 59'lük kısmını proteazlar, % 28'lik kısmını karbohidrazlar, % 3'lük kısmını lipazlar ve % 10'luk kısmını ise diğer enzimler oluşturur. Enzim teknolojisinin gelişmesiyle ürünlerin kullanım alanlarının farklılığı ve maliyet değerlerinin fazla olmasından dolayı biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili yapılan farklı araştırmaları değer kazanmaktadır. Özellikle son zamanlarda stratejik olarak değerlendirilen rekombinant DNA teknolojisinden faydalanarak enzim kullanımı büyük önem kazanmış ve gittikçe kullanımı yaygınlaşmıştır (Gessese, 1998).

Bu çalışmada, Canik Tuzlası'ndan alınan tuzlu su numunelerinden izole edilen halofilik bakterilerden selülaz enziminin optimizasyonu, klasik ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonunun yapılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Canik Tuzlası

Canik Tuzlası, Van-Erciş karayolu üzerinde bulunan Gedikbulak sınırlarında olup doğal kaynak tuzun üretildiği yerlerdendir. Tuz, temel besinlerimizden olmakla beraber sağlığımız için oldukça önemli bir yere sahiptir. Tuzun işlenmesi ve doğal halini korumak için içerisinde bulunan 80'e yakın element farklı kaynaklardan elde edilerek işlemlere tabi tutulur. Kaynak tuzun, hareket halindeki yer altı sularının kaya tuzu yataklarından geçmesi sırasında bir miktar tuzu eritip, iyon halinde bünyesine alarak farklı formasyonlarda yeryüzüne çıkmasıyla tuzlu su kaynakları oluşur. Kaliteli bir tuzun ana yapısında 92 mineral ve 84 element bulunmaktadır.

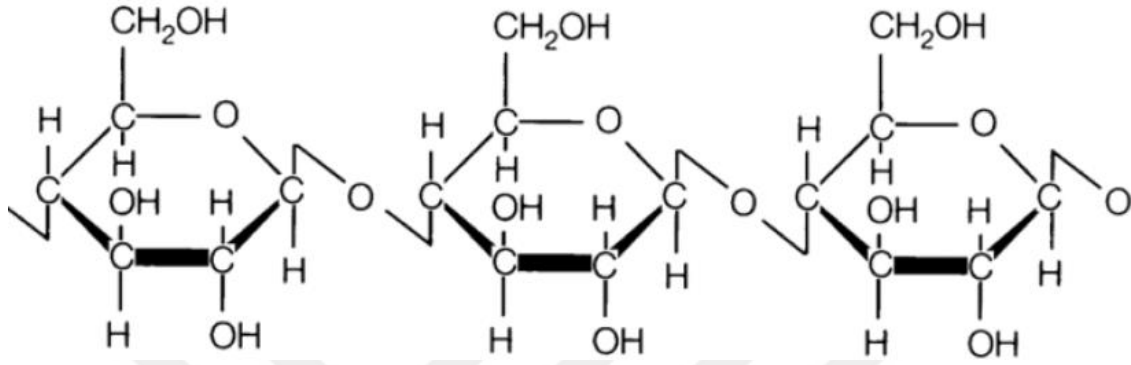
Çalışmanın yapılacağı bölge halofilik mikroorganizmalar, açısından zengin bir alan olduğundan dolayı bilimsel çalışmalara da elverişli bir bölgedir.

2.2. Selüloz

Selüloz (Şekil 2.1) β -1-4 glukoz yapıya sahip, dünya çapında fazla miktarda olan bir biyopolimer olup, küresel olarak ekonomi de büyük yere sahiptir. Odun ve pamuğun % 94'lük kısmının temel bileşeni selülozdan meydana gelir. Odun ve pamuk, yapı malzemeleri, kağıt, tekstil ürünlerinde selüloz yapıları ürünlerin esas kaynağıdır (Brown, 2004). Selüloz bitkilerden sağlanır. Bitkilerdeki selüloz yapısı hemiselüloz ve lignin birlikte bulundurması sebebiyle selüloz üretmek çok fazla enerji ve kimyasal madde ihtiyacı gerektirir. Bu kimyasal maddeler çevre kirliliğine sebep olmaktadır.

Dünyadaki nüfus artışı göz önüne alındığında ise selüloza olan ihtiyacın giderek artacağı görülmektedir. Alışılmış metotlarla bitkilerden selüloz üretme devam ettiği sürece selüloz ihtiyacını giderebilmek için odun ve pamuk yetiştirmek gerekmektedir. Bu sebeple karbon döngüsü bu durumdan direkt olarak etkilenmektedir (Brown, 2004). Odun ve hidrokarbonların atmosfere ısı salmasıyla fazla miktarda karbondioksit oluşumu küresel ısınmaya sebep olan etkenlerden biridir. Bitkilerin kullanılması fotosentezi azaltacağından dolayı küresel ısınmayı tetiklemektedir. Bu sebeple selüloz üretimi için odun ve pamuğun farklı kullanım yöntemleri aranmaktadır (Brown, 2004).

Bitkilerin yanısıra mantarlar ve bakteriler de selüloz üretebilme yeteğine sahiptirler fakat fotosentez yapabilme özellikleri yoktur, selüloz üretebilmek için fotosentetik organizmaların meydana getirdiği glikoza veya başka organik substratlara gereksinim duymaktadırlar (Brown, 2004).



Şekil 2.1. Selülozun yapısı.

Selüloz, biyolojik parçalanmaya karşı dayanıklı olup sağlam ve çözünmez yapısı ile diğer polisakkaritlerden farklıdır (Yang ve ark., 2010). Selüloz, bitki biyokütlesinin % 40'ını oluşturmaktadır. Selüloz hidrofilik özelliğine rağmen suda çözünmez. Selüloz, minimum üç farklı enzimin sinerjistik çalışması ile glikoza hidrolize olabilir (Kıran ve ark., 2006).

2.3. Bakteriyel Selülaz

Selülazlar; selülozun yapısındaki β -1-4 bağlarını parçalayarak son ürün olan glukoz, sello-oligasakkarit ve sellobiyozu oluştururlar. Selülazlar β -glukozidaz, sellobiyohidrolazlar ve endo- β -1,4-glukanaz olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. β -glukozidazlar ise sellobiyozları glikoza hidrolize ederler (Haki ve Rakshit, 2003).

Selülaz enzimi oluşturmak için maliyetin azaltılması ve enzim performansının artırılması gereklidir (Sadhu ve ark., 2013). Selülazın, fazla miktarda üretilmesi için yüksek üretimli mantar ve maliyeti uygun karbon kaynağı gereklidir (Hideno ve ark., 2011). Selülaz üretiminde substrat önemli bir etkidir. Bu nedenle substrat olarak ekonomik biyokütlelerin kullanımı selülaz maliyetinin azalmasına yardım etmektedir (Singh ve ark., 2009). Selülaz üretiminde, çoğunlukla bakteriler ve mantarlar kullanılmaktadır.

Doğada endüstriyel işleyiş bakımından önemli selülazlar bulunmaktadır. Teeri ve ark., (1998), *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Bacillus* suşları tarafından sentezlenmektedir (Tomme ve ark., 1995; Ito 1997).

Selülozun enzimatik hidrolizi için çoğunlukla selülaz üreten mikroorganizmaların ortama direkt olarak ilave edilmesi ile gerçekleştirilir. Fakat bu uygulamalar sonucu verimin az olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, selülozu selülaz ile doğrudan çalışmak daha kesin bir çözüm olarak ortaya konulmuştur.

Bu işlem ilk olarak selülazın üretilmesi, daha sonra kısmen saflaştırılması ve hidroliz çalışmaları için kullanılması şeklinde yapılır. Araştırmalar sonucunda birçok mikroorganizmanın selülaz ürettiği bulunmuştur.

Enzimatik hidroliz, enerjinin tasarruflu kullanılması ve toksik maddelerin veya aşındırıcı asitlerin kullanılmasına gereksinim duyulmamasından dolayı avantajlıdır. Bu sebeple selülozun, selülaz ile hidrolizi yaygın biçimde çalışılan bir konudur. Selülazın, selülozun yüzeyine yapıştığı ve substrat boyunca hareket ederek bir grup katalitik reaksiyonları gerçekleştirdiği bulunmuştur. Enzim, substrattan uzaklaştırılarak ve substratın farklı bölgesine yapışarak katalitik aktivite göstermektedir (Kıran ve ark., 2006). Selülazlar, pekçok alandaki kullanımlarından ötürü dünya çapında endüstriyel enzimler arasında üçüncü sıradadır. Mikroorganizmalar içinde aerobik, anaerobik bakteriler, anaerobik mantarlar, beyaz çürükçül ve yumuşak çürükçül mantarlarda selülaz üretimi yaygın bir şekilde görülmektedir.

Mantarlardan üretilmiş selülazlar oksidatif ve hidrolitik enzimler yaparak, lignin, selüloz, hemiselülozun parçalanmasını sağlayabilmektedir (Pandit ve Maheshwari, 2012). Mantarlardan elde edilen enzimler, bakteriyel enzimlere oranla az komplekstirler (Otajevwo, 2011). Karbon kaynağı, pH değeri, sıcaklık, azot kaynağı, uyarıcıların varlığında selülaz üretimin optimize edilmesinde önemlidir. En önemli parametre ise pH değeridir (Otajevwo, 2011). Selülazların farklı kullanım taleplerinden dolayı uygulamaları her geçen gün artmaktadır. Selülazlar, biyokütlenin biyolojik olarak geri dönüşümünde kullanılmasına rağmen, son zamanlarda gıda, deterjan, tekstil, yem gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaya başlamıştır. Ancak fosil yakıt kaynaklarının giderek azalmasıyla, yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyaç artmıştır. Bununla birlikte selülaz ve diğer enzimler kullanılarak lignoselülozik biyokütlenin hidrolizi gerçekleştirilmiştir (Singhania ve ark., 2010).

Günümüzde, endüstriyel olarak kullanılan selülotik enzimler kumaşların parlaklığının artırılmasında, kotların biyolojik taşlanması, meyve sularının berraklaştırılmasında, endüstriyel atıkların ön işleminde ve hayvancılıkta yem kalitesinin artırılmasında kullanılmaktadır. Selülozun istenilen alanda kullanılması selülozların başarısını, yeni ve daha etkin enzimlerin izolasyonuna bağlıdır (Haki ve Rakshit, 2003).

Bakteri ya da mantarlardan farklı yollarla üretilen selülazın en uygun kullanılan üretim yöntemi katı hal fermantasyonu (Solid State Fermentation, SSF) ve batık hal fermantasyonu (Submerged, SMF) dur. Katı hal fermantasyonu, az miktarda atık su çıkması, düşük maliyeti dolayısıyla daha üstün gözükse de, batık hal fermantasyon sürecinin kontrol edilebilirliğinin kolay olmasından dolayı daha çok tercih edilmektedir (Pandit ve Maheshwari, 2012; Shobana ve Maheswari, 2013).

Selülaz üretiminde mantarlar, bakterilere göre daha fazla tercih edilmektedir.

Çizelge 2.1. Selülaz üretimi için kullanılan bakteri ve mantar türleri (Shara ve ark., 2013).

Bakteri	Mantar
<i>Bacillus subtilis</i> (CBTK 106)	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
<i>Bacillus subtilis</i> KO	<i>Trichoderma reesei</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Aspergillus alternate</i>
<i>Geobacillus pallidus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>

Literatürde, halofilik bakteriler tarafından üretilen bakterilerle ilgili çeşitli araştırmalar mevcuttur. Han ve Zhang (2011), ılımlı halofilik bakteri HS1 izolatu tarafından üretilen selülaz enzimini optimize etmişlerdir. Li ve ark. (2012). Halofilik *Thalassobacillus* izolatlarından organik solventlere tolerans gösteren, alkalın selülaz enzimini karakterize etmiş ve saflaştırmışlardır. Zhang ve ark. (2012), tarafından Haloalkalofil *Bacillus sp.* BG-CS10 izolatu tarafından üretilen selülaz enzimi aktivitesine tuzun etkisi araştırılmıştır. Chen ve Liu (2013), tarafından izole ve teşhis edilen, ılımlı halofilik grup içerisinde yer alan *Halomonas sp.* ZSCW-10 izolatının selülotik aktivitesini belirlemişlerdir. Asha ve Sakthivel (2014), halofilik ve alkalofilik özellik sergileyen *Bacillus subtilis* suşunun ürettiği selülazı saflaştırmış ve karakterize etmişlerdir.

2.4. Selülazların Sınıflandırılması

Selülozik substrattaki hareket bölgelerine göre üç grupta incelenmektedir. İçteki selüloz ile lif bağlarını bölen endoglukanazlar, (endo β -1-4 glukanaz), sellobiyohidrolazlar, çözünebilen oligosakkaritleri hidroliz eden β glikosidazlar ve selülozun dış bölgesinde çalışan ekzoglukanazlar olarak sınıflandırılır.

2.4.1. Endoglukanazlar

Karboksimetil selülaz veya endo β -1-4 glukanazlar olarak bilinmektedirler. Selülozun, yapısındaki β -1-4 bağlarını hidrolize ederler ve selülozun substratı olarak çalışır. Endoglukanazlar, selülozları dağınık olarak parçalayarak glukozları, oligosakkaritleri, sellobiyozları oluştururken, ekzoglukanazlar (sellobiyohidrolazlar) selülozun yapısındaki β -1,4-D-glukozidik bağlarını parçalayarak indirgenmemiş uçlarında olan sellobiyozların serbest kalmasında katkıda bulunurlar.

2.4.2. Ekzoglukanazlar

Selüloz, zincirinde indirgen ve indirgen özelliğe sahip olmayan kısımları içeren bir sistemde hareket etmektedirler. Ayrıca ana ürünleri glikoz ve sellobiyohidrolazları serbest bırakırlar. Mikrokristal selüloz üstünden hareket ederler ve polisakkarit zinciri kısalır. Karboksimetil selülaz (CMC) ve hidroksietilselülaz (HEC) zincirleri üzerinden sınırlı bir etkiye sahiptir.

2.4.3. β - Glikosidazlar

Glukohidrolaz olarak da bilinen β -glikosidazlar kısa oligosakkarit zinciri ve çözünebilir sellobiyozu glikoza hidrolize eder ve selüloz zincirinin uzamasıyla aktivitesini kaybeder, uçta β -glikoz oligosakkaritlerinin hidrolizini gerçekleştirir (Sharada ve ark., 2013).

2.5. Selülazların Özellikleri ve Karakterizasyonu

Selülazların endüstride en iyi performans şartları altında kullanılabilmesi için özelliklerinin belirlenmesi önemlidir.

Selülotik enzimler, metaller gibi moleküllerden de etkilenirler. Bu karakteristik inhibitör etkiye yol açmaktadır. Çinko, civa, gümüş selülazı inhibe ederek katalitik aktiviteyi düşüren iyonlardır. Aktiviteler bakımından saf selülazın karakterizasyonu için endoglukanazın başka substratları kullanılmaktadır. Bununla beraber enzimin sinerjik etkisi, hassas ölçümü önlemektedir.

Karboksimetil selüloz, endoglukanaz aktivitesine karşı substrat olarak kullanılmaktadır. Enzim rastgele polimere saldırır ve polimerizasyon boyutunda değişiklik meydana getirir. Enzimatik reaksiyon, karboksimetil selülaz aktivitesinde indirgen şeker oluşum miktarını belirler. Ekzoglukanazların aktivitesi için mikrokristal selüloz kullanılır (Zoppas ve ark., 2013).

2.6. Selülazın Kullanım Alanları

Selülaz; kağıt, tekstil, gıda, medikal gibi endüstriyel alanda kullanıldığı tespit edilmiştir (Das ve ark., 2010). Günümüzde selülazın birçok farklı kullanım alanı vardır.

2.6.1. Kağıt endüstrisi

Ambalaj kağıtlar, kullanılmış kağıtlar ve gazete kağıtları geri dönüşüm için önemli bir yere sahiptir. Kağıtlardaki mürekkeplerin uzaklaştırılması için günümüzde enzimatik yollar ve kimyasal uygulamalar yapılmaktadır (Schafer ve ark., 2007). Bu sebeple selülazlar kağıt endüstrisinde kağıt fabrikalarının drenajlarının ağartılması, kağıtlardan mürekkebin uzaklaştırılması, kağıdın dayanıklılık özellikleri ve kaba mekanik kağıt hamurunun değiştirilmesi için biyomekanik hamurlaştırmada kullanılmaktadır. Kağıt hamuru üretiminde selülaz, hamur kalitesine hasar veren odunsu maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bu işlem uygulanan enzimin türüne bağlıdır (Zoppas ve ark., 2013). Ayrıca, selülaz karton gibi büyük kağıt parçalarının parçalanmasını kolaylaştırmak da endüstriyel bir kullanım alanıdır.

Selülotik enzimler kağıt havluların dokularındaki yumuşaklık için kullanılmaktadır (Sukiman ve ark., 2005). Kağıt atık maddelerinin geri dönüşüm işleyişinde farklı selülaz sistemleri kullanılmaktadır (Yu, 1996).

2.6.2. Deterjan endüstrisi

Selülozlar, çoğunlukla deterjan endüstrisinde temizlik amacıyla kullanılmaktadır. *Trichoderma reese*'den üretilen selülozlar deterjan endüstrisinde kullanıma uygundur. Aynı şekilde *Trichoderma viride* ve *Trichoderma harzianum* endüstride selülozların ana kaynakları olarak bilinmektedirler. Yüksek sıcaklıklarda ve alkali koşullarda aktif *Humicola* türlerinden meydana getirilen selülozlar çoğunlukla deterjan ve yıkama tozlarına eklenmektedirler (Sukumaran ve ark., 2005).

Selüloz, hidrolazlardan farklı olarak lekeleri özümlemediklerinden dolayı deterjan enzimleri çalışmalarında başarılı bir yere sahiptir. Alkalin pH'daki deterjanların kararlılığı deterjan enzimi için gereklidir (Shirai ve ark., 2001). Alkalin selülozların keşfi ile birlikte deterjan alanında kullanımı enzimin yeni kullanım alanını oluşturmuştur (Horikoshi, 1999). Selülozlar, temizleme ve kumaş onarımı bakımından deterjan endüstrisine katkı sağlamıştır. Öte yandan kumaşları onarıp yüzeyindeki tüylü görüntüyü ve renk tonunu etkileyen özelliğe sahiptir. Lif fragmentleri yıpranmış kumaş ve eskimiş görüntüye sahip olan kumaşları onarım işlemiyle olur (Schafer ve ark., 2007). Zarar görmüş lif yüzeylerinde bulunan kirlerin yüzeyden uzaklaştırılabilmesi ve mikrofibrilleri uzaklaştırma etkileride vardır. Selülozlar, lif yüzeylerinden kirliliklerin temizlenmesi ve kumaşlara parlaklık vererek yeni gibi görünmesini sağlar (Paulo ve Gubitz, 2003). Deterjan endüstrisinde sadece endoglukanazlar istenen performans artışını sağlayabilmektedir (Schafer ve ark., 2007). Fakat selülozların deterjanlarda yüksek oranda kullanılması bazı yıkamalar sonrası pamuksu kumaşlara zarar verebilmektedir (Aehle, 2007). Güçlü aktiviteli yeni deterjanların performanslarını arttırmak için karışıma proteaz, lipaz, amilaz, selüloz, enzimin karıştırılması söz konusudur (Singh ve ark., 2001).

2.6.3. Gıda endüstrisi

Selüloz, gıda endüstrisinde hemiselüloz ve pektinazlarla birlikte meyve ve sebze içeceklerinin şeffaflaştırılmasında, zeytinyağlarının ayrılmasında, yağlı tohumların ekstraksiyonunda, meyve nektar ve pürelerinin üretiminde kullanılmaktadır (Sukuman ve ark., 2005).

Özellikle meyve suyu yapımında hemiselülaz, selülaz, pektinazların ortak kullanımı gıda endüstrisinde başarıyı arttırmaktadır (Soares ve ark., 2001). Meyve sularının yapımında önemli bir yere sahip olan selülazlar, meyve suların renk ve nektarın ekstraksiyon etkinliğini arttırmada, meyve pigmentlerin iyi bir şekilde ekstre olmasına yardımcı olur (Zoppas ve ark., 2013). Selülazın ilave edilmesiyle nektar verimi artırılabilir ve yüksek sıcaklarda nektar hazırlanması esnasında kirlenme önlenmektedir (Saravanan ve ark., 2008). Selülazlar, sükröz, nişasta gibi alternatif tatlandırıcılara rakip olan, glikoz şuruplarının üretiminde hidroliz edilmiş selüloz fermantasyon ile çeşitli kimyasalların üretimi için besin kaynağı olarak da kullanılabilir. Sitrik asit, asetik asit gibi gıda içeriklerin de kullanılan enzimleri içermektedirler (Zoppas ve ark., 2013). Buna ek olarak fırıncılıkta ürünlerin kalitelerini arttırılmasında da selülazlar kullanılmaktadır (Bhat, 2000).

2.6.4. Tekstil endüstrisi

Selülazlar, tekstil endüstrisinde el işlenmesinde, tekstil ürünlerinin işlenmesinde, başarılı enzimlerdir (Karmakar ve ark.). Tekstil uygulamalarda kotların taşlanması için kullanılmaktadır. Kotların biyolojik işlenmesinde ponza taşlarından faydalanılmaktadır. Fakat ponza taşı işleme emek isteyen ve kullanılan donanımlara hasar veren bir uygulamadır. Selülazların β -1-4 bağlarının ayrıştırılmasında selülazların ponza taşının görev alması ile uygulamadaki verimliliği arttırmıştır (Schafer ve ark., 2007).

2.6.5. Yem endüstrisi

Yem endüstrisinde, besin değerini arttırmak için monogastrik ve ruminant yemlerin üretiminde kullanılmaktadır (Bhat, 2000; Kıran ve ark, 2006). Ayrıca pektinaz ve hemiselülaz enzimleri ile birlikte selülazların kullanımı yemin sindirilmesinde ve besin değerlerini arttırmak için kullanılmaktadır (Zoppas ve ark., 2013).

2.7. Selülaz Üretimini Etkileyen Faktörler

Selülaz, enziminin birçok yöntemle üretilebilir. Katı hal fermantasyon ve batık hal fermantasyon yöntemleri en bilindik yöntemlerdendir. Selülaz enzimini etkileyen faktörler mevcuttur.

Bunlar; karbon kaynağı, sıcaklık, azot kaynağı, substratın nem içeriği ve konsantrasyonu, inkübasyon süresi, pH gibi faktörlerdir. Selülaz enzimini etkileyen faktörler kullanılan mikroorganizmalar göre değişmektedir (Otajevwo, 2011).

2.7.1. İnkübasyon sıcaklığı

Sıcaklık, mikroorganizmanın gelişimini etkileyen önemli etkenlerdir. Sıcaklık artışı ile birlikte enzim aktivitesinin artışında değişim meydana gelmektedir yüksek sıcaklıklarda enzim inaktif olmaya başlamaktadır (Thomas ve Ambikapathy, 2011).

2.7.2. pH etkisi

Fungal selülazlar için pH aralığı mikroorganizmaya göre değişiklik göstermesine rağmen uygun aralığın 3-6 olduğu tespit edilmiştir (Padmavathi ve ark., 2012).

Bakteriyel izolatlarda üretilen selülazlarda en yüksek şeker verimi pH 6 olduğu ortamlarda elde edilmiştir. pH değerinin düşmesi ile şeker verimi de azalmış ve pH değerinin 3 olduğu şartlarda en düşük değer elde edilmiştir.

2.7.3. Substrat konsantrasyonu ve nem içeriği

Substrat çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yüksek substrat konsantrasyonları enzimin inhibe olmasına sebep olurken, düşük substrat konsantrasyonları ise verimi ve hidroliz sırasındaki reaksiyon hızını arttırmaktadır (Iqbal ve ark., 2009). Selülaz için kullanılacak olan substratların nem içeriğininin yüksek olması oksijeninin içeriye girmesini engeller ve böylelikle kontaminasyona sebep olabilmektedir. Nemin düşük olması ise substratların gelişim seviyesini, enzim aktivitesini azaltarak besin ulaşılabilirliğini düşürmektedir (Maurya ve ark., 2012).

2.7.4. Azot kaynağı

Enzim üretimi çeşitli organik ve inorganik azot kaynaklarının derişiminden etkilenmektedir. *Bacillus* türleri amonyum klorür (NH₄Cl) kullanımı optimum değerleri gösterirken başka türlerde optimum değeri potasyum nitrat (KNO₃) veya amonyum nitrat (NH₄NO₃) ile sağlanmaktadır (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010).

Birçok çalışmada amonyum sülfatın en uygun azot kaynağı olduğu tespit edilmiştir (Padmavathi ve ark., 2012).

2.7.5. Karbon kaynağı

Karbon kaynağı mikrobiyal fermantasyon ortamının temel bileşenlerindedir. Hücre içi gelişimi ve metabolik reaksiyonları etkilemektedir (Nagar ve ark., 2010). Selüloz üretiminde karboksimetil selüloz (CMC), laktoz, fruktoz, maltoz, galaktoz, nişasta, sükroz gibi farklı ticari karbon kaynakları kullanılmaktadır. Karbon kaynağı enzim üretimi için en önemli faktördür. Selüloz üretimi maya özütü, potasyum fosfat, glikoz, amonyum sülfat, pepton gibi zengin besi ortamı gerektirmektedir. Bu sebeple karbon kaynağı olarak lignoselülozik atıkların selülazın daha ekonomik olması için önemlidir (Rashid ve ark., 2009). Yapılan birçok çalışmada selüloz üretimi karbon kaynağı olarak lignoselülozik biyokütleler kullanılmıştır (Purwadaria ve ark., 2004; Jadhav ve ark., 2013).

2.8. Halofilik Mikroorganizmalar

Halofilik bakteriler toprakta, sulak bölgelerde, tatlı su ve deniz suyu sedimentlerinde bulunabilirler. Hücresel gelişim genellikle aşırı tuzlu ortamlarda inhibe olur ancak bu ortamların taksonomik olarak çeşitli bakteri gruplarını vardır. Halofiller, NaCl gereksinimlerine bağlı olarak, hafif, orta veya aşırı halofilik olarak sınıflandırılabilir. Halofilik mikroorganizmalar tuz seven olarak da adlandırılır. Halofilik mikroorganizmalar tuz gereksinimleri ve tuz toleranslarına göre farklılık göstermektedir. Larsen (1962), % 2 NaCl konsantrasyonunda gelişen bakterileri halofilik olmayan, % 2-5 NaCl konsantrasyonunda gelişenlere hafif halofilik, % 5-20 NaCl konsantrasyonunda gelişenleri orta halofilik ve % 20-30 NaCl konsantrasyonunda gelişenleri ise aşırı halofilik mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (Larsen, 1962). Tuz göllerinde ml başına 107-108 cfu halofilik bakteri içerebileceği bilinmektedir (Birbir ve Sesal, 2003). Bu bakterilerin çoğu ekstrem koşullar altında farklı fonksiyonlara adaptasyon geliştirmişlerdir.

Adaptasyonlar metabolik düzeyde son değişikliklere neden olan halofilik türlerin DNA'nın fiziksel özelliği ve protein stabilitesi ile ilgilidir (Roy ve ark., 2013). Halofilik bakteriler tuz gölleri, tuzlalar, tuzlu toprak gibi alanlarda bulunur.

Bununla ilgili çalışmalar *Halomonos anticariensis*, *Halomonas maura*, *Halomonas elongata*, *Halomonos halmophila*, *Halomonos salina* gibi bakterilerle bilim adamlarınca tespit edilmiştir (Aral ve ark., 1999; Peng ve ark., 2004).

2.9. Bacillus Cinsi

Bacillus, Bacillaceae familyasının bir üyesidir. Hücreler düz ya da düze yakın, çomak şekilli, birçok olumsuz çevre koşulları için dirençli, endospora sahip, gram pozitif, peritrik kamçılı, aerobik veya fakültatif anaerob bakteridir. Tek ya da gruplar halinde gelişebilen, çift veya zincir şeklindedirler (Zemek ve ark., 1981).

Bacillus'ların habitatu toprak olarak da bilinmesine rağmen doğada su, hava, yiyecek gibi birçok ortamda bulunabilirler. Bu bakteriler, toksin üretimi, antibiyotik, enzim üretimi gibi özellikleri ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle bakteriler arasında önemli mikroorganizmalardır (Ediz ve Beyatlı, 2005). Vejetatif hücre çapları 0.5x1.2 µm-2.5x10 µm çapları arasındadır. Genel olarak beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptirler fakat bazı türlerinde pembe, sarı, turuncu ve siyah renklerde kolonilerde rastlanır. *Bacillus*'ların psikrofilik, termofilik ve mezofilik türleri bulunur. Aşırı yüksek sıcaklıklar da bile canlı kalabilmekteyler. Çoğunlukla 35-37 °C'de ve pH 7.0 civarında ürerler. Karbon kaynağı olarak şeker, organik asit, nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi ürerler.

2.9.1. Bacillus cinsinin önemi

Bacillus'lar enzim, toksin ve antibiyotik üretimi, gibi metabolik özellikleri kolay üretilebilmeleri ve endüstriyel öneme sahip olmaları gibi özellikleri ile önemli mikroorganizmalardır. Buna ek olarak sporlanma yetenekleri ve metabolik faaliyetlerinin farklılığının, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağladığı da belirtilmektedir. Yapılan birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus*'lar, ürettikleri proteinler sebebiyle ticari öneme sahiptir (Kim ve ark, 2005; Annamalai ve ark, 2011b).

Bacillus'ların ürettiği endüstriyel enzimler olan selülozlar ve amilazlar deterjan endüstrisinde, nötral protezlar süt endüstrisinde, farklı amilaz ve pullulanazlar besin meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır. *Bacillus* cinslere ait yapılan farklı çalışmalar mevcuttur. Bunlardan bazıları şöyledir:

Zemek ve ark. (1981), *Bacillus* cinsindeki polisakkarit hidrolizleyen enzimler üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda 25 türün 118 suşundan polisakkarit hidroliz enzimleri üretmişlerdir.

Ito (1997), izole ettiği alkalifilik *Bacillus* KSM-635 suşundan saflaştırdığı alkalın selülozun deterjan endüstrisi için uygulanabilirliğini göstermiştir.

Rajoka ve Malik (1997), farklı selülozik substratlar içeren ortamlarda *Cellulomonas biazotea*'dan selüloz üretimini gerçekleştiren bir çalışma yayımlamışlardır. Maksimum β -glükozidaz üretimi karbon kaynağı olarak sellobiyoz ve kallar grass (*Diplachne fusca*) içeren ortamlarda gerçekleşmiştir.

Nikolov ve ark. (2000), glüköz üretimi için etkili bir metod olarak *Trichoderma reesei*'den elde edilen kompleks selülozlar ile atık selülozlardaki liflerin enzimatik hidrolizin geliştirmişlerdir.

Hoshino ve ark. (2006), *Bacillus* sp. KSM-635 suşundan alkalın selüloz enzimini izole edip, bunun deterjan alanında kullanılıp pamuklu giysilerden kirlerin uzaklaştırılması üzerine çalışmışlardır.

Zhang ve ark. (2004), amilaz ve selüloz üreticisi *Bacillus* sp. JCM 9141 ve *Bacillus* sp. JCM 9156 suşlarını aynı besiyerinde üreterek tatlı patateslerin sakkarifikasyonunda multi enzimlerin uygulanmasını araştırmışlardır.

Huang ve Monk (2004), izole ettikleri *Caldibacillus cellulovorans*'tan saflaştırdıkları termosatbil CMCaz'ın SDS-PAGE yöntemiyle moleküler ağırlığının 85,1 kDa olduğunu ve maksimum aktivitesini 80 °C'de, pH 6.5-7.0 arasında gösterdiğini, 70 °C'de 3 saat işlemden sonra % 83 aktivitesinin kaldığını bildirmişlerdir. Enzimin Zn^{2+} ve Hg^{2+} ile oldukça inhibe olduğunu da gözlemlemişlerdir.

Ugwuanyi ve ark. (2004), tarımsal artıkların termofilik aerobik parçalanması sürecinde amilaz ve selüloz enzim aktivitesi ve termofilik popülasyonun üremesi üzerine yaptıkları bir çalışmada 55 °C'de 24 saat ya da daha kısa sürede termofil popülasyonu en yüksek değere çıkarken, 96 saat sonunda popülasyonun çoğunluğunun spor oluşturmaya başladığını bildirmişlerdir.

Singh ve ark. (2004), *Bacillus shaericus*'den elde ettikleri termostabil alkalın karboksimetil selülaz enzimin SDS-PAGE analizlerinde tek bantlı ve moleküler ağırlığının 42 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Enzim 1mM Fe³⁺ ve Hg²⁺ ile inhibe olurken; Co²⁺, K⁺ ve Na⁺ ile aktive olmaktadır. En iyi aktivitesini 60 °C'te gösteren enzim için optimum pH'nın 8.0 olduğunu ve ince tabaka kromatografisi ile son ürün olarak CM glikoz, sellobiyoz ve sellodekstrin oluşturduğu saptanmıştır.

Sukumaran ve ark. (2005), mikrobiyal selülazların üretimi, uygulamaları ve karşılaşılan zorluklar üzerine çalışmışlardır.

Bischoff ve ark. (2006), *Bacillus licheniformis*'ten elde ettikleri endoglukanaz enziminin molekül ağırlığının 37 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Enzim optimum çalışma sıcaklığı 65 °C'de gösterirken, 1 saatlik inkübasyon işleminde 60°C'de daha stabil olduğunu ve % 90'dan fazla aktiviteye sahip olduğunu açıklamışlardır. Optimum çalışma pH'sı 6.0 olan enzim pH 10.0'da % 40 aktiviteye sahiptir.

Xia ve ark. (2008), spesifik olmayan selülazlar ile kitosanların hidrolizinde yaptıkları bir çalışma neredeyse tüm selülazların kitosanı kitin oligomerlerine parçaladığını bildirmişlerdir.

Jo ve ark. (2008), pirinç kabuğundan faydalanarak *Bacillus amyloliquefaciens*'ten karboksimetilselülaz (CMCaz) sentezini gerçekleştirmişlerdir. Kültürün CMCaz üretimi için optimum gelişme koşulu olarak 37 °C ve pH 6.8 olarak bulmuşlardır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu araştırmanın materyalini; Van Erciş karayolu üzerinde bulunan, bölgenin tuz ihtiyacını karşılayan Canik Tuzlası'ndan toplanan tuzlu su örnekleri oluşturdu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Canik Tuzlası'dan görüntü.

3.1.1. Halofilik bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması için kullanılan besiyerler ve ayraçlar

3.1.1.1. Halofilik besiyeri

Halofilik bakterilerin izolasyonu için halofilik besiyeri kullanıldı. Besiyeri içeriği, distile suda çözüldükten sonra otoklavlanarak 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi.

3.1.2. Kullanılan çözeltiler ve boyalar

3.1.2.1. Kristal viyole

Kristal viyole boyası, havanda dövülerek üzerine 10 ml % 96'lık fenol kristaline ve distile su eklendi. 24 saat bekletildikten sonra filtre kağıdından gram boyamada kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.2. Lügol çözeltisi

Katı besiyerlerindeki amilaz analizleri ve gram boyama testinde kullanıldı (Aygan, 2008).

3.1.2.3. Kongo kırmızısı

Katı besiyerinde selüloz aktivitesini belirlemek amacıyla kullanıldı (Das ve ark., 2010).

3.1.2.4. NaOH çözeltisi

Besiyerlerin pH değerlerini ayarlamak amacıyla kullanıldı (Aiba ve ark., 1987).

3.1.2.5. Safranin boyası

Safranin boyası etil alkol ve distile su ile iyice çözüldükten sonra gram boyama tekniğinde kullanıldı.

3.1.2.6. % 3'lük H₂O₂ çözeltisi

% 3'lük H₂O₂ çözeltisi katalaz testi aktivitesinde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.7. Sülfanilik asit çözeltisi

Sülfanilik asit çözeltisi nitrat indirgenmesi aktivitesinde kullanıldı (Çotuk ve Küçükler, 1992).

3.1.2.8. Alfa -naftol çözültisi

Alfa-naftol etanolde çözüldürülerek nitrat indirgenmesi testinde kullanıldı (Çotuk ve Küçüker, 1992).

3.1.2.9. Rhodamin B boyası

Rhodamin B, (% 0.001'lik) boyası lipaz testi yapımında kullanıldı (Çotuk ve Sungur, 2015).

3.1.2.10. Sülfirik asit

Enzim aktivitesinde, tayininde kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tuzlu su örneklerinin toplanması

Tuzlu su örnekleri, Canik Tuzlası'nda bulunan tuzlu su havuzlarından alındı. Örneklemelerde 1000 ml'lik steril polietilen şişeler kullanıldı.

3.2.2. Tuzlu su örneklerinden halofilik bakterilerin izolasyonu

Canik Tuzlası'nın, farklı alanlarından toplanan tuzlu su örnekleri seri seyreltme yöntemiyle mikroorganizma yoğunluğuna göre sıralandı. Daha sonra halofilik besiyerine ekim yapılarak 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ekim yapılan petri plakalarında gelişen bakteri kolonileri morfolojilerine dikkat edilerek seçildi (Sehgal ve Gibbons, 1960).

3.2.3. Halofilik bakterilerin saf kültürlerin elde edilmesi

Halofilik besiyerinde gelişen kültürden steril öze yardımıyla çizgi plak yöntemiyle ekim yapılarak üç farklı saf kültür elde edildi.

3.2.4. Selülaz enzimi üreten izolatların tespiti

Selülaz kullanımının belirlenmesi için bakteriyel izolatlar içerisinde % 1 oranında karboksimetil selülaz içeren halofilik besiyerine ekildi ve 35 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında selülaz aktivitesi gösteren koloniler üzerine % 1 Kongo Red dökülerek 15 dakika bekletildi. Daha sonra 1M NaCl yıkandı. İzolatın, oluşturduğu berrak bölge selülaz enziminin aktif olduğunu gösterdi. Selülaz aktivitesinde aktif olan koloni tekrardan halofilik besiyerine ekilerek 48 saat 35 °C'de inkübasyona tabi tutularak 4°C'de stok kültür olarak saklandı (Gohel ve ark.,2014).

3.3. Selülaz Enzim Aktivitesinin Tespiti

3.3.1. Selülaz enziminin spektrofotometrik ölçümü

Uygun şekilde seyreltilmiş glukoz şeker çözeltisi (1.0 ml), doğrudan bir test tüpünün dibine (1.5X15 cm) pipetlendi. Fenol reaktifi (1.0ml) aynı şekilde eklendi, ardından 5 ml konsantre H₂SO₄ eklendi ve doğrudan şeker çözeltisine hızlı akışlı bir pipet veya uygun bir dispanserden pipetlendi. Çözelti hemen karıştırıldı ve absorbans 490 nm'de okunmadan önce soğumaya bırakıldı. Absorbans değerleri (reaktif boşluklarının çıkarılmasından sonra) daha sonra, glukozun (5 150 µg) absorbansa karşı çizilmesiyle elde edilen standart bir grafik kullanılarak glikoz eşdeğerine çevrildi (Dubois ve ark., 1956).

3.3.2. Selülaz enziminin farklı sıcaklıklarda gösterdiği aktivitenin tespiti

Farklı sıcaklık değerlerinin, selülaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için 100 µl 24 saatlik selüloz-pozitif izolat kültürü ile aşılınmış steril M9 minimal tuz ortamına sahip 250 ml'lik erlenmeyer şişelerine selülaz-pozitif izolat aşılandı. Sıcaklık değerleri 25 °C, 30 °C 35 °C, 40 °C, 45 °C'ye ayarlanarak ekim yapıldı. 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrasında kültürler santrifüj edilerek üst fazı alındı. Daha sonra kültürler selülaz enzim solüsyonu ve substrat eklenerek 120 dakika 35 °C'de inkübasyonlu çalkalayıcıda bekletildi. Bu işlem bittikten sonra, tüpler buz içerisinde bekletilerek üzerlerine fenol çözeltisi ve sülfirik asit eklenildi. 490 nm'de, spektrofotometre cihazıyla en yüksek enzim aktivitesi belirlendi (Dubois ve ark., 1956).

3.3.3. Selülaz enziminin farklı zaman aralıklarında gösterdiği aktivitenin tespiti

Farklı zaman aralıklarının, selülaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için 100 µl 24 saatlik selülaz-pozitif izolat kültürü ile aşılannmış steril M9 minimal tuz ortamı ile 250 ml erlenmeyer şişelerine aşılandı. Erlenmeyer şişeleri 24 saat, 48 saat, 56 saat, 72 saat ve 96 saat boyunca 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, kültürler santrifüj edilerek üst fazı alındı ve üzerlerine selülaz enzim solüsyonu ve substrat eklenerek 120 dakika 35 °C inkübasyonlu çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra tüpler buz içerisine alınarak üzerlerine fenol çözeltisi ve sülfirik asit eklendi 490 nm'de, spektrofotometre cihazıyla en yüksek enzim aktivitesi belirlendi (Dubois ve ark., 1956).

3.3.4. Selülaz enziminin farklı karbon kaynaklarında gösterdiği aktivitenin tespiti

Karbon kaynaklarının, selülaz enzimi aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için karbon kaynaklarının son konsantrasyonları, 100 ml steril M9 minimal tuz ortamına 250 ml erlenmeyer şişelerine % 1 karbon kaynakları ilave edildi. Şişeler, 24 saatlik kültürün 100 µl'si eklenerek inoküle edildi. Karbon kaynağı olarak selüloz, ksiloz, maltoz, sellobiyoz, mannoz, arabinoz, glukoz, mannitol, fruktoz, laktoz, sükroz kullanıldı. Kültürler, 24 saat 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, kültürler santrifüj edilerek üst fazı alındı ve üzerlerine, selülaz enzim solüsyonu ve substrat eklenerek 120 dakika 35 °C inkübasyonlu çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra tüpler buz içerisine alınarak üzerlerine fenol çözeltisi ve sülfirik asit eklenir. 490 nm'de spektrofotometre cihazıyla en yüksek enzim aktivitesi belirlenir (Dubois ve ark., 1956).

3.3.5. Selülaz enziminin farklı azot kaynaklarda gösterdiği aktivitenin tespiti

Azot kaynaklarının, selülaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için azot kaynaklarını, % 1'lik nihai konsantrasyonlara, 100 ml steril M9 minimal tuz ortamına 250 ml'lik erlenmeyer şişelerine ilave edildi. Şişeler, 24 saatlik kültürün 100 µl'si eklenerek aşılandı. Azot kaynağı olarak malt ekstratı, yeast ekstratı, pepton, et ekstratı ve amonyum sülfat kullanıldı. Kültürler, 24saat 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kültürler santrifüj edilerek üst fazı alındı ve üzerlerine selülaz enzim solüsyonu ve substrat eklenerek 120 dakika 35 °C inkübasyonlu çalkalayıcıda bekletildi.

Daha sonra tüpler buz içerisinde alınarak üzerlerine fenol çözeltisi ve sülfirik asit eklenir. 490 nm'de spektrofotometre cihazıyla en yüksek enzim aktivitesi belirlenir (Dubois ve ark., 1956).

3.3.6. Selülaaz enziminin farklı amino asit kaynaklarda gösterdiği aktivitenin tespiti

Amino asit kaynaklarının, selülaaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlemek için, amino asit kaynaklarının son konsantrasyonları, 100 ml steril M9 minimal tuz ortamı içeren 250 ml erlenmeyer şişelerine % 1 oranında ilave edildi. Şişeler, 24 saatlik kültürün 100 µl'si eklenerek aşılandı. Amino asit kaynağı olarak triozin, lizin, glutamin, arginin, sistein, ornithin, glisin, amonyum sülfat kullanıldı. Kültürler, 24 saat 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, kültürler santrifüj edilerek üst fazı alındı ve üzerlerine selülaaz enzim solüsyonu ve substrat eklenerek 120 dakika 35 °C inkübasyonlu çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra tüpler buz içerisinde alınarak buz içerisinde alınarak üzerlerine fenol çözeltisi ve sülfirik asit eklenir 490 nm'de spektrofotometre cihazıyla en yüksek enzim aktivitesi belirlenir (Dubois ve ark., 1956).

3.3.7. Selülaaz enziminin farklı tuz konsantrasyonlarda gösterdiği aktivitenin tespiti

Farklı tuz konsantrasyonların, selülaaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için 100 ml steril M9 minimal tuz ortamına sahip 250 ml'lik erlenmeyer şişelere, 100 µl selülaaz-pozitif izolat ile aşılandı. Tuz konsantrasyonları % 5, % 10, % 15, % 20, % 25 olarak kullanıldı. Kültürler, 24 saat 30 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, kültürler santrifüj edilerek üst fazı alındı ve üzerlerine selülaaz enzim solüsyonu ve substrat eklenerek 120 dakika 35 °C inkübasyonlu çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra tüpler buz içerisinde alınarak üzerlerine fenol çözeltisi ve sülfirik asit eklenir 490 nm'de spektrofotometre cihazıyla en yüksek enzim aralığı belirlenir (Dubois ve ark., 1956).

3.3.8. Selülaaz enziminin farklı pH aralıklarında gösterdiği aktivitenin tespiti

pH'ın, selülaaz aktivitesi üzerindeki etkisinin belirlemek için 100 ml steril M9 minimal tuz ortamına sahip 250 ml'lik erlenmeyer şişeleri, 100 µl selülaaz-pozitif izolatı ile aşılandı. pH değerleri pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 pH 9 olarak kullanıldı.

Kültürler, 24 saat 30 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, kültürler santrifüj edilerek üst fazı alındı ve üzerlerine selülaz enzim solüsyonu ve substrat eklenerek 120 dakika 35 °C inkübasyonlu çalkalayıcıda bekletildi. Daha sonra tüpler buz içerisinde alınarak üzerlerine fenol çözeltilisi ve sülfirik asit eklenir 490 nm’de spektrofotometre cihazıyla en yüksek enzim aralığı belirlenir (Dubois ve ark., 1956).

3.4. Kültürün Koloni ve Hücre Morfolojisinin Belirlenmesi

İzole edilen suşların, koloni morfolojisi binoküler mikroskop kullanılarak belirlendi. Hücre morfolojisinin tespit edilmesi için gram boyama tekniğinden faydandı (Mac Faddin, 2000).

3.4.1. Bakteri Suşlarının Gram Boyama Yöntemi İle Boyanması

Gram boyama yapılacak olan bakteri suşunu, saf kültürden alınıp fizyolojik tuzlu su ile lam yüzeyine yayılarak preparat hazırlandı. Preparat havada kurutulurken alevde fikse edildi. Bu işlemden sonra preparat yüzeyine kristal viyole boyası damlatılarak 2 dakika beklendi. Fazla olan boya dökülerek lügol (Gram iyodür) damlatılarak 1 dakika beklendi. Preparat, % 96’lık etil alkol ile 6-10 saniye dekolorize edildi ardından saf su ile yıkandı. Son aşama olarak safranin boyası damlatılarak 30 saniye bekletilerek saf su ile yıkandı. Kurutma kağıdı üzerine alınarak preparatın kuruması beklenildi. Preparat, kurutulduktan sonra 1 damla imersiyon yağı damlatılarak 100’luk objektifte incelendi.

Mor-menekşe renginde görülen koloniler gram pozitif (+), kırmızı-pembe görülen koloniler ise gram (-) olarak değerlendirildi (Benson, 2002).

3.5. Biyokimyasal Testler

3.5.1 Sitrat testi

Test edilecek bakteri kolonisinden platin öze yardımıyla tüpteki Simon’s Sitrat Yatık Agar besiyeri yüzeyine ekim yapıldı. Ekim yapılan tüpler, 30 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, orijinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak % 0,2’lik Bromo Timol Mavisi kullanılan besiyerinde besiyeri renginin koyu mavi rengin meydana gelmesi reaksiyon sonucunun pozitif olarak değerlendirildi.

Besiyerinde, her hangi bir renk değişikliğin olmaması test sonucunun negatif olduğunu gösterir (Benson, 2002).

3.5.2. Metil red (MR) testi

İncelenecek bakteri kolonisinden öze yardımıyla alınarak tüpteki halofilik broth besiyere ekim yapıldı. Tüpler 30°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, tüplerin üzerine 0,5 ml metil kırmızısı ilave edilerek karıştırıldı. Kırmızı rengin oluşması testin pozitif olduğunu, renk değişimin olmaması testin negatif olduğunu gösterir (York ve ark., 2007).

3.5.3. İndol testi

Test edilecek bakteri kolonisi platin öze yardımıyla steril bir tüp içinde halofilik besiyerine ekim yapıldı. Tüpler etüvde, 30 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, ekim bölgesinde oluşan bulanıklık hareketliliğin göstergesidir. H₂S oluşumu ise üremenin olduğu bölgelerde siyahlaşma ile belirlenir. 0,5 ml Kovak’s Ayırıcı eklenerek çalkalandı. 1-2 dakika içerisinde besiyer üzerinde parlak kırmızı-pembe bir halka oluşması test sonucunun pozitif (indol formasyonunun) olduğunu, sarımsı bir renk oluşması test sonucunun negatif (indol oluşmadığını) gösterir (York ve ark., 2007).

3.5.4. Karbonhidrat oksidasyonu testleri

İzolatlar, içerisinde % 1 oranında test edilecek şeker ve fenol red broth tüplerine ekim yapıldı. Tüpler 30 °C’de 24-72 saat inkübasyona tabi tutuldu. Bakterinin şeker kullanıp kullanmadığı inkübasyon sonucunda besiyeri içerisinde bulunan indikatör boyanın kırmızı renginden sarı renge dönüşmesiyle sonuç pozitif olarak değerlendirilir (Benson, 2002).

3.5.5. Aminoasit dekarboksilasyon testi

İzolatlar, içerisinde % 1 oranında test edilecek aminoasit ve fenol red broth tüplerine ekim yapıldı. Tüpler 30 °C’de 24-72 saat inkübasyona bırakıldı.

Besiyerde glikoz fermantasyonu sonucu azot oluşması meydana gelir ve besiyeri içerisinde bulunan indikatör boyanın sarı renkten kırmızı renge dönüşmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

3.5.6. Nitrat indirgenmesi testi

İçerisinde % 1 oranında KNO_3 ve Durham tüpü bulunan halofilik broth tüplerine test edilecek kültürden ekim yapıldı. Tüpler, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 'de bir hafta boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüplere % 1'lik sülfanilik asit ve % 0.6'lık alfa-naftol ayraçlarından birer mililitre eklendi. Kalıcı kırmızı rengin oluşması, nitrat indirgenmesi pozitif olarak değerlendirildi (Çotuk ve Küçüker, 1992; MacFaddin, 2000).

3.5.7. Fenilalanin deaminaz testi

İçerisinde fenilalanin, bulunan besiyere izolatlar öze yardımıyla yoğun bir şekilde ekildi. Tüpler, $35\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, tüpler içerisine % 10 ferri klorür ($FeCl_3$) ayracından birkaç damla eklenerek tüpler hafifçe çalkalandı. Ayraç eklendikten sonra tüplerde yeşil rengin meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.5.8. Voges - Proskauer (VP) testi

İncelenecek bakteri kolonisinden öze ile alınarak tüpteki halofilik broth bulunan tüpe ekim yapıldı. Tüpler, etüvde $30\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 2-4 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üzerine 1 ml % 40'luk KOH, daha sonra 3 ml % 5'lik alfa naftol ilave edildi ve karıştırıldı. Besiyerinin hava ile temas etmesi için kuvvetli çalkalandıktan sonra 2-5 dakika içinde pembe-kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir (York ve ark., 2007).

3.5.9. Üreaz testi

İncelenecek bakteri kolonisinden öze yardımıyla alınarak tüpteki üreli broth besiyerine ekim yapıldı. Tüpler, etüvde $35\text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında, kültürlerde kırmızı rengin meydana gelmesi amonyak oluşumu nedeniyle pH değerini yükselttiği için renk değişime neden olur. Kırmızı rengin oluşumu pozitif sonuç olarak renk değişiminin olmaması ise negatif sonuç olarak değerlendirildi.

3.5.10. Katalaz testi

Kolonilerin üzerine 100 µl % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatıldı. Halofilik agar, üzerinde geliştirilen kolonilerden öze ile bir miktar alınarak lam üzerindeki hidrojen peroksit ile muamele edildi. Koloniler üzerinde köpük oluşması pozitif katalaz reaksiyonu, köpük gözlenmemesi ise negatif katalaz reaksiyonu olarak değerlendirildi (Çotuk ve Küçükler, 1992; MacFaddin, 2000) ,

3.5.11. Oksidaz testi

Sitokrom oksidaz testi, gram negatif aerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan önemli bir testtir. Bu amaçla Para-aminodimetilanilin monohidroklorid'in %1'lik eriyiği petri kabı içerisinde filtre kağıdına emdirildi. Bakterinin katı vasatta üretilen kültüründen platin öze ile bir miktar alınıp ayrıca emdirilmiş filtre kağıdı üzerine tatbik edildi. Akabinde 5-10 saniye içinde kırmızı-mor bir renk oluşması oksidaz pozitif olarak değerlendirildi (Çotuk ve Küçükler, 1992; MacFaddin, 2000).

3.5.12. Tween 80 hidroliz testi

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

3.5.13. Nişasta hidroliz testi

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

3.5.14. Kazein hidrolizi testi

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

3.5.15. Eskulin hidroliz testi

İçerisinde eskulin buyyon bulunan agar bulunan halofil agara, izolatlar öze ile yoğun bir şekilde ekildi. Petri kapları, 30 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üreyen koloni etrafında siyahlanma oluşumu eskulin hidroliz testinin pozitif olarak değerlendirildi. Negatif sonuçlarda herhangi bir değişiklik gözlemlenmez.

3.6. Moleküler Yöntemler

3.6.1. Genomik DNA izolasyonu

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

Metodun uygulanışı şekli aşağıdaki gibidir.

1. Steril, kapaklı ependorf tüpüne 800 µl TAE tamponu konularak içerisine 4-5 öze daha önceden halofilik agar besiyerinde geliştirilmiş bakteri bioması ilave edildi.

2. Tüp 2700 rpm'de vortekslenerek homojene edildi.
3. Vortekslenen tüp 10000 rpm'de 10 dk. santrifüjlendikten sonra üst faz mikropipetle alınarak ve pellet üzerine tekrar 800 µl TAE tamponu ilave edilerek 10 dk. 10000 rpm'de santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonrasında oluşan üst faz çıkartılıp pellet üzerine 400 µl TAE tampon eklenerek tamponun pelletle tamamen karışması sağlandı.
5. Tüp 75 °C'ye ayarlı su banyosunda 30 dk. inkübe edildi.
6. Su banyosundan çıkartılan tüpe 50 µl % 10'luk SDS ve 2 µl proteinaz K eklenerek 40 °C'ye ayarlı su banyosunda 1 saat bekletildi.
7. İnkübasyon sonrası tüpün ortamdaki tuz toleransının 0.75 - 0.8 olacak biçimde 5M NaCl ve 0.1 hacim % 10 CTAB / 0.7 M NaCl eklendi.
8. Tüp 65°C'olan su banyosunda 10 dk. inkübe edildi.
9. Eşit hacimde 24:1 kloroform: izoamilalkol eklenen tüp 10 dk. oda sıcaklığında hematoloji çalkalayıcısında karıştırıldı.
10. Tüp 16000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendikten sonrası üst faz steril ependorf tüpe aktarıldı. Her bir tüpe 0.1 hacim %10 CTAB / 0.7 M NaCl ilave edildi.
11. 65 °C olan su banyosunda tüp 10 dk. bekletildi.
12. Tüpe eşit hacimde 25: 24: 1 fenol: kloroform: izoamilalkol eklendi ve tüpler 10 – 20 dk. oda sıcaklığında, hematoloji çalkalayıcısında çalkalandı.
13. Tüp 16000 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Oluşan üst faz yeni steril bir ependorfa alındı ve üzerine eşit hacimde 24: 1 kloroform: izoamilalkol eklendi.
14. Hafif şekilde tüp 10 dk. karıştırıldı.
15. Üst faz tekrar yeni steril bir ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 0.8 hacim isopropanol (- 20 °C) ilave edilerek tüp - 20°C'de bir gece bekletildi.
16. Daha sonra tüp 16000 rpm de 15 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
17. Her bir suş için steril ependorf tüpüne %70'lik etil alkolden 100 µl konuldu. Pipetin yardımıyla DNA bu tüplerde yıkandı.
18. Tekrar 16000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
19. Kalan etil alkolün uçması ve DNA'nın kuruması için DNA'lar şeffaf bir görünüm alana kadar oda sıcaklığında bekletildi.

20. Elde edilen DNA miktarına göre steril ependorf tüpüne 30 -100 µl TE çözeltisi konuldu.
21. DNA çözüldükten sonra tüpe 2 µl RNAz ilave edildi.
22. 2-3sn. santrifüj edilen tüp 35 °C’de 30 dk. bekletildi.
23. Daha sonra tüp etiketlenerek +4 °C’de muhafaza edildi.

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

Elektroforez tablası düz bir zemine yerleştirildikten sonra jel solüsyonu hava kabarcığı oluşturulmadan döküldü. Taraklar dikkatli bir şekilde yerleştirildi.

Agarozun donmasından sonra tarak çıkarıldı (15-20 dk) ve içinde 1X TBE pH 8 tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tarağın oluşturduğu boşluklara her bir DNA numunesinden 10 µl ve 8 µl yükleme boyası (Brom Fenol Mavis) ile birlikte toplam 18 µl olarak yüklendi. Agaroz jel 100 voltta ortalama 20 dk elektroforez edildi ve UV transillüminatör’de gözlemlendi. Jel görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflandı.

3.6.2. 16S rRNA’nın PZR amplifikasyonu

16S rDNA’nın, polimeraz zincir reaksiyon işlemleri 0,2 ml’lik PZR tüplerinde Thermal Cycler (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea)’da yapıldı. Test organizmalarından saf olarak elde edilmiş DNA örneği 16S rRNA genini kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için evrensel iki primerler (27f: 5’-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3’ ve 1492R: 5’ TACGGYTACCTTGTTACGACTT) kullanıldı. PZR reaksiyonu için hazırlanan bütün stok solüsyonlar steril ddH₂O ile hazırlandı.

Stok solüsyonlar kontaminasyon riskine karşılık küçük miktarlarda (25-100 µl) steril ependorf tüplere bölündü kullanıma kadar -20 °C’de saklandı.

Hazırlık:

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

Çizelge 3.1. PZR amplifikasyonunda kullanılan miktarlar

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

Uygulama:

1. Reaksiyon karışımı, 1,5 ml'lik PZR tüplerinde her bir örnek için toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı ve daha sonra 0,2 ml'lik PZR tüplerine buz üzerinde 22 µl transfer edildi.
2. Reaksiyon karışımından ayrı olarak her bir örnek için DNA örnekleri 3µl olacak şekilde steril 0,2 ml'lik PZR tüplerinin içerisine transfer edildi. DNA örneklerinin eklenen miktarı toplam hacimi 25 µl yaptı.
3. Transfer işleminden hemen sonra PZR reaksiyonu (MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler, Korea) Çizelge 3.5'deki şartlarda başlatıldı.
4. 3 µl PZR ürünü, % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

Çizelge 3.2. 16S rRNA gen bölgesi PZR reaksiyon şartları

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

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

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

Dizileme Reaksiyonu

Örnek, ABI Prısm 310 Genetic Analyzer cihazı ile ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizileme işlemi BMLabosis firmasına hizmet alımı olarak yaptırılmıştır. Sekansları elde edilen gen bölgesinin analizi yapılmıştır.

3.6.3. Analiz edilen gen bölgesi

16S rRNA, bölgesi dizileme işleminden sonra Codon Code Aligner V.6.0.2 programı ile her suş için kromatogram görüntüsü tek tek incelendi.

Bazları temsil eden piklerin yeterince temiz olduğuna karar verildikten sonra forward ve reverse sekansları karşılaştırılarak konsensus dizi oluşturuldu. Zayıf nitelikli baz dizilerinin çoğunlukla sekans başları ve sonlarındaki bölgelerinden kesilerek uzaklaştırıldı. İzolatın 16S rRNA nükleotid baz dizileri filogenetik dendogramların oluşturulması için kullanıldı. NCBI veri tabanında BLAST algoritması kullanılarak taranmıştır.

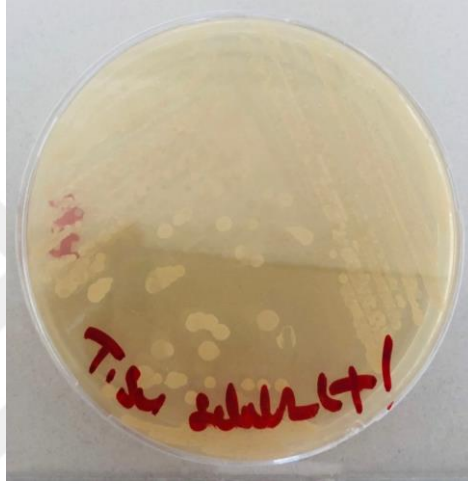
Çalışmada, kullanılan diziler ile NCBI veri tabanından alınan diziler çoklu dizi hizalama metodu ile bir araya getirilip hizalanmıştır. Mega 7 programı ile bu dizilemesi yapılan suş NCBI'daki suşların fasta formatları programa çağrıldı. Daha sonra Clustal W, yapılarak korunmuş bölgeler karşılaştırıldı. Bu işlemin sonrasında Mega 7 programındaki dosya fasta formatında kaydedildi. Bu işlemten sonra Mega 7.0.18 paket programı ile Maksimum Algoritması seçilerek Kimura 2 parameter metodu ile filogenik ağaçlar çizildi (Tamura ve ark., 2013).



4. BULGULAR

4.1. Halofilik Bakterlerin Saf Kùltürlerinin Elde Edilmesi

İzolasyon işleminden sonra saf kùltür elde edilinceye kadar saflaştırma işlemi devam ettirildi. Elde edilen saf kùltür, 4 °C’de stoklandı. Şekil 4.1’de bakteri kolonileri halofilik ortamdaki saf kùltürü gösterilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. İzolatın halofilik besiyerindeki görüntüsü.

4.2. Halofilik Bakterilerin Selülaç Aktivitesi

Selülaç kullanımının belirlenmesinde halofilik besiyeri içerisine % 1 oranında karboksimetil selülaç eklendi ve saf kùltürden ekim yapıldı. İnkübasyon sonrasında, oluşan zon test sonucunun pozitif olduğunu gösterdi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Selülaç enzimi üreten T1 izolatu.

4.3. Farklı Ortam Bileşenlerinin Selülaz Enzimi Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı karbon kaynakları, azot kaynakları, amino asit kaynakları, farklı pH aralıkları, farklı zaman periyotları, farklı tuz konsantrasyonlarının selülaz aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı parametrelerin selülaz enzimi aktivitesi üzerine etkisi.

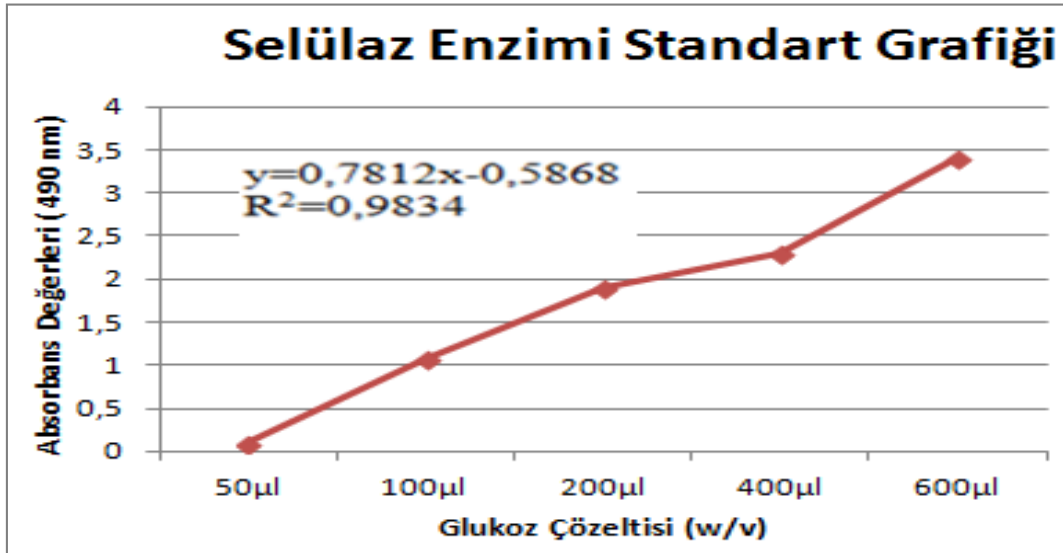
Karbon Kaynakları	Enzim Aktivitesi(IU/ml)
Selüloz	3,696
Ksiloz	3,703
Maltoz	3,699
Sellobiyoz	3,695
Mannoz	3,699
Arabinoz	3,701
Glukoz	3,703
Mannitol	1,500
Fruktoz	3,704
Laktoz	3,699
Sükroz	1,492
Aminoasit Kaynakları	Enzim Aktivitesi(IU/ml)
Triozin	3,697
Lisin	3,685
Glutamin	3,685
Arginin	3,683
Sistein	3,696
Ornithin	3,698
Glisin	3,697
İnorganik ve Organik Azot Kaynakları	Enzim Aktivitesi(IU/ml)
Amonyum Sülfat	3,698
Malt Ekstratı	3,697
Yeast Ekstratı	3,701
Pepton	3,704
Et Ekstratı	3,703
Farklı pH Aralıkları	Enzim Aktivitesi(IU/ml)
pH 5	3,973
pH 6	3,975
pH 7	3,976
pH 8	3,978
pH 9	3,977

Farklı parametrelerde selüloz aktivitesi üzerine etkilerini incelenmiştir (Devamı) (Çizelge 4.1).

Farklı Tuz Konsantrasyonları	Enzim Aktivitesi(IU/ml)
% 5	3,607
% 10	3,601
% 15	3,501
% 20	3,604
% 25	3,605
Farklı Sıcaklık Aralıkları	
25 °C	4,879
30 °C	4,851
35 °C	4,850
40 °C	4,701
45 °C	4,700
Farklı Zaman Aralıkları	
24 saat	5,714
48 saat	5,714
56 saat	5,714
72 saat	5,714
96 saat	5,714

4.4. Selüloz Enzimi Standart Grafiği

Selüloz enzimi için elde edilen standart grafiği R^2 değeri, 0,9834 olduğu için grafiğin kullanılmasına kanaat getirildi.



Şekil 4.3. Standart eğri grafiği.

4.4.1. Selüloz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı karbon kaynaklarının belirlenmesi

Selüloz, ksiloz, maltoz, sellobiyoz, mannoz, arabinoz, glukoz, mannitol, fruktoz, laktoz, süktroz şekerlerinden yapılan optimizasyon sonucuna göre fruktozun selüloz aktivitesi en yüksek iken süktroz şekeri ise düşük aktivite gösterdi.



Şekil 4.4. Farklı karbon kaynaklarının selüloz aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.2. Selüloz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı azot kaynaklarının belirlenmesi

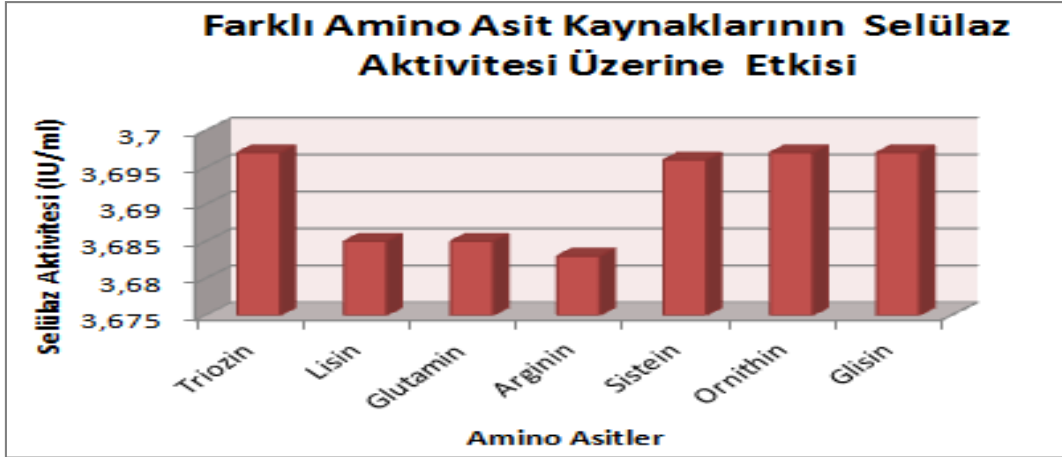
Malt ekstratı, yeast ekstratı, pepton, meat yeast, amonyum sülfat gibi azot kaynaklarından selüloz aktivitesi üzerinde pozitif sonuç gösteren en yüksek etkiye sahip olan azot kaynağı pepton iken en düşük etkiye sahip olan malt ekstratıdır.



Şekil 4.5. Farklı azot kaynaklarının selüloz aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.3. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı amino asit kaynaklarının belirlenmesi

Triozin, lizin, glutamin, arginin, sistein, ornithin, amonyum sülfat amino asitlerinden selülaz aktivitesi üzerinde en yüksek aktiviteyi ornithin gösterirken, en düşük aktiviye arginin gösterdi.



Şekil 4.6. Farklı amino asit kaynaklarının selülaz aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.4. Selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı tuz konsantrasyonlarında belirlenmesi

% 5, % 10, % 15, % 20, % 25 olan farklı miktarlarda NaCl oranlarında selülaz aktivitesi üzerinde pozitif yönde en yüksek aktiviteyi % 5 NaCl gösterirken en düşük aktiviteyi % 15 NaCl gösterdi.



Şekil 4.7. Farklı tuz konsantrasyonunda selülaz aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.5. Selülaaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı sıcaklık belirlenmesi

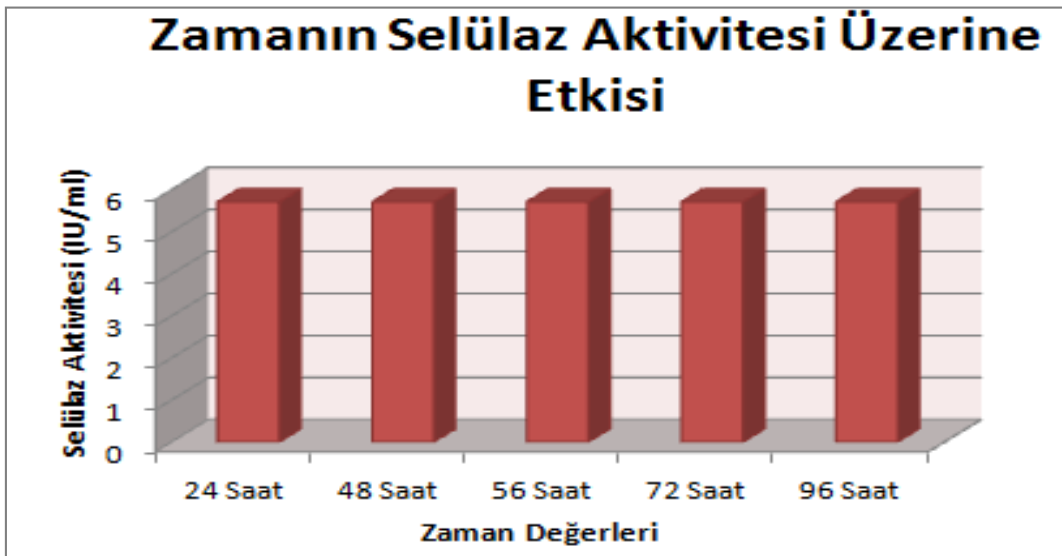
Beş farklı sıcaklık değerlerinde selülaaz aktivitesi üzerinde pozitif ve en yüksek etkiyi 25 °C gösterirken, en düşük etkiyi 45 °C gösterdi.



Şekil 4.8.Farklı sıcaklık aralıklarının selülaaz aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.6. Selülaaz enziminin optimum aktivite gösterdiği farklı zaman aralıklarının belirlenmesi

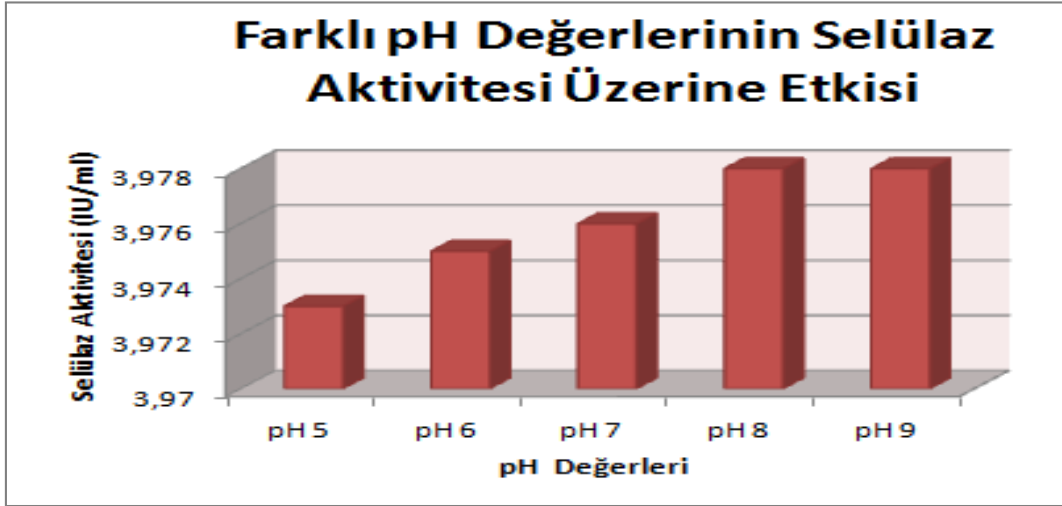
Dört farklı zaman aralığında selülaaz aktivitesi üzerine tüm zaman aralıkları pozitif etki gösterdi.



Şekil 4.9. Farklı zaman periyotlarının selülaaz aktivitesi üzerine etkisi.

4.4.7. Selüloz enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi

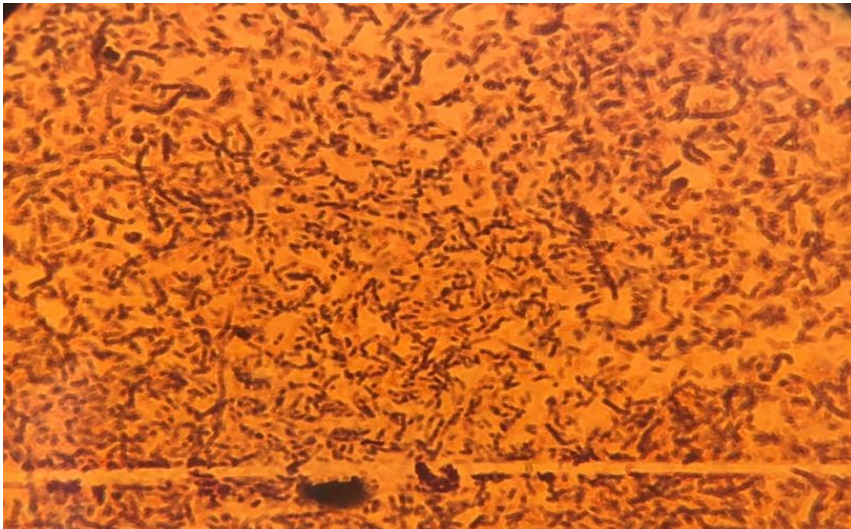
Beş farklı pH aralığının selüloz aktivitesi üzerine pozitif yönde en yüksek etkiyi pH 8 iken, en düşük pH 5 olarak belirlendi.



Şekil 4.10. Farklı pH değerlerin selüloz aktivitesi üzerine etkisi.

4.5. İzolatın Gram Boyama Özellikleri

İzolatın, hücre morfolojisini belirlemek için gram boyama yöntemi uygulandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. İzolatın gram boyama görüntüsü.

4.6. Halofilik İzolatın Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

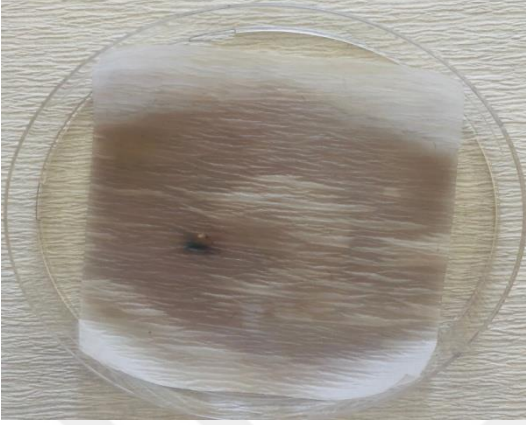
Canik Tuzlası'ndan toplanan su örneklerinden, yapılan izolasyon çalışmalarında elde edilen selüloz üretebilme kabiliyetine göre seçilen koloni gram pozitif olarak değerlendirildi. İzole edilen izolatlar T1 olarak isimlendirildi. İzolatın morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal ve moleküler özellikleri belirlendi.

Karbonhidrat oksidasyon testinde, teste tabi tutulan glukoz, mannoz, ksiloz, laktoz, maltoz, sükroz, sellobiyoz, selüloz, mannitol, nişasta şekerleri pozitif sonuç gösterirken galaktoz, arabinoz, fruktoz traheloz negatif sonuç gösterdi. Amino asit dekarboksilasyon testinde fenilalanin, glisin, asparajin, lizin, glutamin, triozin, metiyonin, ornithin pozitif sonuç gösterirken sistein, arjinin negatif sonuç gösterdi. Azot kaynaklarından et ekstratı, pepton, yeast ekstratı, malt ekstratı pozitif sonuç gösterdi. Katalaz, oksidaz, nitrat, sitrat, üreaz testleri pozitif sonuç gösterirken Metil red, proskouer, indol ve fenilalanin deamilaz testleri negatif sonuç gösterdi. Hidroliz testlerinde kazein hidroliz testi ve nişasta hidroliz testi pozitif sonuç verirken tween 80 hidroliz testi ve eskulin hidroliz testleri sonucu negatif olarak değerlendirildi. NaCl % 2,5-10, NH₄SO₄ ve pH 5, 6, 7, 8, 9, aralıklarında pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Çizelge 4.2).

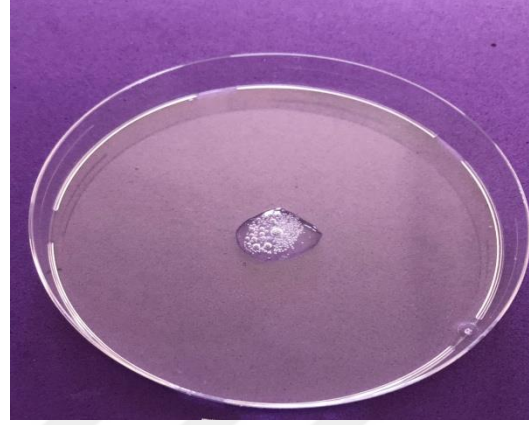
Çizelge 4.2. T1 İzolatının morfolojik, fizyolojik ve bazı biyokimyasal özellikleri

No	Testler	T1
1	Koloni Çapı	2mm
2	Pigmentasyon	Krem
3	Hücre Şekli	Basil
4	Gram Reaksiyonu	+
5	D-Glukoz	+
6	D-Galaktoz	-
7	D-Mannoz	+
8	D-Ksiloz	+
9	Laktöz	+
10	L-Arabinöz	-
11	L-Fruktoz	-
12	Maltoz	+
13	Sükroz	+
14	Trahelez	-
15	Selüloz	+
16	Sellobiyoz	+
17	Mannitol	+
18	Niştasta	+
19	L-Fenilamin	+
20	Glisin	+
21	L-Asparajin	+
22	L-Lisin	+
23	NH ₄ SO ₄	+
24	Glutamin	+
25	Meat Yeast	+
26	Pepton	+
27	Yeast Ekstratı	+
28	Triozin	+
29	Malt Ekstratı	+
30	L-Sistein	-
31	L-Metiyonin	+
32	Ornithin	+
33	L-Arginin	-
34	NaCl % 2,5-10	+
35	pH 5-9	+
36	Sıcaklık 25°C-45°C	+
37	Katalaz Testi	+
38	Oksidaz Testi	+
39	Eskulin Hidroliz Testi	-
40	Niştasta Hidroliz Testi	+
41	Kazein Hidroliz Testi	+
42	Tween 80 Hidroliz Testi	-
43	Metil Red	-
44	Voges Proskouer	-
45	İndol Testi	-
46	Nitrat İndirgenmesi	+
47	Sitrat Testi	+
48	Ürea Testi	+
49	Fenilalanin Deamilaz Testi	-

T1 izolatın, katalaz ve oksidaz testleri sonucunun pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.12; Şekil 4.13).

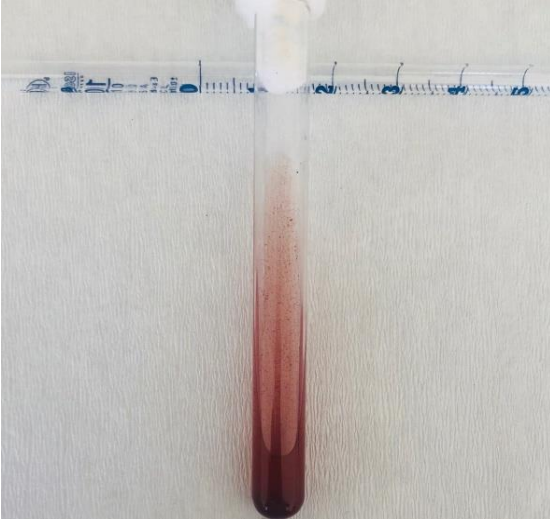


Şekil 4.12. T1 Oksidaz testi.

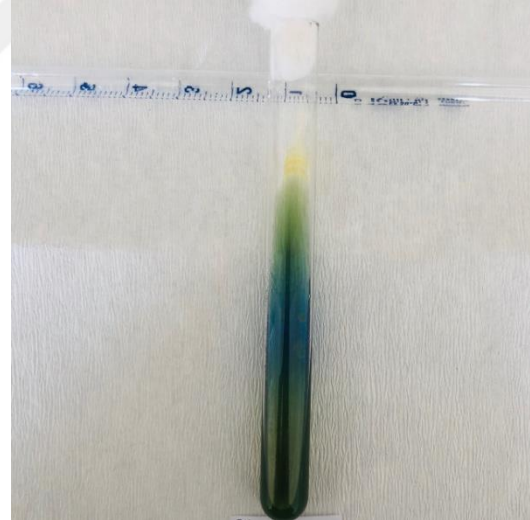


Şekil 4.13. T1 Katalaz testi.

T1 izolatının, nitrat testi ve sitrat testi sonuçları pozitif olduğu belirlendi (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Nitrat testi.

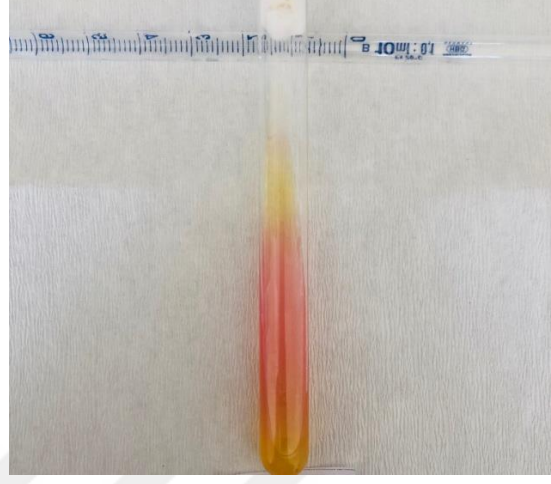


Şekil 4.15. Sitrat testi.

T1 izolatının üreaz testi sonucu pozitif, fenilalanin testi sonucu negatif olduğu belirlendi (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

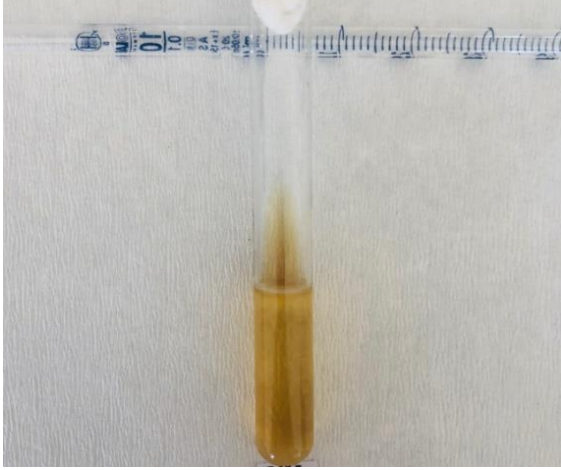


Şekil 4.16. Fenilalanin testi.

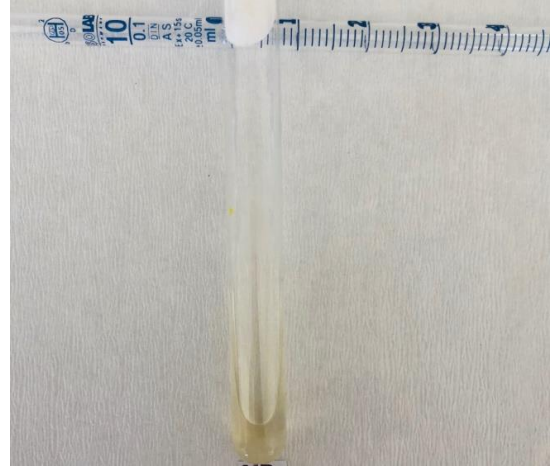


Şekil 4.17. Üreaz testi.

T1 izolatının indol testi, metil red (MR), voges proskouer (VP) testleri sonucunun negatif olduğu belirlendi (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).



Şekil 4.18. İndol testi.



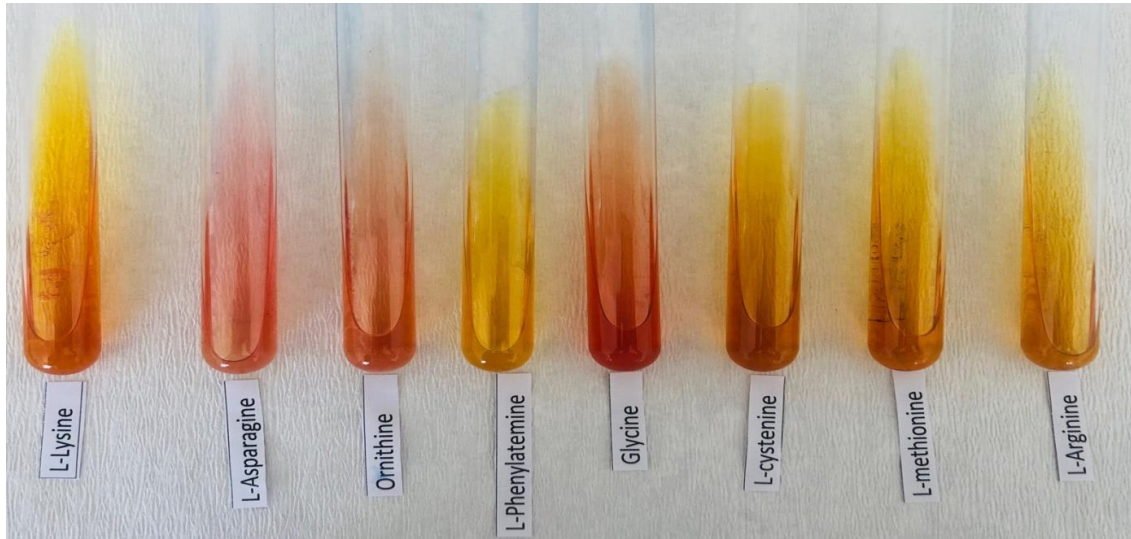
Şekil 4.19. Metil red (MR) testi.

T1 izolatın mannitol, maltoz, laktoz, mannoz, glukoz, sü krozu karbon kaynağı olarak kullandığı belirlendi. İzolatın arabinoz, galaktoz, fruktoz, ksiloz, trahelozu ise karbon kaynağı olarak kullanmadığı belirlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Karbonhidrat oksidasyon testi sonuçları.

T1 izolatın azot kaynağı kullanımını bakımından lizin, asparajin, ornithin, fenilalanin, glisin, metiyonin testlerinde pozitif sonuç olarak belirlendi ancak arginin kullanmadığı gözlemlendi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Aminoasit dekarboksilasyon testi sonuçları.

İzolatin, nişasta hidroliz testi ve kazein hidroliz testinin pozitif sonuç verdiği gözlemlendi (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23).

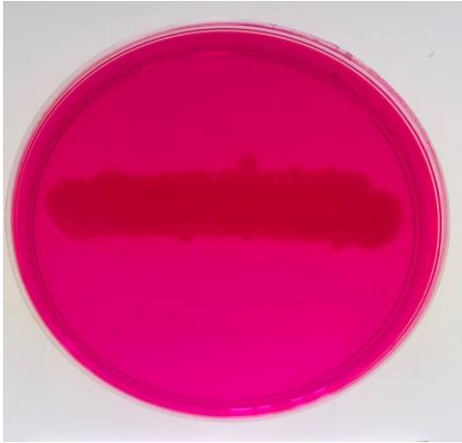


Şekil 4.22. Nişasta hidroliz testi.



Şekil 4.23. Kazein hidroliz testi

İzolatin, tween 80 hidroliz testi ve eskulin hidroliz testleri sonucu negatif sonuç olarak gözlemlendi (Şekil 4.24 ve Şekil 4.25).

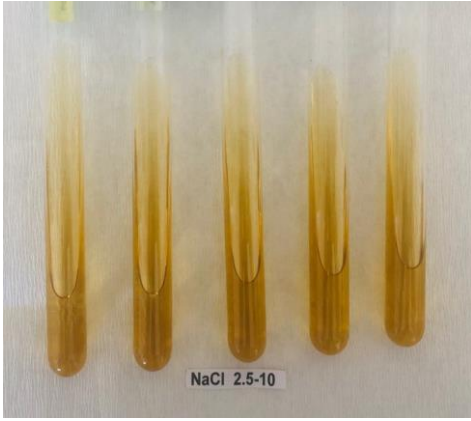


Şekil 4.24. Tween 80 hidroliz testi.



Şekil 4.25. Eskulin hidroliz testi.

T1 izolatu, farklı yüzdelerde tuz konsantrasyonu içeren besiyerlerinde % 5-20 aralığında üremenin pozitif sonuç verdiği gözlemlendi. Farklı pH aralıklarında (5.0-9.0) pozitif sonuç gözlemlendi (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).



Şekil 4.26. İzolatın gelişebildiği tuz aralığı

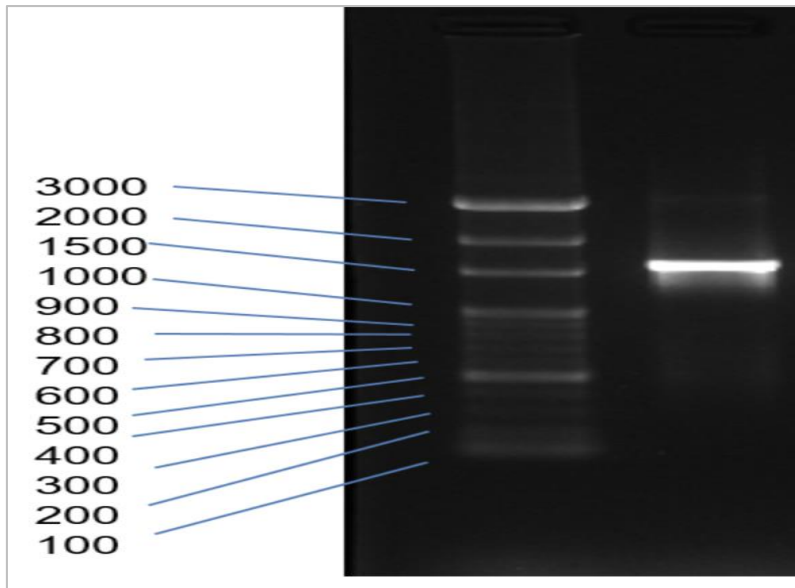


Şekil 4.27. İzolatın gelişebildiği pH aralığı

4.7. Moleküler Değerlendirme

4.7.1. Gen bölgelerinin çoğaltılması

PZR şartlarında hedeflenen bölge çoğaltılarak elde edilen ürün agaroz jel elektroforezi kullanılarak moleküler büyüklükleri baz alınarak yürütülmüştür. PZR işlemi, Bio Rad T100 Thermal Cycler cihazında yapılmıştır. Oluşan bant profillerinin büyüklüğünü belirleyebilmek için (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp) marker kullanılmıştır. Elde edilen bant profili Şekil 4.28'te gösterilmiştir.

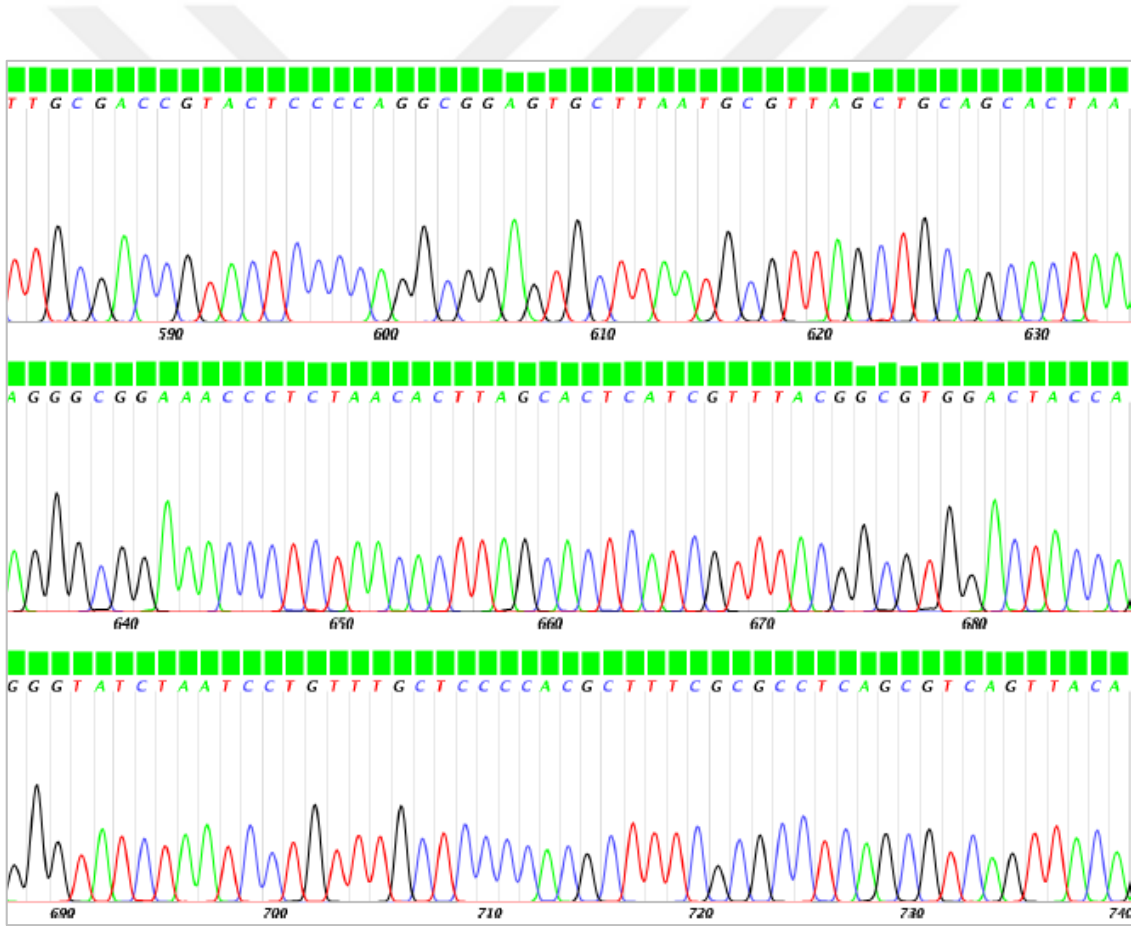


Şekil 4.28. Agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Bantın büyüklüğü belirlenerek ve bazı bölgeler amplifiye edildikten sonra DNA dizi verileri oluşturulmuştur.

4.7.2. Dizi verilerinin tanımlanması

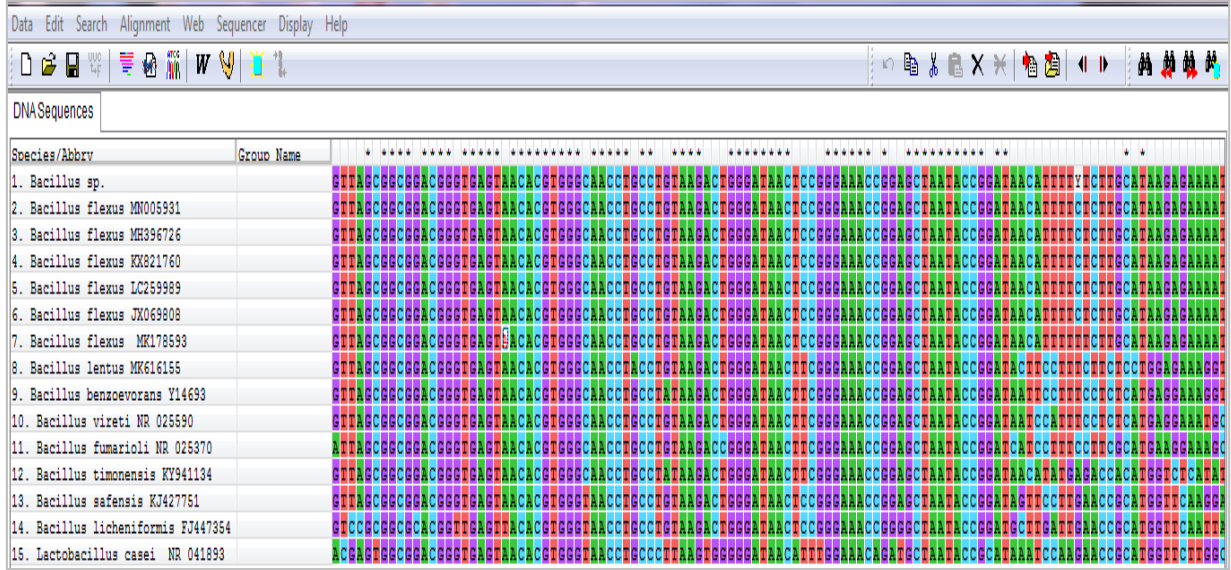
Örneğe ait 16S rRNA gölgesi, sekansı kromatogram görüntüleri Mega7 programı kullanılarak elde edilmiştir. Bazları simgeleyen piklerin yeteri kadar temiz olduğu tespit edildikten sonra örneğin forward ve reverse sekansları birleştirilerek konsensuz dizi oluşturulmuştur. Oluşturulan dizi benzerlikleri ve eşleştiği bireyleri tespit edilmek için NCBI veri tabanı üzerinden BLAST algoritması kullanılarak taranmıştır (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. 16S rRNA gen bölgesine ait kromatogram görüntüsü.

4.7.3. Çoklu dizi analizi

Bu çalışma sonucunda, elde edilen diziyeye veri tabanından alınan diziler eklenerek ve çoklu dizi hizalama metodu ile tüm diziler bir araya getirilip hizalanmıştır (Şekil 4.30). Çoklu dizi hizalamanın amacı bireylerin dizileri arasındaki homolojiyi ve farklılıkları belirtmektir.



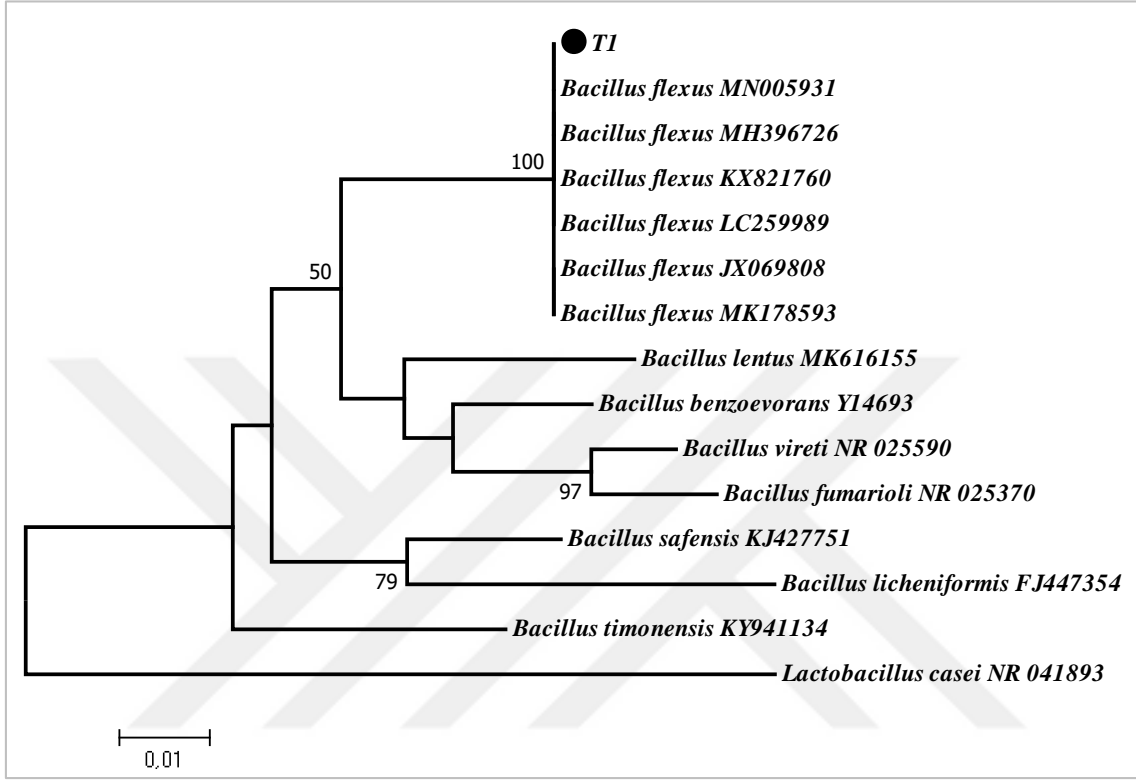
Şekil 4.30. 16S rRNA gen bölgesine ait hizalanmış sekansların görüntüsü.

4.7.4. 16S rRNA gen bölgesinin analizi

İzolatanın 16S rRNA gen sekansı taksonomik hiyerarşiye girebilmek için Kimura-2 parametre model 1 olarak bilinen Maximum Likelihood metodu kullanılarak yapıldı. İlk dendrogram oluşumu Maximum Composite Likelihood (MCL) yaklaşımı ve üstünel logaritmik benzerlik değeri ile topoloji kullanılarak düşünülen iki taraflı mesafeler matrisine Neighbor-Join and BioNJ algoritmadan kullanılarak otomatik bir şekilde elde edildi. Evrimsel olarak korunmuş nükleotid baz dizilerinde polimorfizim oranları yardımıyla türler arasındaki mesafeler bootstrap değeri hesaplanmıştır.

T1 izolatu filogenetik dendrogramında *Bacillus* türünün üyesi olan *Lactobacillus casei* NR041893 dış grup olarak kullanıldı. *Bacillus* grubunu temsil eden çalışma ve türlerin 16S rRNA nükleotid dizileme analizi Maximum Likelihood matriksiyle yapılan filogenetik ağaç Şekil 4.31.'de verilmiştir.

Oluşturulan filogenetik ağaç *Bacillus* cinsi üyeleri kendi aralarında güçlü bir homoloji ile kümelenmiştir. T1 izolatu Gen Bankası verilerinde kayıtlı *Bacillus flexus* türleri ile sıkı bir biçimde kümelenme göstermiştir.



Şekil 4.31. 16S rRNA bölgesine ait Maksimum Likelihood algoritması ile oluşturulan filogenetik ağaç göre (*Lactobacillus casei* dış grup).



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde doğal tuzlu habitatlardan biri olan Canik Tuzlası, Van-Erciş karayolu üzerinde bulunan Gedikbulak Köyü sınırlarında olup Van iline 43 km uzaklığında yer almaktadır. Bölgenin tuz ihtiyacının büyük bir kısmı bu tuzladan karşılanmaktadır.

Halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar, doğal ve yapay tuzlu ortamlarda bulunmaktadır. Tuz gölleri, tuz mağaraları, tuzlalar, tuzlu topraklar, tuzlanmış deriler, tuzlanmış gıdalar halofilik mikroorganizmalar için habitatlardır. Halofilik mikroorganizmalar bakteriler ve arkebakteriler grubunda yer almaktadırlar. Fakat arkebakteriler yüksek halofilik grubu oluşturarak Halobacteriaceae familyasında yer alırlar. Az derecede halofil olanlar ya da ılımlı halofil olanlar bakterilerin farklı gruplarında yer alırlar.

Mikrobiyal enzimler, aşırı sıcaklık yüksek pH'da güçlü derecede aktivite gösterirler. Endüstriyel alanda genellikle kullanılan enzimler içinde *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürler tarafından sentezlenen enzimler vardır. Dünya çapında endüstride kullanılan enzimlerin ortalama % 60'ı Avrupa'da, % 40'ı ABD ve Japonya'da üretilmiştir (Bhat, 2000). Tarihsel olarak enzimler çeşitli kaynaklardan elde edilmiştir.

Günümüze kadar ortalama 2000 farklı enzim tanımlanmış olup % 10'luk kısmı ticari kullanıma uygun olarak kullanılmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlerin endüstriyel alandaki gereksinimi karşılayamaması, mikrobiyal enzimlere yönelik ilginin artışı oluşturmuştur. Mikroorganizmalar, biyokimyasal farklılıkları ve genetik manipülasyonlara adaptasyonları gibi nedenlerden ötürü ideal enzim kaynakları olarak kullanılmaktadır (Rao ve ark., 1998). Mikrobiyal enzimler aşırı sıcaklık ve yüksek pH'da aktivite gösterirler. Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin % 90'ı mikroorganizmaların fermantasyonu sonucu ile üretilmektedir.

Endüstride çalışılan enzimlerin, ürün üretebilmesi için birtakım üstün özelliklere sahip olması lazımdır. Bu doğrultuda, endüstride kullanılacak enzimin ekonomik, çeşitli alanlarda kullanılabilme ve alerjik veya toksik aktivite göstermemesine bağlıdır (Wiseman, 1987). Ekstremofilik organizmalar yüksek pH, aşırı sıcaklık ve tuz konsantrasyonu ve aşırı basınç gibi şartlara adapte olmuş organizmalardır.

Sentezledikleri glikoizomerazlar, amilaz, ksilenaz, proteazlar, selülaç, pullulanaz, alkoldehidrojenazlar ve DNA modifiye eden enzimler önceliktedir. Bu enzimler deterjan, gıda, yenilenebilir enerji kaynaklarında, alkol üretiminde, tekstil, içecek üretimi, kimya endüstrisinde farmasötik gibi alanlarda kullanılmaktadır (Niehgus ve ark., 1999).

Halofilik organizmalar, ekstrem halofil, halofil ve ılımlı halofil olarak üç grupta incelenir. Orta seviyede halofil organizmaları optimum düzeyde üreyebildikleri tuz konsantrasyonu % 3-15 arasındadır (Ventosa ve ark., 1998). Halofil organizmalar genellikle tuz içeren çeşitli habitatlarda, soda gölleri ve çöllerde bulunmaktadır. Halofil organizmalar olarak en çok bilinenler *Bacillus halophilus*, *Halobacillus halophilus* ve *Marinococcus halophilus* türleridir. Halotolerantlar, tuz içeren çevresel ortamlarda ürediklerinde dolayı biyoteknolojinin çeşitli alanlarında ve güncel uygulamalar için potansiyel oluşturabilmeye sahiptir. Halofilik mikroorganizmalar, fermente gıda ve gıda katkı maddeleri üretiminde kullanılmaktadır.

Endüstriyel önemini ve kullanımı açısından uygun olması sebebiyle çalışmamızda Canik Tuzlası'ndan izole ve karakterize edilen halofilik bakteriler tarafından üretilen selülaç enziminin optimizasyonunu gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda Canik Tuzlası'dan izole edilen T1 izolatının selülaç aktivitesine bakılmıştır. İzolat T1 olarak isimlendirilmiştir. T1 izolatı, farklı karbon kaynaklarının selülaç aktivitesi üzerinde etkileri incelendiğinde selüloz, ksiloz, maltoz, sellobiyoz, mannoz, arabinoz, glukoz, fruktoz ve laktöz kaynakları optimum selülaç aktivitesi göstermiştir. T1 izolatı, farklı azot kaynaklarının selülaç aktivitesi üzerinde etkileri incelendiğine pepton optimum selülaç aktivitesi göstermiştir. T1 izolatı, farklı amino asit kaynaklarının selülaç aktivitesi üzerinde etkileri incelendiğinde trioçin, ornithin, glisin, amonyum sülfat optimum selülaç aktivitesi göstermiştir T1 izolatı, pH 8 ve 9'da optimum selülaç enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. T1 izolatı, 25 °C'de optimum selülaç enzim aktivitesi olumlu yönde olduğu belirlenmiştir. T1 izolatı, % 5-25 aralığındaki tuz konsantrasyonlarında % 5 'lik konsantrasyonda optimum selülaç aktivitesi göstermiştir. Analize göre bu aralıklarda enzim sentezi gerçekleştiği tespit edilmiştir.

T1 izolatu, 24-72 farklı beş zaman aralığında optimum selüloz enzim etkisi pozitif yönde olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştıracak olursak:

Mawadza ve ark. (2000) çalışmalarında iki *Bacillus* suşundan sentezledikleri selüloz enziminin karakterizasyonun çalışmışlardır. Her iki enzimin optimum pH aralıkları 5-6.5 ve optimum sıcaklık aralıkların ise 70 °C olarak belirlemiştir. Çalışmamızda selüloz aktivitesinin optimum ürediği pH ve sıcak değerlerin farklılık gözlemlenmiştir.

Singh ve ark.(2001), yaptığı çalışmada *Bacillus* sp.VG1'den izole ettikleri CMCaz enziminin optimal seviye gösterdiği pH aralığı 9-10 iken optimum aktivite gösterdiği sıcaklık aralığı 65 °C olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmanın optimum aktivite gösterdiği pH 9 olması benzerlik göstermiş.

Kim ve ark. (2005), izole ettikleri *Bacillus* sp. HSH-810 suşundan oluşturdukları alkalın selüloz enziminin optimum etkiyi pH 10'da gösterirken optimum sıcaklığı ise 50 C'de göstermiştir. Buna ek olarak enzimin pH 6-10 aralığında stabil olduğunu ve 1 saat 60 °C muamale edilmediğinde enzim aktivitesini % 60 oranında arttığını bildirmişlerdir. Enzimin moleküler ağırlığı ise 80 kDA olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda selüloz aktivitesinin etkin olduğu pH ve sıcaklık değerleri farklılık göstermektedir.

Topuz ve ark. (2007), izole ettikleri 42 *Bacillus* suşu arasında en yüksek selüloz üretme kabiliyetinin 42 °C ve pH 8.5'da olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamız selüloz enziminin yüksek aktivite gösterdiği pH parametresi benzerlik göstermiştir.

Aygan ve Arıkan (2008), Van gölü çevresinden aldıkları toprak örneklerinden izole ettikleri ılımlı halofilik *Bacillus*'ların ksilanaz, amilaz ve selüloz gibi enzimlerin optimum pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarını çalışmışlardır. Selüloz enziminin optimum sıcaklığı 35 °C, optimum pH aralığının 7.5-9.5, optimum NaCl konsantrasyonunun ise % 5-7 olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışma ile benzerlik pH aralığında ve tuz konsatrayon aralığında tespit edilmiştir.

Trivedi ve ark. (2011), yaptığı çalışmada *Ulva Lactuca*'dan (deniz maruludan), izole ettikleri *Bacillus flexus* NT suşundan ekstraseüler alkali-halotoleant selüloz enzim aktivitesi için optimum pH değerinin 10, optimum sıcaklık değerinin ise 45 °C olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada benzerlik tespit edilmemiştir.

Aygan ve Battaloğlu (2015), *Bacillus sp.* P-5, bahçe topraklarından izole ettikleri suşun pH 6.0-10.5 enzim sentezi gerçekleştirirken optimum selüolitik aktiviteyi pH 8 ve 35 °C olduğunu bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada suşun optimum pH değeri benzerlik göstermiştir.

Jebeli ve ark. (2017), yaptığı çalışmada kirli su kaynaklarından izole ettiikleri bakterilerin arsenik dönüşüm kabiliyetini çalışmışlardır. Bakterinin gram pozitif, endosporlu ve *Bacillus* cinsine ait özelliklere sahip olduğu, 16S rRNA gen dizisine göre *Bacillus flexus* olduğu tespit edilmiştir. Suş optimum pH 9, % 2'lik tuz konsantrasyonunda ve 38 °C 'de büyüdüğü bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada suşların aynı cins olduğu halde farklı ortamlarda optimum büyüme gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmalar sonucunda elde edilen selüloz enziminin en yüksek ve etkin optimizasyon tespitindeki farklılıkların sebebi çalışılan suşların aynı olmamasından kaynaklıdır. Suş gram pozitif, spor oluşturan, çubuk şeklinde bir bakteridir.

Yapılan morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları sonucu koloni morfolojileri ve diğer özelliklerine göre suş *Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır. Tanımlama işlemlerinden sonra suş için içerisinde substrat bulunan sıvı besiyerleri kullanılarak farklı sıcaklık, zaman ve pH değerlerinde üreme ve enzim sentezleme özellikleri incelenmiştir. 16S rRNA gen dizileri moleküler yöntemlerden biri olup bakteriler arasındaki filogenetik analizlerin tanımlanmasında kullanılan bir tekniktir (Busse ve ark., 1996). 16S rRNA gen bölgesi korunaklı bölgeler olması, bakteriler arasında evrensel olması ve türe özgü değişiklik gösteren bölgelerin olması, bakterileri cins ya da tür aşamasında araştırmacılara açık veri tabanları kullanarak tanımlamasına olanak sağlamışlardır (Vandamme ve ark., 1996). Korunaklı bölgeler, geç evrimleştikleri için tür, alt tür ve cins bakımından filogenetik ilişkileri tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Veri bankalarında depo edilmiş sekans dizilerinin nitelikleri moleküler boyuttaki çalışmaların güvenilirliğinde ciddi ölçüde etkilemektedir. Veri bankalarında son yirmi yılda 1.3 milyon bakteri ve 54 bin arkeaya ait 16S rRNA gen bölgesi RDP'de arşivlenmiştir. Bu çalışmada, T1 izolatının 16S rRNA gen dizisi 27F ve 1492R primerler çoğaltılmıştır. Gen bölgesinin sekans analizleri sonuçları baz alınarak MEGA 7 programında tüm nükleotidleri kromatogram görüntülerine bakılarak kontrol edilmiştir.

16S rRNA gen dizileri, NCBI'dan elde edilerek izolatın gen dizileri hizalanmıştır. Bazları simgeleyen piklerin temiz oluşuna tespit edilerek boşluklar çıkarıldıktan sonra gen dizileri filogenetik analizi yapılmıştır. Toplam 1304 nükleotidlik 16S rRNA belirlenmiştir. T1 izolatın, karşılaştırılan 1304 nt'lik bölgede 15 nükleotid farklılığı ile %100 *Bacillus flexus* MN005931, *Bacillus flexus* MH396726, *Bacillus flexus* KX821760, *Bacillus flexus* LC259989, *Bacillus flexus* JX069808, *Bacillus flexus* MK178593 suşları ile sıkı bir homoloji kümelenmiştir. Buna ek olarak, % 97 *Bacillus vireti* NR 025590, *Bacillus fumarioli* NR 025370 olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, filogenetik ağaç içerisinde *Bacillus* türleri güçlü bir homoloji ile kümelenmiş olup dış grup olarak *Lactobacillus casei* NR041893 türü ile ayrı bir kladda ve grupların kendi aralarında güçlü bir homoloji oluşturması açısından yapılan analizin güvenilir olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda T1 suşu morfolojik, biyokimyasal ve moleküler analizler sonucu *Bacillus flexus* olarak teşhis edilip birtakım ekstraselüler hidrolitik enzim yetenekleri ortaya çıkmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar ile bakterilerin endüstriyel alanda kullanım potansiyeli olan enzim elde edilmiştir. T1 suşu, selülaz aktivitesi göstermiştir. Gelecekte yapılacak olan çalışmalar, selülaz enziminin izolasyonu, karakterizasyonu ve optimizasyonu, raf ömrü gibi özelliklerin geliştirilmesi konularında araştırmalar yapılarak, endüstriyel alanda önemli enzim olup büyük ölçeklerde üretilmesinde kullanılabilir. Bu tür çalışmalar bilime katkı sağlamakla birlikte, ülkemizin endüstriyel alandaki çalışmalarda enzim kullanımında dışa bağıllığı aza indirgeyerek, ekonomi açısından önemli değer katacaktır.



KAYNAKLAR

- A. Hebeish and N. A. Ibrahim., 2007. "The impact of frontier sciences on textile industry," *Colourage*, 41–55.
- Aehle, W., 2007. Enzymes in industry production and applications. *Third, Completely Revised Edition*. 99-262.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., and Balasubramanian, T., 2011b. Extraction, Purification and Characterization of Thermostable, Alkaline Tolerant α -Amylase from *Bacillus cereus*. *Indian J Microbiol*, **51**:424-429.
- Aral, D.R., Marquazz, M.C., Volcani, B.E., Schleifer, K.H., 1999. *Bacillus marismortui* sp. Nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**:521: 530.
- Asha, B. M., Sakthivel, N., 2014. Production, purification and characterization of a new cellulase from *Bacillus subtilis* that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent tolerant properties. *Annals of Microbiology*, **64**(4), 1839-1848.
- Aygan, A., 2008. Haloalkalifil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. *Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*.
- Aygan, A., Arıkan, B., 2008. Amilaz selüloz ve ksilanaz üretebilen orta düzeyde halofil *Bacillus* sp. izolasyonu ve optimum üreme ve enzim sentezlerinin belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi*, **18**(2): 1-11.
- Aygan, A., Battaloğlu, G. Kahramanmaraş topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. P-5 tarafından endoglukanaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, **11**:11-20.
- Benson, J. K., 2002. Microbiological Application: Laboratory Manual in General Microbiol. *8th Edition*: 471-478
- Bhat, M. K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **18**:355-383.
- Birbir, M., Sesal, C. 2003. Extremely halophilic bacterial communities in Şereflikoçhisar Salt Lake in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, **27**(1), 7-22.
- Bischoff, K. M., Rooney, A. P., Li, X. L., Liu, S., and Hughes, S. R., 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett*. **28**:1761-1765.
- Brown, R.M. Jr., 2004. Cellulose structure and biosynthesis: **What is in store for the 21st century**. *J Polym Sci Pol Chem*, **42**: 487–495.
- Busse, H.J., Denner, E.B.M., Lubitz, W., 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *Journal of Biotechnology*, **47**(1): 3-38.
- Chen, W. Q., Liu, Y. Y., 2013. Isolation and identification of *Halomonas* sp. ZSCW-10: a moderately halophilic bacteria strain with cellulase activity. *In Advanced Materials Research*. **236**:241.
- Çotuk, A., Küçükler, M., 1992. *Biyologlar için Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*.
- Das A., Bhattacharya, S., and Murali, L., 2010. Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolated from cow dung. *American-Eurasian J. Agric Environ. Sci.*, **8**(6):685-691.

- Demain, A.L., and Solomon, N.A., 1981. In Industrial microbiology and the advent of genetic engineering, *Scientific American, Freeman&Comp., San Francisco*. 3-14
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, **28**(3): 350-356.
- Ediz, N., ve Beyathı, Y., 2005. *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından biyoplastik üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **5**:1-22.
- Gessesse, A., 1998. Purification and properties of two thermostable alkaline Xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 3533-3535.
- Gohel, H. R., Contractor, C. N., Ghosh, S. K., & Braganza, V. J. 2014. A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar plates. *Int J Curr Microbiol App Sci*, **3** 261-266.
- Haki, G.D., and Rakshit S.K., 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, **89**:17-34.
- Han, Q. J., Zhang, Q. Q., 2011. Study on cellulase production by a moderately halophilic bacterium HS1. *Chemistry and Bioengineering*, **5**, 017.
- Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Yano, S., Fang, X., Endo, T. ve Sawayama, S., 2011, "Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source", *Enzyme and Microbial Technology* **48**: 162-168.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: some application of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **63**(4):735- 750.
- Hoshino, E., Tanaka A., and Kanda T., 2006. Effects of a non-ionic surfactant on the behavior of *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase in the hydrolysis of malto-oligosaccharide. *Journal of surfactants and detergents*, **9**:63-68.
- Huang, x. P., and Monk C., 2004. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**:85-92.
- Iqbal, H.M.N, Asgher, M., Ahmed, I. ve Hussain, S., 2010, "Media optimization for hyper production of carboxymethyl cellulase using proximally analyzed agro-industrial residue with *Trichoderma harzianum* under SSF", *IJAVMS*, **4**,(2), 47-55.
- Ito, S., 1997. Alkaline cellulase from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles*, **1**:61-66.
- Jadhav, A.R., Girde A.V., More S.M., More S.B. ve Khan, S. 2013. " Cellulase production by utilizing agricultural wastes", *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, **1**(7): 6-9.
- Jebeli, M. A., Maleki, A., Amoozegar, M. A., Kalantar, E., Izanloo, H., Gharibi, F. 2017. *Bacillus flexus* strain As-12, a new arsenic transformer bacterium isolated from contaminated water resources. *Chemosphere*, **169**, 636-641.
- Jo, K. I., Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Chung, C. H., Nam, S. W., Kim, S. K., and Lee, J. W., 2008. Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquenfaciens* DL-3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **13**:182-188.

- John, W., and Sons, I., 1998. Industrial enzymes and their applications. *United States of Amerika*. 454.
- Kempe, S. and Kazmierczak, J. and Landmann, G. and Konuk, T. and Reimer, A. and Lipp, A., 1999. Largest known microbialites discovered in lake Van, Turkey. *In: Nature*, **349**:605-608.
- Kıran, Ö. E., Çömelekçioğlu, U., ve Dostbil, N., 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi*. **9**(1):12-19.
- Kim, J. Y., Hur S. H., and Hong J. H., 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. *HSH-810*. *Biotechnology Letters*, **27**:313–316.
- Larsen H., 1962. The bacteria: a treatise on structure and function, Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms, *Environ Technol*, **31** (8-9): 825-834.
- Lerner, K. L., and Lerner B. W., 2002. World of microbiology and immunology. America, 1-359.
- Li, X., Wang, H. L., Li, T., Yu, H. Y., 2012. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant alkaline cellulase from a halophilic isolate of *Thalassobacillus*. *Biotechnology Letters*. **34**(8): 1531-15360.
- M. Karmakar and R. R. Ray., 2011., “Current trends in research and application of microbial cellulases,” *Research Journal of Microbiology*. 41–53.
- MacFaddin, J. F., 2000. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd edition. **Williams amp; Wilkins**.
- Maurya, D., Singh, D., Pratap, D. ve Maurya, J., 2012 “Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*”, *J. Environ. Biol.*, **33**, 5-8.
- Mawadza, C., Rajni H. K., Zvaury A R., and Mattiasson B., 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology* **83**: 177–187.
- Muthuvelayudham, R. and Viruthagiri, T., 2010. Application of central composite design based response surface methodology in parameter optimization and on cellulase production using agricultural waste, *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, **3**(2): 97-104.
- Nagar, S., Gupta, V.K., Kumar, D., Kumar, L. ve Kuhad, R.C., 2010. “Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 71–83.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G., 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Application Microbiology Biotechnology*, **51**: 711-729.
- Nikolov, T., Bakalova, N., Petrova, S., Benadova, R., Spasov, S., and Kolev, D., 2000. An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. *Bioresource Technology*. **71**:1-4.
- Otajewwo, F.D. 2011. “Cultural conditions necessary for optimal cellulase yield by cellulolytic bacterial organisms as they relate to residual sugars released in broth medium”, *Modern Applied Science*, **5**(3): 141-151.
- Padmavathi. T, Nandy, V. ve Agarwal, P., 2012. “Optimization of the medium for the production of cellulases by *Aspergillus terreus* and *Mucor plumbeus*”, *Euro. J. Exp. Bio.*, **2**(4):1161-1170.

- Pandit, N.P. ve Maheshwari, S.M. 2012. "Optimization of cellulase enzyme production from sugarcane pressmud using oyster mushroom - pleurotus Sajor-Caju by solid state fermentation", **J. Bioremed. Biodegrad**, **3(3)**: 1-5.
- Paulo, A. C., and Gubitz, G. M., 2003. Textile processing with enzymes. **CRC press, Cornwall, England**. 1:85573 610 1.
- Peng, Q.Z., Peng Q.J., Zhang Y.Q., Liu Z.X., Wang Y.X., Li W.J., Cui X.L., Chen Y.G., 2004. *Halobacillus locisalis* sp. Nov., a halophilic bacterium isolated from a marine solar saltern of the Yellow Sea in Korea, **Extremophiles**, **8**:23-28.
- Purwadaria, T., Kumalasari, A.T., Tutiharyati, Ketaren, P. P. Ve Sinurat, A. P. 2004. Optimization of cellulase production with *Penicillium Nalgiovense* S11 grown on pretreated wheat pollard, **Biotropia**, **23**: 1 – 12.
- Rajoka, M. I., and Malik, K. A., 1997. Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. **Bioresource Technology**. **59**:21 27.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M. Gathe, M.S., Deshpande, W., 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62(3)**:597-635.
- Rashid, S.S, Alam, M.Z., Karim M. I. A ve Salleh, M.H. 2009. Optimization of the nutrient suppliments for cellulase production with the basal medium palm oil mill effluent, world academy of science, **Engineering and Technology**, **60**: 809-815.
- Sadhu, S. ve Maiti, T.K. 2013, "Cellulase production by bacteria: a review", **British Microbiology Research Journal**, **3(3)**: 235-258.
- Saravanan, K., Sivashankar, M. Ve Sivacharan S.R.C. 2008. Production and optimization of cellulase from *Aspergillus Niger*, srm university, **Department of Biotechnology School of Bioengineering Faculty Of Engineering And Technology, Kattankulathur**. **61**:25-15.
- Schafer, T., Borchert, T. W., Nielsen, V.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L., Salmon, S., Pedersen, S., Hansen, H.P.H., Poulsen, P.B., Lund, H., Oxenboll, K.M., Wu, G.F., Pedersen, H.H., and Xu H., 2007. Industrial enzymes. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, **105**:59–131.
- Sehgal, Gibbons N. 1960. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. **Can J Microbiol** **6**:165–169.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S. ve Rao, M.A. 2013. "Production of cellulase a review", **International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences**, **3(4)**: 1070-1090.
- Shobana, P. and Maheswari, N.U. 2013. "Production of cellulase from *Aspergillus fumigatus* under submerged and solid state fermentation using agricultural waste", **International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry**, **2(4)**: 595-599.
- Singh, A., Singh, N. ve Bishnoi, N.R. 2009. "Production of cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation", **International Journal of Civil and Environmental Engineering**, **1(1)**, 23-26.
- Singh, J., Batra, N., and Sobti, R. C., 2001. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a new isolated *Bacillus* sp. VG1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. **17**:761-765.

- Singh, J., Batra, N., and Sobti, R. C., 2004. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolated, *Bacillus sphaericus JS1*. *J Ind MicrobiolBiotechnol*. **31**:51-56.
- Soares, M. M. C. N., Silva R. D., Carmona E. C., and Gomes E., 2001. Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **17**:79-82.
- Sukumuran R. K., Singhanian R. R., and Pandey A., 2005. Microbial cellulases production, applications and challenges. *Journal of Scientific And Industrial Research*, **64**:832-844.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., M., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution*, **30** (12): 2725–2729.
- Teeri, T.T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C., Jones, T.A. 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose. *Biochemistry Society Trans*, **26**: 173- 178.
- Thomas D.P. ve Ambikapathy. V.2011. "Optimization of cellulase produced by *Hormodendrum cladosporioides* using three leaf litters", *J. Microbiol. Biotech. Res.*, **1(3)**,135 146.
- Tommme, P., Warren, R.A., Gilkes, N.R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiolgy Physiol*, **37**: 1-81.
- Topuz, U., Kıran, Ö. E., ve Çömelekçioğlu, U., 2007. Selülaz üreticisi *Bacillus* suşlarının enzimatik özelliklerinin araştırılması. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*. **10(2)**:13-16.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B.2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate polymers*, **83(2)**, 891-897.
- Ugwuanyi, J. O., Harvey, L. M., and Mcneil, B., 2004. Development of thermophilic populations, amylase and cellulase enzymatic activities during thermophilic aerobic digestion of model agricultural waste slurry. *Process Biochemistry*. **39**:1661-1669.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J., 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, **60(2)**: 407-438.
- Ventosa, A., Marquez.M.C., Garabito.M.J., and Arahal,D.R. 1998. Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hyper saline environments. *Extremophiles*. **2**:297 304.
- Vroemen, A. J., 1983. Production of industrial enzymes. *Antonie van leeuwenhoek*, **49**:90-91.
- Wiseman,A., 1987. Handbook of enzyme biotechnology. *Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry*, 274-373.
- Xia, W., Liu, P., and Liu J., 2008. Advance in chitosan hydrolysis by non-specific cellulases. *Bioresource Technology*. **99**:6751-6762.
- Yang, D., Weng, H., Wang, M., Xu, W., Li, Y., and Yang, H., 2010. Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain *Mol Biol Rep*. **37**:1923-1929.

- York, M. K., Traylor, M. M., Hardy, J., Henry, M., 2007. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. MR-VP (Methyl Red–Voges-Proskauer) Tests. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C.* 3.17.33.1 - 3.17.33.4
- York, M. K., Traylor, M. M., Hardy, J., Henry, M., 2007. Biochemical tests for the identification of aerobic bacteria. Indole test. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C. p.* 3.17.12.1 - 3.17.12.
- Yu, P. 1996. Analysis of a municipal recyclable material recycling program. *Resour. Conserv. Recy*, **17**: 47-56.
- Zeman, N.W. and McCrea, J.M., 1985. Alpha-amylase production using a recombinant DNA organism. *Cereal Foods World*. **30** (1): 777-780.
- Zemek J., Augustin J., Borris R., Kuniak L., Svaboa M., Pacova., 1981. Polysaccharide-hydrolyzing enzymes in the genus *Bacillus*. *Folia Microbiol*, **26**:403-407.
- Zhang C., Xing x. H., and Liu M. S., 2004. Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. *Biochemical Engineering Journal*, **19**:181–187.
- Zhang, G., Li, S., Xue, Y., Mao, L., Ma, Y., 2012. Effects of salts on activity of halophilic cellulase with glucomannanase activity isolated from alkaliphilic and halophilic *Bacillus sp.* BG-CS10. *Extremophiles*, **16**(1), 35-43.
- Zhang, Y. P., Hong, J., Ye, X., 2009. Cellulase assays. *In Biofuels*(213-231). Humana Press, Totowa, N.J. Hebeish and N. A. Ibrahim, 2007. *The impact of frontier sciences on textile industry, Colourage*. **54**: 41–55.
- Zoppas, F.M., Meneguzzi, A., ve Tramontina, F. 2013. “Alternatives for cellulase production in submerged fermentation with agroindustrial wastes”, *International Journal of Modern Engineering Research*, **3**(4): 2374-2381.

EKLER

Ek 1. Besiyerleri

Ek.1.1.Halofilik agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
NaCl	20 gr
Yeast Ekstrakt	1 gr
KCl	0,2 gr
MgSO ₄	2 gr
Kazein	0,75 gr
Demir	Eser Miktarda
MnCl	Eser Miktarda
ddH ₂ O	80 ml
Agar	1,5 gr
Karboksimetil selülaz	1 gr

Ek 1. 2. Nişasta agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Nişasta	2gr
Halofil Agar	2gr
Distile su	100ml

Ek 1.3. Skim milk agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Skim milk	0.1gr
Halofil Agar	2gr
Distile su	100ml

Ek 1. 4. Tween 80 Agar

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Tween 80	3ml
Halofil Agar	2gr
Distile su	100ml

Ek 1.5. Nitrat broth

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
KNO ₃	1gr
Halofil Broth	100ml

Ek 1.6. Karbonhidrat Fermentasyon Ortamı

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Fenol Red	0.03gr
Halofil Broth	100 ml

Ek 1.7. M9 Besiyeri (Devamı)

Kullanılan maddeler	Miktarlar
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	6,4gr
KH ₂ PO ₄	1,5gr
NaCl	2,5gr
MgSO ₄	100µl
CaCl ₂	50µl

Ek 2. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Tamponlar

Ek 2.1. Agaroz jel hazırlama

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
Agaroz	0.4gr
TBE	40ml
Ethidium Bromid	4µl

Ek 2.2. CTAB+0.7 M NaCl

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

Ek 2.3. Fenol-kloroform-izoamilalkol

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

Ek 2.4. TBE Hazırlama

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

Ek 2.5. 0.5M EDTA

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

Ek 2.6. Ethidium bromide (Devamı)

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

Ek 2.7. RNAaz hazırlama

Kullanılan malzemeler	Miktarlar
RNAase	25µl
Stril saf su	1ml

Ek 2.8. SDS çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Miktarlar
SDS	10gr
Distile su	100ml

Ek 2.9. Kloroform-izoamilalkol çözeltisi

Kullanılan Maddeler	Oranlar
Kloroform-izoamilalkol	24:1

Ek 2.11. T.E. (Tris-Edta) çözeltisi

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

Ek 2.12.TAE (tris-asetat) çözeltisi

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



ÖZ GEÇMİŞ

1994 yılında İstanbul'da doğdu. İlköğretimini Sabri Akın İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra lise eğitimini Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2013 yılında başladığı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden 2017 yılında moleküler biyolog olarak mezun oldu. Aynı yıl girdiği Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.



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

Tarih: 16.08.20019

Tez Başlığı / Konusu: **Canik Tuzlasından (Van) İzole ve Karakterize Edilen *Bacillus flexus* T1 İzolatı Tarafından Üretilen Selüloz Enziminin Aktivitesi Üzerine Ortam Bileşiminin Etkisi**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 64 sayfalık kısmına ilişkin, 16.08.20019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından **Turnitin** .intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 (sekizdir) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

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

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

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


16.08.20019

Adı Soyadı: Tuğba BÖREKÇİ

Öğrenci No:17910002103


Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Programı:

Statüsü: Y. Lisans Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR


Dr. Öğr. Üyesi Erdal ÖĞÜN


ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR
(Unvan, Ad Soyad, İmza)
Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü