

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**POLİHİDROKSİBUTİRAT VE TERMOFİLİK BİR FERULİK ASİT
ESTERAZIN KLASİK VE MİKROBALONCUK FERMENTASYON
YÖNTEMİ İLE ÜRETİMİ**

DOKTORA TEZİ

FULYA AY ŞAL

ARALIK 2016

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
DOKTORA TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Polihidroksibutirat ve termofilik bir ferulik asit esterazın klasik ve mikrobaloncuk fermentasyon yöntemi ile üretimi” adlı bu çalışma, TÜBİTAK Yurt Dışı Araştırma Sırası Bursu ve 8704 nolu KTU BAP 01 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projesi ile sağlanan imkanlarla Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında ‘Doktora Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenerek, konunun seçilmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesinde yardımlarını ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarımın çeşitli aşamalarında desteklerini esirgemeyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve Yrd. Doç. Dr. Kadriye İNAN’a teşekkür ederim. Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda yaşadığım zor anlarda yardımlarıyla bana destek olan Yrd. Doç. Dr. Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Yrd. Doç. Dr. Halil İbrahim Güler’e, Arş. Gör. Ayşegül ÖZER’e, Esmâ CEYLAN’a ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim. Çalışmaların gerçekleştirilmesi adına ABD’de Utah Science Technology and Research (USTAR)’da çalışan ve oradaki danışmanlığımı üstlenerek laboratuvarının hiçbir olanağını benden esirgemeyen ve bana her zaman yardımcı olan Prof. Dr. Foster AGBLEVOR’a, çalışmaların bir kısmını da Utah State Üniversitesi’nde yürütebilmemi sağlayan ve oradaki laboratuvarın da yine tüm imkanlarını bana sunan ve tez kapsamı dışında farklı projelerde de çalışmaya destek veren USU Biyoloji Mühendisliği öğretim üyesi Prof. Dr. Charles D. MILLER’a ve ABD’ndeki tüm çalışmalarımda benden desteğini esirgemeyen ve şu an NASA’da görevli olan Dr. Asif RAHMAN’a çok teşekkür ederim. Ayrıca tez kapsamında kullanılan mikrobaloncuk cihazını yapabilmemizi sağlayan Kocaeli Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tamer SINMAZÇELİK’e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Özellikle, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç verip yanımda olan ve her konuda bana yardımcı olan sevgili eşim Bilal ŞAL’a ve değerli aileme minnet ve şükranlarımı sunmaktan onur duyarım.

Fulya AY ŞAL
Trabzon 2016

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Polihidroksibutirat ve termofilik bir ferulik asit esterazın klasik ve mikrobaloncuk fermentasyon yöntemi ile üretimi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’n sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 26/12/2016

Fulya AY şAL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş	1
1.2. Biyolojik Olarak Parçalanabilen Plastikler.....	4
1.2.1. PHA'lar ve Kullanım Alanları.....	6
1.2.1.1. PHA Sentezleyen Mikroorganizmalar	8
1.2.1.2. PHA'ların Biyosentezi.....	10
1.2.1.2.1. PHA Oluşumundaki Genetik Faktörler	11
1.2.2. Polihidroksibutiratlar (PHB'lar)	11
1.2.2.1. PHB Sentez Mekanizması	12
1.2.2.2. PHA'ların Üretimi	14
1.3. Ferulik Asit Esterazlar (FAE'lar)	15
1.3.1. FAE Üretici Mikroorganizmalar.....	16
1.3.2. Termofilik Bakterilerin Özellikleri.....	17
1.3.2.1. Termofillerin Diğer Bakterilerden Farklı Olan Yönleri	18
1.3.2.2. <i>Geobacillus</i> Cinsinin Özellikleri	19
1.3.3. FAE Üretici Mikroorganizmaların Tanımlanması.....	20
1.3.4. FAE'ların Sınıflandırılması	20
1.3.5. FAE'ların Yapısal Analizi	21
1.3.6. Klasik Esteraz Motifi, GlyXSerXGly.....	22
1.3.7. FAE'ların Histidin, Serin ve Aspartik Asitten Oluşan Katalitik Üçlüsü ve Reaksiyon Mekanizmaları	23
1.3.8. FAE'ların Endüstriyel Önemleri.....	25

2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	28
2.1.	Materyal.....	28
2.1.1.	Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler.....	28
2.1.2.	Kullanılan Besiyerleri.....	28
2.1.3.	Kullanılan Bakteriler ve Plazmitler.....	29
2.1.4.	Veritabanları ve Biyoinformatik Programlar.....	31
2.2.	Metot.....	32
2.2.1	Aktivitelerine Bağlı Olarak Kullanılacak İzolatların Seçimi.....	32
2.2.2	Klonlama Çalışmaları.....	32
2.2.2.1	Ekspresyon Primerleri.....	32
2.2.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu ve PCR.....	33
2.2.2.3.	<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T FAE Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması.....	34
2.2.2.4.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	35
2.2.3.	FAE'in Üç Boyutlu Yapısının Çizimi ve Aktif Bölgesinin Tespiti.....	36
2.2.4.	FAE'in Klasik Esteraz Motifi (GlyXSerXGly) Analizi.....	36
2.2.5.	Bakteriyal FAE'ların Filogenetik Analizi.....	36
2.2.6.	FAE Geninin Ekspresyonu ve Enzim İzolasyonu.....	37
2.2.7.	Enzimlerin Saflaştırılması.....	37
2.2.7.1.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE).....	39
2.2.8.	FAE Aktivitesinin Ölçümü.....	39
2.2.9.	Protein Miktarları Ölçümü.....	40
2.2.10.	FAE'in Karakterizasyonu.....	41
2.2.10.1.	Substrat Spesifitesi.....	41
2.2.10.2.	Optimum Sıcaklık.....	41
2.2.10.3.	Optimum pH.....	41
2.2.10.4.	Isıl Kararlılık.....	42
2.2.10.5.	pH Kararlılık.....	42
2.2.10.6.	Metal İyon Etkisi.....	42
2.2.10.7.	Organik Çözücülerin ve İnhibitörlerin Etkisi.....	42
2.2.10.8.	Enzim Kinetiği.....	43
2.2.11.	Klasik ve MBD Fermentasyonla PHB Üretimi.....	43
2.2.11.1.	Erlenlerde PHB Üretimi.....	43
2.2.11.2.	PHB'in Klasik Fermentörde Üretimi.....	44

2.2.11.3.	PHB'ın Mikrobaloncuk (MBD) Fermentasyonla Üretimi.....	44
2.2.12.	Yapılan Analizler.....	46
2.2.12.1.	Volumetrik Oksijen Transfer Kat Sayısı (kLa) Hesaplanması.....	47
2.2.13.	MBD Cihazının Türkiye'de Üretimi.....	47
2.2.14.	Klasik ve MBD Fermentasyonla FAE Üretimi.....	48
2.2.14.1.	FAE'ın Erlen Kültüründe Üretimi.....	48
2.2.14.2.	FAE'ın Klasik Fermentörde Üretimi.....	48
2.2.14.3.	FAE'ın MBD Fermentasyonla Üretimi.....	49
3.	BULGULAR.....	51
3.1.	Çalışmada Kullanılacak Türlerin Belirlenmesi ve Enzim Aktivite Deneyi.....	51
3.2.	<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T FAE Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması.....	51
3.3.	<i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T FAE Kodlayan Genin Baz Dizilimi.....	53
3.4.	FAE'ın Üç Boyutlu Yapısı ve Aktif Bölgesi.....	54
3.5.	FAE'ın Klasik Esteraz Motifi (GlyXSerXGly) Analizi.....	56
3.6.	Bakteriyal FAE'ların Filogenetik Analizi.....	57
3.7.	Enzim Üretimi ve Saflaştırılması.....	57
3.8.	FAE'ın Karakterizasyonu.....	58
3.8.1.	Substrat Spesifitesi.....	58
3.8.2.	Optimum Sıcaklık.....	59
3.8.3.	Optimum pH.....	59
3.8.4.	Isıl Kararlılık.....	60
3.8.5.	pH Kararlılık.....	61
3.8.6.	Metal İyon Etkisi.....	62
3.8.7.	Organik Çözücülerin ve İnhibitörlerin Etkisi.....	63
3.8.8.	Enzim Kinetiği.....	64
3.9.	PHB'nin Klasik ve Mikrobaloncuk Fermentasyonla Üretimi.....	67
3.9.1.	PHB'ın Erlenlerde Üretimi.....	67
3.9.2.	PHB'ın Klasik Fermentörde Üretimi.....	68
3.9.3.	PHB'ın MBD Fermentasyonla Üretimi.....	71
3.9.4.	Volumetrik Oksijen Transfer Kat Sayısı (kLa) Hesaplanması.....	74
3.10.	FAE'ın Klasik ve Mikrobaloncuk Fermentasyonla Üretimi.....	74
4.	TARTIŞMA.....	77

5.	SONUÇLAR.....	89
6.	ÖNERİLER.....	92
7.	KAYNAKLAR.....	93
8.	EKLER	103

ÖZGEÇMİŞ



Doktora Tezi

ÖZET

POLİHİDROKSİBUTİRAT VE TERMOFİLİK BİR FERULİK ASİT ESTERAZIN
KLASİK VE MİKROBALONCUK FERMENTASYON YÖNTEMİ İLE ÜRETİMİ

Fulya AY ŞAL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2016, 104 Sayfa, 1 Ek Sayfa

Bu çalışmada, klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonlarını karşılaştırmak amacıyla rekombinant *E. coli* suşundan polihidroksibutirat (PHB) üretimi, ABD’de Utah Science Technology and Research (USTAR)’da yapıldı. Klasik fermentasyonda 0,8 vvm hava akış hızında ve 350 rpm çalkalama hızında 48 saat sonucunda 6,21 hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) ve %23 oranında PHB üretimi (kuru hücreye göre) elde edildi. MBD fermentasyonda yine aynı klasik fermentasyon şartları kullanılarak 8,17 hücre yoğunluğu (OD₆₀₀) ve %43 oranında PHB üretimi elde edildi. *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542^T’a ait ferulik esteraz geni, pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak karakterize edildi. Enzimin optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH’sı 8,5 olarak tespit edildi. Enzimin 50°C’de iki gün inkübasyonunun sonucunda, aktivitesinin %64’e indiği görüldü. MBD cihazı daha sonra ferulik asit esteraz üretimi için kullanıldı. Rekombinant *E. coli*’nin 3,5 saatlik klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonları sonucunda klasik fermentasyonda; kuru hücre ağırlığı, protein miktarı, hücre yoğunluğu 1,2 g/L, 244,48 µg/mL, 3,8 iken mikrobaloncuk fermentasyonda; kuru hücre ağırlığı, protein miktarı, hücre yoğunluğu sırasıyla 1,5 g/L, 278 µg/mL ve 4,5 olarak bulundu. Bu tez kapsamında bakteriyal yeni bir ferulik asit esteraz geni literatüre kazandırıldı. Türkiye’de ilk defa kullanılan MBD cihazının fermentör besiyerinde oksijen kütle transferini, *E. coli* büyümesini ve ürün oluşumunu arttırdığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: *E. coli*, Ferulik asit esteraz, Mikrobaloncuk, Polihidroksibutirat

PhD. Thesis

SUMMARY

PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE AND A THERMOPHILIC
FERULIC ACID ESTERASE WITH CONVENTIONAL AND MICROBUBBLE
FERMENTATION

Fulya AY ŞAL

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ
2016, 104 Pages, 1 Appendix Page

In this study, a recombinant *E. coli* strain was used to produce polyhydroxybutyrate (PHB) to compare conventional and MBD aerobic fermentation conditions at Utah Science Technology and Research (USTAR), USA. In conventional fermentation operating at 350 rpm and 0.8 vvm air flow rate, an OD₆₀₀ of 6.21 and PHB yield of 23% (dry cell basis) was achieved. MBD fermentation with similar bioreactor operating parameters produced an OD₆₀₀ of 8.17 and PHB yield of 43%. The ferulic acid esterase gene from *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542^T was cloned into pET28a(+) expression vector and characterized. The enzyme had an optimum temperature of 50°C and optimum pH of 8.5. The enzyme has been found to retain 64% of its activity after two days incubation at 50°C. MBD generating device also was used for the production of ferulic acid esterase. After 3.5 hours of conventional and MBD fermentations of *E. coli*, it was observed that with conventional fermentation, dry cell weight, protein concentration, cell density were found to be 1.2 g/L, 244.48 µg/mL, 3.8 while with MBD fermentation, dry cell weight, protein concentration, cell density were found to be 1.5 g/L, 278 µg/mL, 4.5, respectively. A new bacterial ferulic acid esterase gene was added to the literature within the content of thesis. This study demonstrated a MBD generator application which was used for the first time in Turkey, the method can increase oxygen mass transfer, *E. coli* growth and bioproduct generation.

Key Words: *E. coli*, Ferulic acid esterase, Microbubble, Polyhydroxybutyrate

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Mikrobaloncukların mikroskop görüntüleri	2
Şekil 2. Mikrobaloncuk üreten diskin şematik görüntüsü	3
Şekil 3. Mikrobaloncuk üreten cihazın fermentörle çalışma mekanizmasının şematik görüntüsü	3
Şekil 4. Polihidroksialkanoatların genel yapısı.....	6
Şekil 5. Poli(3-hidroksibutirat)'ın biyosentezi.....	13
Şekil 6. <i>A. eutrophus</i> bakterisine ait P(3HB)'nin metabolik yapım ve yıkımı	13
Şekil 7. Bakteride PHB birikimi	14
Şekil 8. Hidroksisünamik asitlerin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 9. Ferulik asidin yapısı.....	16
Şekil 10. <i>L. johnsonii</i> bakterisinin oluşturduğu şeffaf zon	20
Şekil 11. α/β hidrolaz katlanmasının sekonder yapısı.	22
Şekil 12. LJ0536 FAE'nin homologlarıyla çoklu dizi hizalaması.....	23
Şekil 13. Hidroliz reaksiyon mekanizması	24
Şekil 14. PHB üretiminde kullanılan fermentör	44
Şekil 15. Mikrobaloncuk üreten cihaz	45
Şekil 16. Mikrobaloncuk üreten cihazın PHB üretiminde fermentörle birlikte kullanımı.....	46
Şekil 17. Türkiye'de üretilen mikrobaloncuk cihazı.....	48
Şekil 18. Mikrobaloncuk üreten cihazın FAE üretiminde fermentörle birlikte kullanımı.....	50
Şekil 19. FAE aktivitesine sahip olan bakteri suşlarından <i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T	51
Şekil 20. GtexF ve GtexR primerleri ile gerçekleştirilen PCR'in annealing sıcaklığı ile optimizasyon sonuçları	52
Şekil 21. Rekombinant plazmitlerin <i>EcoRI</i> restriksiyon analizleri.....	52
Şekil 22. FAE geninin pET28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanması.....	53
Şekil 23. <i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T FAE'nin aminoasit ve baz dizilimi.....	54
Şekil 24. Ferulik asit esterazın üç boyutlu yapısı (Ribbon model, PyMOL).....	55
Şekil 25. Ferulik asit esterazın üç boyutlu yapısı (Yüzey gösterimi, PyMOL).....	55
Şekil 26. GthFAE'nin aminoasit dizisinin diğer bakteriyel FAE'ların dizileri ile karşılaştırılması.....	56

Şekil 27.	Bakteriyal ferulik asit esterazların filogenetik analizi	57
Şekil 28.	Saflaştırılmış GthFAE'in SDS-PAGE analizi	58
Şekil 29.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE'nin substrat spesifitesi.....	58
Şekil 30.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE'nin optimum sıcaklık grafiği.....	59
Şekil 31.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE'nin optimum pH grafiği	60
Şekil 32.	GthFAE'in ısı kararlılığı.....	60
Şekil 33.	GthFAE-His'in ısı kararlılığı.....	61
Şekil 34.	GthFAE-His'in ısı kararlılığı.....	61
Şekil 35.	GthFAE'in pH kararlılığı.....	62
Şekil 36.	GthFAE-His'in pH kararlılığı.....	62
Şekil 37.	Metal iyonlarının GthFAE aktivitesi üzerine etkisi.....	63
Şekil 38.	Deterjan ve organik çözücülerin GthFAE aktivitesi üzerine etkisi	63
Şekil 39.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE'nin <i>p</i> -NP butirat (C4) için Michaelis- Menten eğrileri	64
Şekil 40.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE'nin <i>p</i> -NP kaprilat (C8) için Michaelis- Menten eğrileri	65
Şekil 41.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE'nin <i>p</i> -NP kaprat (C10) için Michaelis- Menten eğrileri	65
Şekil 42.	<i>G. thermoglucosidasius</i> FAE'nin <i>p</i> -NP laurat (C12) için Michaelis- Menten eğrileri	66
Şekil 43.	<i>E. coli</i> XL1Blue/pBHR68'in erlende inkübasyonu ile PHB üretimi sürecindeki OD ₆₀₀ ve CFU/mL-zaman grafiği	67
Şekil 44.	<i>E. coli</i> XL1Blue/pBHR68'in erlende inkübasyonu ile PHB üretimi sürecindeki kuru hücre ağırlığı (g/L), glukoz konsantrasyonu (µg/mL), OD ₆₀₀ -zaman grafikleri.....	68
Şekil 45.	<i>E. coli</i> XL1Blue/pBHR68'in erlende inkübasyonu ile PHB üretimi sürecindeki besiyerinin glukoz konsantrasyonu (µg/mL) ve CFU/mL-zaman grafiği	68
Şekil 46.	<i>E. coli</i> XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki OD ₆₀₀ - zaman grafiği.....	69
Şekil 47.	<i>E. coli</i> XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki CFU/mL-zaman grafiği.....	69
Şekil 48.	<i>E. coli</i> XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, 12, 24, 48. saatlerde üretilen PHB (%) miktarları	70

Şekil 49.	Klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki besiyerinin Glukoz konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)-zaman (saat) grafiği	70
Şekil 50.	Klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecinde elde edilen kuru hücre ağırlık (g/L) oranları.	71
Şekil 51.	MBD ve klasik fermentasyonla, 350 rpm çalkalama hızında ve 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki OD_{600} -zaman grafiği	72
Şekil 52.	MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 ve 5000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında, PHB üretimi sürecindeki CFU/mL- zaman grafiği.....	72
Şekil 53.	Klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 ve 5000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve 0,8 vvm oksijen varlığında elde edilen kuru hücre ağırlığı (g/L) oranları.....	73
Şekil 54.	Klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 ve 5000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve 0,8 vvm oksijen varlığında elde edilen PHB (%) miktarları	73
Şekil 55.	Klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve 0,8 vvm oksijen varlığında PHB üretimi sürecindeki besiyerinin glukoz konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$)-zaman grafiği	74
Şekil 56.	GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucu elde edilen protein miktarı ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	75
Şekil 57.	GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucu elde edilen kuru ağırlık (g/L)	75
Şekil 58.	GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucunda elde edilen bakteri yoğunluğu	76
Şekil 59.	GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucunda elde edilen CFU/mL profili	76

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. PHA üretici bakteriler.....	9
Tablo 2. FAE'ların sınıflandırılması.....	21
Tablo 3. Çalışmada kullanılan bakteri suşları.....	30
Tablo 4. Çalışmada kullanılan vektörler ve özellikleri.....	31
Tablo 5. Dizayn edilen ekspresyon primerleri.....	33
Tablo 6. Co-Affinite kromotografisinde kullanılan tamponlar.....	39
Tablo 7. GthFAE'in kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , K_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri).....	66
Tablo 8. GthFAE-His'in kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , K_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri).....	66
Tablo 9. Klasik ve MBD fermentasyonların kLa (h^{-1}) değerleri.....	74
Tablo 10. GthFAE'in diğer mikroorganizmalara % aminoasit benzerliği.....	80

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

Amp	: Ampisilin
bp	: Baz çifti
BSA	: Sığır serum albumini
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CFU/mL	: 1 mL’de koloni oluşturan hücre sayısı
CoCl ₂	: Kobalt klorür
Da	: Dalton
DCW	: Kuru hücre ağırlığı
ddH ₂ O	: Çift distile su
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotittrifosfat
DO	: Çözünmüş oksijen
DTT	: Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiaminotetraasetik asit
EM	: Elektron mikroskobu
FAE	: Ferulik asit esteraz
g	: Gram
HA	: Hidroksialkanoat
IPTG	: Isopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid
kan	: Kanamisin
kb	: Kilo baz
KCl	: Potasyum klorür
kDa	: Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	: Potasyum fosfat monobazik
K ₂ HPO ₄	: Potasyum fosfat dibazik
kLa	: Volumetrik kütle transfer kat sayısı
<i>lacZ</i>	: Beta- galaktosidaz geni
L	: Litre

LB	: Luria Bertani Sıvı Besiyeri
M	: Molar
MBD	: Microbubble dispersion
MCA	: Metil kafeat
MFA	: Metil ferulat
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
MpCA	: Metil p-kumarat
MSA	: Metil sinapat
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum dihidrojen fosfat
NCBI	: National Centre for Biotechnology Information
nM	: Nanomolar
nmol	: Nanomol
OD	: Optik Yoğunluk
OSX	: Oat spelt ksilan
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHA	: Polihidroksialkanoat
PHB	: Polihidroksibutirat
P(3HB)	: Poli (3-hidroksibutirat)
P(3HV)	: Poli (3-hidroksivalerik asit)
PMSF	: Fenil metan sulfonil florid
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
<i>rpoB</i>	: DNA-directed RNA polymerase, beta alt ünitesi
rRNA	: Ribozomal RNA
SBP	: Şeker pancarı kağıt hamuru

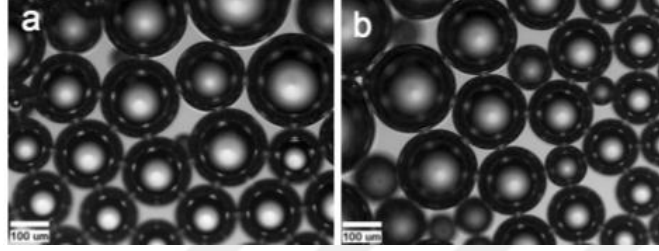
SDS	: Sodyum dodesilsulfat
sn.	: Saniye
T _m	: Erime Sıcaklığı
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
vvm	: Volumetric flow rate of gas per minute per volume of liquid (Bir dakikada bir litre sıvıdan geçen gazın akış hızı)
WB	: Buğday kepeği
X-gal	: 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranosid
γ	: Gama
β	: Beta
Δ	: Delta
α	: Alfa
°C	: Derece
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
μmol	: Mikromol

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

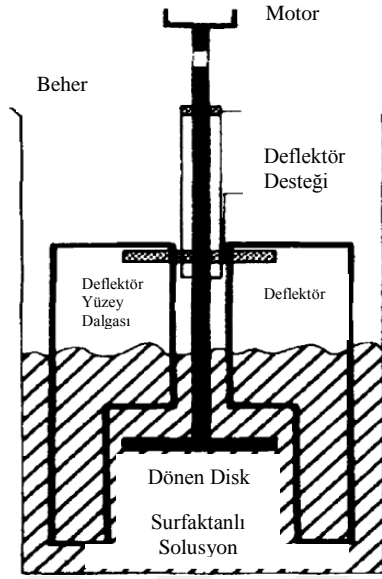
Birçok önemli endüstri dalında, ihtiyaç duyulan enzimlerin büyük ölçekli ve daha ucuz üretimi oldukça önemlidir. Bunun için de fermentörlere ihtiyaç vardır. Fakat fermentörlerde bazı sorunlardan dolayı üretim maliyeti oldukça artmaktadır. Endüstriyel fermentasyonlarda mikroorganizmaların üremesini en fazla etkileyen işlem, kütle transfer işlemidir. Mikroorganizmalar, sürekli bir şekilde besin maddelerini tükettikleri için, fermentasyondaki besin maddelerinin sürekli olarak yenilenmesi gerekmektedir. Glukoz veya amonyak gibi besinler, fermentasyon ortamına 1 mol/L konsantrasyonunda ilave edilirler ve bunların kütle transfer problemleri azdır. Aerobik fermentasyonlarda besin olarak oksijen de gereklidir. 35°C'de saf sudaki oksijenin çözünürlüğü, 0,217 mmol/L'dir. Mikroorganizmaların üremesi için gerekli olan tuz ve diğer besinler bu oranı düşürür. Bu nedenle, aerobik fermentasyondaki en büyük problem, yüksek oksijen kütle transfer oranının kazanılmasıdır. Fermentörlerdeki oksijen transportu, kabaca baloncuk yüzey alanının baloncuk hacmine oranıyla doğru orantılıdır. Yani oksijen transportu, gaz baloncuklarının yarıçapıyla ters orantılıdır. Genellikle, baloncuklar ne kadar küçükse, fermentördeki oksijen transfer oranı o kadar yüksektir. Küçük baloncuklar fermentörde daha fazla kalabildiğinden dolayı, mikroorganizmalar için daha fazla oksijen sağlanmış olur. Endüstriyel fermentörlerdeki karıştırıcılar, baloncuk boyutunu küçültmektedir. Buna rağmen, küçük baloncuklar hızlıca bir araya toplanırlar, bu nedenle fermentördeki geri kalan baloncuklar yaklaşık olarak 3-5 mm çapında olurlar. Fermentasyon besiyerinde oksijen seviyesini arttırmanın klasik metodu; çalkalama hızını, gaz akış hızını veya oksijen basıncını arttırmaktır. Bu da kullanılan enerjinin ve dolayısıyla maliyetin artmasına sebep olmaktadır. Bu klasik yöntemlere rakip olabilecek ve kullanılan enerjiyi ve dolayısıyla maliyeti düşürecek diğer bir yöntem mikrobaloncukların kullanımınıdır. Fermentörlerde kullanılacak bu mikrobaloncukların oksijenin kütle transfer oranını arttırdığı kanıtlanmıştır (Hensirisak vd., 2002). Bu sistemin en önemli avantajı, çok düşük çalkalama hızlarında bile kütle transferinin mikrobaloncuklar sayesinde artmasıdır. Mikrobaloncuk fermentasyonda fermentör tankına aktarılan baloncukların çapı 20-1000 µm arasında değişir (Şekil 1). Klasik fermentasyonda ise çalkalama ile oluşan baloncukların boyutları

ise 3-5 mm çapındadır. Yani çok daha büyüktür. Dolayısıyla mikrobaloncuk fermentasyonda baloncukların çapı daha küçük olduğundan dolayı oksijen tutulumu ve miktarı daha fazla olur. Aynı çalkalama hızında mikrobaloncuk fermentasyonda klasik fermentasyona göre kLa (volumetrik kütle transfer kat sayısı) değerlerinde %30'lara varan artış görülmüştür (Hensirisak vd., 2002).

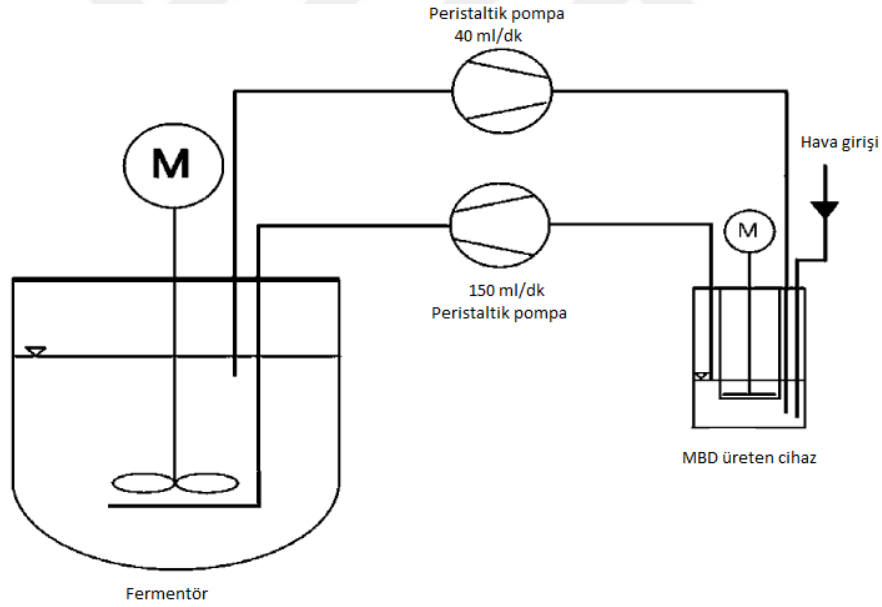


Şekil 1. Mikrobaloncukların mikroskop görüntüleri. a) Disk hızı 4000 rpm, 1vvm oksijen b) Disk hızı 5000 rpm, 1vvm oksijen (Zhao vd., 2014)

Weber ve Agblevor, yüksek ölçekli selüloz üretiminde ilk kez mikrobaloncuk yöntemini kullanmışlardır (Weber ve Agblevor, 2005). ABD’de yapılan bu çalışmada, besiyerindeki oksijen transferini etkili bir şekilde arttırmışlardır. Düşük karıştırma oranında bile, çözülmüş oksijen konsantrasyonu kritik konsantrasyon seviyesinin üzerindedir. Bu hızlı çoğalma aşamasında, hücre kütle konsantrasyonu hızlı bir şekilde artmıştır. Bu sayede, klasik karıştırma işlemi yerine MBD (micro bubble dispersion/mikrobaloncuk dispersiyon) kullanıldığında hücre kütle verimi, saatte 0,10 dan 0,18 g/L’ye çıkmıştır. Aynı zamanda MBD yöntemiyle, düşük karıştırma hızında (350 rpm) kLa (volumetrik kütle transfer kat sayısı) değeri beş kat artmıştır. Ayrıca yine ABD’de 2014 yılında yapılan başka bir çalışmada; mikrobaloncuklarla desteklenen fermentasyon besiyerinde, çözülmüş oksijen miktarının %60’tan %85’e yükseldiği ve yükselen oksijen miktarının *Nicotiana tabacum*’un saçak kök kültürlerinde metabolit üretimini teşvik ederek, besiyerinde üretilen nikotin miktarını arttırdığı tespit edilmiştir (Zhao vd., 2014). Bu sonuçlar büyük ölçekli fermentasyonlarda daha az enerji harcanmasını sağlayarak maliyetin düşürülmesinde büyük avantaj sağlayacağını göstermektedir (Zhang vd., 2005; Weber ve Agblevor, 2005; Hensirisak vd., 2002). Mikrobaloncuk üreten cihazın ve bu cihazın fermentörle birlikte çalışma prensibinin şematik görüntüsü Şekil 2 ve 3’te verilmiştir.



Şekil 2. Mikrobaloncuk üreten diskin şematik görüntüsü (Zhang vd., 2005)



Şekil 3. Mikrobaloncuk üreten cihazın fermentörle çalışma mekanizmasının şematik görüntüsü (Zhang vd., 2005)

Mikrobaloncukların kullanımının küçük hacimli (1 L) fermentörlerde kuru hücre ağırlığında önemli derecede artışa sebep olduğu ve kLa değerini artırdığı yukarıda bahsedilen çalışmalarda kanıtlanmıştır. Klasik ve mikrobaloncuk fermentörlerdeki enerji kullanımını karşılaştırmak için yapılan bir çalışmada, küçük hacimli (1 L) fermentörlerde klasik fermentöre göre kullanılan enerjide önemli bir kazanım sağlanamamıştır. Buna

rağmen fermentör hacmi arttırıldığında (50 L ve yukarısı) klasik fermentörde kullanılan enerjiden üç kat daha düşük enerji kullanılarak üretim yapılabileceği kanıtlanmıştır. Bunun sebebi de mikrobaloncuklar sayesinde oksijenin kültürde daha fazla tutulumudur.

Yapılan çalışmalar fermentörün hacmi arttıkça kazanılan enerjinin daha fazla olacağını göstermektedir. Küçük hacimli fermentörlerde, düşük çalkalama hızında, oksijen tutulumunun az da olsa arttırılması, büyük ölçekli fermentörlerde enerjiden çok daha fazla kazanım olacağını gösterir. Dolayısıyla endüstriyel boyutta büyük ölçekli üretimlerde bu metot ile beraber maliyet oldukça düşebilecektir (Hensirisak vd., 2002; Zhang vd., 2005).

E. coli'de aerobik olarak bir enzim üretimi yapılabilmesi için fermentasyon ortamını iyice havalandırmak gerekir. Bu nedenle de genellikle çalkalama hızı arttırılmaktadır. Buradaki temel sorun, fermentasyon besiyerinde oksijenin çok az çözünmesi ve bundan kaynaklı olarak besiyerini havalandırmak ve çalkalamak için daha fazla enerjiye ihtiyaç olmasıdır. Endüstriyel olarak önemli enzimlerin büyük ölçekli üretiminin daha az maliyetle üretimi bu sebeple oldukça önemlidir.

1.2. Biyolojik Olarak Parçalanabilen Plastikler

Plastikler sağlamlık, hafiflik, dayanıklılık ve parçalanmalara karşı dirençlilik gibi çok yönlü özelliklere sahip materyallerdir. Bunların yapıları kimyasal olarak manipule edilerek çok çeşitli esneklikte ve şekillerde üretilebilirler. Moleküler ağırlıkları 50.000-1.000.000 Da arasında değişiklik gösterirler. Otomobilden ilaç sektörüne kadar birçok endüstri alanında kullanılırlar (Reddy vd., 2003). Plastik üretiminde yaygın olarak sentetik polietilen, polivinil klorid ve polistiren kullanılmaktadır (Reddy vd., 2003). Toplam global plastik eşya üretimi, 1950'de 1,5 milyon ton iken, 2008 yılında 245 milyon tona ulaşmış, yıllık %9 büyüme oranı göstermektedir (Chanprateep, 2010). Hayatın kalitesini ve konforunu arttırmak için oldukça fazla kullanım alanına sahiptir. Paketlemede kağıt ve camın yerini alarak endüstride çok önemli bir yere sahip olmuştur. Fakat kullanım alanları arttıkça da kendi problemlerini beraberinde getirmişlerdir. Çevrede plastiklerin birikmesi ve bozunmadan yıllarca kalıp çevre kirliliğine sebep olması bütün dünyanın sorunu haline gelmiştir. Plastik atıkların yönetiminde kullanılan çözümler arasında kaynakları azaltma, yakma, geri dönüşüm ve biyo veya foto parçalama bulunmaktadır. Fakat bunların çoğu problemlidir. Plastikleri yakma potansiyel olarak tehlikelidir ve pahalıdır. Bu yakım esnasında akrinonitril tabanlı plastiklerden siyanid gazı oluşmakta ve sağlık

problemlerine yol açabilmektedir. Plastiklerin geri dönüşümü yapılabilir fakat çok meşakkatlidir. Atılan çok çeşitli plastiklerin ayrıştırılması ve sınıflandırılması zaman alıcı süreçlerdir. Pigment, kaplamalar ve dolgu maddeleri geri dönüştürülen plastiklerin kullanımını kısıtlamaktadır. Kısaca tüm bu çevre kirliliği ve problemlerin üstesinden gelebilmek için tek çözüm biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin kullanılmasıdır.

Biyolojik olarak parçalanabilen plastikleri üçe ayrılabilir.

1. Kimyasal olarak sentezlenen polimerler

Poliglikolik asit, polilaktik asit, poli(ϵ -kaprolakton), polivinil alkol, poli(etilenoksit) bu kategorideki parçalanabilen plastiklerdendir. Bunlar enzimatik ve mikrobiyal saldırılara karşı duyarlıdır. Plastiklerin her özelliğiyle uyuşmadıklarından dolayı ticari olarak plastiklerin yerine geçebilecek uygunlukta değildirler.

2. Nişasta tabanlı biyoparçalanabilen plastikler

Bu kategorideki plastiklere dolgu maddesi ve çapraz bağlayıcı ajan olarak nişasta eklenmiştir ve plastik-nişasta karışımı elde edilmiştir. Nişasta-poliyeten buna örnektir. Toprak bakterileri nişastayı kolayca parçalayabilir. Bu sayede de polimer matriksi parçalanmış olmaktadır. Bu olay parçalanma süresini oldukça azaltmaktadır fakat bu tür plastikler kısmen parçalanabilir özelliktedirler. Nişasta parçalanmasından sonra kalan kısımlar uzun yıllar parçalanmadan kalabilmektedirler.

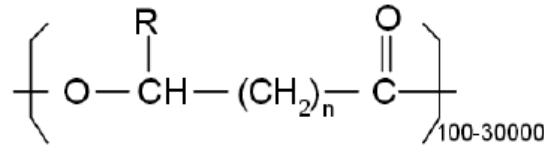
3. Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar)

Bu plastikler %100 olarak parçalanabilen tek plastiklerdir. Birçok mikroorganizma tarafından ortamda ana besin maddesi olarak nitrojen veya fosfor varsa enerji deposu olmak üzere sentezlenirler. Polipropilen gibi sentetik birçok termoplastiklere benzer özelliklere sahiptirler. Aerobik şartlarda topraktaki, göldeki ve lağımlardaki mikroorganizmalar tarafından tamamen su ve karbondioksite, anaerobik şartlarda metana parçalanabilirler. Polihidroksibutirat (PHB) ilk keşfedilen ve çokça çalışılmakta olan PHA'dır. Bakteriler PHB'ı yaklaşık kuru ağırlıklarının % 80'ine kadar bünyelerinde biriktirebilirler. Kimyasal özellikleri, kalıptan çekilebilme, şekil verilebilme, diğer sentetik polimerlerle birleştirilerek heteropolimer yapılabilme gibi birçok özellikleri bakımından polipropilen veya poliyeten gibi klasik plastiklerin özelliklerine çok benzerdir. Tüm bunlara rağmen yüksek maliyeti açısından klasik plastiklerin yerine tamamen biyoparçalanabilen plastikler olan PHB'lar hala çok fazla tercih edilmemektedir (Khanna ve Srivastava, 2005).

1.2.1. PHA'lar ve Kullanım Alanları

Birçok çeşit biyoplastikten polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), en iyi bilinen ve tamamen biyosentetik olan ve sıfır toksik atıkla parçalanan olarak tanımlanmıştır. PHA'lar hidroksialkanoatların (HA'lar) poliesterleridir ve genel yapısı Şekil 4'te gösterilmiştir.

Birçok bakteri tarafından hücre içi karbon ve enerji stoğu olarak sitoplazmada granüller halinde birikirler (Chanprateep, 2010). Uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulmaktadır. Bu hücre içi depo materyalinin birikimi, genellikle fazla karbon kaynağı varlığında, üreme için gerekli azot kaynağının, oksijenin ve fosfor, kükürt, magnezyum, potasyum, demir gibi temel besin maddelerinin eksikliğinde olmaktadır (Jan vd., 1996). PHA'lar; sukroz, nişasta, selüloz, triaçilgliserol gibi yenilenebilir kaynaklardan; metan, mineral yağ, lignit gibi fosil kaynaklardan; propiyonik asit, 4-hidroksi-butirik asit gibi kimyasallardan ve karbondioksit gibi çeşitli birçok substrattan üretilebilmektedir (Reddy vd., 2003). Isıya karşı esnek ve değişik mekanik özelliklerde 150'den fazla PHA monomeri rapor edilmiştir. Erime sıcaklıkları 50-180°C'dir. PHA'ların moleküler ağırlıkları, üreten organizmaya bağlı olarak 50.000-1.000.000 Da arasında değişiklik gösterir.



POLİMER

n=1	R=hidrojen	Poli(3-hidroksipropionat)
	R=metil	Poli(3-hidroksibutirat)
	R=etil	Poli(3-hidroksivalerat)
	R=propil	Poli(3-hidroksiheksanoat)
	R=nonil	Poli(3-hidroksidodekanoat)
	R=metil	Poli(3-hidroksibutirat)
n=2	R=hidrojen	Poli(4-hidroksibutirat)
n=3	R=hidrojen	Poli(5-hidroksivalerat)

Şekil 4. Polihidroksialkanoatların genel yapısı

Monomer birimlerinin hepsi D- konfigürasyonundadır (Reddy vd., 2003). PHA'ların yapılarına bağlı olarak birçok özellikleri vardır. PHA'ların homopolimerleri, random kopolimeri, blok kopolimerleri bakteriyal tür ve üreme şartlarına göre değişiklik göstermektedir (He vd., 1999). PHA'ları değişik kriterlere göre de sınıflandırmak mümkündür. Genellikle PHA'lar zincirlerindeki karbon atomlarının sayısına bağlı olarak; 3-5 karbonlu kısa zincirli PHA'lar (*scl-PHA*), 6-14 karbonlu orta zincir uzunluğundaki PHA'lar (*mcl-PHA*) ve 14 karbon atomundan fazla karbon atomu içeren uzun zincirli PHA'lar (*lcl-PHA*) olmak üzere 3 gruba ayrılabilir. Bu farklılık, belirli sayıda karbon atomu içeren 3-hidroksialkanoatları tanıyan PHA sentezinin substrat spesifikliğinden kaynaklanmaktadır. Farklı tip PHA'lar değişik bakteriler kullanılarak elde edilir. Mesela, *Alcaligenes eutrophus* bakterisi poli-3-hidroksibütirat gibi kısa zincirli PHA üretirken, *Pseudomonas oleovorans* bakterisi ise orta zincir uzunluğunda PHA'lar üretir. Bu çeşitlilik sayesinde PHA'lar, bioparçalanabilir implantlarda, biofuel üretiminde, ilaç veya kiral ara ürünlerin geliştirilmesi gibi değişik alanlarda kullanılabilirler. PHA'ların oligomerleri hayvanlar için besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. 20'den fazla şirket, PHA'ları ticari olarak kullanmaktadır (Chen, 2010). Bakteri-bazlı PHB'nin petrol-bazlı polietilen ve polipropilene eşdeğer hatta bazen daha üstün özelliklere sahip, biyo-çözünür ve biyo-uyumlu bir malzeme olması, bu biyo-plastik grubunun endüstriyel öneminin her gün artmasına sebebiyet verir. Imperial Kimya Endüstrisi (*Imperial Chemical Industry – ICI*) tarafından üretilen ilk PHA ko-poliesterlerinden biri olan BIOPOL®'ün üretiminden bu güne kadar biyoplastik endüstrisi çok gelişmiştir. BIOPOL® ilk olarak şişeleme ve paketleme endüstrisinde kullanılmasına rağmen zamanla tıbbi malzeme, tarımsal ürünler, protezler, hijyen ürünleri, sentetik kan damarı gibi biyo-malzemeler ile, yapışkanlar gibi gündelik kullanımda ihtiyaç duyulan birçok plastikte ve ileri teknoloji polimer sistemlerinde kullanılmaya başlanmıştır (Chen, 2009).

PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. İnsan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır (Holmes, 1985). PHB'lar tarımda; toprakta parçalanma gerektiren uygulamalar ve kaplama işlemlerinde kullanılabilir. Biyoplastikler, ekin sulaması için yapılan olukların üretiminde tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre ve pestisitlerin kontrollü salınımında plastik kılıflar olarak da kullanılabilir (Holmes, 1985). (R)-hidroksi karboksilik asitler, büyük oranda antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve

feromonlar gibi ince kimyasalların sentezi için kiral yapı blokları olarak kullanılabilirler. Birçok ilaç, sadece bir kiral formda aktiftir ve D-3-hidroksibütirat böyle bileşiklerin organik sentezinde bir çimento bloğu gibi kullanılır. D-3-hidroksibütirat monomerinden, Hindistan mısırındaki haşaratın bir seks hormonu, bir balarısı hormonu, Cerambycidae familyasından bir böceğin koruyucu substratı ve güzel koku olarak S-citronellol gibi altı saf kimyasalın organik olarak sentezlendiği belirtilmiştir (Holmes, 1985). Ayrıca, biyoplastikler, özellikle uzun yan zincire sahip olan PHB'lar, basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılabilirler. Lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların üretiminde de PHB kullanılmaktadır (Madison ve Huisman, 1999; Lootz vd., 2001). PHB ve kopolimerlerinin mekanik özellikleri polietilen, polipropilen vs. gibi bazı ticari plastiklere benzediğinden termoplastik poliesterlerdir. PHB daha kırılğan olması ve zayıf çözgen dayanıklılığı dışında, polipropilenle benzer özelliklere sahiptir (Yılmaz, 2003). Düşük su buharı geçirgenliği gibi besin paketleme endüstrisi açısından önemli olan bir özelliği ile de, düşük yoğunluklu polietilene benzemektedir. PHB mükemmel olan gaz bariyer özelliğinden dolayı, film şeklinde kaplamacılıkta kullanılmıştır. Kanada'daki Hamur ve Kağıt Araştırma Enstitüsü, Montreal'deki Mc Gill Üniversitesi ile PHA üreten bir firma olan Ecole Politeknik ve Imperial Kimya Şirketi arasındaki ortak bir projeyle PHB, kaplanmış kağıt ve yüksek kalitede film yapmak için kullanılmıştır. Bu kaplanmış kağıtlar tamamen biyolojik olarak parçalanabilmektedir ve ticari olarak, kaplanmış kağıtlarda geri dönüşüm daha kolay olmuştur (Yılmaz, 2003).

Doğaya dost bu plastiklerin kullanımı doğada parçalanamayan plastiklerin sebep olduğu kirliliğin üstesinden gelebilecek çok iyi bir çözümdür.

1.2.1.1. PHA Sentezleyen Mikroorganizmalar

Toprak bakterilerinin %30'unda PHA sentezlenebilmektedir (Wu vd., 2000). Açık denizlerde, ve ekstrem koşullarda yaşayan bakteriler de PHA üretme yeteneklerine sahiptir. Şimdiye dek 300 farklı mikroorganizmanın PHA sentezlediği görülmüştür fakat bunlardan çok azı PHA'nın yüksek ölçekli üretiminde kullanılmaktadır. Bu organizmalar, *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha* veya *A. eutrophus* olarak bilinir), *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *P. oleovorans*, *Pseudomonas denitrificans*, *Protomonas extorquens* ve rekombinant *E. coli*'dir (Steinbuchel ve Valentin, 1995; Lenz, 2007; Lee, 1996).

PHA elde edilmesinde kullanılan bakteriler, sentez için gereken kültür şartlarına bağlı olarak iki gruba ayrılabilir: Birinci grup bakteriler PHA sentezi için karbon kaynağının fazlalığına ve azot, fosfor, magnezyum, kükürt gibi temel besinlerin sınırlandırılmasına ihtiyaç duyarken (örneğin; *A. eutrophus*), ikinci grup bakteriler PHA sentezi için besin sınırlandırılmasına ihtiyaç duymamakta ve gelişme boyunca polimer biriktirebilmektedir (örneğin; *A. vinelandii* mutant suşu) (Khanna ve Srivastava, 2005).

Değişik substratlar varlığında üretilen PHA'lar ve üreticileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. PHA üretici bakteriler (Reddy vd., 2003)

Mikroorganizma	Karbon kaynağı	PHA	PHA içeriği(%w/v)
<i>A. eutrophus</i>	Glukonat	PHB	46-85
	Propionat	PHB	26-36
	Oktanoat	PHB	38-45
<i>Bacillus megaterium</i> <i>QMB1551</i>	Glukoz	PHB	20
Rekombinant <i>Klebsiella</i> <i>aerogenes</i>	Molaz	PHB	65
<i>Methylobacterium</i> <i>rhodesianum</i> MB 1267	Fruktoz/Methanol	PHB	30
<i>Methylobacterium</i> <i>extorquens</i> (ATCC 55366)	Methanol	PHB	40-46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sütleğen ve hint yağı	PHB	20-30
<i>P. denitrificans</i>	Methanol	P(3HV)	0,02
	Pentanol	P(3HV)	55
<i>P. oleovorans</i>	Glukonoat	PHB	1,1-5
	Oktanoat	PHB	50-68
<i>Pseudomonas putida</i> <i>GPP104</i>	Oktanoat	PHB	14-22
<i>P. putida</i>	Palm çekirdeği yağı	PHA	37
	Laurik asit	PHA	25
	Miristik asit	PHA	28
	Oleik asit	PHA	19
	Glukoz	PHB	40
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glukoz	PHB	40

1.2.1.2. PHA'ların Biyosentezi

Asetil-CoA, PHA sentetazın substratı olarak kullanılan, değişik uzunluktaki 3-hidroksialkanoyil-CoA üretimi için anahtar bileşendir. 3-hidroksialkanoyil-CoA, aynı zamanda değişik uzunluktaki yağ asitlerinden β -oksidasyon ile de üretilmektedir. Enzim kodlayan birçok gen, direk veya indirek olarak PHA sentezinde görev yapar. PHA'ların biyosentezi sekiz değişik biyokimyasal yolla özetlenebilir (He vd., 1999).

İlk yolda, üç anahtar enzim görev alır, β -ketotiyolaz, NADPH-bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz ve PHA sentaz. Bunlar sırasıyla, *phaA*, *phaB* ve *phaC* genlerinden kodlanır. *R. eutropha*, bu yolla PHA sentezleyen bir organizmadır. İkinci PHA sentez yolu, mikroorganizmalar tarafından yağ asidi alınımıyla alakalıdır. Yağ asidi β -oksidasyonundan sonra, asetil-CoA PHA monomer sentez sürecine katılır. 3-ketoaçil-CoA redüktaz, epimeraz, (R)-enol-coA hidrataz/enol-coA hidrataz I, açil-CoA oksidaz ve enol CoA hidrataz I PHA sentezi için gerekli olan PHA öncülü 3-hidroksiaçil-CoA'nın üretimi için gerekli olan enzimlerdir. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Aeromonas hydrophila* bu yolla orta uzunlukta PHA veya (R)-3-hidroksibütirat (R3HB) ve (R)-3-hidroksihekzanoat (PHBHHx) kopolimerlerini üretmektedir. Üçüncü yolda; 3-hidroksiaçil-ACP-CoA transferaz (PhaG) ve malonil-CoA-ACP transaçilaz (FabD), 3-hidroksiaçil-ACP elde etmek için kullanılmaktadır. Bundan da 3-hidroksiaçil-CoA monomeri üretilerek PHA sentaz tarafından PHA üretimi sağlanmış olur. Dördüncü yolda; (S)-3-hidroksibütiril-CoA, NADH-bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz ile okside edilir. Beşinci yolda; suksinik semialdehit dehidrogenaz (SucD), 4-hidroksibütirat dehidrogenaz (4hbD) ve 4-hidroksibütirat-CoA:CoA transferaz (OrfZ) kullanılarak 4-hidroksibütiril-CoA ve buradan da PHA sentezlenir. Bu yol, *Clostridium kluyveri* de keşfedilmiştir (Valentin ve Dennis, 1997). Altıncı yolda; laktonaz ve hidroksiaçil-CoA sentaz kullanılarak, 4,5-alkanolakton, PHA sentezi için 4,5-hidroksiaçil-CoA'ya dönüştürülür. Yedinci yolda; *A. hydrophila* 4AK⁺'te bulunan alkol dehidrogenaz kullanılır. 1,4-butanediol, 4-hidroksibütirata ve ardından 4-hidroksibütiril-CoA'ya okside edilerek PHA üretilir (Xie ve Chen, 2008). Sekizinci yolda; 6-hidroksi-hekzanoat, 6-hidroksihekzanoat-PHA'ya sekiz enzim ile dönüştürülür.

1.2.1.2.1. PHA Oluşumundaki Genetik Faktörler

PHA sentezleyen genler *phaA*, *phaB* ve *phaC* biraradadır ve tek bir operonda (*phbCAB*) bulunurlar. PHA oluşumu için lokuslar tarafından kodlanan genler, 18 farklı bakteri türünden karakterize edilmiştir. P(3HB)'nin biyosentezindeki çeşitlilik *pha* lokusunun ne kadar çeşitli olabileceğinin göstergesidir. Gen organizasyonları türden türe değişiklik göstermektedir. *Acinetobacter* sp., *A. latus*, *Pseudomonas acidophila* ve *R. eutropa*'da *phbCAB* genleri kromozom üzerinde ardarda dizilidir. *P. denitrificans*, *Rhizobium meliloti* ve *Zoogloea ramigera*'da *phbAB* ve *phbC* lokusları bağlantısızdır. *Chromatium vinosum*, *Thiocystis violacea* ve *Synechocystis*'te PHA polimerazın *phbE* ve *phbC* genleri tarafından kodlanan iki alt birimi vardır. *phbAB* ve *phbEC* genleri tek bir lokustadır fakat birbirinden uzakta bulunmaktadır. *C. vinosum*, *P. acidophila*, *R. eutropa*, *R. meliloti* ve *T. violacea* *phb* lokuslarında ekstra bir gene (*phbF*) sahiptir fakat bunun da PHA metabolizmasındaki görevi henüz aydınlatılamamıştır. *P. oleovorans* ve *P. aeruginosa*'da *pha* lokusu iki tane *phaC* genine sahiptir ve bu genlerin arasında hücre içi PHA depolimeraz kodlayan *phaZ* geni vardır. Sonuç olarak CAB operonunda genlerin sıralaması türler arasında korunmamıştır (Reddy vd., 2003).

1.2.2. Polihidroksibutiratlar (PHB'lar)

PHB en iyi bilinen PHA'dır ve fermentasyon stratejilerinin geliştirilmesinde kullanılan model üründür (Galehdari vd., 2009). İlk kez, Lemoigne tarafından, 1920'li yıllarda, topraktan izole edilen *B. megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksibütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri (PHB) olarak tanımlamıştır. Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson, *Bacillus* hücresi içinde PHB sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır (Braunegg vd., 1998; Anderson ve Dawes, 1990). PHB ile ilgili araştırmalarla, termoplastik ve elastomerik bir materyal olduğu anlaşılan polimer, patentli ürünlere dönüşmüştür (Poirier, 2002).

Araştırmacılar, PHB'in birçok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulduğunu ve PHB birikiminin genellikle, fazlaca karbon kaynağı varlığında, ancak üreme için gerekli nitrojen kaynağı, oksijen ve esansiyel elementler (N,

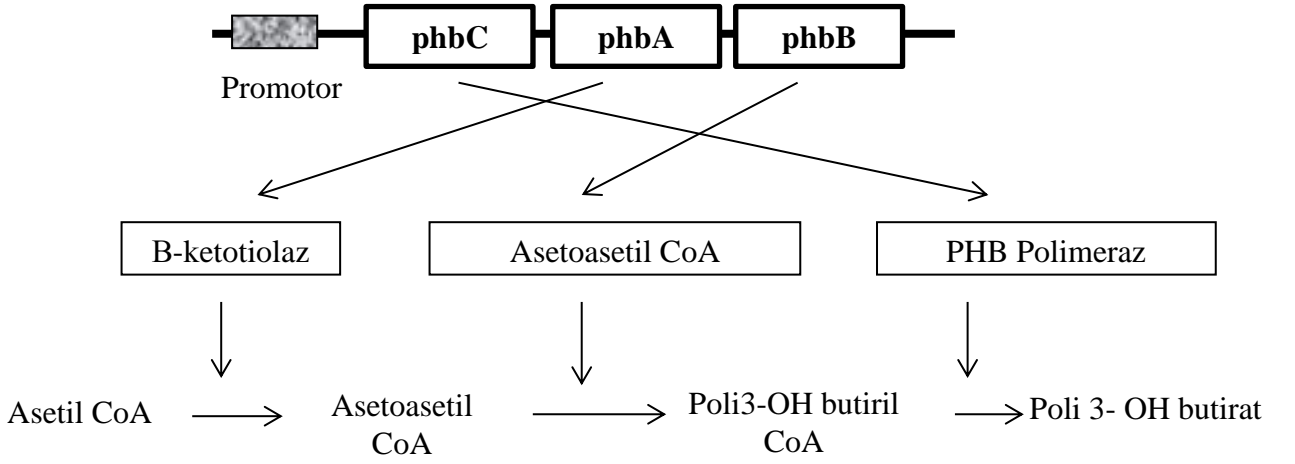
P, S, Mg, K, Fe vb.) gibi besleyici maddelerin eksikliğinde gerçekleştiğini bildirmektedirler (Valentin vd., 1994; McCool vd., 1996; Findlay ve White, 1983; Brandl vd., 1991; Anderson ve Dawes, 1990). Yapılan araştırmalarda, üreme ile PHB birikimi arasında yakın bir ilgi tespit edilmiştir. Buna göre, bakteri gelişiminin eksponansiyel fazında PHB birikimi artmakta iken geç eksponansiyel-erken durgun dönemde maksimum düzeye ulaşmaktadır (McCool vd., 1996). Üreme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir (Lee, 1996). Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Nickerson vd., 1981).

Düşük moleküler ağırlığa sahip olan ve depo edilmeyen formdaki bu PHA, P(3HB), *E. coli*'nin sitoplazmik membran ve sitoplazmasında bulunmaktadır. Bu PHA aynı zamanda maya, bitki ve hayvanların membranlarında da bulunmaktadır. Bunların, kalsiyum kanalları veya DNA transportunda, bağlandıkları makromolekülleri parçalayıcı enzimlere karşı koruma gibi fonksiyonları vardır (Dawes, 1973). PHB'ler genel olarak bakterilerde, hücre içinde birikerek kuru ağırlığın %90'ını oluşturabilirler ve besin stresi varlığında karbon ve enerji rezervi olarak kullanılırlar (Madison ve Huisman, 1999). PHB 3-5 karbon monomeri içeren kısa zincirli PHA'lardandır (Rahman vd., 2013).

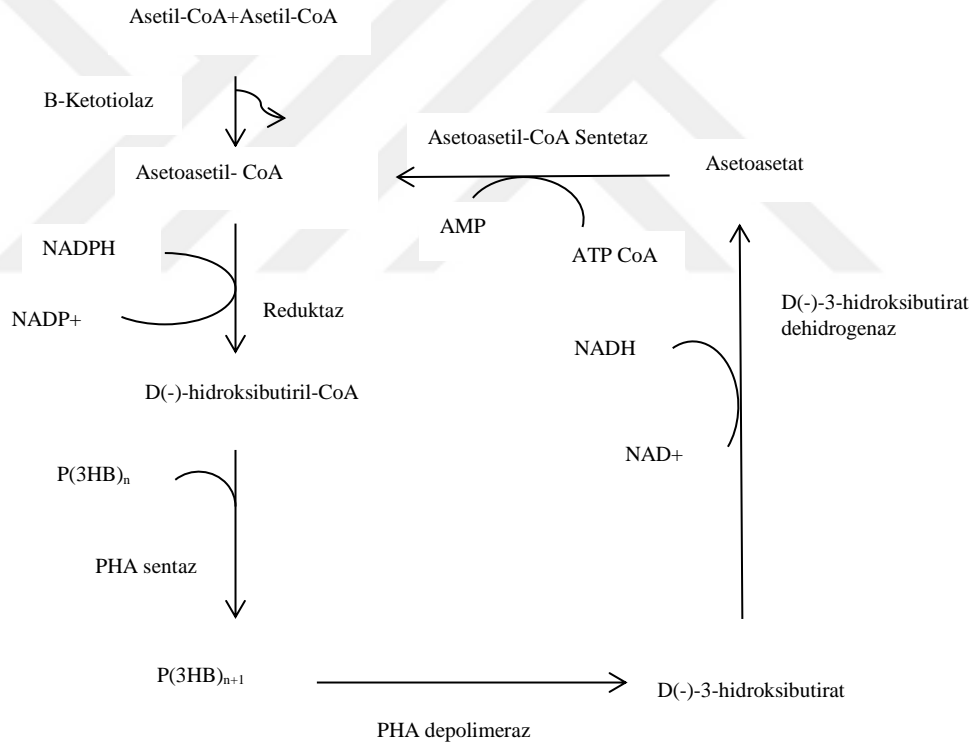
Yapılan elektron mikroskopu (EM) çalışmalarında, granülün içte yer alan bir merkezi kısım ve birkaç tabakalı membranla çevrilmiş kabuktan oluştuğu bildirilmiştir. PHB'lar, polipropilen gibi petrol türevli yaygın plastiklere benzer materyal özellikler gösterirler (Madison ve Huisman, 1999). Ancak, bir termoplastik olan PHB'nin sertliği, polietilene kıyasla dört misli fazladır. Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden özütlendiğinde kristalize olur (Madison ve Huisman, 1999; Dave, 1996).

1.2.2.1. PHB Sentez Mekanizması

PHB sentezinde üç anahtar enzim rol oynar; β -ketotiaz, NADPH-bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz ve PHA sentaz. Bunlar sırasıyla *phaA*, *phaB*, ve *phaC* genlerinden kodlanırlar. PHA depolimeraz, dimer hidrolaz, 3-hidroksibütirat dehidrogenaz, ve asetoasetil-CoA sentaz da PHA sentezi ve yıkımında yardımcı olan enzimleridir (Chen, 2010) (Şekil 5 ve 6).



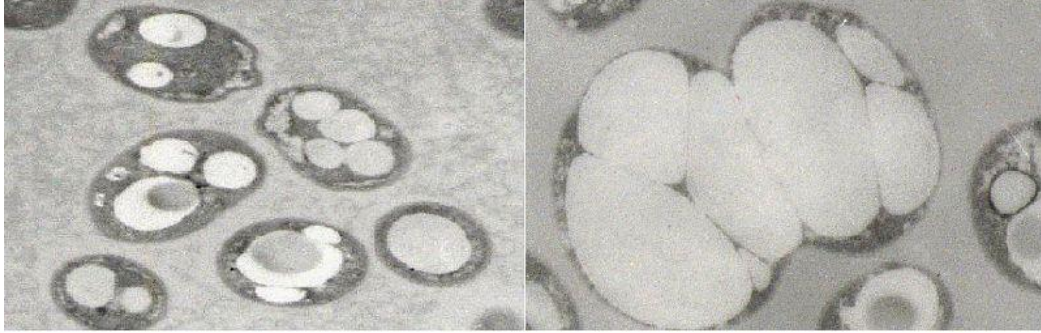
Şekil 5. Poli(3-hidroksibutirat)'ın biyosentezi. *phbCAB* operonu üç enzimi kodlar. Bu üç enzim ile üç basamakta P(3HB) sentezlenir (Madison ve Huisman, 1999)



Şekil 6. *A. eutrophus* bakterisine ait P(3HB)'nin metabolik yapım ve yıkımı (Lee, 1995)

PHB üretiminden sonra PHB polimerleri yüzeyinde PHA sentaz ve phasin (PhaP1) proteinleri tutunan hidrofobik kora sahip küresel granüller oluşturulur (Rahman vd., 2013) (Şekil 7). Faz kontrast veya EM kullanıldığında, bakteriyel hücrelerde PHB granülleri kolaylıkla gözlenebilir. PHB, genellikle küre şeklinde olup, her granül çap olarak 100-800

nm arasındadır. Bunlar 2-4 nm kalınlığında üniter olmayan bir membranla çevrilidir. Granüllerin yaklaşık %98'i PHB, %2'si ise protein içermektedir (Dunlop ve Robards, 1973).



Şekil 7. Bakteride PHB birikimi (Montoro vd; 2013)

1.2.2.2. PHA'ların Üretimi

PHA'nın bol miktarda üretimi için yarı kesikli (fed-batch) ve kesiksiz (continuous) fermentasyon gereklidir. PHA'nın yüksek verimlilikle elde edilmesi için ikinci gruba ait bakterilerin yarı kesikli kültürlerinde besin takviyesi stratejisi önemlidir. Mısır maserasyon sıvısı, maya özütü veya balık peptonu gibi kompleks nitrojen kaynakları, hücre çoğalmasını arttırmak için ilave edilebilmektedir.

Doğal (rekombinant olmayan) PHA üreten bakteriler, uzun jenerasyon süresine ve nispeten düşük optimum üreme sıcaklığına sahiptirler ve bu PHA üretici bakterileri lizis ederek ürettikleri PHA'ları elde etmek zordur. Buna rağmen *E. coli* gibi, PHA degradasyonu ve sentez yeteneğine sahip olmayan bakteriler, çok hızlı çoğalırlar (aynı zamanda yüksek sıcaklıklarda bile) ve bu bakteriler çok kolaylıkla lizis edilebilir. Hızlı üreyebildiklerinden dolayı, büyük miktarlarda polimerin birikmesini sağlarlar. Ayrıca ucuz substratları karbon kaynağı olarak kullanmaları (Hahn vd., 1995; Fidler ve Dennis, 1992), hücrelerin kolay lizis edilerek PHA granüllerinin saflaştırılıp elde edilmesi maliyetin düşmesine sebep olur. Bu nedenlerden dolayı PHA üretiminde rekombinat *E. coli* sıklıkla tercih edilir (Wang ve Bakken, 1998).

Ticari PHA üretim sistemlerinin başarılı olarak uygulanması için bütün fermentasyon koşullarını mutlaka standardize etmek gerekir. PHA'ların yüksek maliyetli üretimleri bunların kullanımını kısıtlamaktadır. Ürünün fiyatı tamamen kullanılan substratın

maliyetine, kullanılan substrattan üretilen PHA'nın verimine ve diğer süreçler için kullanılması açısından ürünün formülünün etkinliğine bağlıdır (Lee, 1996). Ticari uygulamalarda PHA'nın kullanımı, maliyetinden ötürü zorlaşmıştır. *A. eutrophus* bakterisi doğal konak olarak kullanılarak üretilen PHA'nın maliyeti kg başına 16 ABD dolarıdır. Bu da polipropilenden 18 kat daha pahalı demektir. PHA üreticisi olarak rekombinant *E. coli* kullanıldığında, bu fiyat kg başına 4 ABD dolarına düşürülmüştür; ancak bu fiyat petrokimyasal plastıklere göre yine de yüksektir. 1 kg polipropilen'in maliyeti yaklaşık 0,70 ABD dolarıdır (Zinn vd., 2001).

PHA'ların büyük ölçekli üretimleri biyoreaktörlerde genetik olarak değiştirilmiş *E. coli*'den yapılmaktadır. Rekombinant *E. coli*'nin kullanımındaki avantajlar; hızlı üreme, yüksek hücre yoğunluğu, birçok ucuz karbon kaynağını kullanabilme yetenekleri ve kolay saflaştırma (Khanna ve Srivastava, 2005). *E. coli*'nin aerobik olarak kültürü yapılırken fazla miktarda oksijen kaynağına gerek vardır. Bu nedenle oksijenin besiyerinde zayıf çözünürlüğünü arttırmak için çalkalama ve havalandırma hızını daha da arttırmak gerekmektedir. Bu da reaktörlerde kullanılan enerjiyi arttırarak bu süreci daha az ekonomik kılmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için oksijen kütle transferini iyileştirerek fermentasyon süreci boyunca daha az enerji kullanılmasını sağlayacak mikrobaloncuk sistemi geliştirilmiştir (Hensirisak vd., 2002).

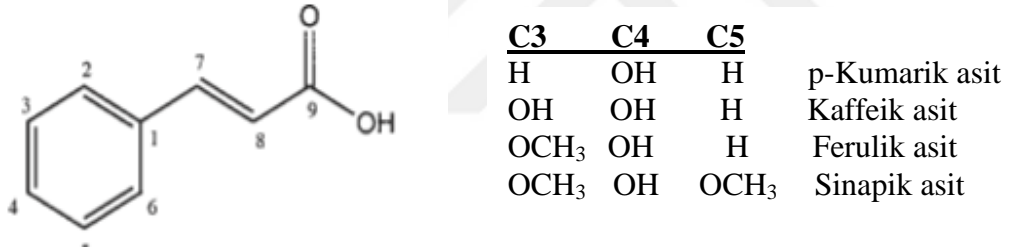
1.3. Ferulik Asit Esterazlar (FAE'lar)

Ferulik asit esterazlar (FAE'lar), bitki hücre duvarındaki polisakkarit ve fenolik asit arasındaki ester bağının yapımı ve yıkımını katalizleyen hidrolaz sınıfı enzimlerdir. FAE'lar (EC 3.1.1.73) sinnamoyl esterazlar ve sinamik ester hidrolazları içeren karboksilik asit esterazların (EC 3.1.1) bir alt sınıfıdır ve bu enzimler bitki hücre duvarındaki hemiselülozlar ve hemiselüloz-lignin arasındaki çapraz bağ için gerekli olan ferulat ester grupları arasındaki bağları kırar (Faulds ve Williamson, 1993). FAE'lar, feruloyl esteraz, sinnamoyl ester hidrolaz, sinnamoyl esteraz ve hidroksisinamoyl esterazlar olarak da adlandırılırlar. Mezofilik ve termofilik kaynaklı FAE'lar, sentetik hidroksisinamik asit metil esterleri (ferulik asit, diferulik asit, p-kumarik asit, sinapinik asit ve kafeik asit) üzerinde aktivite gösterirler (Şekil 8). Enzimin reaksiyonlar sonucu açığa çıkarttığı ferulik asit ($C_{10}H_{10}O_4$), fitokimyasal fenolik bileşiklerden türeyen, yaygın olarak bulunan bir hidroksisinamik asittir (Ou ve Kwok, 2004) ve kimyasal dönüşümle diğer kullanışlı

aromatik kimyasallara dönüşebilir (Mathew ve Abraham, 2006; Li vd., 2003; Ernst, 1992). Ferulik asit, sinamik asitten türevlenen fenilpropenoiddir (Şekil 9). Adı, Umbelliferae familyasının bir üyesi olan *Ferula foetida*'dan gelmiştir ve bu bileşik ilk kez 1866 yılında izole edilmiştir. Canlı organizmalarda, dopa deoksidant enzim inhibisyonu, indolasetat enzim inhibisyonu, mikroorganizma ve pestlere karşı koruma gibi fonksiyonları vardır (Mathew ve Abraham, 2006; Li vd., 2003; Ernst, 1992).

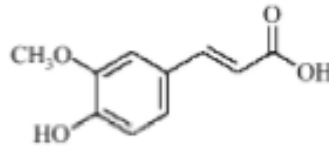
FAE'lara hemiselülaz yardımcı enzimler de denilmektedir çünkü ksilanaz, selülaz ve pektinazlarla beraber bitki hücre duvarındaki hemiselülozu sinerjik olarak çalışarak parçalayabilirler.

Ferulik asit ve FAE'larla alakalı yayınlar, yıllar geçtikçe artış göstermektedir. 1990-2000 yılları arasında 242 doküman yayınlanmışken, 2001-2008 yılları arasında bu sayı 548 olmuştur (Fazary ve Ju, 2007). Bugüne kadar FAE'ların mikrobiyal üretimini konu alan çalışmalar, mantar ve bakterilerden elde edilen FAE'ların izolasyon, saflaştırma ve karakterizasyonunu kapsamaktadır.



Sinamik asit

Şekil 8. Hidroksisinamik asitlerin kimyasal yapısı



Şekil 9. Ferulik asidin yapısı

1.3.1. FAE Üretici Mikroorganizmalar

Çalışılan FAE'ların çoğu mantar kökenlidir. Bakteri ve bitki FAE'ları hakkında çok az bilgi mevcuttur. İnsanların FAE sentezlemediği bilinmektedir bununla beraber

insanların tüm bağırsak florasında FAE aktivitesine rastlanmıştır. Bu da bağırsaklarda besinlerdeki liflerden fitofenollerin salınmasını sağlayabilen FAE'lerin varlığını göstermektedir (Kroon vd., 1997; Gonthier vd., 2006). Çalışılan mikrobiyal FAE'ler şu organizmalara aittir; *Streptomyces* C254, *Streptomyces olivochromogenes* NRCC 2258 (Johnson vd., 1989), *Streptomyces thermophile* ATCC 34628 (Levasseur vd., 2004; Bhat ve Maheshwari, 1987), *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 (Garcia vd., 1998), *Schizophyllum commune* ATCC 38548 (Mackenzie ve Bilous, 1988), *Neocallimastix* MC-2 (Borneman vd., 1992), *Penicillium brasilianum* IBT 20888 (Panagiotou vd., 2006), *Streptomyces* sp. S10 (Mukherjee vd., 2007), *Aspergillus niger* CS 180 (CMICC 298302) (Kroon ve Williamson, 1996), *Aspergillus oryzae* VTTD-85248, *A. niger* VTTD-77050 (Tenkanen vd., 1991), *Bacillus subtilis* ATCC 7661, *B. subtilis* FMCCDL1, *B. subtilis* NCIMB 3610 (Donaghy vd., 1998), *Clostridium stercorearium* NCIMB 11754 (Rumbold vd., 2003) ve *Sporotrichum thermophile* (Vafiadi vd., 2005; Topakas vd., 2005).

1.3.2. Termofilik Bakterilerin Özellikleri

Dünya üzerinde yaşayan canlılara bakıldığında bunların üç ana grup altında toplandığı görülmektedir. Bunlar, ökaryotlar, bakteriler ve arkebakterilerdir (Trent, 2000). Bakteriler dünya üzerinde çok geniş bir yayılım göstermektedir ve büyüebildikleri en uygun sıcaklıklara göre üç grup altında toplanırlar. Sakrofiller, -10°C 'ye kadar olan düşük sıcaklıklarda büyüeyebilen fakat optimum üreme sıcaklığı 15°C veya daha düşük sıcaklıklar olan bakterileri içermektedir. Mezofiller normal ortam sıcaklıklarında ($15-50^{\circ}\text{C}$) büyüeyebilirler ve insan sağlığı açısından patojen olan bakterileri içermektedirler. Termofiller ise, genel olarak 50°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda yaşayabilen, hatta bazı türlerinin ise 100°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda bile yaşayabildiği bakteri grubudur.

Optimum üreme sıcaklıkları $50-105^{\circ}\text{C}$ arasında olan pek çok termofilik bakteri tanımlanmıştır. Bu bakteriler yüksek sıcaklıklarda yaşayabildikleri için, bunlar aşırı termofiller ve çok aşırı termofiller olarak adlandırılmaktadırlar. Termofiller ve aşırı termofiller yüksek sıcaklıklarda yalnızca hayatta kalmazlar, ayrıca onların üremeleri ve çoğalabilmeleri için bu yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyarlar. Termofillerin optimum üreme sıcaklığı 50°C 'nin üzerindeki sıcaklıklarken, aşırı termofillerin optimum üreme sıcaklığı 80°C 'nin üzerindedir. Ayrıca aşırı termofiller genellikle 60°C 'nin aşağısındaki sıcaklıklarda üreyemezler (Inan, 2011).

Termofilik bakterilerin doğal yaşam alanları, dünya üzerinde çok geniş yayılım gösterir. En yaygın ve erişilebilir alanları, termal alanlar, kaplıcalar ve jeotermal sıcak topraklardır. Termofilik bakteriler ilk olarak 1879 yılında Miquel tarafından topraktan, çöplerden, dışkı ve pisliklerden, kanalizasyon ve nehir çamurlarından izole edilmişlerdir. İzole edilen bu termofilik bakteriler, 72°C'de büyüyebilmektedirler (Miquel, 1888).

1.3.2.1. Termofillerin Diğer Bakterilerden Farklı Olan Yönleri

Yüksek sıcaklıklarda üremeyi sınırlayan faktörlerin ne olduğu veya üremenin üst sıcaklığının ne olduğu, halen açıklanamamaktadır. Ancak, termofilik bakteriler yüksek sıcaklıklarda hücre ve moleküllerinin fonksiyonel halde kalmasına izin verecek çeşitli adaptasyonlara sahiptirler. Bu adaptasyonlar şu şekilde incelenebilir (Inan, 2011).

DNA yapısı: Lineer çift zincirli DNA 65°C'de termal denatürasyona uğrarken süpersarmal plazmitlerin en az 107°C'ye kadar termal denatürasyona dirençli olduğu görülmektedir. Plazmit DNA'sı topolojik olarak kapalı olduğu için termal denatürasyona karşı daha dirençlidir. Plazmit DNA'sı termal denatürasyona dirençli olmasına rağmen, termal degradasyona karşı dirençli değildir. Marguet ve Foreterre (1994) yapmış oldukları bir çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonunun, çift zincirli DNA'yı 107°C'de termal degradasyona karşı koruduğu gösterilmiştir. Tuzlar tarafından DNA'nın termal degradasyona karşı korunması, termofilik bakterilerin yaşamı ile ilgilidir. Çünkü termofilik bakteriler, hücre içi yüksek tuz konsantrasyonuna sahiptirler (Marguet ve Forterre, 1994).

Protein yapısı: Termal proteinler, mezofilik proteinlerin denatüre olduğu yüksek sıcaklıklarda aktivitelerini korurlar ve kararlı halde kalırlar.

Querol ve arkadaşları (1996) yaptıkları bir çalışmada, termal kararlılığı arttıran en az 13 farklı fiziksel ve kimyasal faktörün olduğunu göstermiştir. Bu faktörlerden bazıları tuz köprülerinin optimizasyonu, daha kısa halkalar, halkalarda glisin miktarının azaltılması ve prolin miktarının artırılması, hidrojen bağları ve proteinlerin iç kısımlarındaki hidrofobik paketlemelerdir (Querol vd., 1996).

Hücre membran yapısı: Normal sıcaklıklarda yaşayan canlı organizmalar, lipid bilayer yapısında bir hücre membranına sahiptirler ve lipid bilayer membran yapısı ısıya karşı dirençli değildir. Hipertermofiller, yüksek sıcaklıklarda hayatta kalabilmeleri için lipid monolayer yapısında olan değişik bir membran yapısına sahiptirler. Bu hücre membranı, yüksek sıcaklıklarda erimeye karşı direnç gösterir. Ayrıca arkeobakteriler,

hücre membran yapılarında sıcaklığa ve degradasyona karşı dirençli olan eter lipitlerini içerirler.

Termofilik organizmaların hücre membran proteinlerinin en önemli özelliği daha etkili ve sıkı bir şekilde katlanabilen aminoasitlere, daha yoğun bir şekilde sahip olmasıdır. Aspartik ve glutamik asitler içerdikleri amin gruplarından dolayı heliks yapısını kuvvetlendirirken, glisin ve serin kuvvetli hidrojen bağı yapma özelliklerinden dolayı proteininin daha iyi katlanmasını ve ısıya karşı daha yüksek bir direnç göstermesini sağlar (Senes vd., 2000; Rinia vd., 2002; Adamian ve Liang, 2002).

RNA yapısı: Galtier ve arkadaşları (1999) yapmış oldukları bir çalışmada, rRNA'nın GC içeriği ile optimum üreme sıcaklıkları arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (Galtier vd., 1999).

1.3.2.2. *Geobacillus* Cinsinin Özellikleri

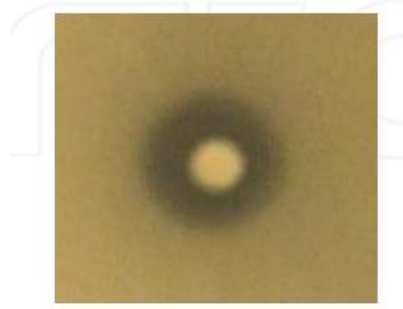
1991 ve 1994 yıllarında, 16S rRNA dizin analizlerine göre, *Bacillus* cinsi, grup 1 ve grup 5 olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır (Rainey vd., 1994; Ash vd., 1991). Grup 5, 16S rRNA dizinleri (%98,5-99,2) yüksek benzerlik gösteren, fenotipik ve filogenetik olarak birbirine çok benzer olan termofilik basillerden oluşan bir gruptur. Bu grup, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermovatenulatus*, *Bacillus thermoleoverans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* ve *Bacillus thermodenitrificans*'ı içermektedir. Nazina ve arkadaşları 2001 yılında, farklı coğrafik alanlardan beş tane termofilik suş izole etmişlerdir ve bu suşların 16S rRNA analiz verilerini, *Bacillaceae* familyasının üyeleriyle karşılaştırmışlardır. 16S rRNA analiz verilerininin karşılaştırılması, DNA-DNA benzerliklerinin, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi sonucunda, bu suşlardan ikisinin *Bacillus* cinsi Grup 5 içerisinde sınıflandırılan iki yeni tür olduğu belirlenmiştir ve grup 5, *Bacillus* cinsinden ayrılarak *Geobacillus* adında yeni bir cins olarak sistematığe kazandırılmıştır (Nazina vd., 2001).

Yeryüzü veya toprak basilleri anlamını ifade eden *Geobacillus* cinsi, şu an sistematığı yapılmış 16 türü içermektedir ve tip türü *Geobacillus stearothermophilus*'dur. Bu cinsin üyeleri Gram pozitif veya değişken, hücreleri çubuk şeklinde, hareketli, elips veya silindirik şeklinde terminal veya subterminal sporlara sahip, koloni morfolojisi ve büyüklüğü değişkendir. Başlıca kinonu, menakinon-7'dir ve nötrofilik özelliktedirler. Bu cinsin % (G+C) içeriği, % 48,2-58 arasında değişmekte olup, başlıca yağ asitleri, izo-C_{15:0},

iso-C_{16:0} ve izo-C_{17:0}'dir (Inan, 2011). Üreme sıcaklıkları en düşük 35°C, en yüksek 80°C'dir. Fakat çoğu izolat, 45-70°C arasında yaşar (Nazina vd., 2001). Geobacilluslar, deniz termalleri, geotermaller, ılıman topraklar, mandıralar, kaplıcalar ve gübreli topraklar gibi birçok alanda yaşayabilmektedir (Zeigler, 2014).

1.3.3. FAE Üretici Mikroorganizmaların Tanımlanması

FAE aktivitesi varlığını tespit etmek için kullanılan yöntem ilk olarak Donaghy tarafından *Lactobacillus*'lar kullanılarak yapılmıştır (Donaghy vd., 1998). Bu yöntemde model substrat olarak etil ferulat kullanılmıştır. Yarı çözünebilen bir substrat olan etil ferulat besiyerine %0,1 (w/v) oranında eklendiğinde, besiyeri bulanık bir hal alır. Bakterilerin gece kültürü bu agar besiyeri üzerine ekimi yapıp üç güne kadar etüvde bekletilir. Bakterilerin kolonilerinin etrafındaki şeffaf zon varlığı, etil ferulatin hidroliz olmasından kaynaklıdır ve ferulik asit esteraz aktivitesi varlığını gösterir. Bu yöntem yine *Lactobacillus* cinslerine ait olan *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri* ve *Lactobacillus helveticus* bakterilerinde Lai tarafından başarıyla uygulanmıştır (Şekil 10) (Lai vd., 2009).



Şekil 10. *L. johnsonii* bakterisinin oluşturduğu şeffaf zon

1.3.4. FAE'ların Sınıflandırılması

FAE'ların üçüncül yapıları hakkındaki bilgiler kısıtlıdır. Primer ve sekonder yapıları da mantar ve bakteriler arasında oldukça zayıf korunmuştur. Mantarlarla ilgili yayınlar bakterilerden çok daha fazla olduğundan dolayı bakteriyal FAE'ların genlerini tanımlamak ve karakterize etmek oldukça zordur (Lai vd., 2012). Şimdiye kadar tanımlanan ve FAE

aktivitesi gösteren enzimlerin tespit edilen aminoasit dizileri sayesinde neighborhood-joining filogenetik ağaçları çizilebilmiş ve bu genetik karşılaştırma, substrat spesifitesi ile desteklenince, FAE'ların dört alt sınıfı oluşmuştur, A, B, C ve D (Kroon vd., 1999; Faulds ve Williamson, 1994). Bu sınıflar Tablo 2'de gösterilmektedir.

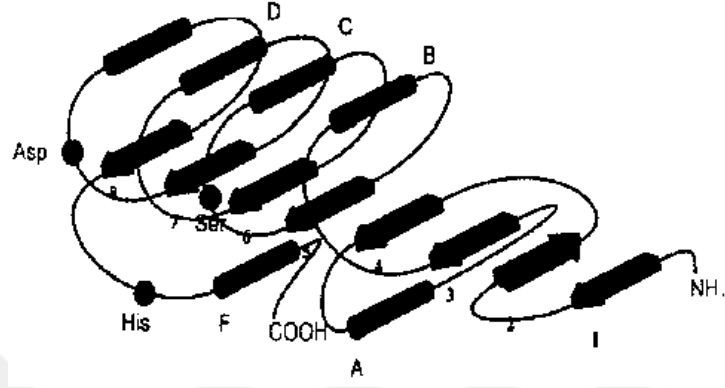
Tablo 2. FAE'ların sınıflandırılması (Fazary ve Ju, 2007)

FAE tipi	Tip A	Tip B	Tip C	Tip D
Mikroorganizma	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Talaromyces stipitatus</i>	<i>Pseudomonas florescens</i>
FAE	FAE-A	FAE-B	FAE-C	XYLD
Seçici besiyeri	WB, OSX	SBP	SBP, WB	WB
Hidrolizledikleri metil esterleri	MFA, MSA, MpCA	MFA	MFA, MSA, MpCA, MCA	MFA, MSA, MpCA, MCA
Bitki hücre duvarından serbest diferullatların salınımı	Sadece 5,5'-diferullik asit	Hayır	Hayır	Sadece 5,5'-diferullik asit
Dizi benzerliği	Lipaz	Sinnamoil esteraz aile 1 asetil ksilan esteraz	Klorojenat esteraz tannaz	Ksilanaz

1.3.5. FAE'ların Yapısal Analizi

Sınırlı sayıda FAE'ların kristal yapıları aydınlatılmıştır. Bunlardan en çok çalışılanı, *Aspergillus niger*'in tip A FAE'idir (Thibault vd., 1998; Ralph vd., 1994; Hermoso vd., 2004). Bu enzimin kristal yapısına göre, enzim, serin-histidin-aspartik asit katalitik üçlüsüne sahip bir α/β hidrolazdır (Şekil 11). Bu grubun sekonder yapısı, merkez korda α -helikslerle çevrili en az sekiz tane β -sheet dizisinden oluşur. Bu diziyi tanımlamak için α/β sandviçi ifadesi de kullanılır. Merkezdeki β -sheet dizileri ve α -heliksler çoğunlukla paraleldir. α -heliks ve β -sheet dizileri polipeptit zinciri boyunca arda arda sıralanma eğilimi gösterirler. Protein databank'ta (PDB) oldukça az FAE bulunmaktadır. Sadece iki türden bir mantar olan *A. niger* ve *Butyrvibrio proteoclasticus* bakterisinin kristal yapıları

PDB’de bulunmaktadır. Probiyotik bakteri olan *Lactobacillus johnsonii* LJ0536’nın da kısmen yapısı PDB’ye sonradan eklenmiştir (Lai vd., 2012). Literatürde yeni keşfedilecek FAE’lara da oldukça ihtiyaç vardır.



Şekil 11. α/β hidrolaz katlanmasının sekonder yapısı

1.3.6. Klasik Esteraz Motifi, GlyXSerXGly

Genel olarak karboksilik asit esterazları klasik olarak korunmuş bir adet GlyXSerXGly dizisine sahiptir. Bununla birlikte *L. johnsonii* LJ0536’ya ait FAE’in aminoasit dizisine bakıldığında iki adet GlyXSerXGly dizisine sahip olduğu görülür ve klasik karboksilesterazlardaki bir adet GlyXSerXGly dizisi kuralını bozar. Çoklu dizi hizalama analizleri LJ0536 ile birlikte homoloğu olan LREU1684 FAE’ları da yine iki adet GlyXSerXGly dizisine sahiptir. Bu sıranın iki adet olmasının sebebi henüz açıklanmamıştır (Lai vd., 2012). LJ0536 FAE’ı tipik α/β hidrolaz katlanmasına sahiptir. 12 adet β -sheet ve 9 adet α -heliksine sahiptir. İki adet GlyXSerXGly motifinden sadece biri (Gly104-X-Ser106-X-Gly108) katalitik olarak aktiftir. Diğer GlyXSerXGly motifi (Gly66-X-Ser68-X-Gly70) hidrojen bağlarıyla proteinin katlanmasını sürdürür (Lai vd., 2011). Şekil 12’de LJ0536’ye yakın dizilere sahip FAE’ların hizalanması gösterilmektedir (Lai vd., 2012).

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

EFI73470.1      MKKMMNKKTLAIAIVCLGYVFPMQAKIENFTLQGSKGGKLAATLQAPKLSGKVKRLV
EGD34818.1     -----MKKNIITLVLILITLMQTTKAQQTEDLTLEGAKGKLAATLQTPKIEKGGKVRMVI
YP_001578032.1 -----MSRITIERDGLTLVG-----DREEP--FG-EIYDMAI
ADD11991.1     -----MATITLERDGLQLVG-----TREEP--FG-EIYDMAI
YP_815563.1    ---MKLKKKKVGI-----YMATITIERDGLNLVG-----TREEP--FG-EIYDMAI
YP_001844134.1 -----MEVAIKSAGLTLRG-----LLEGS--NQVPNDRIAI
ADD11992.1     -----METTIKRDLNLHG-----LLEGT--DKIENDATAI
YP_001272260.1 -----MEITIKRDGLKLYG-----LLEGT--TTIKNDTIAI
                : : .: * * : : : :
                : : .: * * : : : :

EFI73470.1      ICHGFGSDK---ERPLLKAIADSLQSKGIASIRDFNCGCGKSEKGFQDMTVLNEIEDAKD
EGD34818.1     ---DRPLLRTIADQLQKAGIASIRDFNCGCGKSEGRFQDMTVLNEIEDAKK
YP_001578032.1 ---NTDLLRQIADDLRDNVAVRDFNNGHGESDGFEDMTVCNEIADGKA
ADD11991.1     ---NTSLLREIANSRLDENIASVRFDFNNGHGDSDGKFENMTVLNEIEDANA
YP_815563.1    ---NTPLLKEIADELRLDENIASVRFDFNNGHGDSDGKFENMTVLNEIEDANA
YP_001844134.1 LMHGFKGDLYTEENLLNQLAHLRLNDQGLATLRFDFAGCGKSDGRFSDMTVLSLQDGMK
ADD11992.1     LMHGFKGDLYDSDSKILYALSHYLNQDQSLPTIRDFDGCCKSDGKFEDMTVYSEILDGK
YP_001272260.1 LMHGFKGNLGYDSDSKILYALSHYLNQDQGLPTLRFDFDGTGHSDFKDMTVFSEILDGK
                : ** .: : : * :. *.. .: : :**** * *.:*.*.:*** .*: *
                : : * :. *.. .: : :**** * *.:*.*.:*** .*: *

VWAYALTLPWVSDISMVGHSSQGGVVTSMVAGQLKGSIRSIALCAPAAVLRDDALRGSTQG
VIAYAEKLPYVSGISIVGHSQGGVVASMVAGELKKAIKSVALCAPAAVLRDDALRGITQG
ILDYVRTDPHVRDI FLVGHSSQGGVVASMLAGLYPDVVKVLLAPAAQLKDDALRSNTQG
ILNYVKTDPHVRNIYLVGHSSQGGVVASMLAGLYPDLIKKVLLAPAAATLKGDALENGTQG
ILNYVKTDPHVRNIYLVGHSSQGGVVASMLAGLYPDIKKKVLLAPAAATLKTDALNGSTQG
IIDYARQEVQAKEIILVGHSSQGGVVASMLAAYYRDVIDKLVLLAPAAATLKDDALIGTCQG
IIDYVRNTVKAKHIYLVGHSSQGGVVASMLAGYRDVIEKLALLAPAAATLKSADALDGVCGQ
IIDYAHTTMQAKKIYLVGHSSQGGVVASMLAAYYRDIITKLVLLAPAAATLKDDALKGVCGQ
                : : * . : * : :*****:***. : :.* **** * : * . **
                : : * . : * : :*****:***. : :.* **** * : * . **

SIYDPHHIPEYVDSR---GLRIGRDYFMTAQTLPYETARQYTGPFVLLVHGTWVIVPY
ATYNPHHIPEYIDLPR---GLRMGHDYVKTATLPYETAQQYKGSVLIHGTWVWVFP
ATYDPNHI PDVPLVGNKLGMLGGFYLRTAQVLPYIEVSCQCFTRPVSVIAGTNDQVWDP
VTYNPDHIPDRLPFKD---LTLGGFYLRIQQQLPIYEVSAQFTRPKVCLIHGTDVWVSP
VKYNPDHIPDRLPFKD---LTLGGFYLRIQQQLPIYEVSVHFTRPVCCLIHGANDTVWSP
TTYDPNHI PDYVTVGG---FKVGGDYFRTAQLLPYETAQHYAGPVLMIHGLADTVWDP
STYDPTHIPETVNVSG---FEVGGAYFRTAQLLPYQTAEHYNREVLIIHGLADKVVSP
SQYDPNHI PETVDVHG---FTVGGDYFRTAQLLPYETAQHYSGPTILLIHLADNVVSP
                *:* ***: : : : * . ** *****.: : : . : : * * : *

```

Şekil 12. LJ0536 FAE'nin homologlarıyla çoklu dizi hizalaması. ADD11991.1: *L. johnsonii* N6.2, LJ0536 sennamoyl esteraz. ADD11992.1: *L. johnsonii* N6.2, LJ1228 sennamoyl esteraz. YP_001272260.1: *L. reuteri* DSM 20016, α/β katlanması ailesi hidrolaz benzeri protein. YP_815563.1: *L. gasseri* ATTC 33323, α/β katlanması ailesi hidrolaz. YP_001578032.1: *L. helveticus* DPC 4571, α/β katlanması ailesi hidrolaz. YP_001844134.1: *L. fermentum* IFO 3956, hypothetical protein. EFI73470.1: *Prevotella bryantii* B14, α/β ailesi hidrolazı. EGD34818.1: *Capnocytophaga* sp. oral taxon 338 str. F0234, α/β ailesi hidrolazı

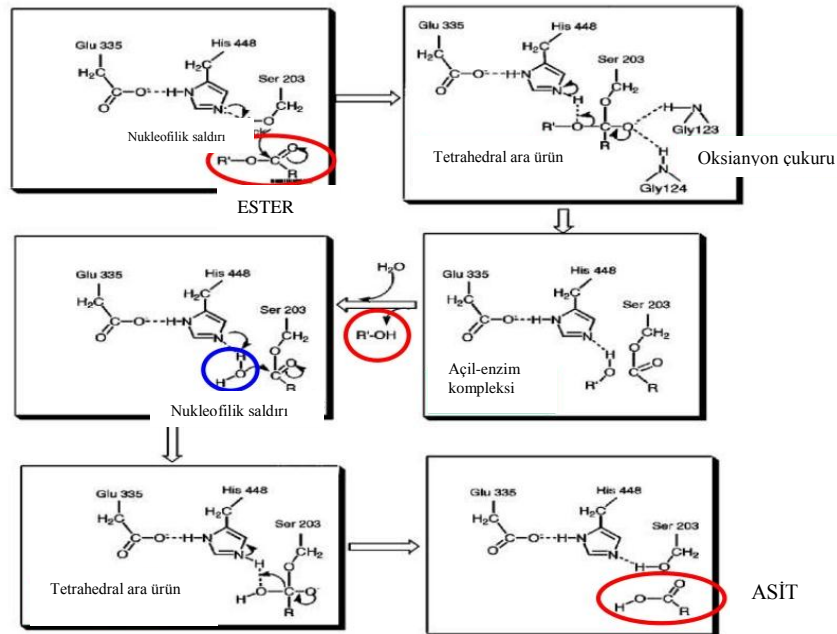
1.3.7. FAE'lerin Histidin, Serin ve Aspartik Asitten Oluşan Katalitik Üçlüsü ve Reaksiyon Mekanizmaları

Ester hidrolizinde iki temel basamak vardır: açılasyon ve deaçılasyon (Lai vd., 2012). Açılasyonda katalitik serinin hidroksil oksijeni, ester substratındaki karbonil karbonuna saldırır. Saldırıdan sonra, katalitik üçlünün histidini, katalitik serini deprotonlar ve ilk tertrahedral ara ürün oluşur. Katalitik üçlünün üçüncü aminoasiti olan aspartik asit protonlanmış histidinin stabilitesinde oldukça önemli bir rol oynar. Oluşan tetrahedralin

oksianyonu, oksianyon çukurunun karşısında pozisyonlanır. Oksianyon çukuru, substratın karbonil oksijen anyonu ve katalitik cebin diğer aminoasitlerinin azot atomları arasında hidrojen bağlarının oluşmasıyla oluşur. Histidin protonu o gruba transfer eder. Histidin deprotonlanması, ester oksijeninin protonlanmasını sağlayarak, ilk ürünün salınmasını sağlar (mesela substrat metil ferulat ise bu ürün metanoldür). Sonuçta tetrahedral ara ürün daralır ve karakteristik olan açilenzim ara ürünü oluşur. Bu nedenle substratın yarım kalan kısmı katalitik serine bağlı kalır.

Reaksiyonun ikinci basamağı (deaçilasyon), su varlığında gerçekleşir. Su molekülü açilenzim ara ürününe bağlı kalan substratın karboksil grubuna saldırır. Histidin hemen bir su molekülünü deprotonlar ve ikinci tetrahedral ara ürün oluşmuş olur. Bundan sonraki katalizleme açilasyon mekanizmasına benzerdir. İkinci tetrahedral ara ürün oksianyon çukurunun oluşmasıyla stabilize edilir. Histidin protonu nükleofilik serine hareket eder. Sonuç olarak, ester oksijeni protonlanır ve tetrahedral ara ürün daralır. Ester oksijeninin protonlanması ikinci ürünün salınmasını sağlar (örneğin substrat metil ester ise ürün ferulik asittir). En sonunda da enzim doğal haline geri döner (Şekil 13).

Esterazların katalitik bölgeleri her zaman üç kısımdan oluşur: nükleofil (serin), tamamen korunmuş aminoasit (histidin), asidik aminoasit (aspartik asit). Enzimin substratıyla çalışabilmesi için histidin her zaman katalitik serinin yanında ve aspartik asit de histidin yanında olması gerekir.



Şekil 13. Hidroliz reaksiyon mekanizması

1.3.8. FAE'ların Endüstriyel Önemleri

Termofilik bakterilerden elde edilen FAE'ların, endüstride önemli bir rol oynayacağına dair beklentiler vardır. Bu nedenle sıcaklığa ve kimyasal denatürasyona dayanıklı yeni enzimlerin elde edilmesine ihtiyaç vardır. FAE'ların reaksiyon sonucunda oluşturduğu ferulik asit, fenolik –OH gruplarıyla beraber serbest radikallere hidrojen sağlar. Bu sayede antioksidan etki gösterir. Ferulik asit aynı zamanda organizmaları aktif oksijenin toksitidesinden koruyan süperoksit dismutaz gibi aktif oksijeni ortadan kaldıran etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber UV'yi güçlü bir şekilde absorbladığı da düşünülmektedir. Kozmetikte, güneş kremlerinde UV absorblayıcı olarak kullanılmaktadır. İnsan, hayvan ve hücre kültürleriyle yapılan birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar (Lin vd., 2005; Lesca, 1983; Kampa vd., 2004; Balasubashini vd., 2004) ferulik asitin şu fonksiyonlarının olduğunu göstermiştir. Bunlar:

- 1- Göğüs, kolon, akciğer, mide kanserlerini inhibe eder veya önler;
- 2- Alzheimer proteinlerinin beyinde hasara yol açmasını önler;
- 3- Prostatın büyümesini önler;
- 4- Kemiklerin güçlenmesini sağlar;
- 5- Pankreatik adacıkların genişlemesi sağlar;
- 6- Lipid, trigliserit ve kan glukoz seviyeleri düşürür;
- 7- Kolestrol üretimini azaltır;
- 8- Hücre membranlarına serbest radikallerin zarar vermesini önler;
- 9- UV'nin cilde zarar vermesini önler;
- 10- İmmun sistemini uyarır.

Günümüzde, bitki hücre duvarında daha fazla ferulik asit olmasına rağmen, doğal ferulik asit ticari olarak, pirinç kepeğindeki γ -oryzanolden elde edilmektedir. Bunun bir nedeni, ferulik asitin polisakkaritlerle çapraz bağlar yapmasıdır. Örneğin otlarda arabinoksilanla, ispanakta pektinle çapraz bağ yapmıştır ve ferulik asiti polisakkaritlerden koparıp serbest bırakarak saflaştırmak zordur. Neyseki bitki hücre duvarındaki bu çapraz bağı kırıp ferulik asiti açığa çıkarmak için iki metot geliştirilmiştir (Mukherjee vd., 2007). Bunlardan biri FAE'ları kullanarak enzimatik olarak bu işi yapmaktır. Fakat bazı durumlarda FAE'ları, polisakkarit hidrolazlarla kombine bir şekilde kullanmak gerekir. Alkalin hidrolizi diğer bir yoldur ve bazen buğday kepeğindeki ferulik asitin içeriğini tespit etmekte kullanılmaktadır (Oosterveld vd., 2000). Yüksek alkalin konsantrasyonu,

karbonhidratlara bağı olan ferulik asitin serbest kalmasını sağlar fakat ferulik asiti bu hidrolizattan saflaştırmak zordur ve enzimatik hidrolize göre dezavantajlıdır. Çünkü içeriğinde birçok bileşik vardır ve koyu kahverengi bir renge sahiptir.

FAE'lar bazen hemiselüloz yardımcı enzimler olarak adlandırılırlar çünkü bitki hücre duvarını degrades eden ksilanaz ve pektinaza yardım ederler. Hücre duvarındaki hemiselulozun hidroliz edilmesinde iki grup enzim rol almaktadır. İlk grupta, ksilan ana zincirlerini kıran endo-ksilanaz ve β -ksilosidaz enzimleridir. İkinci grup enzimler ise hücre duvarındaki ksilan ve diğer bitki polimerleri arasındaki çapraz bağları kırarak yan zincirleri uzaklaştıran α -L-arabinofuranosidaz, asetil ksilan esteraz ve FAE yer almaktadır. İkinci grup enzimler içerisinde FAE, en önemli etkiye sahiptir. Bu enzim, ferulik asit yan zincirleri ve çapraz bağları uzaklaştırarak, endo-ksilanazların etki alanını artırarak hemiselulozun hidrolizini artırır. Bu sayede, kağıt endüstrisinde ve hayvan yemi üretiminde ksilanazlarla beraber kullanımı yaygındır (Wong, 2006).

FAE'lara, tekstil, kağıt, tarım, besin, ilaç endüstrisinde, ayrıca endüstriyel atıklardan ferulik asit eldesinde ihtiyaç duyulmaktadır.

FAE'lar kağıt endüstrisinde hemiselülozun parçalanmasını (Record vd., 2003) ve hayvan yemlerinde besin asimilasyonunu kolaylaştırmak amacıyla (Topakas vd., 2003) kullanılmaktadır. Şeker-fenolik ester sentezini katalizlerler (Topakas vd., 2004). Bazı organizmalar üzerinde fenolik bileşiklerin antimikrobiyal etkisi vardır. Bitki hücre duvarının fenolik içeriği (özellikle p-coumarik asit, ferulik asit, ve p-hidroksibenzaldehit), rumen mikroorganizmalarının üremesini inhibe eder (Williamson ve Vallejo, 1997; Williamson vd., 1998) ve bitki hücre duvarından türevlenen fenolik asitlerin üremesini inhibe edici özelliğinden yararlanarak besin koruyucu olarak kullanılırlar (Garcia-Conesa vd., 1999).

Endüstri alanında oldukça fazla ihtiyaç duyulan FAE'larla ilgili yapılacak çalışmalar, bu alana oldukça önemli katkılar sağlayacaktır.

Bu çalışma kapsamındaki asıl hedefimiz, oksijen sorununu çözmek için mikrobaloncuklarla oksijen transferini ve gaz tutulumunu arttırarak, fermentasyon sürecinde kullanılacak olan enerjiyi düşürmek ve üretimi arttırmaktır. Bu tez kapsamında Türkiye'de ilk defa MBD cihazı üretilmiştir. Bu cihazın bir versiyonu ilk kez 1985 yılında Sebba tarafından geliştirilerek patenti alınmıştır (US 5314644 A) (Sebba, 1985). Fakat bu cihazın patent süresi dolmuştur (US patents, 2015). Ayrıca bu proje kapsamında yapılacak olan MBD cihazına ait Türk patent enstitüsüne kayıtlı bir patent yoktur, yani ülkemizde

böyle bir cihaz patentlenmemiştir (Türk Patent Enstitüsü, 2015). Mikrobaloncuk yönteminin PHB ve FAE üretimini de arttırıp artırmadığı bu tez sayesinde belirlenmiştir. Ayrıca bu tez kapsamında literatüre yeni termofilik bakteriyal bir FAE kazandırılmıştır.



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler

Tripton, NaCl, Commassie Brilliant Blue G-250, Commassie Brilliant Blue R-250, Nutrient Agar, Gliserol, β -merkaptotanol, 4-Nitrofenol, 2-Propanol, Sodyum Asetat, K_2HPO_4 , Lizozim, KH_2PO_4 , EDTA, Amonyum Sülfat (Merck), Yeast Ekstrakt, M9 Tuzları (Becton, Dickinson and Co), Agar (Himedia), Glukoz (Acros Organics), Etil Alkol, Ampisilin Na Tuzu, Kanamisin, X-Gal (Applichem), IPTG (Gold Biotechnology), Metil Ferulat (Santa Cruz Biotech), N-N Dimetilformamid, Etil Ferulat, Etidyum Bromür, Agaroz, 4-Nitrofenil Butirat, 4-Nitrofenil Dekanoat, 4- Nitrofenil Stearat, 4- Nitrofenil Palmitat, 4- Nitrofenil Miristat, 4- Nitrofenil Dekanoat, 4-Nitrofenil Asetat, Metanol, Amonyum Asetat, Trizma Baz, Akrilamid (Sigma-Aldrich), $CaCl_2$ (Aktar Kimya), BSA (NEB), PMSF (Amresco), SDS, Glisin, Bromo Fenol Mavisi (Gerbu), Asetonitril (Carlo Erba), Bis-akrilamid, Protein Ladder, dNTP Seti (Promega), TEMED (Janssen Chimica), NaOH (JTBaker), Asetik Asit (Riedel-dan Haen) kimyasalları kullanılmıştır.

EcoRI, *XhoI* (Promega), *NcoI* (Fermentas) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştır.

T4 DNA Ligaz, *Taq* DNA polimeraz, Genomik DNA İzolasyon Kiti, pGEMT Easy Vector System I (Promega), Plazmit DNA izolasyon kiti (Fermentas), GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen), TALON[®]Metal Affinity Resin (Takara) ve Q-Sepharose (Sigma) belirtilen firmalardan temin edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan LB (Luria-Bertani) sıvı besiyerinin hazırlanışı şöyledir: 1 L ddH₂O içerisinde, %1 (w/v) tripton, %0,5 (w/v) yeast ekstrakt, %0,5 (w/v) NaCl olacak şekilde hazırlandı. Besiyeri, 1 L'ye tamamlanmadan önce, pH değeri 7,4'e ayarlandı ve son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri, 121°C'de 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edildi (Luria, 1984).

LB (Luria-Bertani) katı besiyerinin hazırlanışı şöyledir: 1 L ddH₂O içerisinde, %1 (w/v) tripton, %0,5 (w/v) yeast ekstrakt, %0,5 (w/v) NaCl ve %1,2 (w/v) agar olacak şekilde hazırlandı. Besiyeri, 1 L'ye tamamlanmadan önce, pH değeri 7,4'e ayarlandı ve son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri, 121°C'de 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edildi (Luria, 1984).

Modifiye M9 besiyerinin hazırlanışı şöyledir: 1 L ddH₂O içerisinde, 1 X M9 tuzu (Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, NH₄Cl), 0,002 M MgSO₄, %1,5 (w/v) glukoz, %0,2 (w/v) yeast ekstrakt olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyeri, 121°C'de 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edildi.

Nutrient Agar besiyerinin hazırlanışı şöyledir: 1 L ddH₂O içerisinde, 20 g olacak şekilde hazırlandı ve 121°C'de 20 dk. süre ile otoklavda sterilize edildi.

2.1.3. Kullanılan Bakteriler ve Plazmitler

Tez kapsamındaki çalışmalarda kullanılan bakteri suşları ve özellikleri Tablo 3'te ve çalışmada kullanılan vektörler ve özellikleri Tablo 4'te listelenmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Kullanılan bakteri	Özellikleri	Kaynağı
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15</i> Tn10 (TetR)]	Agilent Technologies, Santa Clara, CA
<i>E. coli</i> JM101	F', <i>traD36</i> , <i>proA⁺B⁺</i> , <i>lacIq,Δ(lacZ,)M15/Δ(lac-proAB)</i> , <i>glnV</i> , <i>thi⁺</i>	Laboratuvar Stoğu
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) LysS	F', <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> , (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3), pLysS (Cam ^R)	Laboratuvar Stoğu
<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	F', <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>), <i>dcm⁺</i> , Tet ^R , <i>gal</i> , λ(DE3), <i>endA</i> , Hte	Agilent Technologies, Santa Clara, CA
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	DSMZ 2542 Tip suş, toprak bakterisi, Japan, Kyoto, Shimogamo kökenli	DSMZ German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

Tablo 4. Çalışmada kullanılan vektörler ve özellikleri

Kullanılan vektör	Özellikleri	Kaynağı
pGEMT Easy I	Yüksek kopya sayısı, T7 ve SP6 RNA polimeraz promotorları, β -galaktosidaz enziminin α -peptit kodlama bölgesi içerisine yerleştirilmiş bir MCS (Çoklu Klonlama Bölgesi), 3'-T uçları, Amp ^R	Promega
pET-28a(+)	Yüksek ekspresyon seviyesi, T7 promotor, trombin kesim bölgesi, N-terminal bölgesinde His•Tag [®] /thrombin/T7•Tag [®] ve C-terminal bölgesinde de opsiyonel His•Tag dizisine ve <i>lacI</i> genine sahip, Kan ^R , MCS	Novagen Inc.
pBHR68	pBluescript SK-, <i>R. eutropha</i> 'ya ait <i>phbCAB</i> genleri, T7 <i>lac</i> promoter, Amp ^R	Utah State Üniversitesi Biyoloji Mühendisliği Laboratuvar Stoğu, ABD

2.1.4. Veritabanları ve Biyoinformatik Programlar

NCBI GenBank veritabanı ile, çalışmada kullanılan bakterilerin genomları araştırıldı (Dennis vd., 2005).

NCBI Blast programı kullanılarak; klonlama çalışmalarında elde edilen gen dizileri, NCBI veri tabanlarındaki diğer gen dizileriyle karşılaştırıldı (Altschul vd., 1990).

Clustal Omega online programı ile, gen dizilerinin hizalaması yapıldı (McWilliam vd., 2013).

Fast PCR programı ile, dizayn edilen primerin özellikleri analiz edildi. Ayrıca DNA-protein dönüşümleri de bu program ile yapıldı (Kalendar vd, 2009).

Origin Pro8 programı ile, karakterize edilen enzimin kinetik parametreleri hesaplandı (URL-1, 2007).

Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 6.06 programı ile, karakterize edilen enzimin filogenetik ağacı çizildi (Tamura vd., 2013).

PyMOL Molecular Graphics System ile, enzimin üç boyutlu yapısı çizildi (Delano, 2002).

Expasy Bioinformatics Resource Portal online programı ile enzimin moleküler ağırlığı ve izoelektrik noktası belirlendi (Artimo vd., 2012).

2.2. Metot

2.2.1. Aktivitelerine Bağlı Olarak Kullanılacak İzolatların Seçimi

Kullanılacak olan suşları belirlemek için daha önce laboratuvarımız tarafından çeşitli kaplıcalardan izole edilen ve ayrıca stoklarda bulunan suşlar kullanıldı. Bu suşların tümü taranmadan önce nutrient agar besiyerinde bakterilerin üremesi için gerekli olan sıcaklıklarda 24 saat inkübe edildi.

Bu suşlar, (g/L): 1,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,37 g KH_2PO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g FeCl_3 , 1 g yeast extract ve 20 g bakteriyolojik agar içeren besiyeri üzerinde FAE aktivitesi açısından tarandı. Her bir petriye, petri döküm aşamasında 0,3 ml etil ferulat ilave edildi. Bu ilave anında petrinin her yerine agar besiyerinin homojen bir şekilde dağıldığından emin olmak için, petriye dökülen agar iyice karıştırıldı. 25°C'de üç saat katılaşmaya bırakılan nutrient agar petrilerinden (24 saat büyütülmüş) çok miktarda alınan inokulum ile çizgi ekim yapılarak etüvde maksimum üç gün inkübe edildi.

2.2.2. Klonlama Çalışmaları

2.2.2.1. Ekspresyon Primerleri

Laboratuvarımızdaki bakteri stoklarında bulunan ve FAE aktivitesine sahip olduğu tespit edilen *Geobacillus thermoglucosidasius* DSM 2542^T ile klonlama çalışmalarına başlandı.

G. thermoglucosidasius'un, tanımlanmamış fakat tarafımızdan FAE geni olduğu düşünülen gen dizisi, bakterinin gen bankasındaki genom dizisinden elde edildi. Bu gen dizisini, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlamak üzere, gerekli kesim bölgelerini içeren ekspresyon primerleri dizayn edildi. Bu primerlerden; GtexF ve GtexR, enzime His Tag kuyruğu eklemeyecek şekilde dizayn edilirken, GtexHR, enzimin kolay saflaştırılabilmesi için, N terminalinde His Tag kuyruğu yerleştirecek dizili olarak dizayn edildi. *NcoI* restriksiyon endonükleazının, kesim bölgesinde ATG dizisi olduğundan dolayı, kodon okuma sırasının kaymaması için GtexF primeri farklı olarak; gen dizisine, glisin aminoasitini kodlayan GGA kodonu ekleyecek şekilde dizayn edildi. Dizayn edilen primerler Tablo 5'te listelenmiştir.

Tablo 5. Dizayn edilen ekspresyon primerleri

GtexF	5'- <u>CCC ATG GGA</u> CAA AAA GCG ATA AC-3' <i>NcoI</i>	23 nt, Tm:56,9 GC: %47,8
GtexR	5'-CGG <u>AAT TCT</u> TAG GAA ACA AAC CC-3' <i>EcoRI</i>	23 nt, Tm:54,3 GC: %43,5
GtexHR	5'- <u>CCC TCG AGG</u> GAA ACA AAC CC-3' <i>XhoI</i>	20 nt, Tm:58,2 GC: %60

2.2.2.2. Genomik DNA İzolasyonu ve PCR

G. thermoglucosidasius bakterisinden genomik DNA izolasyonu, Promega Genomik DNA İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T bakterisi, 3 mL LB besiyerine ekildi ve 55°C'de gece boyunca bir sulu çalkalayıcıda inkübe edildi. Gece kültürü, 13.000 rpm'de iki dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreler 480 µl 50 mM EDTA içerisinde çözüldü. 120 µl 10 mg/mL lizozim ilave edildi, hafifçe pipetleyerek karıştırıldı ve 37°C'de 60 dk. inkübe edildi. Elde edilen karışım, 13.000 rpm'de iki dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Tüpe 600 µl *Nuclei Lysis* solüsyonu eklendi ve hafifçe pipetle karıştırıldı. Karışım 80°C'de beş dk. inkübe edildi ve oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 3 µl *RNase* solüsyonu eklendi. Tüp iki-beş kez alt-üst edildi ve 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına ulaştıktan sonra 200 µl *Protein Precipitation* solüsyonu eklendi ve 20 sn. vortekslendikten sonra beş dk. süreyle buza

bırakıldı. Beş dk. sonunda 13.000 rpm’de üç dk. santrifüj edildi. Süpernatant içinde 600 µl izopropanol bulunan yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpü, pelet oluşuncaya kadar alt üst edildi ve 13.000 rpm’de iki dk. santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve kurutma kağıdı kullanarak tüm süpernatant sıvısının atıldığından emin olundu. Pelletin üzerine 600 µl oda sıcaklığında % 70’lik etanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 13.000 rpm’de iki dk. santrifüj edildi. Pipetörle süpernatant uzaklaştırıldı ve etanolun tamamının uzaklaşması için mikrosantrifüj tüpü 15 dk. 37°C’de bekletildi. Pellet üzerine 100 µl *DNA Rehydration* solüsyonu eklendi ve 65°C’de bir saat inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, elde edilen DNA kullanılacağı zamana kadar 4 °C’de saklandı.

GtexF-GtexR ve GtexF-GtexHR primerleri ile *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T,un genomik DNA’sı kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Gen fragmentlerini elde ettiğimiz PCR şartları şu şekildedir:

94°C’de üç dk.’lık denatürasyon basamağı ardından 36 döngü; 94°C’de 45 sn. denatürasyon, 54-58°C’de 45 sn. bağlanma (annealing) ve 72°C’de bir dk. uzama (extention) ve son olarak da 72°C’de 7,5 dk. olacak şekilde son uzama.

2.2.2.3. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T FAE Geninin pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne Klonlanması

Yukarıda açıklandığı gibi elde edilen DNA fragmentleri, baz dizilimi belirlenmek üzere, pGEM-T Easy I klonlama vektörü ile Promega firmasının öngördüğü şartlar altında ligasyon için inkübasyona bırakıldı ve CaCl₂ transformasyonu ile *E. coli* JM101 hücresine aktarıldı.

pGEM-T Easy I vektörüne ligasyon için tepkime bileşenleri

10X T4 DNA ligaz tamponu	1 µL
Kalıp DNA	3 µL
pGEM-T Easy klonlama vektörü	1 µL (1:1 sulandırılmış vektör)
T4 DNA ligaz (1 U)	1 µL
ddH ₂ O	4 µL

Transformasyon için; 200 µl alıcı konak hücresi içeren santrifüj tüpüne, 10 µl ligasyon ürünü eklendi ve 30 dk. buz üzerinde bekletildi. İnkübasyon sonrasında numune, 42°C'lik ısıtıcı blokta iki dk. bekletildi ve süre sonunda her bir tüpe 200 µl LB sıvı besiyeri eklendi. Numuneler, 37°C'de iki saat inkübe edildikten sonra, 50 µg/mL ampicilin içeren LB agar petrilere yayılarak, 37°C'de bir gece inkübe edildi (Sambrook vd., 1989). Ertesi gün elde edilen mavi-beyaz kolonilerden, klon olduğu düşünülen beyaz koloniler seçilerek, bunların plazmit izolasyonu, plazmit DNA izolasyonu kiti kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında gerçekleştirildi. Klonlamanın başarılı olup olmadığı, plazmitlerin *EcoRI* restriksiyon endonükleaz ile kontrol kesimleri yapılarak tespit edildi. His Tag dizisine sahip FAE genini içeren pGEM-T vektörü pGEMGthFAE-His, His Tag dizisine sahip olmayan FAE genini içeren pGEM-T vektörü pGEMGthFAE olarak adlandırıldı.

2.2.2.4. *G. thermoglucosidasius* FAE Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

Ekspresyon vektörü pET-28a(+)`ya, ilgili genin klonlanması zor bir süreç olduğundan, PCR ürünleri öncelikle pGEM-T Easy klonlama vektörüne klonlandı ve klonun varlığı, restriksiyon endonükleazlar ve sekanslama ile kontrol edildi. pGEMGthFAE olarak adlandırılan klon, FAE genini pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlamak üzere, öncelikle *NcoI* restriksiyon endonükleazı ile kesildi. Etanol presipitasyonunun ardından, *EcoRI* ile kesildi ve jele yüklenerek, kesilen FAE geni, Qiagen Jelden Çıkarma kiti ile firmanın öngördüğü yöntemle jelden çıkarıldı.

Etanol Presipitasyonu: DNA numunesine, hacminin 1/10'u kadar sodyum asetat (3 M, pH 5,2) ve hacminin üç katı kadar %96'lık etanol ilave edildi. İki saat -20 °C de veya 15 dk. -80°C de bekletildikten sonra 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice atılıp geri kalan pelletin üzerine 500 µl %96'lık etanol ilave edildi ve alt üst edildikten sonra 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Supernatant yine dikkatlice atılıp geri kalan pelletin üzerine 500 µl %70'lik etanol ilave edildi ve alt üst edildikten sonra 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra kalan pellet 37°C'lik etüvde 10 dk. veya kuruyuncaya kadar bekletildi. Kuruduktan sonra ddH₂O'da çözüldü.

Jelden çıkarılan FAE geninin, *NcoI* ve *EcoRI* ile kesilmiş pET-28a(+)`ya T4 DNA ligaz kullanılarak firmanın öngördüğü şartlar altında ligasyonu yapıldı. Ligasyon ürünü, T7 promotörünün çalışmasına ve FAE'in ekspresyonuna imkân sağlayan *E. coli* BL21(DE3) LysS suşuna, yukarıda anlatılan CaCl₂ transformasyonu yöntemi ile aktarıldı ve

transformasyon ürünü, 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar petrilere yayılarak, 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda elde edilen kolonilerden, klonun varlığı, restriksiyon endonükleazlar ile kontrol edildi. His Tag dizisi içermeyen FAE genine sahip olan klon, pETGthFAE olarak adlandırıldı.

Diğer taraftan pGEMGthFAE-His'in, *NcoI* ve *XhoI* restriksiyon endonükleazları ile iki saat boyuca ikili kesimi yapıldı. Kesim ürünlerinin, pET-28a(+) vektörüne aynı şekilde ligasyonu yapıldı ve *E. coli* BL21(DE3) LysS suşuna, CaCl₂ transformasyon yöntemi ile aktarıldı ve transformasyon ürünü, 50 µg/mL kanamisin içeren LB agar petrilere yayılarak, 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda elde edilen kolonilerden, klonun varlığı, restriksiyon endonükleazlar ile tespit edildi. His Tag dizisi içeren FAE genine sahip olan bu klon, pETGthFAE-His olarak adlandırıldı.

2.2.3. FAE'in Üç Boyutlu Yapısının Çizimi ve Aktif Bölgesinin Tespiti

PyMOL Molecular Graphics System ile enzimin üç boyutlu yapısı çizildi. Üç boyutlu yapısı üzerinde, enzimin iki adet korunmuş bölgesi gösterildi.

2.2.4. FAE'in Klasik Esteraz Motifi (GlyXSerXGly) Analizi

FAE'in klasik esteraz motifi (GlyXSerXGly) analizi, Lai'nin (2012) kullandığı bakterilere ait aminoasit dizileri kullanılarak Online bir program olan Clustal Omega programı ile yapıldı. Analizde kullanılan bakteriler ve proteinleri; *L. johnsonii* N6.2 sinnamoyl esterazı, *L. reuteri* DSM 20016 α/β katlanması ailesi hidrolaz benzeri proteini, *L. gasseri* ATTC 33323 α/β katlanması ailesi hidrolazı, *L. helveticus* DPC 4571 α/β katlanması ailesi hidrolazı, *L. fermentum* IFO 3956 hyphothetical proteini, *Prevotella bryantii* B14 α/β ailesi hidrolazı, *Capnocytophaga sp.* oral taxon 338 str. F0234 α/β ailesi hidrolazıdır.

2.2.5. Bakteriyal FAE'lerin Filogenetik Analizi

NCBI GenBank'tan elde edilen bakteriyal FAE'lerin amino asit dizileri, BioEdit programı kullanılarak alt alta hizalandı. Daha sonra bu sıralar analiz edilmek üzere Fasta formatına dönüştürüldü. Fasta formatına dönüştürülen diziler kullanılarak MEGA 6.06

programı ile filogenetik ağaç çizildi. Filogenetik ağaç çiziminde kullanılan aminoasit sıraları şunlardır; *Butyrivibrio fibrisolvens* sinamoyil esterazı (CinI, AAC44493.1), *B. proteoclasticus* B316 ferulik asit esterazı (Est1E, YP_003832182.1), *L. johnsonii* sinamoyil esterazı (LJ0536, ADD11991.1), *L. johnsonii* NCC 533 sinamoyil esterazı (LJ1228, NP_965083.1), *Cellulosilyticum ruminicola* JCM 14822 ferulik asit esteraz III (AEA06597.1), *B. fibrisolvens* sinamoyil esterazı (CinII, AAB57776.1), *Caldanaerobacter subterraneus subsp. tengcongensis* MB4 ferulik asit esterazı (TtFAE, NP_623397.1), *Dickeya dadantii* 3937 ferulik asit esterazı (DdFAET, YP_003883788.1), *Cellvibrio japonicus* esterazı (Esteraz D, CAA41727.1), *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 ferulik asit esterazı (Phesterase, YP_339903.1), *Ruminiclostridium thermocellum* ferulik asit esterazı (AAA23286.1), *Cellulosilyticum ruminicola* JCM 14822 ferulik asit esterazı (CrFAEI, ACZ98598.1).

2.2.6. FAE Geninin Ekspresyonu ve Enzim İzolasyonu

E. coli BL21(DE3) LysS/pETGthFAE ve *E. coli* BL21(DE3) LysS/pETGthFAE-His'in gece kültürlerinden LB besiyerine OD₆₀₀'si 0,1 olacak şekilde ekim yapıldı. Bu kültürlerin OD₆₀₀'leri 0,6-0,9 oluncaya kadar inkübe edilerek 1 mM IPTG ile indüklendi ve ardından üç buçuk-dört saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra hücreler, 10.000 rpm'de beş dk. santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöken hücreler 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,5) vortekslenildi ve beş dk. Sartorius Labsonic marka sonikatör kullanılarak %80 güçte 0,6 döngü aralığında patlatılarak 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edildi. Pellet kısımları atılarak süpernatant kısımları saklandı.

İzole edilen enzimlerin aktiviteleri, 2 mg/mL etil ferulat içeren LB'de kontrol edildi. Besiyeride kuyucuklar açılarak, enzimler bu kuyucuklara konuldu. Kontrol olarak da enzimleri izole ederken kullanılan tampon kullanıldı. Petride bu tamponun etil ferulatu parçalayıp parçalamadığı kontrol edildi. Elde edilen enzimler, GthFAE ve GthFAE-His olarak adlandırıldı.

2.2.7. Enzimlerin Saflaştırılması

GthFAE'ı saflaştırmak için ilk olarak, ısı şoku uygulaması yapıldı. Yukarıda anlatıldığı gibi elde edilen özüt, 15 dk süreyle 50°C'de bekletildi. Ardından 15 dk. 14.800

rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernant alındı, çöken kısım uzaklaştırıldı. Ardından iyon değişimi kolon kromatografisi yapıldı. İyon değişimi kromatografisi için 50 cm uzunluğundaki ve 1,5 cm çapındaki bir kolon kullanıldı. Bu çalışmada kolon malzemesi olarak anyonik iyon değiştirici olan Q-Sepharose, hareketli faz olarak 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu kullanıldı. Kolon malzemesinin ve deneyde kullanılan tüm tamponların gazı bir vakum pompası ile alındı ve sonrasında bir Pastör pipeti kullanılarak kolona yavaş bir şekilde dolduruldu. Doldurma işlemi bittikten sonra kolon 500 mL 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu ile dengeye getirildi. Çözeltinin akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlandı. Özüt kolondan geçirilerek, içerisinde bulunan proteinlerin kolon dolgu malzemesine bağlanmaları sağlandı. Sonrasında kolondan 50 mL daha tampon geçirilerek kolona tutunmayan proteinler uzaklaştırıldı. Kolona tutunan proteinlerin elüsyonu ise, 400 mL'lik 0 M-0,6 M tuz (NaCl) gradient köprüsü ile yapıldı. Kolondan çıkan fraksiyonlar, cam tüplerinde 3,5 mL olacak şekilde toplandı. Tüm tüplerde FAE aktivitesi taraması yapılarak, en fazla aktivite bulunduran tüpler seçilerek birleştirildi ve SDS-PAGE'de saflığı kontrol edildi. Elde edilen enzimi tuzdan arındırmak için diyaliz yapıldı. Bunun için enzim, diyaliz membranı içinde 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu içerisine alındı ve tampon, bir gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak, diyaliz edildi. Diyalizden sonra 14.800 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek bozunan (denatüre olan) proteinlerin atılması sağlandı.

GthFAE-His'i saflaştırmak için kobalt (Co) affinite kolon kromatografisi (TALON® Metal Affinity Resin içeren kit) kullanıldı.

Çalışmada kullanılan tamponların içerikleri Tablo 6'da verilmiştir. 1-2 mL Co bağlı His-boncukları, 10 mL yıkama tamponu ile 15 mL'lik falkon tüp içerisinde üç kez yıkandı. Ardından proteinler ayrı ayrı (4 mL) His-boncukları içeren falkon tüplere transfer edilerek yıkama tamponu ile son hacim 15 mL'ye tamamlandı. En az iki saat düşük hızda alt üst edilerek dikkatlice çalkalandı. İnkübasyon süresi sonunda numune, 700 x g'de beş dk. santrifüj edildi. Santrifüjün ardında süpernatant, pipetör yardımı ile uzaklaştırıldı. His-boncukları, en az üç kez 20 mL yıkama tamponu ile yıkanarak bağlanmamış ilgisiz proteinler elimine edildi. Elüsyon basamağına geçmeden önce yıkama tamponu, His-boncuklardan pipetör yardımı ile tamamen uzaklaştırıldı. Elüsyon tamponu kullanılarak bağlanmış proteinlerin ayrılması sağlandı.

Tablo 6. Co-Affinite kromotografisinde kullanılan tamponlar

Tampon	NaH ₂ PO ₄ (mM)	NaCl (mM)	İmidazol (mM)	pH
Liziz	50	300	10	7,0
Yıkama	50	300	20	7,0
Elüsyon	50	300	250	7,0

Elüsyon tamponuyla elde edilen numunenin saflığı, SDS-PAGE’de kontrol edildi.

2.2.7.1. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Protein jel elektrofrezleri Hoeffler SE 600 marka elektrofrezde %12’lik jel kullanılarak 15 mA’lik akım altında gerçekleştirildi. GthFAE’in moleküler ağırlığını hesaplamak ve saflığını kontrol etmek amacıyla saflaştırılan enzim, moleküler ağırlığı belli olan bir protein markırı ile SDS poliakrilamid jel elektrofrezinde yürütülerek belirlendi. Her bir örnekten 50 µg protein kullanılarak yürütüldü. Her bir numunenin üzerine eşit miktarda muamele tamponu (0,15 M Tris-HCl pH 6,8; %4 (w/v) SDS; %20 (v/v) Gliserol; %6 (v/v) β-merkaptoetanol) ilave edildi ve sonrasında 99°C’de dört dk. bekletilerek %12’lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jele yüklendi ve 15 mA akım altında, yürütme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü (Sambrook vd., 1989). Yürütme işlemi sonrasında jel, Commasie Brilliant Blue (%0,125 (w/v) commasie Brilliant Blue R-250, %50 (v/v) metanol, %10 (v/v) asetik asit) boyası ile bir saat boyandı ve hemen ardından birinci yıkama solüsyonunda (%50 (v/v) metanol, %10 (v/v) asetik asit %40 (v/v) ddH₂O) bir saat bekletildi. Daha sonra ikinci yıkama solüsyonunda (%7 (v/v) asetik asit ve %5 (v/v) metanol) bantlar belirginleşinceye kadar bekletildikten sonra tarayıcı ile fotoğraflandı.

2.2.8. FAE Aktivitesinin Ölçümü

FAE aktivitesi ilk olarak etil ferulat ve metil ferulat ile kontrol edildi. Etil ve metil ferulat, dimetilformamid içerisinde çözülerek hazırlandı ve kullanıldı. Değişik *p*-NP esterleri üzerine etkisini incelemek için enzimin optimum sıcaklık ve pH’sında spektrofotometrik olarak aktivitesi ölçüldü. Enzim aktivitesinin spektrofotometrede tayini

için substrat çözeltisi; 1:4:95 (v/v/v) oranında olacak şekilde sırasıyla; asetonitril-izopropanol (1:1) karışımında çözülmüş *p*-NP butirat (*para*-nitrofenil butirat, 4C'lu), *p*-NP kaprilat (8 C'lu), *p*-NP kaprat (10 C'lu), *p*-NP laurat (12 C'lu), *p*-NP miristat (14 C'lu) ve *p*-NP palmitat (16 C'lu) etanol, tampon bileşenlerinden hazırlandı. Rutin çalışmalarda Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazında kör olarak; 900 µl substrat çözeltisi ve 300 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu, numune olarak 900 µl substrat çözeltisi, 270 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponu ve 30 µl enzim kullanılarak 405 nm'de ölçümleri yapıldı.

1 Ünite, hazırlanan enzim özütü ile pH 7,5 ve 50 °C'de *p*-NP bütirattan bir dk.'da oluşan 1 µmol *p*-NP (*p*-nitrofenol) olarak tanımlanmıştır. 405 nm'de *p*-NP'ün molar absorblama katsayısı (ϵ), $0,016 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak hesaplandı.

2.2.9. Protein Miktarları Ölçümü

Protein miktarları Bradford'un yöntemine göre hesaplandı. 1000 mL boya solusyonu hazırlanırken 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 boyası önce 50 mL %95'lik etanol içinde iyice çözümlenerek, üzerine 100 mL %85'lik fosforik asit eklendi. Daha sonra oluşan karışım saf su ile 1000 mL'ye tamamlandıktan sonra hazırlanan çözelti karanlık bir yerde filtre kağıdı ile filtre edildi. Bu boya ile ilk olarak BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılarak 595 nm dalga boyunda protein konsantrasyonu standardı grafiği oluşturuldu. Standart grafik için 1, 2, 4, 6,10, 15, 20, 40, 60, 80, 90 µg BSA içeren çözeltiler, 0,15 M NaCl ile 100 µl'ye tamamlanıp her bir örneğin üzerine 5 mL hazırlanan boyadan eklendi. Protein ve boya karışımları vortekslenip oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Standart grafik oluşturulduktan sonra, örneklerin ölçümü yapılırken değişik miktarlarda örnek 0,15 mM NaCl ile 100 µl'ye tamamlanarak 5 mL boya eklendi. Yine aynı prosedür uygulandıktan sonra standart grafiğin yüklendiği Agilent 8453E UV-visible Spectroscopy System cihazı kullanılarak 595 nm'de ölçümler yapıлып, protein konsantrasyonu µg/µl cinsinden hesaplandı.

2.2.10. FAE'in Karakterizasyonu

Her iki FAE'in (GthFAE ve GthFAE-His) da karakterizasyonu yapıldı. Yapılan deneyler en az üç kez tekrarlandı.

2.2.10.1. Substrat Spesifitesi

GthFAE ve GthFAE-His'in spektrofotometrik olarak 4-nitrofenol esterleri üzerine etkisini incelemek için, *p*-NP butirat (4 C'lu), *p*-NP kaprilat (8 C'lu), *p*-NP kaprat (10 C'lu), *p*-NP laurat (12 C'lu), *p*-NP miristat (14 C'lu) ve *p*-NP palmitat (16 C'lu) substratları kullanıldı. Enzimin en iyi aktiviteye sahip olduğu substrat 100 kabul edilerek % bağıl aktivitesi hesaplandı.

2.2.10.2. Optimum Sıcaklık

GthFAE ve GthFAE-His'in en iyi çalıştığı optimum sıcaklık değeri 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75°C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta gerçekleştirilen 20 dk.'lık seri reaksiyonlar ile *p*-NP butirat varlığında belirlendi. Bu reaksiyon serisinde enzimin en iyi çalıştığı sıcaklık değeri daha sonraki çalışmalarda kullanılacak olan reaksiyon sıcaklığı olarak belirlendi.

2.2.10.3. Optimum pH

GthFAE ve GthFAE-His'in en iyi çalıştığı optimum pH değerini bulmak için pH 5-10 arasındaki tamponlar kullanıldı (pH 5-5,5 için 50 mM sodyum asetat tamponu, pH 6-6,5 için 50 mM fosfat tamponu, pH 7-9 için 50 mM Tris-HCl tamponu). Reaksiyonlar belirlenen optimum sıcaklık değerinde ve *p*-NP butirat varlığında gerçekleştirildi. Gözlenen optimum pH aktivite değeri daha sonra yapılacak olan kinetik parametrelerin belirlenmesi gibi çalışmalarda reaksiyon pH'sı olarak kullanıldı.

2.2.10.4. Isıl Kararlılık

GthFAE ve GthFAE-His'in kararlılıklarına ısının etkisini incelemek için enzim, 30 dk. boyunca 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) tamponunda, 30, 40, 50, 60, 70 ve 80°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite (%); optimum pH ve sıcaklıkta *p*-NP butirat ile 20 dk.'lık bir reaksiyon sonucunda ölçüldü. Ayrıca enzimler, 40, 50 ve 60°C'de 150 dk.'ya kadar inkübe edilerek, yine aynı şekilde kalan aktivite (%) hesaplandı.

2.2.10.5. pH Kararlılık

GthFAE ve GthFAE-His'in kararlılıklarına pH'nın etkisini incelemek için enzim, 50 mM sodyum asetat (pH 5-5,5) 50 mM fosfat (pH 6-6,5), 50 mM Tris-HCl (pH 7-9) tamponlarında 50°C'de 120 dk.'ya kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite (%); optimum pH ve sıcaklıkta *p*-NP butirat ile 20 dk.'lık bir reaksiyon sonucunda ölçülerek enzimin en kararlı olduğu pH değeri belirlendi.

2.2.10.6. Metal İyon Etkisi

GthFAE ve GthFAE-His'in aktiviteleri üzerine metal iyonlarının etkisi; Mg⁺², Li⁺, Ca⁺², K⁺, Zn⁺² ve Co⁺² metal iyonlarının klorür tuzları ile gerçekleştirildi. Enzim, ilave edilen 1 mM ve 5 mM metal iyonları ile 60°C'de bir saat inkübe edildi. Bekletilen enzimlerle *p*-NP butirat substrat olarak kullanılarak aktivite bakıldı. Enzimin metalsiz hali 100 kabul edilerek metal içeren enzimlerin % kalan aktivitesi hesaplandı.

2.2.10.7. Organik Çözücülerin ve İnhibitörlerin Etkisi

Deterjan ve organik çözücülerin GthFAE ve GthFAE-His'in aktiviteleri üzerine etkileri incelendi. Enzim, 30 dk, % 1 (v/v) DMSO, β- merkaptoetanol, DMSO, etanol, izopropanol, 5 mM EDTA, PMSF ve DTT, %0,1 (v/v) SDS, Tween 20, Triton X-100 içerecek şekilde 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda 60 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kalan aktivite; optimum pH ve sıcaklıkta *p*-NP butirat ile 20 dk.'lık bir

reaksiyon sonucunda ölçüldü. Enzimin kimyasalları içermeyen hali 100 kabul edilerek kimyasalları içeren enzimin % kalan aktivitesi hesaplandı.

2.2.10.8. Enzim Kinetiği

GthFAE ve GthFAE-His'in kinetik verileri, değişik substrat konsantrasyonları ile gerçekleştirilen seri reaksiyonlar ile belirlendi. Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) değerleri hazırlanan Lineweaver–Burk grafiğinde, x ve y eksenleri kestiği noktalara karşılık gelen değerlerin tersi olarak belirlendi (Lineweaver ve Burk, 1934) ve K_m ve V_{max} değerleri, OriginPro8.1 programıyla hesaplandı. Ayrıca enzimin K_{cat} ve K_{cat}/K_m değerleri de hesaplandı. Bu değerler, enzimin etki ettiği substratlar olan *p*-NP butirat (C4), *p*-NP kaprilat (C8), *p*-NP kaprat (C10), *p*-NP laurat (C12) substratlarının her biri için hesaplandı.

2.2.11. Klasik ve MBD Fermentasyonla PHB Üretimi

Klasik ve MBD fermentasyonlarını karşılaştırmak amacıyla rekombinant *E. coli* XL1Blue bakterisinden PHB üretimi, ABD'de Utah Science Technology and Research (USTAR)'da yapılmıştır. Deneyle en az üç kere tekrar edilmiştir.

2.2.11.1. Erlenlerde PHB Üretimi

E. coli XL1Blue/pBHR68'in gece kültürü, 5 mL LB (50 µg/mL ampisilin) içerisinde, 37°C'de 220 rpm hızla çalkalanan inkübatörde yapıldı. Ertesi gün gece kültürü, 50 mL M9 besiyeri (100 µg/mL ampisilin ve 0,1 mM IPTG içeren) içeren 250 mL'lik erlenlere OD₆₀₀'si 0,05 olacak şekilde ekim yapmak için kullanıldı. Erlenler, 4, 8, 12, 24 ve 48 saat sonra sırasıyla alındı ve PHB, glukoz ve kuru hücre ağırlığı (DCW) analizleri yapıldı. 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 ve 48. saatlerin herbirinde OD₆₀₀ ve CFU/mL ölçümleri yapıldı (Rahman vd., 2013).

2.2.11.2. PHB'ın Klasik Fermentörde Üretimi

PHB üretiminde Biostat Q Multi-Fermentor Bioreactor System kullanıldı (Şekil 14). Tankın gerekli açıklıkları folyo ile kapatıldıktan sonra, tank otoklavda 121°C'de 1,1 atm basınç altında steril edildi. Sterilizasyon işlemi bittikten sonra tank oda sıcaklığına getirildi ve DO ve pH problemleri kalibre edildi. Fermentöre, 1 L olacak şekilde 100 µg/mL ampisilin ve 0,1 mM IPTG içeren M9 besiyeri ilave edildi. Fermentör; ayrı ayrı 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarıyla ve içerisine yine ayrı ayrı 0,4 ve 0,8 vvm'lik oksijen sağlanarak kullanıldı. Fermentörün sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. DO ve pH, inkübasyon boyunca kontrol edilmeden kendiliğinden düşmesi sağlandı. Fermentör, *E.coli* XL1Blue/pBHR68'in gece kültürü ile OD₆₀₀'si 0,05 olacak şekilde inokule edildi. 0, 4, 8, 12, 24 ve 48. saatlerde fermentörden örnekler alınarak bunların, PHB, glukoz, kuru hücre ağırlığı ve CFU/mL analizleri yapıldı. OD₆₀₀ ölçümleri yapıldı. Volumetrik oksijen transfer kat sayısı (kLa), “non-fermentative (Dynamic gassing-out)” metoduyla hesaplandı (Tribe vd., 1995).



Şekil 14. PHB üretiminde kullanılan fermentör

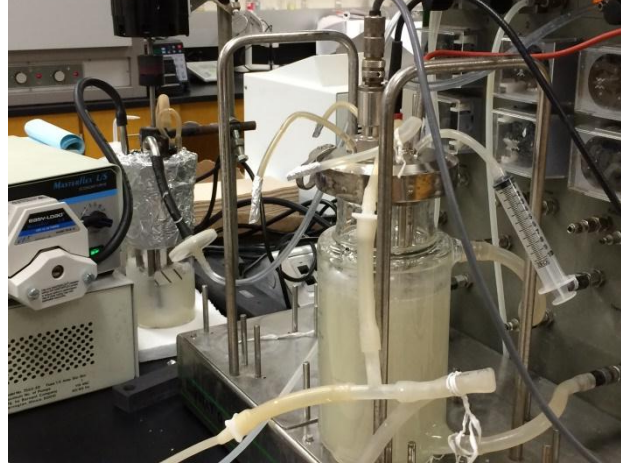
2.2.11.3. PHB'ın Mikrobaloncuk (MBD) Fermentasyonla Üretimi

Mikrobaloncukları üretebilmek için Sebba tarafından geliştirilen bir spinning diske sahip MBD cihazı kullanıldı (Sebba, 1985). Bu disk yaklaşık 5 cm eninde ve 3 mm kalınlığındadır. Disk kuvvetli bir motora bağlanmıştır ve 1 L'lik cam bir tankın içerisindedir (Şekil 15). Bu cihaz fermentörden ayrı bir şekilde, gerekli açıklıkları folyo ile

kapatılarak fakat yine otoklavda aynı şartlarda steril edildi. Sterilizasyondan sonra içerisine ayrıca bir şişede steril edilmiş 400 mL M9 besiyeri ilave edildi. Bakteri inokulasyonları ve gerekli kimyasalların eklenmesi yine klasik fermentördeki gibi aseptik teknikler kullanılarak fermentörün içerisine yapıldı. Hava 0,4 ve 0,8 vvm hızla MBD jeneratörüne dağıtıldı (Şekil 16). Fermentörün sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. MBD diskinin dönme hızı 4000 rpm olarak ayarlanarak, mikrobaloncuk oluşumu sağlandı. Oluşan bu mikrobaloncuklar, fermentöre 150 mL/dk. hızla çalışan bir peristaltik pompayla beraber pompalandı. Fermentörden de MBD jeneratöre, fermentasyon besiyerini 40 mL/dk. hızla transfer etmek için, ayrı bir peristaltik bir pompa kullanıldı. Bu pompalama oranında mikrobaloncuk kanalında ve fermentördeki sıvı seviyesi stabil kaldı (Zhang vd., 2005; Weber ve Agblevor, 2005; Hensirisak vd., 2002). Bu esnada fermentör tankının hızı 350 rpm'e ayarlandı. Yine klasik fermentasyondaki gibi inkübasyon sırasında, DO ve pH değerleri kontrol altında tutulmayarak kültürde kendiliğinden düşmesi sağlandı. Fakat bu düşüşler kayıt altına alındı. *E.coli* XL1Blue/pBHR68'in gece kültürü ile OD₆₀₀'si 0,05 olacak şekilde inokulasyonu yapıldıktan 0, 4, 8, 12, 24, ve 48 saat sonra örnekler alınarak, PHB, glukoz, kuru hücre ağırlığı ve CFU/mL analizleri yapıldı. OD₆₀₀ ölçümleri yapıldı. kLa, yine "non-fermentative (Dynamic gassing-out)" metoduyla hesaplandı.



Şekil 15. Mikrobaloncuk üreten cihaz



Şekil 16. Mikrobaloncuk üreten cihazın PHB üretiminde fermentörle birlikte kullanımı

2.2.12.Yapılan Analizler

Kuru hücre ağırlığını belirlemek için, belirtilen saatlerde alınan numunelerden 50 mL'si, falkon tüplere konularak 3500 rpm'de 20 dk. santrifüj edildi. Santrifüjden sonra alınan pellet liyofilize edilerek, kuru ağırlığı g/L olarak hesaplandı.

Kültürdeki glukoz içeriği, glukoz assay reagent ile analiz edildi: 60 µl numuneye 120 µl glukoz assay reagent ilave edildi ve 30 dk boyunca 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 120 µl H₂SO₄ (12 N) eklendi ve reaksiyon durduruldu. Numunelerin absorbansı 96'lık mikropate kullanılarak 540 nm'de ölçüldü. Konsantrasyon hesabı, yapılan glukoz standardı eğrisi ile hesaplandı.

CFU/mL analizi için alınan numunelerin, 96'lık steril mikropate kullanılarak 10 defa seri sulandırmaları yapıldı. Sulandırmalardan sonra herbirinden ayrı ayrı 10'ar µl numune alınıp, agar petriye inokülasyonları yapıldı. 37°C'lik etüvde 16 saat inkübe edilerek, ertesi gün her bir alanda oluşan kolonilerin sayımı yapıldı ve sulandırma katsayıları ile çarpılarak 1mL'deki CFU hesaplandı.

OD₆₀₀ analizi için, kültürlerin inkübasyonu süresince belli zaman aralıklarında alınan numunelerin spektrofotometrede 600 nm'de ölçümleri yapıldı ve OD₆₀₀'ün zamana karşı grafiği çizildi.

PHB analizi, NMR-GC methoduyla yapıldı (Linton vd., 2012). Bu yöntemde, yaklaşık 15 mg numuneyle aynı hacimde sodyum hipoklorid ve kloroform ilave edilen

numuneler, liyofilize edilerek santrifüj edildi ve 1 H NMR yapıldı. PHB konsantrasyonu NMR-GC standardına göre hesaplandı (Rahman vd., 2013).

2.2.12.1. Volumetrik Oksijen Transfer Kat Sayısı (kLa) Hesaplanması

kLa'yı hesaplamak için ilk olarak biyoreaktördeki oksijen, sisteme nitrojen verilerek tamamen uzaklaştırıldı. Ardından oksijen; 0,4 vvm, 0,8 vvm hızla doğrudan fermentöre ve ayrıca daha sonra MBD ile fermentöre verildi. % DO, %90-95'e ulaşana kadar zamana karşı kaydedildi. kLa'yı bulmak için aşağıdaki denklemler kullanıldı.

$$dCL/dt = kLa (C^* - CL) \quad (1)$$

$$kLa = \ln (C^* - CL)/t \quad (2)$$

dCL/dt: Zamana karşı (t) DO daki değişim

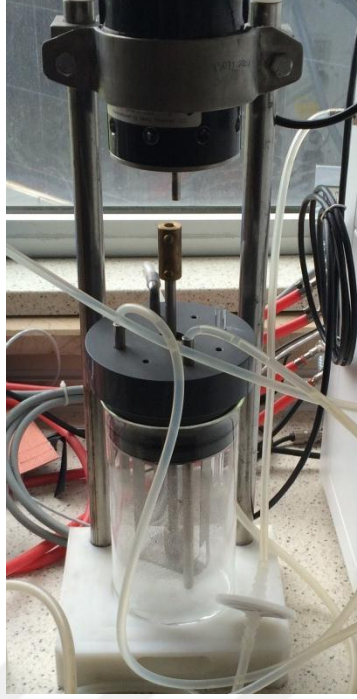
C*: Doymuş DO konsantrasyonu

CL: Biyoreaktördeki DO konsantrasyonu

ln (C* - CL)'nin zamana karşı (t) grafiği çizilerek, buradaki lineer grafiğin eğiminden kLa (h⁻¹) hesaplandı.

2.2.13. MBD Cihazının Türkiye'de Üretimi

MBD cihazının Türkiye'de bizim laboratuvarımızda FAE üretimi için kullanılmasına karar verildi. Fakat cihaz Türkiye'de bulunmadığından dolayı, Kocaeli Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü'ne yaptırılarak ilgili çalışmalarda kullanıldı. Söz konusu MBD cihazında kullanılan motorun özelliklerine sahip bir motor ABD'den sipariş verilerek Türkiye'ye getirildi (Troemner Firması, Model 101 Light Duty Overhead Mixer, New Jersey). Motorun hızı maksimum 7500 rpm'e çıkmaktadır. Ayrıca bu motor, üstten ayarlanabilir hız düğmesine, maksimum 8,5 litrelik su karıştırma kapasitesine, tek şafta ve doğrudan sürücülü motora ve bir desteğe takılabilmesini sağlayan ayarlanabilen anahtarlara sahiptir. 3 mm kalınlığında ve 5 cm çapındaki paslanmaz çelikten oluşan bir spinning disk yapıldı ve motora bağlanarak 1 L'lik cam bir tankın içerisine yerleştirildi (Şekil 17).



Şekil 17. Türkiye’de üretilen mikrobaloncuk cihazı

2.2.14. Klasik ve MBD Fermentasyonla FAE Üretimi

2.2.14.1. FAE’ın Erlen Kültüründe Üretimi

E. coli BL21(DE3) LysS/pETGthFAE-His`in, 37°C’de 220 rpm hızla çalkalanan inkübatörde, 5 mL LB (50 µg/ml kanamisin) içerisinde gece kültürü yapıldı. Ertesi gün gece kültürü, 50 mL LB besiyeri (50 µg/mL kanamisin içeren) içeren 250 mL’lik erlenlere OD₆₀₀’si 0,1 olacak şekilde ekim yapmak için kullanıldı. Hazırlanan kültürler 37°C’lik etüvde yine 220 rpm hızla çalkalandı. Kültürün OD₆₀₀’si 0,9 olduğunda 1 mM IPTG ile indüklemeye yapıldı. Erlen, üç buçuk saat sonunda alındı ve kuru hücre ağırlığı, OD₆₀₀, CFU/mL ve protein konsantrasyonu analizleri yapıldı.

2.2.14.2. FAE’ın Klasik Fermentörde Üretimi

FAE üretiminde Sartorius Biostat A Plus Bioreactor System kullanıldı. Tankın gerekli açıklıkları folyo ile kapatıldıktan sonra, tank otoklavda 121°C’de 1,1 atm basınç altında steril edildi. Sterilizasyon işlemi bittikten sonra tank oda sıcaklığına getirildi.

Fermentöre 1,5 L olacak şekilde 50 µg/mL kanamisin içeren LB besiyeri ilave edildi. Fermentör 350 rpm çalkalama hızıyla ve kompresörden 1,1 bar'lık hava sağlanarak kullanıldı. Fermentörün sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. DO ve pH'nın inkübasyon boyunca kontrol edilmeden kendiliğinden düşmesi sağlandı. Fermentör, *E. coli* BL21(DE3) LysS/pETGthFAE-His`in gece kültürü ile OD₆₀₀'si 0,1 olacak şekilde inokule edildi. Kültürün OD₆₀₀'si 0,9 olduğunda, 1 mM IPTG ile indükleme yapıldı. üç buçuk saat sonunda işlem durduruldu ve alınan numunelerin kuru hücre ağırlığı, OD₆₀₀, CFU/mL ve protein konsantrasyonu analizleri yapıldı.

2.2.14.3. FAE'ın MBD Fermentasyonla Üretimi

Mikrobaloncukları üretebilmek için Türkiye'de tarafımızca yapılan bir spinning diske sahip MBD cihazı kullanıldı (Şekil 18). Bu cihaz fermentörden ayrı bir şekilde, gerekli açıklıkları folyo ile kapatılarak fakat yine otoklavda aynı şartlarda steril edildi. Sterilizasyondan sonra içerisine ayrıca bir şişede steril edilmiş LB besiyerinden 400 mL ilave edildi. Bakteri inokulasyonları ve gerekli kimyasalların eklenmesi yine klasik fermentördeki gibi aseptik tekniklere göre fermentörün içerisine yapıldı. 1,1 bar'lık hava kompresörden MBD jeneratörüne dağıtıldı. Fermentörün sıcaklığı 37°C'ye ayarlandı. MBD diskinin dönüş hızı 4000 rpm olarak ayarlanarak, mikrobaloncuk oluşumu sağlandı. Oluşan bu mikrobaloncuklar fermentöre peristaltik pompayla beraber pompalandı. Fermentörden de gelen fermentasyon besiyeri, MBD jeneratöre, ayrı bir peristaltik bir pompa ile pompalandı. Bu esnada fermentör tankının çalkalama hızı 350 rpm'e ayarlandı. Yine klasik fermentasyondaki gibi inkübasyon sırasında, DO ve pH değerleri kontrol altında tutulmayarak kültürde kendiliğinden düşmesi sağlandı. Fermentör, *E. coli* BL21(DE3) LysS/pETGthFAE-His`in gece kültürü ile OD₆₀₀'si 0,1 olacak şekilde inokule edildi. Kültürün OD₆₀₀'si 0,9 olduğunda 1 mM IPTG ile indükleme yapıldı. üç buçuk saat sonunda işlem durduruldu ve alınan numunelerin kuru hücre ağırlığı, OD₆₀₀, CFU/mL ve protein konsantrasyonu analizleri yapıldı.



Şekil 18. Mikrobaloncuk üreten cihazın FAE üretiminde fermentörle birlikte kullanımı

3. BULGULAR

3.1. Çalışmada Kullanılacak Türlerin Belirlenmesi ve Enzim Aktivite Deneyi

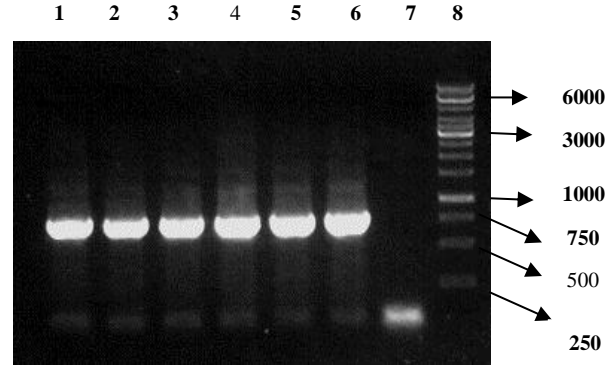
Seçilen izolatlardan *Geobacillus pallidus* C1Noc, *Geobacillus thermodenitrificans* Y2, *Geobacillus* sp. TF1 ve *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T suşlarında ekim çizgilerinin etrafında şeffaf zonun varlığı gözlemlendi. Bu şeffaf zonun varlığı FAE aktivitesini göstermektedir (Şekil 19). Bu seçilen suşlar dışındaki bakterilerde bu zon gözlemlenmedi.



Şekil 19. FAE aktivitesine sahip olan bakteri suşlarından *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T

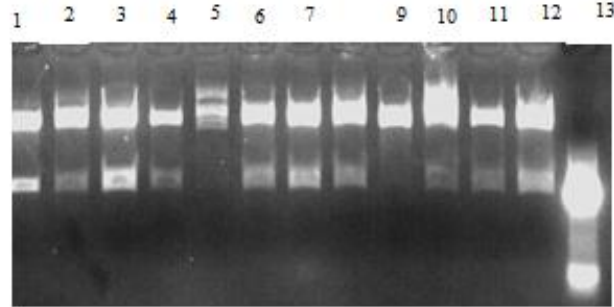
3.2. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T FAE Geninin pET-28a(+) Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

G. thermoglucosidasius DSM 2542^T bakterisinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. Ardından yapılan PCR sonucunda, 759 bp'lik gen dizisi elde edildi (Şekil 20).



Şekil 20. GtexF ve GtexR primerleri ile gerçekleştirilen PCR'in annealing sıcaklığı ile optimizasyon sonuçları 1-6: Annealing sıcaklığı 50-54°C'li PCR ürünleri 7: Kontrol 8: Moleküler ağırlıklar standardı

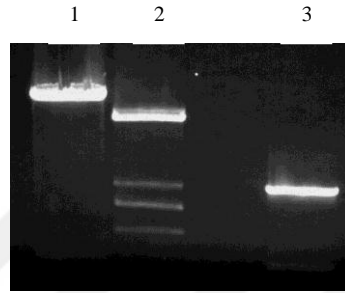
G. thermoglucosidasius DSM 2542^T'un FAE geni öncelikle pGEM-T Easy Klonlama Vektörüne klonlandı (Şekil 21). pGEMGthFAE; dizi analizine (Macrogen-Hollanda) gönderildi ve gelen sonuçlara göre istediğimiz gen bölgesinin çoğaltılmış olduğu tespit edildi.



Şekil 21. Rekombinant plazmitlerin *EcoRI* restriksiyon analizleri. 1-12: *EcoRI* ile kesilmiş pGEMT Easy vektörü ve 759 bp'lik insert 13- 759 bp'lik FAE geni

Klonlamaya çalışılan gen, 491. nükleotitinden sonra *NcoI* kesim bölgesi içermektedir. Klonlama aşamasında *NcoI* restriksiyon endonukleazıyla kesim yapılması gerekmektedir fakat bu da genin yaklaşık 500 ve 250 bp'lik iki fragmente ayrılmasına sebep olmaktadır. Bu problemi aşmak için kısmi kesim olup olmadığı denendi. Restriksiyon endonukleazın kesim şartlarında, bu reaksiyonu 37°C'de iki saat inkübe etmek gerekirken kısmi kesmesi için değişik zamanlarda inkübasyon yaparak kısmi kesim

yapıp yapmadığı araştırıldı. Sonuçta 10 dk'lık kesim sonunda kısmi kestiği, yani genin ortasından kesmeyip sadece, klonlama yapabilmek için primerle eklediğimiz genin 5` uç tarafındaki kesim bölgesinden kestiği belirlendi (Şekil 22). Bu gen, jelden çıkarılarak pET-28a(+) vektörüne ligasyon yapıldı. Diğer taraftan histidin kuyruğu içerecek şekilde klonlamayı sağlayacak olan primerlerin kesim bölgelerinde böyle bir problem olmadığından dolayı gen direk olarak iki saat boyunca gerekli restriksiyon enzimleriyle kesilerek pET-28a(+) vektörüne ligasyonu yapıldı.



Şekil 22. FAE geninin pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanması. 1: *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleazları ile kesilen pET-28a(+) vektörü 2: *NcoI* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleazları ile kısmi kesilen pGEMGthFAE 3: 759 bp'lik FAE geni.

3.3. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T FAE Kodlayan Genin Baz Dizilimi

G. thermoglucosidasius DSM 2542^T bakterisinden elde edilen FAE kodlayan 759 bp'lik gen dizisi Şekil 23'te gösterilmektedir.

```

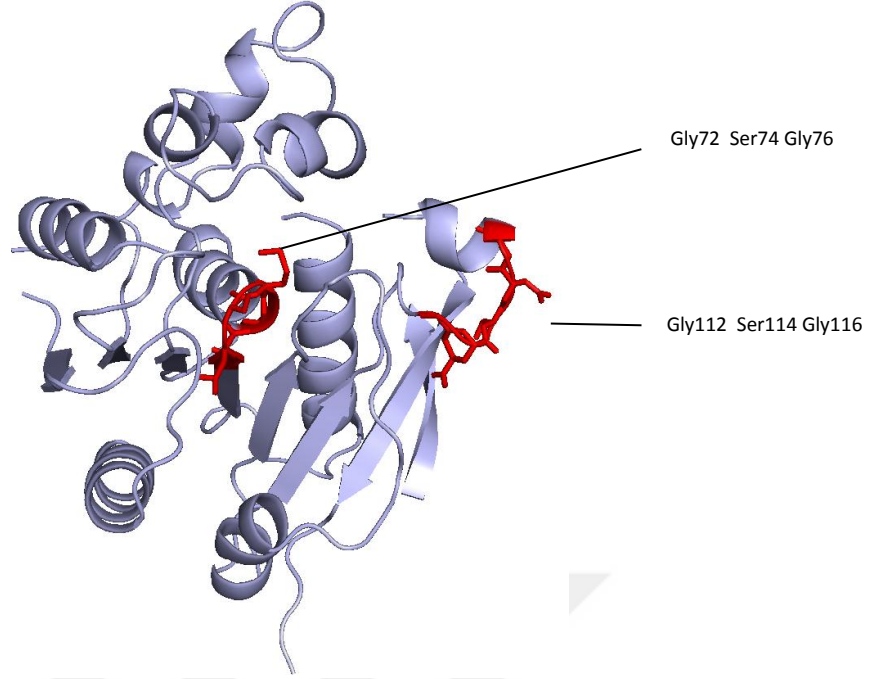
1 V Q K A I T L T H R G M T L R G M E H I
1 GTGCAAAAAGCGATAACATTGACTCATCGGGGCATGACGCTGCGCGGGATGGAGCATATC
21 P E K S L D E K V P A V I L F H G F T G
61 CCGGAAAAATCGCTTGATGAAAAGGTCCCTGCGGTTATTTTGTTCACGGATTTACCGGC
41 T K L E P H R L F L K I S R A L E K Q G
121 ACGAAGCTGGAGCCGCATCGCTTGTTTTTAAAAATATCGCGCGCGCTTGAGAAGCAAGGA
61 I A S F R F D F L G S G E S D G D F E E
181 ATTGCCAGCTTCCGCTTTGACTTTTTAGGCAGCGGGGAAAGCGACGGCGATTTTGAAGAG
81 M T V S K E I E E A H A I V D F V K R D
241 ATGACCGTGTCTAAAAGAAATAGAGGAAGCGCATGCGATTGTGCGACTTTGTCAAACGCGAT
101 G R I D P S H I Y L L G L S M G G L V A
301 GGGCGCATTGATCCATCGCACATTTACTTGCTCGGTCTCAGCATGGGCGGGCTTGTGTC
121 S V V A G E R P N D V A K L I L M A P A
361 AGCGTCGTTGCTGGCGAAAGACCGAATGATGTGCGGAAATTAATTCTTATGGCGCCGGCG
141 G N M Y E L I T E T I R Q E N I D V T A
421 GGAAATATGTACGAGTTGATTACGGAGACGATTGCGCAAGAAAATATCGATGTGACTGCT
161 P Y F D H G G N L V G R S F L E D L Q T
481 CCTTATTTTGACCATGGGGCAACTTAGTCGGACGCTCGTTTTTGGAAAGATTTACAAACG
181 I N V F E R A K P Y D G P V L L I H G T
541 ATCAACGTATTTGAACGGGCTAAGCCGTACGACGGCCCTGTGCTGCTGATTTCATGGAACG
201 E D D V V P H R V S H L Y E Q L C Y G S
601 GAGGATGATGTTGTGCCGCATCGCGTCAGCCATCTGTATGAGCAATTATGCTATGCCAGC
221 R A T V H L I E G A N H T F D G H R W E
661 CGCGTACCGTCCATTTGATTGAAGGAGCCAACCATACGTTTGACGGACATCGCTGGGAA
241 T E V I K T I L G F V S *
721 ACGGAAGTCATTAAGACGATTCTCGGGTTTGTTCCTAA

```

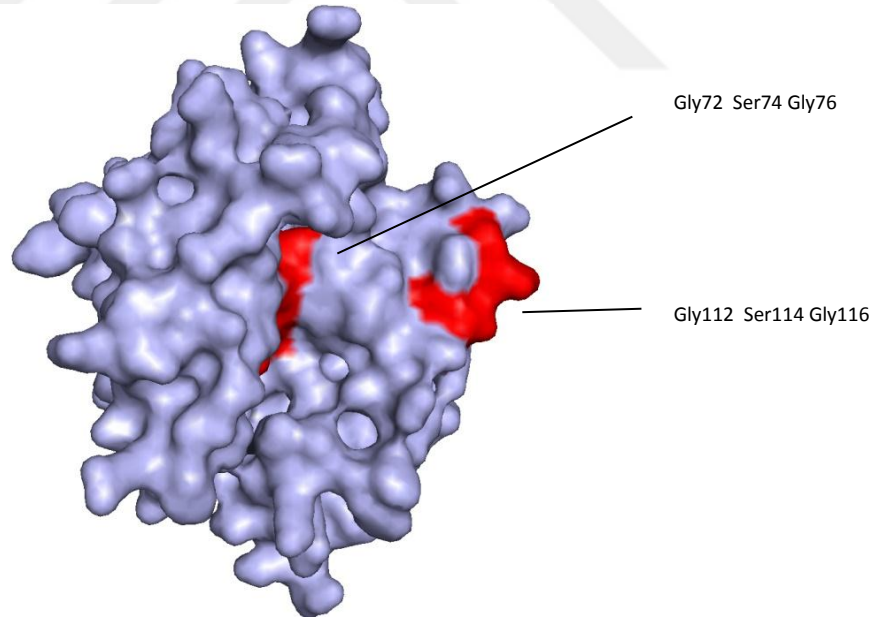
Şekil 23. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T FAE'nin aminoasit ve baz dizilimi

3.4. FAE'nin Üç Boyutlu Yapısı ve Aktif Bölgesi

GthFAE'nin üç boyutlu yapısı çizildi ve üzerinde enzimin sahip olduğu iki adet GlyXSerXGly motifi gösterildi (Şekil 24 ve 25). Enzimin, 8 adet α -heliks ve birbirine paralel 8 adet β -sheet tabakasına sahip ve katalitik bölgesinde Serin, Histidin ve Aspartik asit aminoasitleri olduğu tespit edildi (Ser 114, Asp 202, His 232).



Şekil 24. Ferulik asit esterazın üç boyutlu yapısı (Ribbon model, PyMOL). İki adet GlyXSerXGly motifi oklarla gösterilmiştir



Şekil 25. Ferulik asit esterazın üç boyutlu yapısı (Yüzey gösterimi, PyMOL). İki adet GlyXSerXGly motifi oklarla gösterilmiştir

3.5. FAE'in Klasik Esteraz Motifi (GlyXSerXGly) Analizi

GthFAE'in klasik esteraz motifi (GlyXSerXGly) analizi Clustal Omega Programı ile yapıldı. GthFAE'in iki adet GlyXSerXGly motifine sahip olduğu tespit edildi. Sonuçlar Şekil 26'da gösterilmektedir.

```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

GthFAE                      -----QKAITLTHRGMTLRG-----MEHIPEKSLDEKVPVAVI
EFI73470.1                   MIKMMNKKTLAIAIVCLGYVFPMQAQKIENFTLQGSKGLAATLQAPKLSGEKVLV
EGD34818.1                   -----MKKNIIITLVLILITLMTQTTKAQQTEDLILEGAKGKLAATLQTPKIEGKVKVMVI
YP_001578032.1               -----MSRITIERDGLTLVG-----DREEP--FG-EIYDMAI
ADD11991.1                   -----MATITLERDGLQLVG-----TREEP--FG-EIYDMAI
YP_815563.1                  ---MKLKKKKVGI-----YMATITIERDGLNLVG-----TREEP--FG-EIYDMAI
YP_001844134.1               -----MEVAIKSAGLTRG-----LLEGS--NQVPNDRIAI
ADD11992.1                   -----METTIKRDGLNLHG-----LLEGT--DKIENDAIAI
YP_001272260.1              -----MEITIKRDGLKLYG-----LLEGT--TTIKNDTIAI
                               :      : * *
                               :      : * *

GthFAE                      LFHGFGTGKL-EPHRLFLKISRALKQGIASFRFDLFGSGESDGDFFEEMTVSKEIEEHA
EFI73470.1                   ICHGFGSDK---ERPLLKAIADSLQSKGIASIRFDNFGCGKSEGFQDMTVLNEIEDAKD
EGD34818.1                   EGD34818.1---DRPLLRTIADQLQKAGIASIRFDNFGCGKSEGRFQDMTVLNEIEDAKK
YP_001578032.1               IMHGFAANR---NTDLLRQIADDLRDNVAVSVRFDFNGHGESDGKFFEDMTVCNEIADGKA
ADD11991.1                   IFHGFANR---NTSLLREIANSRLDENIASVRFDFNGHGDSDGKFFENMTVLNEIEDANA
YP_815563.1                   IFHGFANR---NTPLLKEIADELRLDENIASVRFDFNGHGDSDGKFFENMTVLNEIEDANA
YP_001844134.1               LMHGFKGDLGYDEENLLNQLAHLRLNDQGLATLRFDFAGCGKSDGRFSDMTVSELQDGMK
ADD11992.1                   LMHGFKGDLGYDDSKILYALSHYLNQSLPTIRFDGCGKSDGKFFEDMTVYSEILDGK
YP_001272260.1              LMHGFKGNLGYDDSKILYALSHYLNQSQIPTLRFDFDGTGHSDFEFKDMTVSEILDGMK
                               : *** .
                               : : : * * : : : * * * * * * * * * * * * : : :
                               : : : * * : : : * * * * * * * * * * * * : : :

GthFAE                      IVDFVKRDGRIDPSRIYLLGLSMGGLVASVWAGERPNVDVAKLILMAPAGNMYELITETIR
EFI73470.1                   VWAYALTLPW--VSDISMVGHSGGGVVTSMVAGQLKGSIRSIALCAPAAVLRDDALRGST
EGD34818.1                   VIAYAEKLPY--VSGISIVGHSGGGVVASMVAGELKKAIKSVALCAPAAVLRDDALRGTT
YP_001578032.1               ILDYVRTDPH--VRDIFLVGHSGGGVVASMLAGLYPDVVKVLLAPAAQLKDDALRSNT
ADD11991.1                   ILNYVKTDPH--VRNIYLVGHSGGGVVASMLAGLYPDLIKKVLLAPAAATLKGDALRGST
YP_815563.1                   ILNYVKTDPH--VRNIYLVGHSGGGVVASMLAGLYPDI IKKVLLAPAAATLKTDALNGST
YP_001844134.1               IIDYARQEVQ--AKEIILVGHSGGGVVASMLAAYYRDVIDKLVLLAPAAATLKDDALIGTC
ADD11992.1                   ILDYVRNTVK--AKHIYLVGHSGGGVVASMLAGYRDVIEKLLAPAAATLKSDALDGV
YP_001272260.1              IIDYAHTMQ--AKKIYLVGHSGGGVVASMLAAYYRDIITKLVLLAPAAATLKDDALKGV
                               : : :
                               : : * * * * * * * * * * * * : : * * * * :

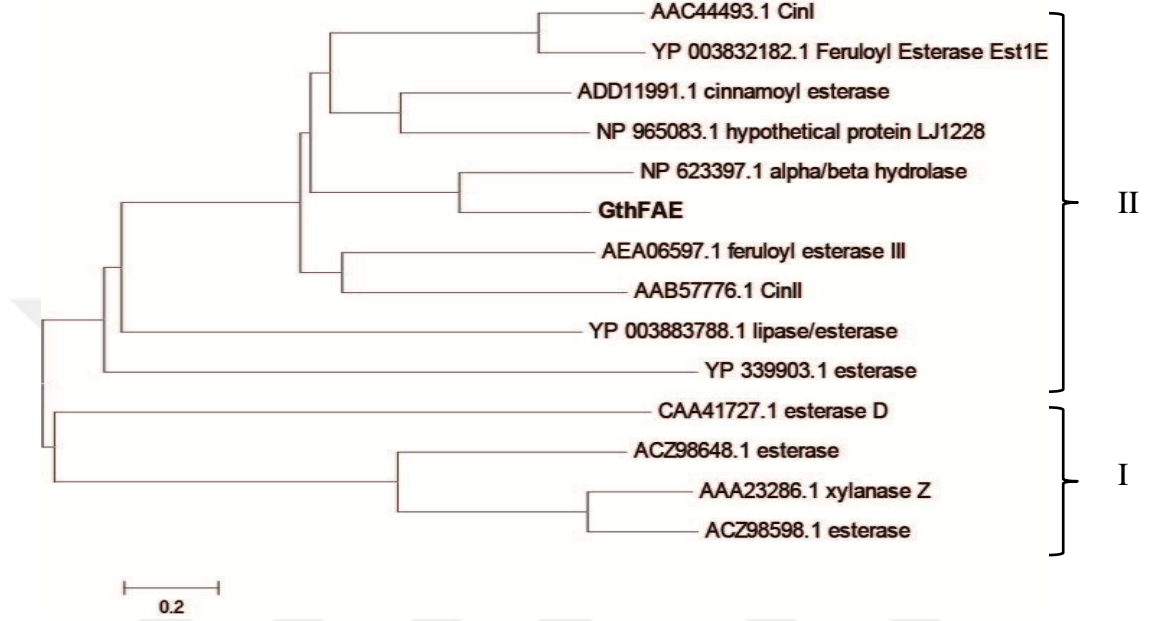
GthFAE                      QEN---IDVTAPYFDHGG---NLVGRAFLEDLQTI NVFERAKPYDGPVLLIHGTEDDVV
EFI73470.1                   QGSIYDPHHIPEYVDSR---GLRIGRDYFMTAQTLP IYETARQYTGEPVLLVHGTWDVIV
EGD34818.1                   QGATYNPHHIPEYIDLPR---GLRMGHYVKTATLPIYETAQQYKGSVLIHGTWDVVV
YP_001578032.1               QGATYDPNHIPDVVPLVGNKLGMLGGFYLRTAQVLP IYEVVSQCFTRFVSVIAGTNDQVV
ADD11991.1                   QGVTYNPDHIDRLPFKD---LTLGGFYLRIAQQLPIYEVVSQFTKPVCLIHGTDDTVV
YP_815563.1                   QGVKYNPDHIDRLPFKD---LTLGGFYLRIAQQLPIYEVSVHFTRPVCLIHGANDTVV
YP_001844134.1               QGTYDPNHIDYVTVGG---FKVGGDYFRTAQLLP IYETAQHAYAGVLMHGLADTVV
ADD11992.1                   QGSTDYDPTHIPETVNVSG---FEVGGAYFRTAQLLP IYQTAEHYNREVLLIHGLADKVV
YP_001272260.1              QGSQYDPNHIDYVTVHG---FTVGGDYFRTAQLLP IYETAQHYSGPTLLIHGLADNVV
                               *
                               : * : : * : : : : : : : : : : * * * * *

```

Şekil 26. GthFAE'in aminoasit dizisinin diğer bakteriyal FAE'ların dizileri ile karşılaştırılması. ADD11991.1: *L. johnsonii* N6.2, LJ0536 sinneraz esteraz. ADD11992.1: *L. johnsonii* N6.2, LJ1228 sinneraz esteraz. YP_001272260.1: *L. reuteri* DSM 20016, α/β katlanması ailesi hidrolaz benzeri protein. YP_815563.1: *L. gasseri* ATTC 33323, α/β katlanması ailesi hidrolaz. YP_001578032.1: *L. helveticus* DPC 4571, α/β katlanması ailesi hidrolaz. YP_001844134.1: *L. fermentum* IFO 3956, hypothetical protein. EFI73470.1: *Prevotella bryantii* B14, α/β ailesi hidrolaz. EGD34818.1: *Capnocytophaga sp.* oral taxon 338 str. F0234, α/β ailesi hidrolaz ve tez kapsamında klonlanıp karakterize edilen GthFAE. Dizilerdeki GlyXSerXGly motifi altı çizilerek gösterilmiştir

3.6. Bakteriyal FAE'ların Filogenetik Analizi

Bakteriyal FAE'lara ait filogenetik ağaç Neighbour-Joining methodu ile çizildi (Şekil 27).

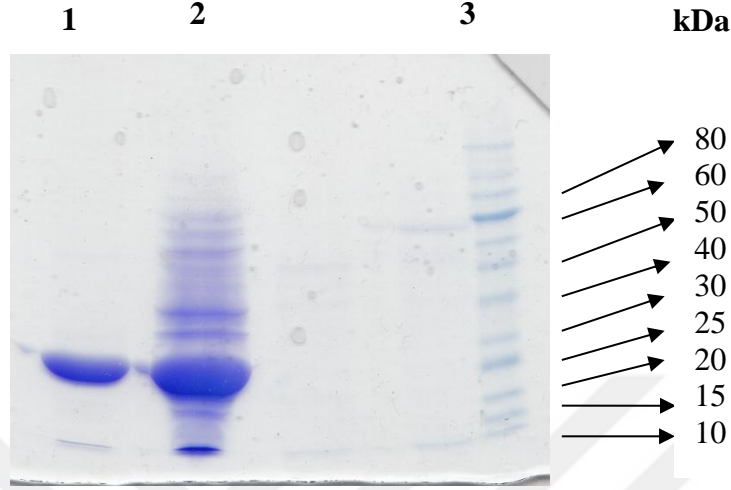


Şekil 27. Bakteriyal ferulik asit esterazların filogenetik analizi. Analizde kullanılan bakteriler ve proteinleri şunlardır: *B. fibrisolvans* sinamoyil esterazı (CinI, AAC44493.1), *B. proteoclasticus* B316 ferulik asit esterazı (Est1E, YP_003832182.1), *L. johnsonii* sinamoyil esterazı (LJ0536, ADD11991.1), *L. johnsonii* NCC 533 sinamoyil esterazı (LJ1228, NP_965083.1), *C. ruminicola* JCM 14822 ferulik asit esteraz III (AEA06597.1), *B. fibrisolvans* sinamoyil esterazı (CinII, AAB57776.1), *C. subterraneus subsp. tengcongensis* MB4 ferulik asit esterazı (TtFAE, NP_623397.1), *D. dadantii* 3937 ferulik asit esterazı (DdFAET, YP_003883788.1), *C. japonicus* esterazı (Esteraz D, CAA41727.1), *P. haloplanktis* TAC125 ferulik asit esterazı (Phesteraz, YP_339903.1), *R. thermocellum* ferulik asit esterazı (AAA23286.1), *C. ruminicola* JCM 14822 ferulik asit esterazı (CrFAEI, ACZ98598.1) ve tez kapsamında klonlanıp karakterize edilen GthFAE. Bar; her bir aminoasit pozisyonundaki 0,2'lik değişimi ifade eder

3.7. Enzim Üretimi ve Saflaştırılması

GthFAE üretildikten sonra, yapılan ısı şoku uygulaması ve iyon değişimi kolon kromatografisi ardından en yüksek aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. GthFAE-His

ise, üretildikten sonra kobalt affinite kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Saflıkların kontrolü, SDS-PAGE analizi ile belirlendi (Şekil 28).

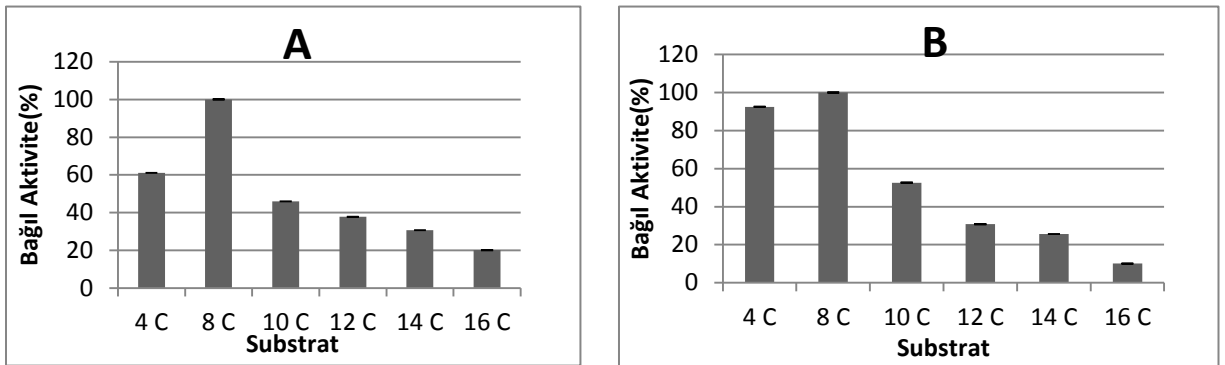


Şekil 28. Saflaştırılmış GthFAE'nin SDS-PAGE analizi. 1) Saf enzim 2) Kaba ekstrat 3) Protein marker

3.8. FAE'nin Karakterizasyonu

3.8.1. Substrat Spesifitesi

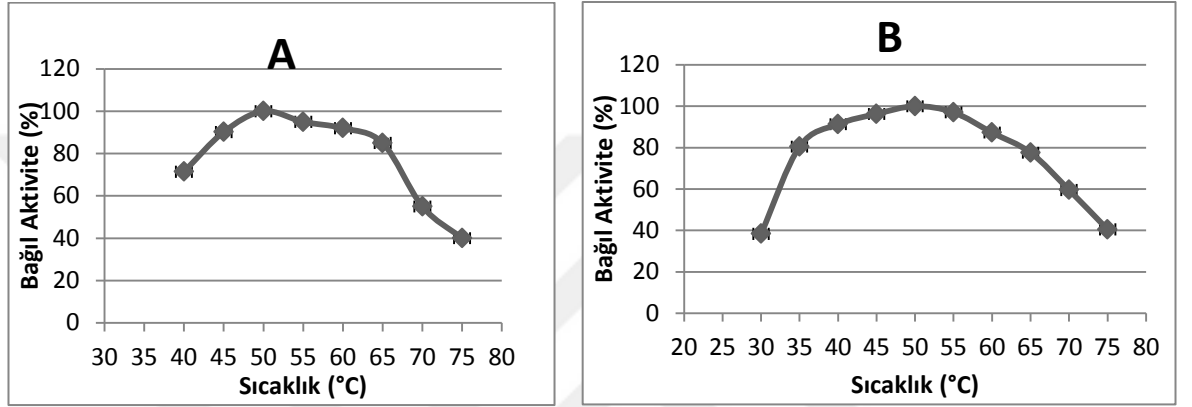
FAE aktivitesinin değişik *p*-NP esterleri üzerine etkisi Şekil 29'de gösterilmiştir. GthFAE ve GthFAE-His, 8 C'lu substrat (*p*-NP kaprilat) üzerinde en fazla aktiviteye sahiptir. Aktivitenin 16 C'lu bir substrat olan *p*-NP palmitata doğru düştüğü anlaşılmaktadır.



Şekil 29. *G. thermoglucosidarius* FAE'nin substrat spesifitesi. A) GthFAE B) GthFAE-His

3.8.2. Optimum Sıcaklık

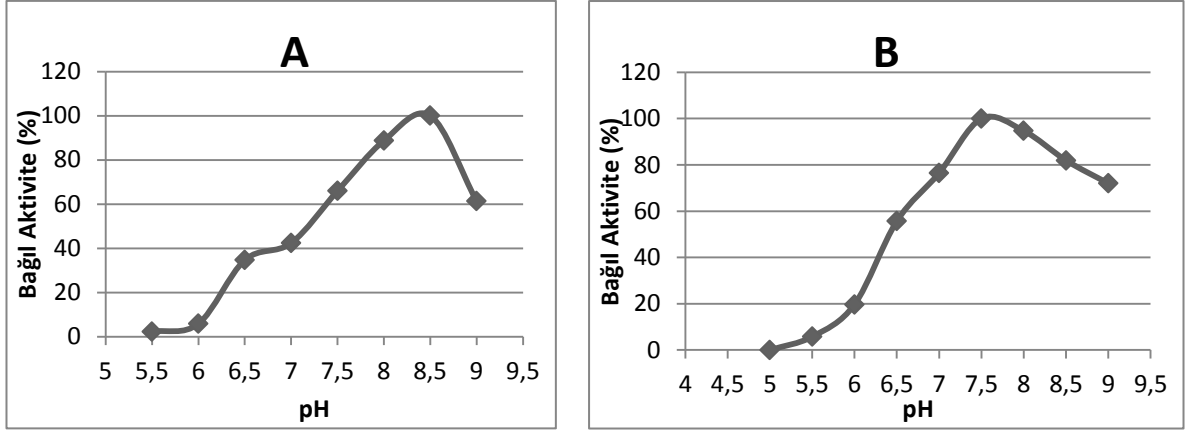
GthFAE ve GthFAE-His'in; 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 75°C'de aktivitesi ölçülerek sıcaklığın enzimin çalışmasına etkisi araştırıldı ve sıcaklık-aktivite grafiği oluşturularak enzimin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlendi. Sonraki deneylerde reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirildi (Şekil 30).



Şekil 30. *G. thermoglucosidasius* FAE'nin optimum sıcaklık grafiği A) GthFAE B) GthFAE-His

3.8.3. Optimum pH

G. thermoglucosidasius FAE'nin en iyi çalıştığı pH'yı belirlemek için pH 5-9 aralığındaki tamponlarda gerçekleştirilen bir seri reaksiyon yapıldı. Elde edilen aktivite ölçümlerine göre pH-Aktivite grafiği oluşturuldu. Şekil 31'de de görüldüğü üzere GthFAE'nin aktivitesi en yüksek pH 8,5'de gözlemlendi. GthFAE-His'in ise optimum pH'sı 7,5 olarak belirlendi.

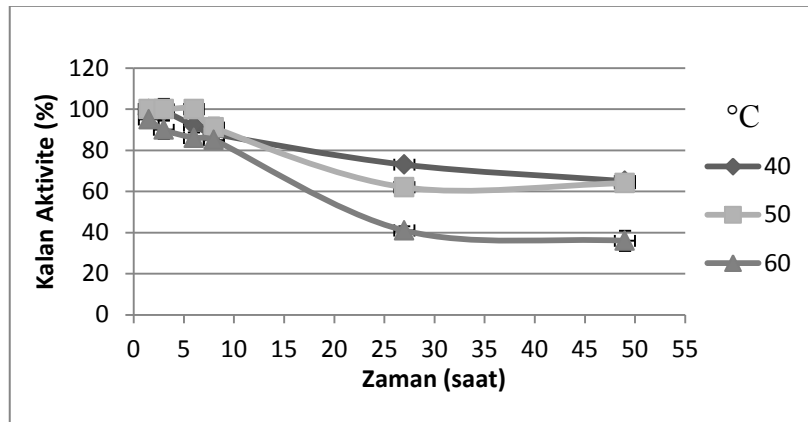


Şekil 31. *G. thermoglucosidasius* FAE'nin optimum pH grafiği A) GthFAE B) GthFAE-His

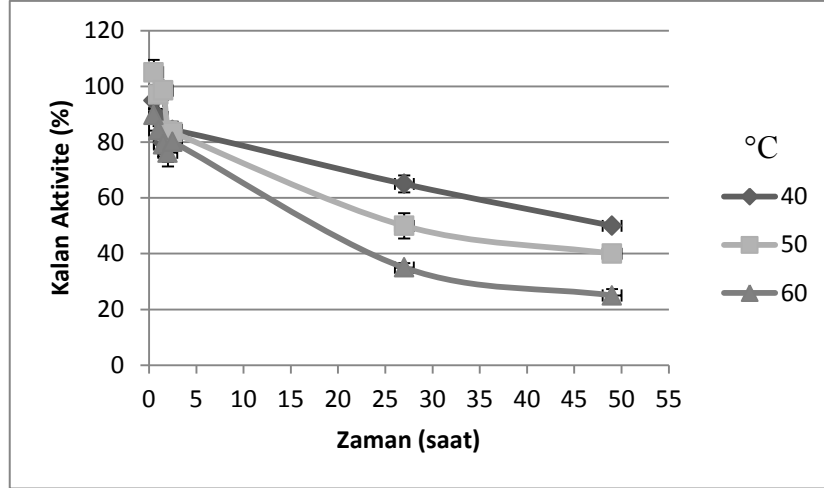
3.8.4. Isıl Kararlılık

GthFAE ve GthFAE-His, 40, 50 ve 60°C'de 49 saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında GthFAE'nin, GthFAE-His'e göre daha stabil olduğu görüldü. Her iki enzimin de ikinci gün inkübasyon sonunda kararlı kalarak aktivitelerinin hala devam ettiği tespit edildi (Şekil 32 ve 33).

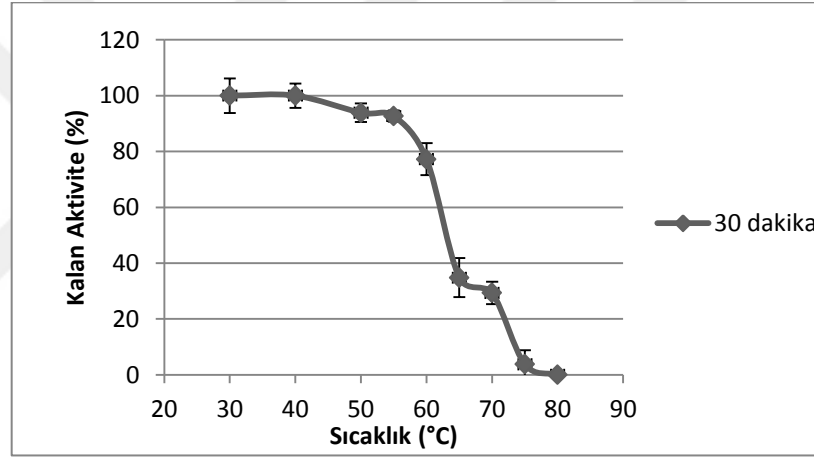
FAE'nin kararlılığına ısının etkisini incelemek için ayrıca, GthFAE-His; 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80°C'de 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 60°C'ye kadar aktivitenin önemli bir miktarda azalmadığı, 65 ve 70°C'de aktivitenin %50'nin altına indiği, 75°C'de %3'e düştüğü ve 80°C'de ise aktivitesini kaybettiği belirlendi (Şekil 34).



Şekil 32. GthFAE'nin ısıl kararlılığı



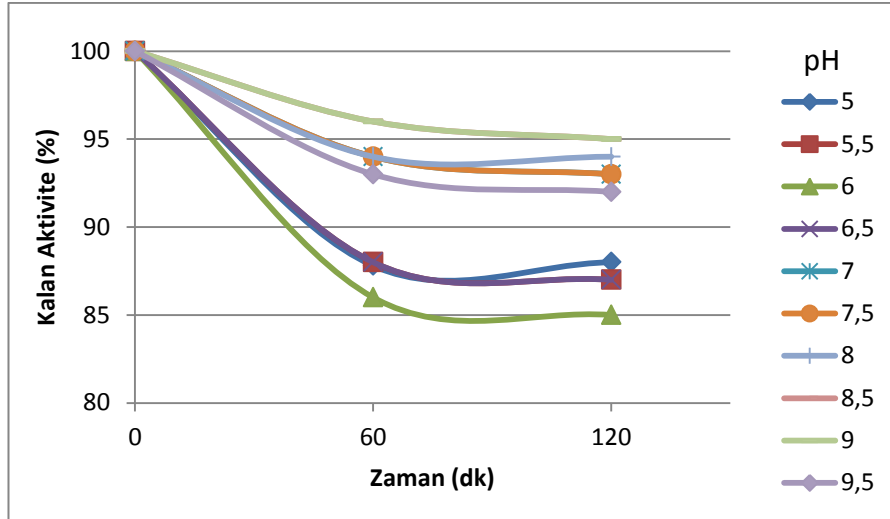
Şekil 33. GthFAE-His'in ısı kararlılığı



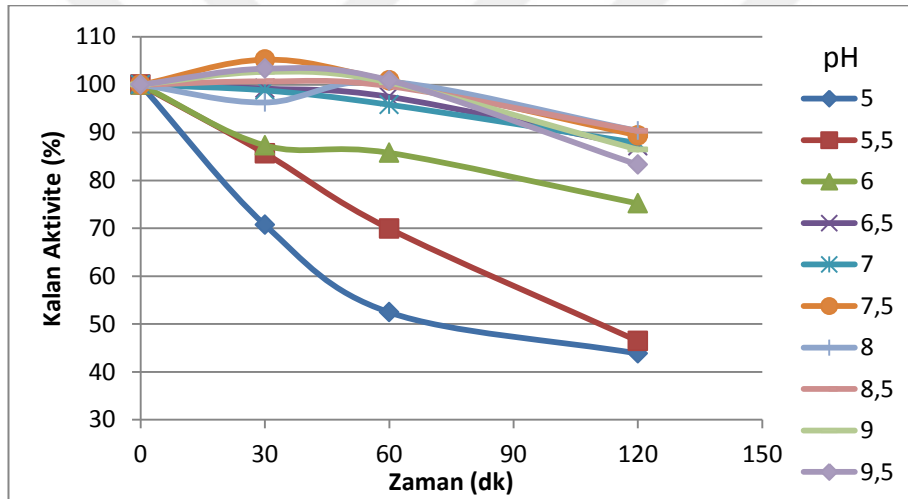
Şekil 34. GthFAE-His'in ısı kararlılığı

3.8.5. pH Kararlılık

GthFAE-His ve GthFAE'in pH kararlılığını belirlemek için enzim, pH 5'ten 9,5'e kadar farklı pH'larda 120 dk.'ya kadar 50°C'de inkübe edildi ve % kalan aktiviteleri hesaplandı. Genel olarak yine GthFAE'in pH kararlılığının GthFAE-His'e göre çok daha iyi olduğu görüldü. GthFAE-His'in aktivitesinin pH 5 ve 5,5'de 120 dk.'nın sonunda % 50'nin altına indiği görülürken, GthFAE'in aktivitesinin pH 5 ve 5,5'de %80'nin üstünde kaldığı tespit edildi (Şekil 35 ve 36).



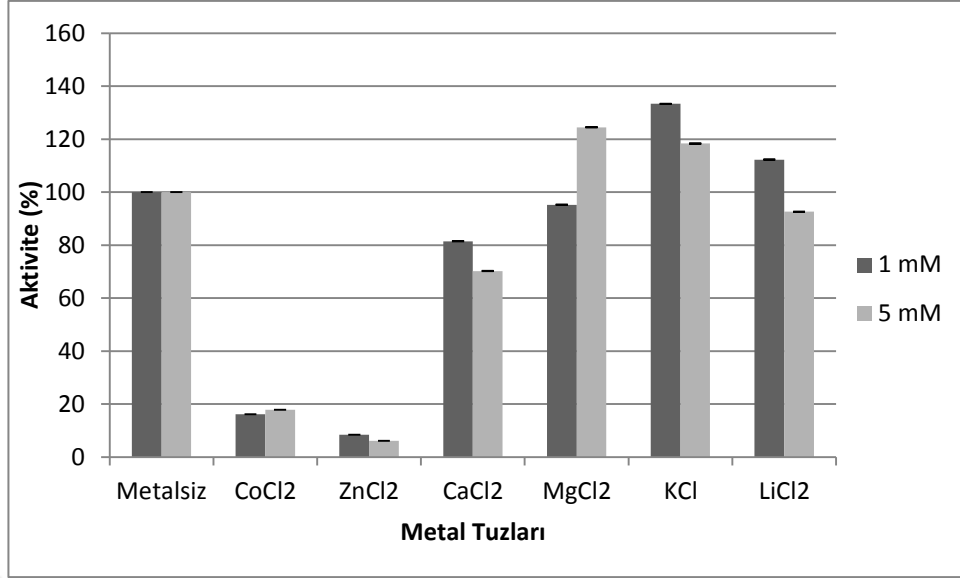
Şekil 35. GthFAE'in pH kararlılığı



Şekil 36. GthFAE-His'in pH kararlılığı

3.8.6. Metal İyon Etkisi

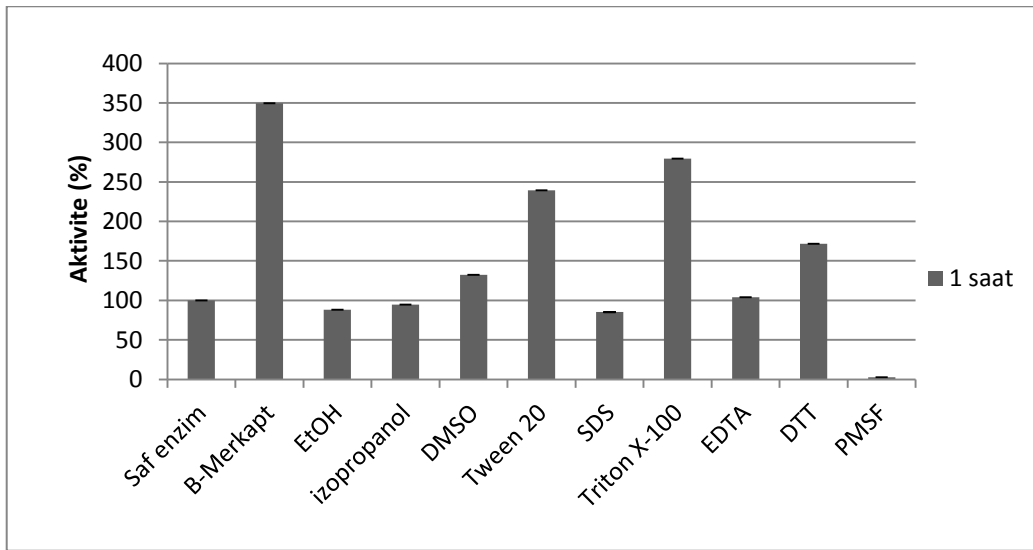
GthFAE'in aktivitesi üzerine metal iyonlarının etkisi; Mg^{+2} , Li^+ , Ca^{+2} , K^+ , Zn^{+2} , ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları ile gerçekleştirildi ve sonuçlar Şekil 37'de gösterilmektedir.



Şekil 37. Metal iyonlarının GthFAE aktivitesi üzerine etkisi

3.8.7. Organik Çözücülerin ve İnhibitörlerin Etkisi

Deterjan ve organik çözücülerin GthFAE aktivitesi üzerine etkileri incelendi. Enzim, % 1 (v/v) DMSO, β - merkaptoetanol, etanol ve izopropanol, 5 mM EDTA, PMSF ve DTT, %0,1 (v/v) SDS, Tween 20 ve Triton X-100 içerecek şekilde 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) tamponunda 60 dk. inkübe edildi ve sonuçlar Şekil 38’de gösterilmektedir.



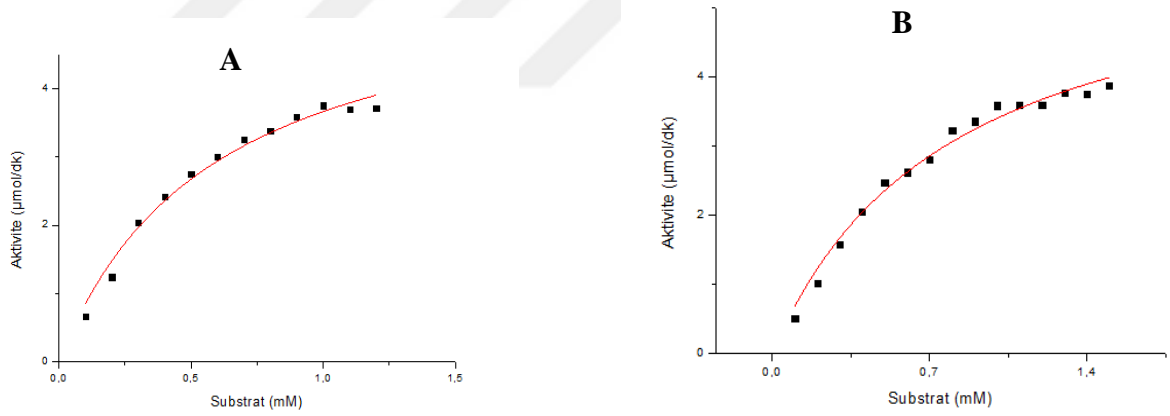
Şekil 38. Deterjan ve organik çözücülerin GthFAE aktivitesi üzerine etkisi

3.8.8. Enzim Kinetiği

GthFAE-His ve GthFAE'in *p*-NP butirat (C4), *p*-NP kaprilat (C8), *p*-NP kaprat (C10) ve *p*-NP laurat (C12) için substrat-aktivite grafikleri çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edildi. Çizilen Lineweaver-Burk eğrilerinin oluşturduğu doğrunun x-eksenini kestiği nokta $-1/K_m$ 'ye eşitlenerek K_m değeri, y-eksenini kestiği nokta ise $1/V_{max}$ 'a eşitlenerek V_{max} değeri olarak hesaplandı (Origin Pro 8.1 programı ile). Michaelis- Menten eğrileri Şekil 39, 40, 41 ve 42'de gösterilmektedir.

GthFAE'in *p*-NP butirat (C4) substratı için K_m değeri 0,59 mM, V_{max} değeri 31.591 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 14.793 s^{-1} ve k_{cat}/K_m değeri $25.072 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ olarak hesaplandı.

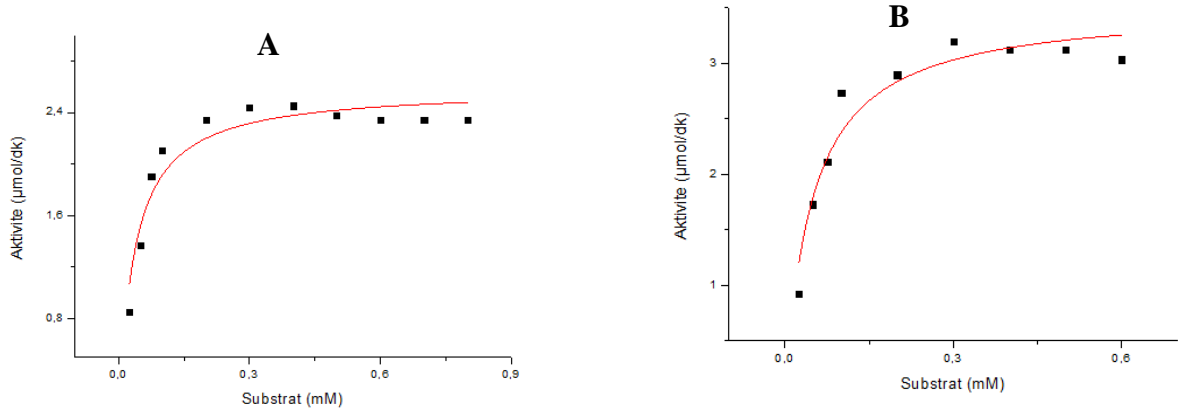
GthFAE-His'in *p*-NP butirat (C4) substratı için K_m değeri 0,79 mM, V_{max} değeri $28.170 \mu\text{mol/dk/mg}$ olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 13.213 s^{-1} ve k_{cat}/K_m değeri $16.725 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ olarak hesaplandı.



Şekil 39. *G. thermoglucosidasius* FAE'nin *p*-NP butirat (C4) için Michaelis-Menten eğrileri A) GthFAE B) GthFAE-His

GthFAE'in *p*-NP kaprilat (C8) substratı için K_m değeri 0,035 mM, V_{max} değeri $11.735 \mu\text{mol/dk/mg}$ olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 5491 s^{-1} ve k_{cat}/K_m değeri $156.885 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ olarak hesaplandı.

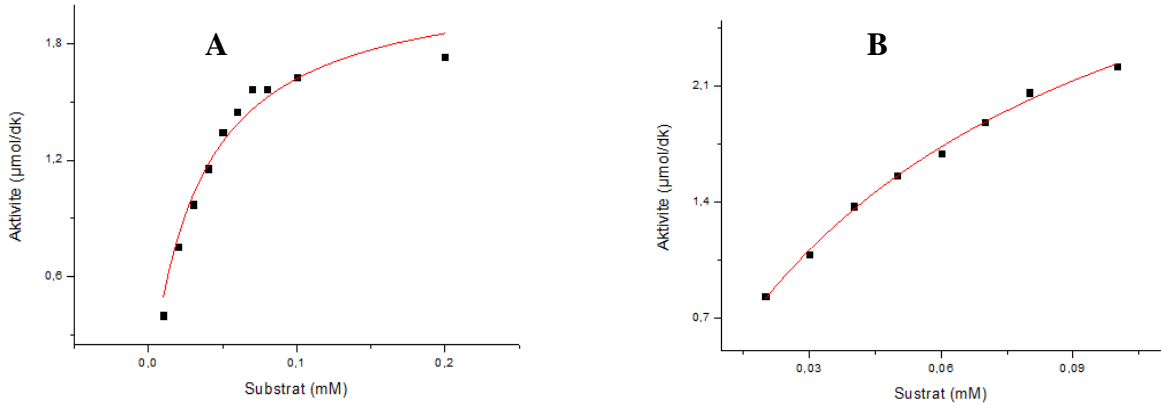
GthFAE-His'in *p*-NP kaprilat (C8) substratı için K_m değeri 0,048 mM, V_{max} değeri $9542 \mu\text{mol/dk/mg}$ olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 4468 s^{-1} ve k_{cat}/K_m değeri $93.083 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ olarak hesaplandı.



Şekil 40. *G. thermoglucosidasius* FAE'nin *p*-NP kaprilat (C8) için Michaelis- Menten eğrileri A) GthFAE B) GthFAE-His

GthFAE'nin *p*-NP kaprat (C10) substratı için K_m değeri 0,034 mM, V_{max} değeri 9787 µmol/dk/mg olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 4579 s⁻¹ ve k_{cat}/K_m değeri 134.676 s⁻¹mM⁻¹ olarak hesaplandı.

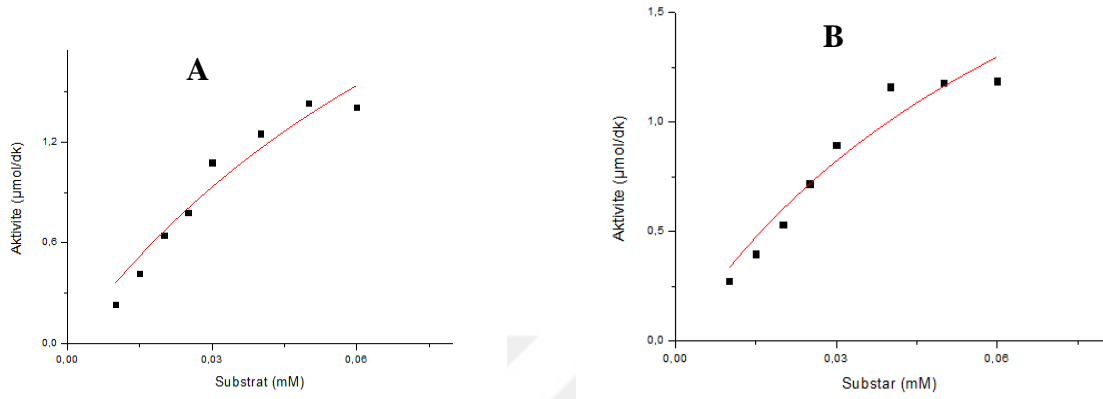
GthFAE-His'in *p*-NP kaprat (C10) substratı için K_m değeri 0,08 mM, V_{max} değeri 10.766 µmol/dk/mg olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 5041 s⁻¹ ve k_{cat}/K_m değeri 63.012 s⁻¹mM⁻¹ olarak hesaplandı.



Şekil 41. *G. thermoglucosidasius* FAE'nin *p*-NP kaprat (C10) için Michaelis- Menten eğrileri A) GthFAE B) GthFAE-His

GthFAE'nin *p*-NP laurat (C12) substratı için K_m değeri 0,11 mM, V_{max} değeri 7902 µmol/dk/mg olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 3700 s⁻¹ ve k_{cat}/K_m değeri 33.636 s⁻¹mM⁻¹ olarak hesaplandı.

GthFAE-His'in *p*-NP laurat (C12) substratı için K_m değeri 0,07 mM, V_{max} değeri 4173 $\mu\text{mol/dk/mg}$ olarak hesaplandı. K_{cat} değeri 2601 s^{-1} ve k_{cat}/K_m değeri 37.157 $\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ olarak hesaplandı.



Şekil 42. *G. thermoglucosidasius* FAE'nin *p*-NP laurat (C12) için Michaelis- Menten eğrileri A) GthFAE B) GthFAE-His

GthFAE ve GthFAE-His'in bu veriler doğrusunda Origin Pro 8.1 programı ile hesaplanan K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri Tablo 7 ve 8'de özetlenmiştir. Tüm veriler göz önüne alındığında GthFAE'in substratlara ilgisinin GthFAE-His'e göre biraz daha fazla olduğu görüşmüştür.

Tablo 7. GthFAE'in kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , K_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri)

Substrat	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dk/mg}$)	K_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
<i>p</i> -nitrofenil butirat (C4)	0,590	31.591	14.793	25.072
<i>p</i> -nitrofenil kaprilat (C8)	0,035	11.735	5491	156.885
<i>p</i> -nitrofenil kaprate (C10)	0,034	9787	4579	134.676
<i>p</i> -nitrofenil laurat (C12)	0,110	7902	3700	33.636

Tablo 8. GthFAE-His'in kinetik parametreleri (K_m , V_{max} , K_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri)

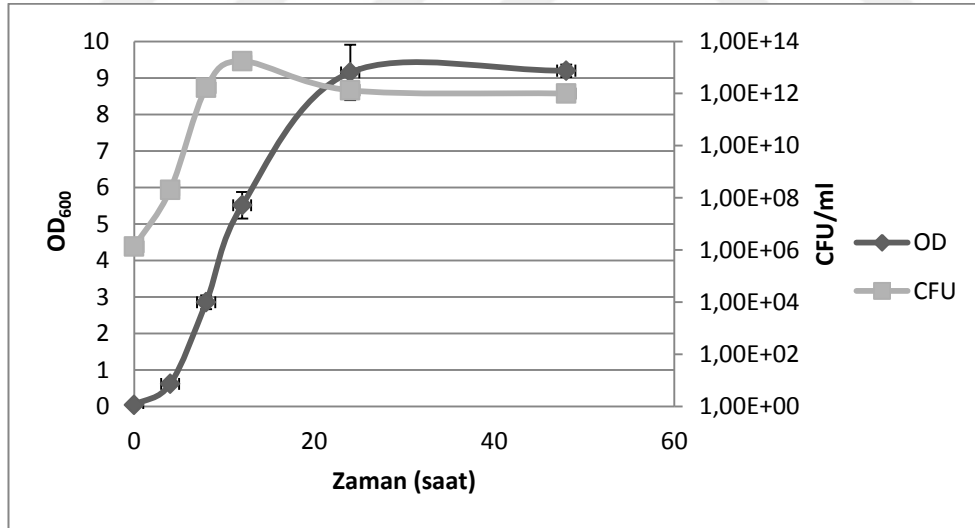
Substrat	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dk/mg}$)	K_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)
<i>p</i> -nitrofenil buirat (C4)	0,790	28.170	13.213	16.725
<i>p</i> -nitrofenil kaprilat (C8)	0,048	9542	4468	93.083
<i>p</i> -nitrofenil kaprat (C10)	0,080	10.766	5041	63.012
<i>p</i> -nitrofenil laurat (C12)	0,070	4173	2601	37.157

Kullanılan substratlardan elde edilen sonuçlara göre, GthFAE ve GthFAE-His'in her ikisinin de en yüksek k_{cat}/K_m değerinin *p*-NP kaprilat (C8) için gösterdiği, diğer substratlarda azaldığı tespit edilmiştir.

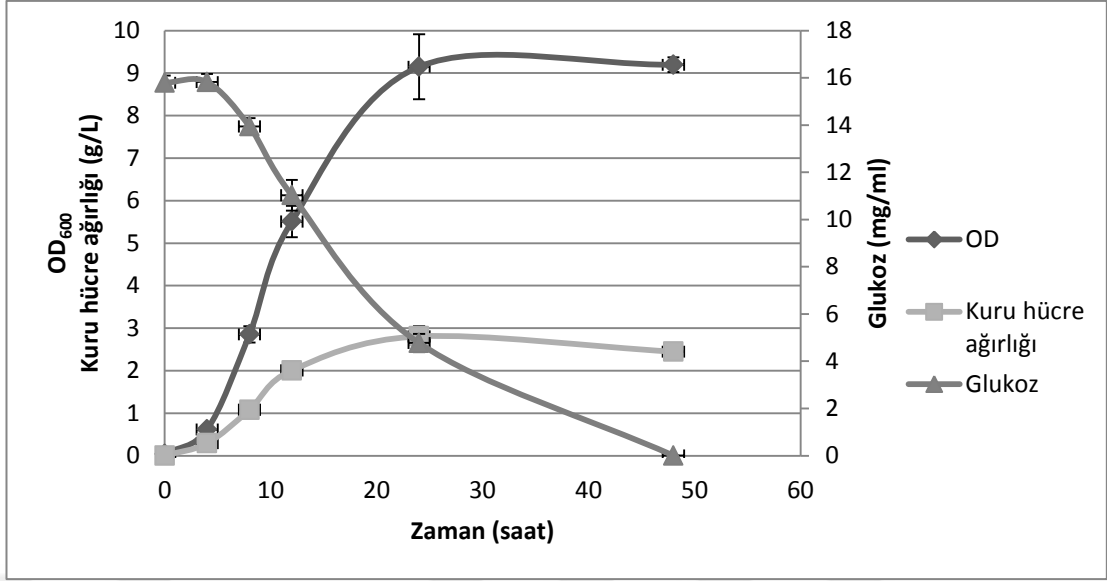
3.9. PHB'nin Klasik ve Mikrobaloncuk Fermentasyonla Üretimi

3.9.1. PHB'ın Erlenlerde Üretimi

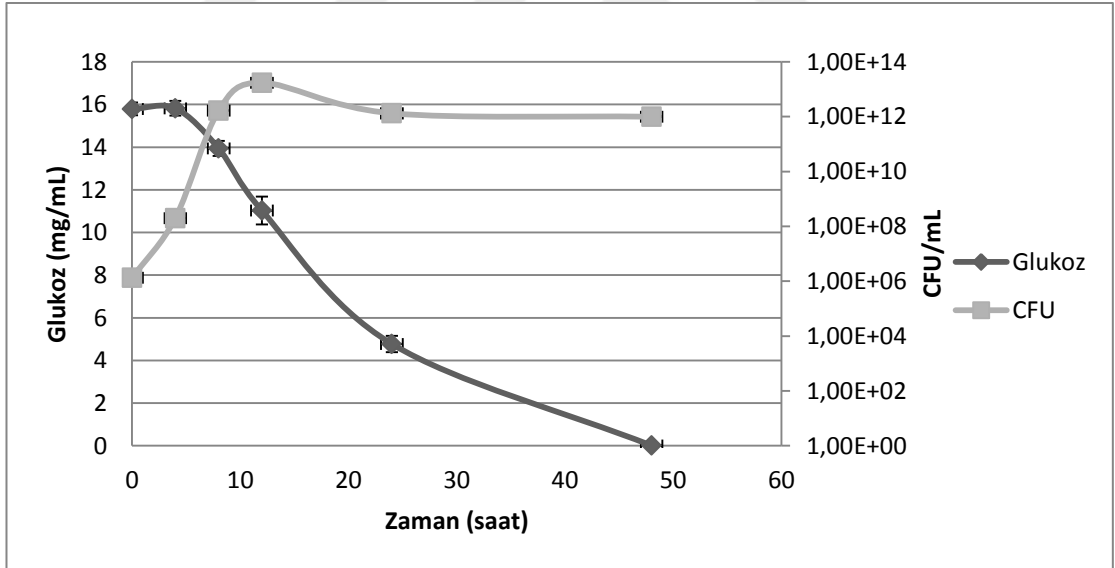
PHB üretiminde farklı saatlerdeki hücre üreme eğrisi, CFU/mL, kuru hücre ağırlığı ve besiyerinin glukoz konsantrasyonu Şekil 43, 44 ve 45'de gösterilmektedir. *E. coli* XL1Blue/pBHR68'in 48 saat sonunda kuru ağırlığının %43,91 oranında PHB biriktirdiği belirlenmiştir. CFU-zaman grafiğine göre, bakteriler 12 saatte durgun faza ulaşmışlardır. Hücre üremesi arttıkça, glukoz konsantrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bakteriler ortamdaki glukozu 48 saat sonunda tamamen bitirmişlerdir. Maksimum kuru hücre ağırlığına 24 saatte ulaşılmıştır (2,8 g/L).



Şekil 43. *E. coli* XL1Blue/pBHR68'in erlenlerde inkübasyonu ile PHB üretimi sürecindeki OD₆₀₀ ve CFU/mL-zaman grafiği



Şekil 44. *E. coli* XL1Blue/pBHR68'in erlende inkübasyonu ile PHB üretimi sürecindeki kuru hücre ağırlığı (g/L), glukoz konsantrasyonu (mg/mL), OD₆₀₀-zaman grafikleri

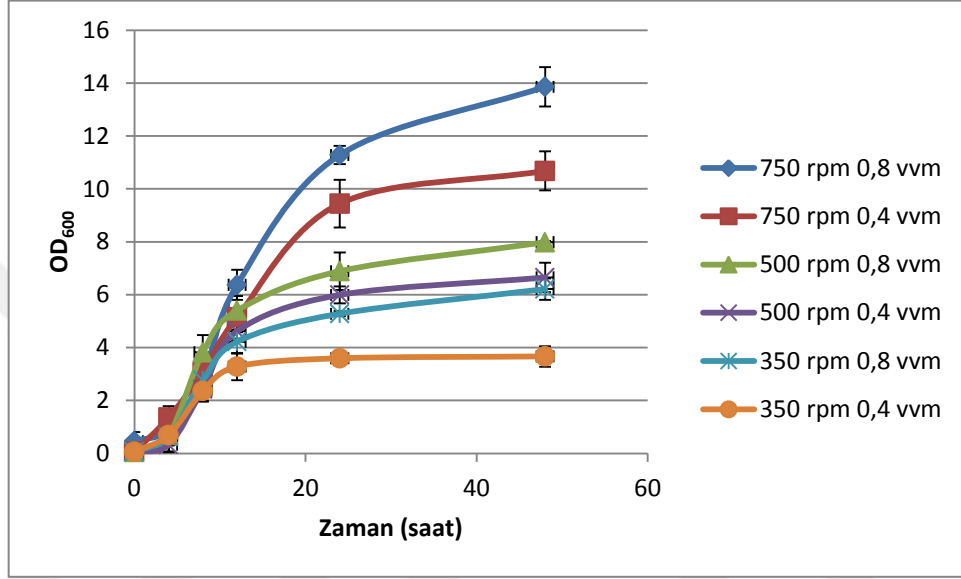


Şekil 45. *E. coli* XL1Blue/pBHR68'in erlende inkübasyonu ile PHB üretimi sürecindeki besiyerinin glukoz konsantrasyonu (mg/mL) ve CFU/mL-zaman grafiği

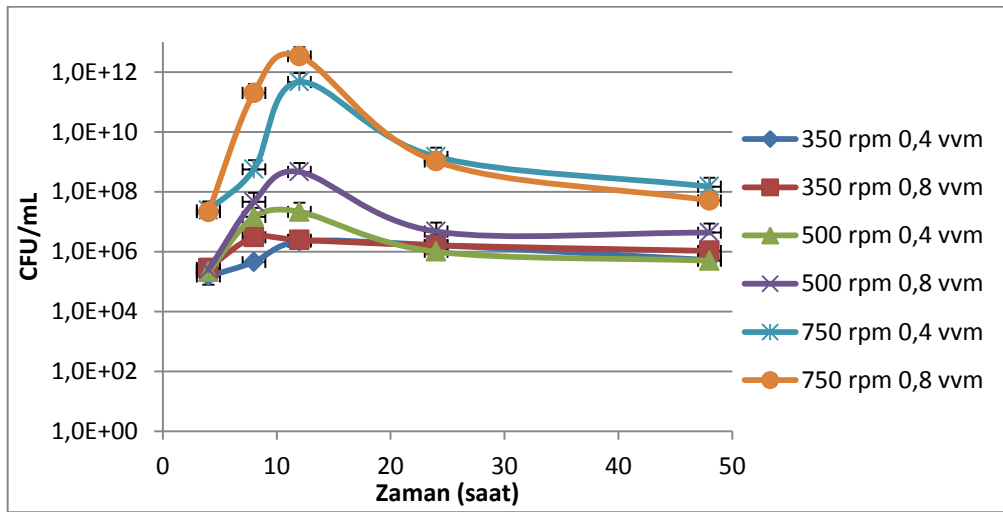
3.9.2. PHB'm Klasik Fermentörde Üretimi

E. coli XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentör sürecindeki hücre üreme eğrisi, CFU/mL, PHB, glukoz konsantrasyonu ve kuru hücre ağırlığı Şekil 46-50'de gösterilmektedir. Klasik fermentördeki hücre yoğunluğu, fermentörün çalkalama hızı

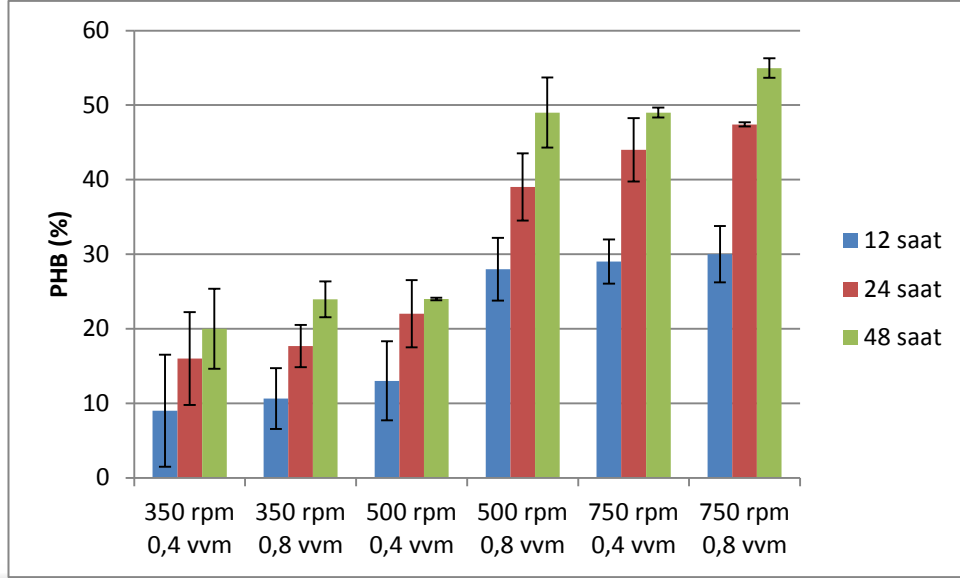
arttıkça artmıştır. DO seviyesi, her bir çalkalama hızında oldukça hızlı düşmüştür ve ardından artmaya başlayarak 12 ve 24. saatlerde sabitlenmiştir. Fermentasyonun 48. saatinde 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında en yüksek % PHB oranlarına ulaşılmıştır fakat 24 ve 48. saatler arasında da çok fark yoktur. 750 rpm çalkalama hızında en yüksek kuru hücre ağırlığı elde edilmiştir.



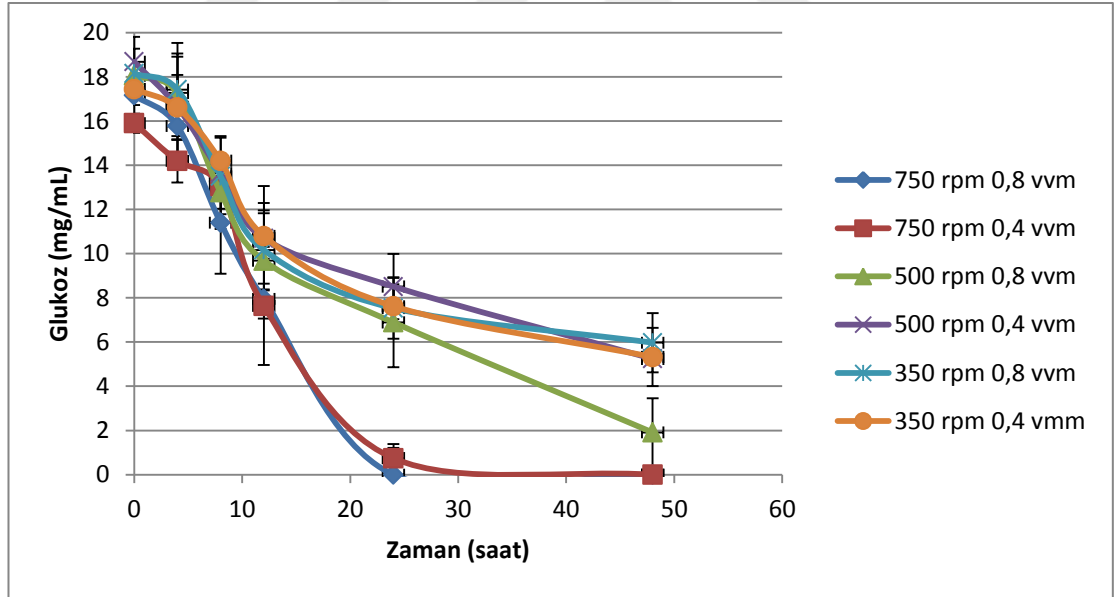
Şekil 46. *E. coli* XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki OD₆₀₀- zaman grafiği



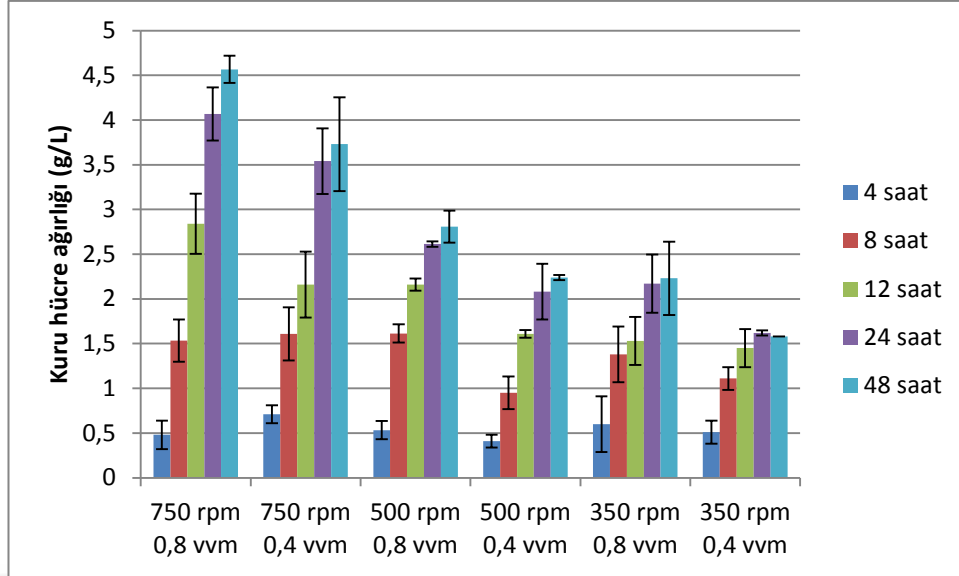
Şekil 47. *E. coli* XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki CFU/mL-zaman grafiği



Şekil 48. *E. coli* XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, 12, 24, 48. saatlerde üretilen PHB (%) miktarları



Şekil 49. Klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki besiyerinin Glukoz konsantrasyonu (mg/mL)-zaman (saat) grafiği

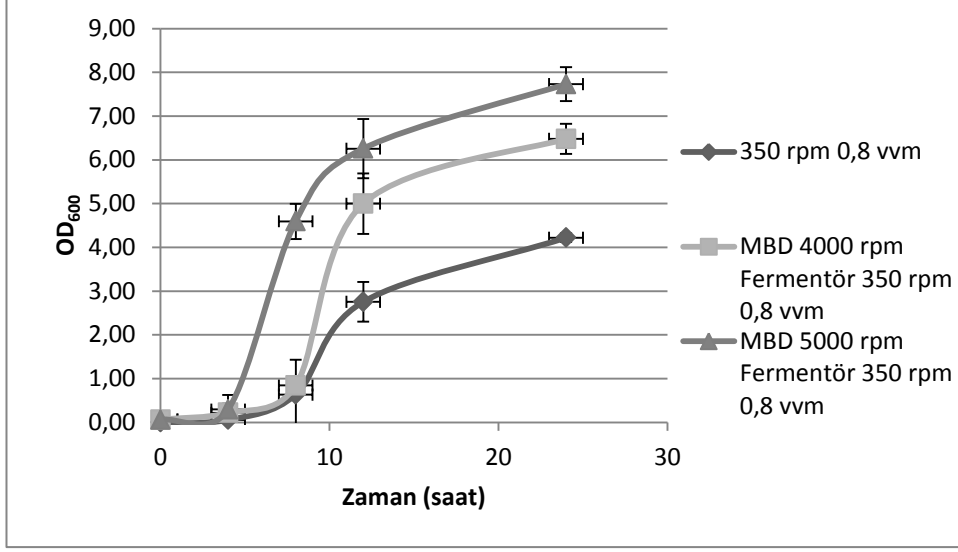


Şekil 50. Klasik fermentörde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve 0,4, 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecinde elde edilen kuru hücre ağırlık (g/L) oranları

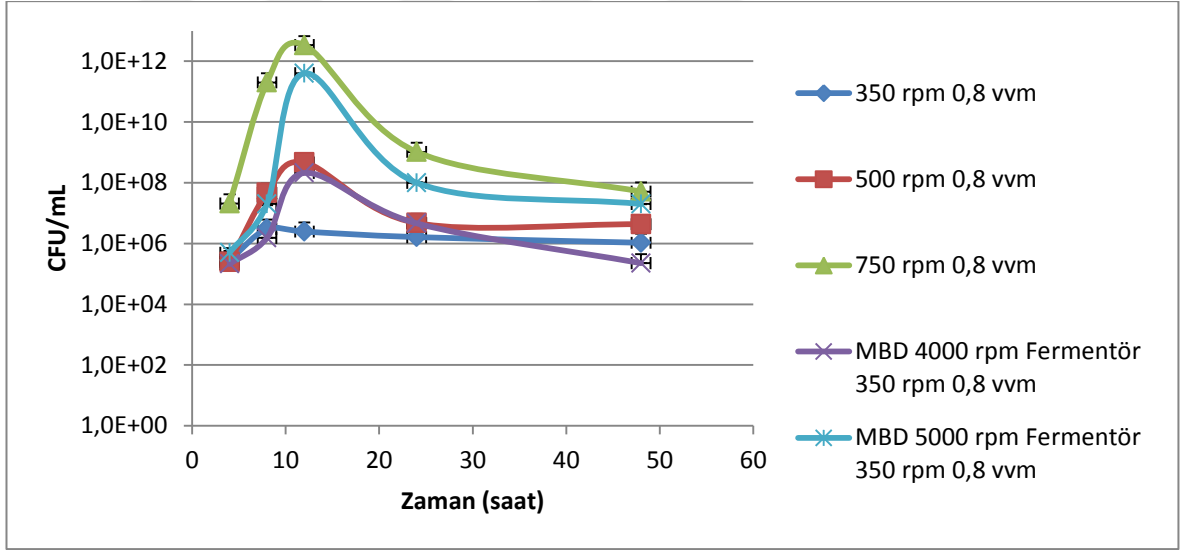
3.9.3. PHB'ın MBD Fermentasyonla Üretimi

E.coli XL1Blue/pBHR68'in MBD fermentasyonu ile hücre üreme eğrisi, CFU/mL, PHB, glukoz konsantrasyonu ve kuru hücre ağırlığı profili Şekil 51-55'de gösterilmektedir.

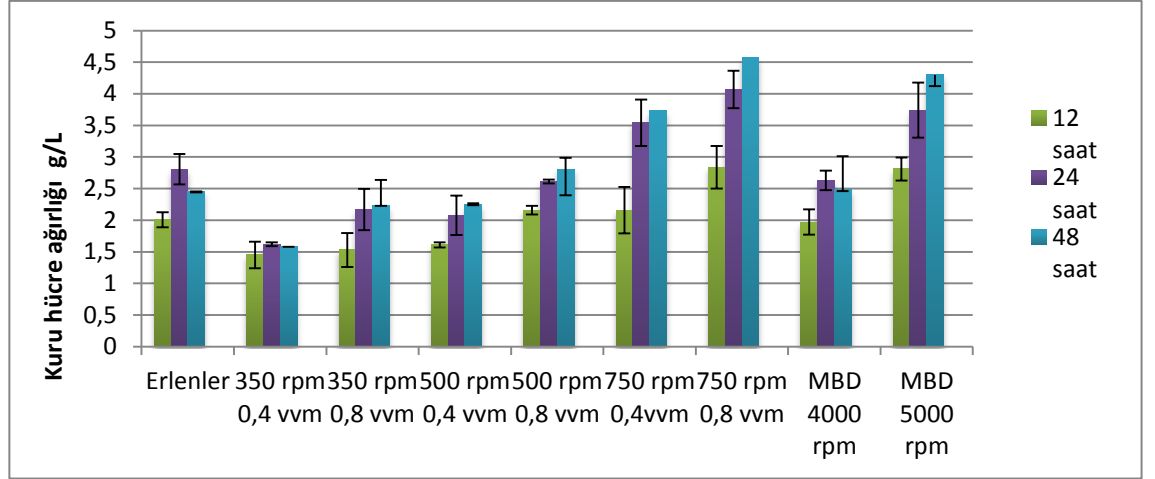
Klasik fermentasyonda; 24 saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken bakteri yoğunluğu 4,22'dir, MBD fermentasyonda ise; 24 saat sonunda, MBD hızı 5000 rpm ve fermentör reaktörünün çalkalama hızı 350 rpm iken bakteri yoğunluğu 7,73'tür. MBD fermentasyonda; 48 saat sonunda, MBD hızı 5000 rpm ve reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken kuru hücre ağırlığı 4,43 g/L'dir. Klasik fermentasyonda ise; 48 saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken kuru hücre ağırlığı 2,23 g/L'dir. MBD fermentasyonda, MBD hızı 5000 rpm olduğunda ise PHB üretimi 48 saat sonunda %56'ya çıkmıştır. Klasik fermentasyonda ise; 48 saat sonunda PHB üretimi 23,93'dir. MBD'nin hızı 5000 rpm iken 48 saat sonunda ortamdaki glukoz tamamen tükenmiştir.



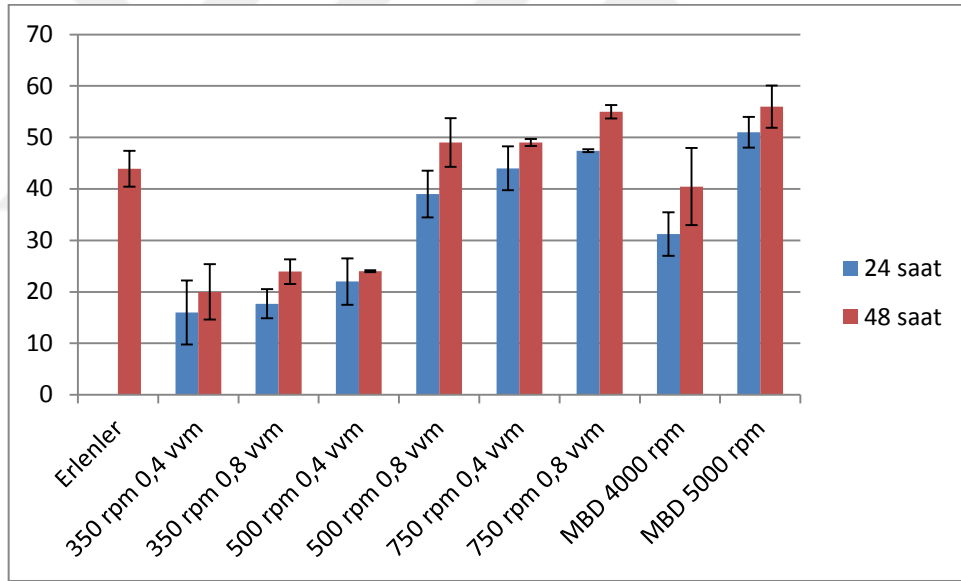
Şekil 51. MBD ve klasik fermentasyonla, 350 rpm çalkalama hızında ve 0,8 vvm oksijen varlığında, PHB üretimi sürecindeki OD₆₀₀-zaman grafiği



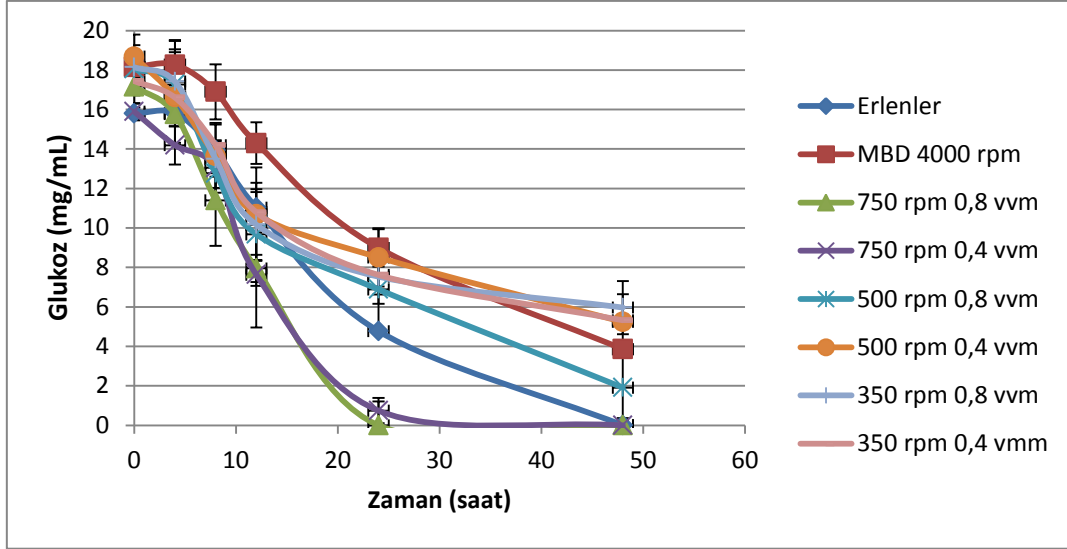
Şekil 52. MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 ve 5000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında, PHB üretimi sürecindeki CFU/mL - zaman grafiği



Şekil 53. Klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 ve 5000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve 0,8 vvm oksijen varlığında elde edilen kuru hücre ağırlığı (g/L) oranları



Şekil 54. Klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 ve 5000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve 0,8 vvm oksijen varlığında elde edilen PHB (%) miktarları



Şekil 55. Klasik fermentasyonda; 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında ve MBD fermentasyonda; MBD hızı 4000 rpm, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm ve 0,8 vvm oksijen varlığında PHB üretimi sürecindeki besiyerinin glukoz konsantrasyonu (mg/mL)-zaman grafiği

3.9.4. Volumetrik Oksijen Transfer Kat Sayısı (kLa) Hesaplanması

MBD sisteminin kLa değerleri, 350 rpm ve 500 rpm (0,4 ve 0,8 vvm)'de sırasıyla 18,108, 23,124, 30,606, 32,802 h⁻¹ dir. Bu değerler de aynı çalkalama hızında klasik fermentördeki değerlerden yüksektir (Tablo 9).

Table 9. Klasik ve MBD fermentasyonların kLa (h⁻¹) değerleri

	350 rpm 0,4 vvm	350 rpm 0,8 vvm	500 rpm 0,4 vvm	500 rpm 0,8 vvm	750 rpm 0,4 vvm	750 rpm 0,8 vvm
Klasik	16,812	22,014	23,472	27,528	32,862	34,29
MBD	18,108	23,124	30,606	32,802	-	-

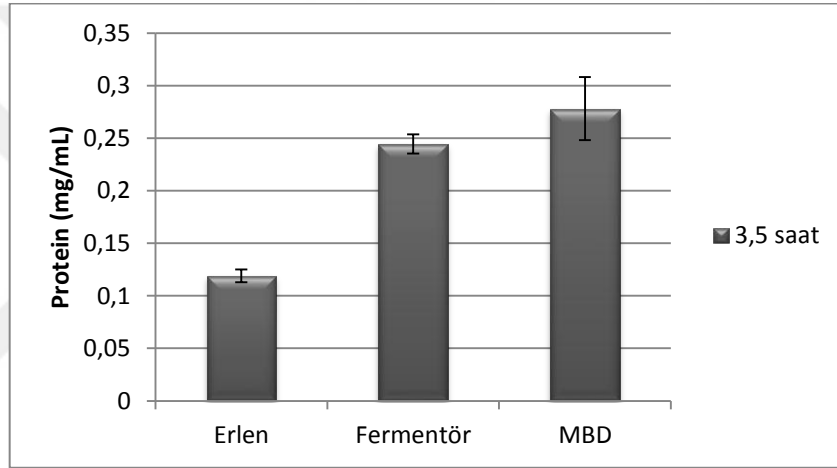
3.10. FAE'ın Klasik ve Mikrobaloncuk Fermentasyonla Üretimi

E. coli BL21(DE3) LysS/pETGthFAE-His'in erlendeki, klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla fermentörde elde edilen üreme eğrisi, CFU/mL, kuru hücre ağırlığı ve protein konsantrasyon grafiği Şekil 56-59'da gösterilmektedir.

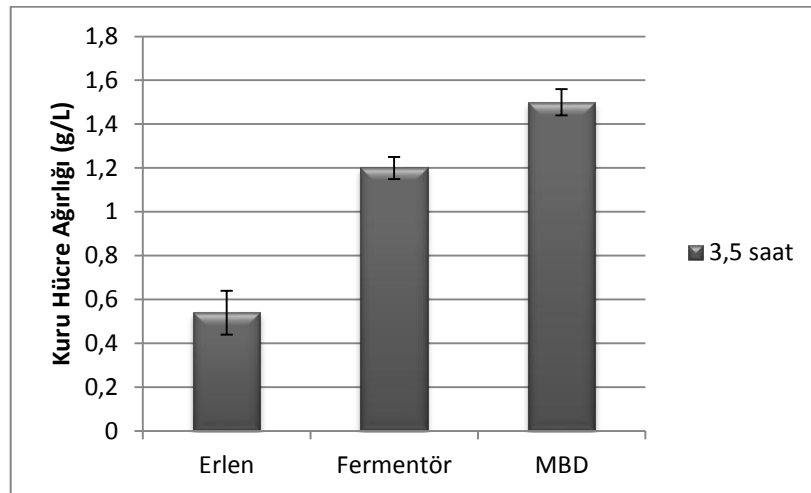
Klasik fermentasyonda; üç buçuk saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken bakteri yoğunluğu 3,8'dir, MBD fermentasyonda ise; MBD hızı 4000 rpm ve fermentör reaktörünün çalkalama hızı 350 rpm iken bakteri yoğunluğu 4,5'tir.

Klasik fermentasyonda; üç buçuk saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken protein miktarı 244,48 $\mu\text{g/mL}$ 'dir, MBD fermentasyonda ise; MBD hızı 4000 rpm ve fermentör reaktörünün çalkalama hızı 350 rpm iken protein miktarı 278 $\mu\text{g/mL}$ 'dir.

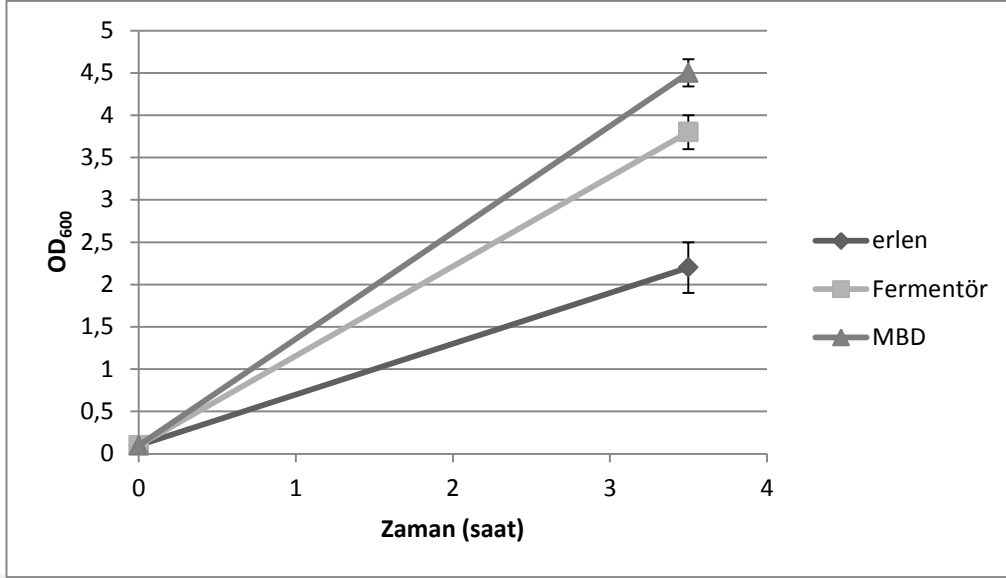
Klasik fermentasyonda; üç buçuk saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken kuru hücre ağırlığı 1,2 g/L'dir, MBD fermentasyonda ise; MBD hızı 4000 rpm ve fermentör reaktörünün çalkalama hızı 350 rpm iken kuru hücre ağırlığı 1,5 g/L'dir.



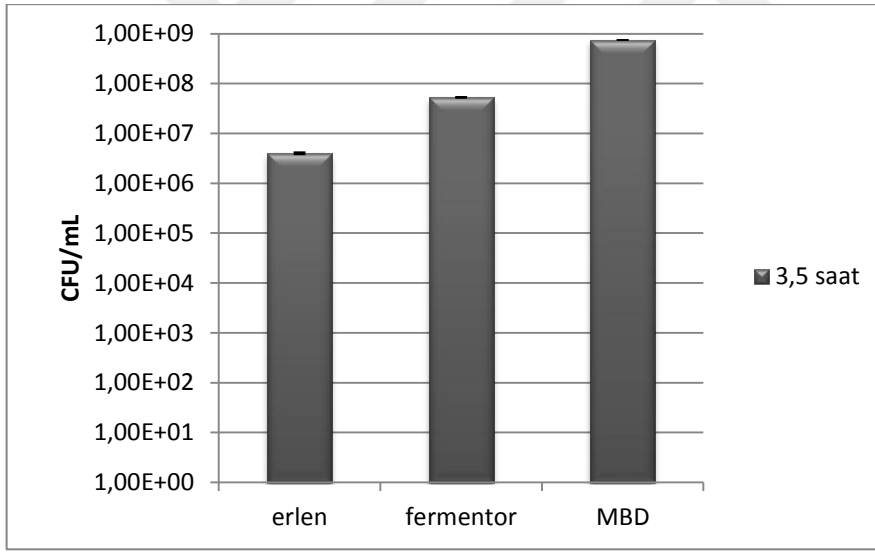
Şekil 56. GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucu elde edilen protein miktarı (mg/mL)



Şekil 57. GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucu elde edilen kuru ağırlık (g/L)



Şekil 58. GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucunda elde edilen bakteri yoğunluğu



Şekil 59. GthFAE-His'in klasik ve mikrobaloncuk fermentasyonla ve erlende üretimi sonucunda elde edilen CFU/mL profili

4. TARTIŞMA

Termofilik enzimler, yüksek sıcaklıklara karşı gösterdikleri kararlılık ve bu yüksek sıcaklığın getirdiği pek çok avantajdan dolayı, birçok endüstriyel alanda tercih edilmektedirler. Termofilik enzimlerin pH değişikliklerine ve yüksek sıcaklıklara karşı gösterdiği kararlılık, bu enzimlerin endüstri alanlarında tercih edilme nedenleridir. Termofilik enzimler, mikroorganizmaların optimum üreme sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta bile kararlı ve aktiftir. Bu yüksek sıcaklıklar, reaksiyon sırasında meydana gelebilecek kontaminasyon riskini önemli derecede azaltır, çünkü biyolojik döngüde kontaminasyona sebep olan bakterilerin çoğu mezofiliktir (Burg, 2003). Ayrıca bu yüksek sıcaklıklarda, reaksiyona katılan maddelerin difüzyon hızları ve çözünürlükleri önemli derecede artar ve bu da daha fazla ürün oluşumunu sağlar (Mozhaev, 1993; Kumar ve Swati, 2001).

Bu enzimlerden özellikle son zamanlarda FAE'lar, kâğıt ve kozmetik endüstrileri başta olmak üzere tekstilde, tarım, besin ve ilaç endüstrisinde, ayrıca endüstriyel atıklardan ferulik asit elde edilmesi gibi pek çok endüstri ve medikal alanda çok büyük önem kazanmışlardır. FAE'lar, bitki hücre duvarındaki polisakkarit ve fenolik asit arasındaki ester bağının yapımı ve yıkımını katalizleyen hidrolaz sınıfı enzimlerdir. Enzimin reaksiyonlar sonucu açığa çıkarttığı ferulik asit ($C_{10}H_{10}O_4$), fitokimyasal fenolik bileşiklerden türeyen, yaygın olarak bulunan bir hidroksisinamik asittir (Ou ve Kwok, 2004) ve kimyasal dönüşümle diğer kullanışlı aromatik kimyasallara dönüşebilir (Mathew ve Abraham, 2006; Li vd., 2003; Ernst, 1992).

FAE'lar ile ilgili çalışmalar son yıllarda çok büyük önem kazanmasına rağmen, bu enzim daha çok mantarlar üzerinde çalışılmıştır ve şu ana kadar karakterizasyonları yapılan FAE'ların çoğunun $60^{\circ}C$ 'nin altında optimum aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Yani çoğu mezofiliktir. Ayrıca, FAE'ların klonlanması ile ilgili çok az çalışma bulunduğu için bu enzimin gen ve amino asit dizileri ve bu bilgilere dayalı sınıflandırılmaları ile ilgili literatürde çok az bilgi bulunmaktadır.

Endüstrideki bu ihtiyaç doğrultusunda, bu çalışma kapsamında, *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T bakterisinde, FAE aktivitesini belirlemek için model substrat olan etil ferulat içeren besiyeri sayesinde, FAE varlığı belirlenmiştir.

Geobacillus thermoglucosidasius'un gen bankasındaki genom dizisinden yararlanılarak bulunan, tanımlanmamış fakat tarafımızdan FAE geni olduğu düşünülen 759 bp'lik gen dizisini, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlamak üzere, gerekli kesim bölgelerini içeren ekspresyon primerleri dizayn edilmiştir. Bu primerlerden histidin kuyruğu içermeyecek şekilde dizayn edilenler, *EcoRI* ve *NcoI* restriksiyon enzim kesim bölgeleri içermektedir. Fakat klonlamaya çalıştığımız gen de, 491. nükleotitinden sonra *NcoI* kesim bölgesi içermektedir. Bu enzimle kesim yapıp klonlamamız gerektiğinden, bu da genin yaklaşık 500 ve 250 bp'lik iki fragmente ayrılmasına sebep olmaktadır. Bu problemi aşmak için kısmi kesim olup olmadığı denenmiştir. Restriksiyon endonukleazın kesim şartlarında, bu reaksiyonu 37°C'de iki saat inkübe etmek gerekirken kısmi kesmesi için değişik zamanlarda inkübasyon yaparak kısmi kesim yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Sonuçta 10 dk.'lık kesim sonunda kısmi kestiği, yani genin ortasından kesmeyip sadece, klonlama yapabilmek için primerle eklediğimiz genin baş tarafındaki kesim bölgesinden kestiği görülmüştür. Bu genin, jelden çıkarılarak pET-28a(+) vektörüne ligasyonu yapılmıştır. Diğer taraftan histidin kuyruğu içerecek şekilde klonlamayı sağlayacak olan primerlerin kesim bölgelerinde böyle bir problem olmadığından dolayı, gen direk olarak 2 saat boyunca gerekli restriksiyon enzimleriyle kesilerek pET-28a(+) vektörüne ligasyonu yapılmıştır ve her iki vektör de *E. coli* BL21 (DE3) LysS suşuna aktarılarak genlerin ekspresyonları başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Genel olarak karboksilik asit esterazları, klasik olarak korunmuş bir adet Gly-X-Ser-X-Gly dizisine sahiptir. Bununla birlikte *L. johnsonii* LJ0536'ya ait FAE'nin aminoasit dizisine bakıldığında, iki adet Gly-X-Ser-X-Gly dizisine sahip olduğu görülür ve klasik karboksilesterazlardaki bir adet Gly-X-Ser-X-Gly dizisi kuralını bozar (Lai vd., 2012). *G. thermoglucosidasius* FAE'nin da aminoasit sırası incelendiğinde, iki adet Gly-X-Ser-X-Gly motifine sahip olduğu görülmüştür. Diğer iki adet Gly-X-Ser-X-Gly motifine sahip olan enzimler ve bakterileri ise şunlardır; *L. johnsonii* N6.2, LJ0536 sinnamoyl esterazı, *L. johnsonii* N6.2, LJ1228 sinnamoyl esterazı, *L. reuteri* DSM 20016, α/β katlanması ailesi hidrolaz benzeri proteini, *L. gasseri* ATTC 33323, α/β katlanması ailesi hidrolazı, *L. helveticus* DPC 4571, α/β katlanması ailesi hidrolazı, *L. fermentum* IFO 3956, hyphothetical proteini, *Prevotella bryantii* B14, α/β ailesi hidrolazı ve *Capnocytophaga sp.* oral taxon 338 str. F0234, α/β ailesi hidrolazıdır.

Esterazların katalitik bölgeleri her zaman üç kısımdan oluşur: nukleofil (serin), tamamen korunmuş aminoasit (histidin), asidik aminoasit (aspartik asit). Protein

Homology/Analogy Recognition Engine online program ile GthFAE'in üç boyutlu yapısı çizilerek bu enzimin aktif bölgesi tespit edilip incelenmiştir. Enzimin, birbirine paralel 8 adet α -heliks ve 8 adet β -sheet tabakasına sahip ve katalitik bölgesinde, esterazlarda klasik olarak bulunan serin, histidin ve aspartik asit aminoasitleri olduğu tespit edilmiştir (Ser 114, Asp 202, His 232).

Filogenetik ağaç çiziminde kullanılan bakterilere ait FAE'lar, Li ve arkadaşları (2011) tarafından iki şubeye ayrılmıştır. Bunlardan; *B. fibrisolvans*, *B. proteoclasticus* B316, *L. johnsonii*, *L. johnsonii* NCC 533, *C. ruminicola* JCM 14822, *B. fibrisolvans*, *C. subterraneus subsp. tengcongensis* MB4, *D. dadantii* 3937 ve *P. haloplanktis* TAC125 FAE'ları, şube II'ye, *C. japonicus* esterazı, *R. thermocellum* ve *C. ruminicola* JCM 14822 FAE'ları şube I'e dahil edilmiştir. Li ve arkadaşları (2011) tarafından tanımlanan FAEI ve FAEII, şube I'e, FAEIII ise şube II'ye dahil edilmiştir. Bu FAE'ların katalitik bölgeleri sırasıyla Ser174-His262-Asp232, Ser163-His262-Asp231, ve Ser106-His227-Asp197 olarak belirlenmiştir. GthFAE ve yukarıda sınıflandırılan bakterilerin FAE'ları ile çizilen filogenetik ağaca göre, GthFAE'in, FAE III gibi şube II'ye ait olduğuna karar verilmiştir. Yine GthFAE'in katalitik bölgesi Ser114-His 232-Asp 202 olarak belirlendiğinden, bu FAE, FAEIII'e daha çok benzemektedir.

GthFAE'in diğer mikroorganizmalara % aminoasit benzerliği Tablo 10'nda gösterilmektedir. Genel olarak FAE'ların primer dizileri, tabloda da görüldüğü gibi, birbirlerine çok az benzerlik gösterirler. Bu nedenle sadece bakteriyal değil, mantar orijinli FAE'ları da sınıflandırmak zordur. Literatürde tanımlanmış az sayıda bakteriyal FAE olduğundan, bunları sınıflandırmak daha da zordur.

Tablo 10. GthFAE'in diğ er mikroorganizmalara % aminoasit benzerliğ i

Mikroorganizma	% Benzerlik
<i>Lactobacillus Johnsonii</i> Lj0536	40
<i>Selenomonas ruminantium</i>	37
<i>Bacteroides salanitronis</i>	37
<i>Leuconostoc citreum</i> LBAE C10	36
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	35
<i>Lactobacillus helveticus</i>	35
<i>Capnocytophaga sp. oral taxon 338</i>	35
<i>Prevotella oris</i>	34
<i>Gracilibacillus halophilus</i>	33
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12</i>	33
<i>Lactobacillus fermentum</i>	33
<i>Paenibacillus wynnii</i>	32
<i>Alloscardovia omnicoles</i>	30
<i>Streptococcus sobrinus</i>	30
<i>Amphibacillus sediminis</i>	30

GthFAE'in moleküler ađ rlığ ı ve izoelektrik noktası, Exspasy Bioinformatics Resource Portal'da 28,11 kDa ve 5,53 olarak hesaplanmıştır. Saflaştırma sonucunda yapılan SDS-PAGE analizi de enzimin moleküler ađ rlığ ın 28,11 kDa olduğ unu desteklemektedir. Literatürdeki FAE'lar birbirine çok az benzemekte ve moleküler ađ rlığ ılıkları da oldukça farklılık göstermektedir. GthFAE'in moleküler ađ rlığ ına yakın olan organizmalar ve ađ rlığ ılıkları ř oyledir; *Fusarium oxysporum* FAE'ı 27 kDa (Wong, 2006), *Aspergillus niger* FAE'ı 28,55 kDa (Benoit vd., 2006).

Metal iyonlarının GthFAE'in aktivitesi üzerine etkisi; Mg^{+2} , Li^+ , Ca^{+2} , K^+ , Zn^{+2} , ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları ile gerç ekleştirilmiştir. Enzimin 1 mM $CoCl_2$ ile bir saat inkübasyonu sonucunda; aktivitesinin %16,13'e, 5 mM $CoCl_2$ ile inkübasyonu sonucunda ise %17,86'ya indiğ i tespit edilmiştir. 5 mM $ZnCl_2$ 'ün ise, enzimi daha da fazla inhibe ederek aktivitesini %6,15'e dūřürdüđ u belirlenmiştir. Enzimin 1 mM $CaCl_2$ ile inkübasyonu sonucunda; aktivitesinin %81,46'ya, 5 mM $CaCl_2$ ile %72,22'ye, 5 mM $LiCl_2$ ile de %92,6'ya indiğ i tespit edilmiştir. 1 mM KCl ile enzimin aktivitesinin %133,33'a, 5 mM $MgCl_2$ ile %118,34'e ç ıktığ ı belirlenmiştir. Literatürde, bu ç alışmadaki gibi, Co^{+2} ve

Zn⁺²'nin FAE'lar üzerine inhibe edici etkisi oldukça fazladır. 5 mM'lık Zn⁺², *Pleurotus eryngii* (McCrae vd., 1994) ve *Aspergillus awamori* FAE'larını (Nietera vd., 2014) inhibe etmiştir. Yine 5 mM'lık Co⁺², *Pleurotus eryngii* FAE'ını (McCrae vd., 1994) inhibe etmiştir. 50 mM'lık K⁺, Mg⁺² ve Li⁺, *Pleurotus eryngii* FAE'nin aktivitesini %10-20 oranında arttırmıştır.

Deterjan ve organik çözücülerin GthFAE'nin aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Enzim, %1 (v/v) DMSO, β-merkaptotanol, etanol, izopropanol, 5 mM EDTA, PMSF ve DTT, %0,1 (v/v) SDS, Tween 20, Triton X-100 içeren tamponlarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda β-merkaptotanolun; enzimin aktivitesini %350'ye, tritonX-100'ün %279,29'a, DTT'nin %171'e, Tween 20'nin %239'a ve DMSO'nun da %132'ye çıkararak, enzimin aktivitesini oldukça fazla arttırdıkları belirlenmiştir. SDS'in, enzimin aktivitesini %85,14'e indirdiği, PMSF'nin ise enzimin aktivitesini %2,49'a indirerek enzimi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir. EDTA'nın ise aktiviteyi %103'e çıkartarak enzimi çok da fazla etkilemediği tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde, 1 mM PMSF, *L. plantarum* FAE'nin (Esteban-Torres vd., 2013) aktivitesini %12-35'e indirmiş, *Pleurotus eryngii* FAE'nin (Nietera vd., 2014) aktivitesini de tampon sistemine bağlı olarak %50-100 arasında inhibe etmiş ve *Aspergillus terreus*'ün FAE'ını (Kumar vd., 2013) tamamen inhibe etmiştir. 1 mM'lık Tween 20'nin *L. plantarum* FAE'nin (Esteban-Torres vd., 2013) aktivitesini %250'ye çıkarmıştır. DTT ve DMSO ise, farklı olarak GthFAE'ı aktive ederken, *Pleurotus eryngii* FAE'ını kuvvetli bir şekilde inhibe etmiştir. EDTA, *Lactobacillus acidophilus* FAE'nin (Wang vd., 2004) aktivitesini %75'e indirirken, GthFAE'ı etkilemediği görülmüştür. EDTA, enzimi inhibe etmediğinden, bu enzim bir metalloprotein değildir sonucuna varılabilir. Disülfid bağlarını indirgeyici kimyasallar olan β- merkaptotanol ve DTT, enzimi inhibe etmediğinden dolayı bu enzim aktivitesi için serbest SH gruplarına veya S-S köprülerine ihtiyaç duymamaktadır yorumu yapılabilir. Ayrıca β- merkaptotanol ve DTT, enzimin aktif bölgesinin alanını genişletip, enzimin daha fazla substratla etkileşmesini sağlamış olabilir. PMSF, aktif bölgede hidrolitik reaksiyondan sorumlu serini inhibe eder. GthFAE'nin aktivitesini tamamen inhibe etmesi, aktif bölgesinde serin aminoasidi olduğunu kanıtlamaktadır.

GthFAE ve GthFAE-His'in *p*-NP butirat (C4), *p*-NP kaprilat (C8), *p*-NP kaprat (C10), ve *p*-NP laurat (C12) için substrat-aktivite grafikleri çizilerek enzimin basit Michaelis- Menten kinetiğine uyduğu tespit edilmiştir. Değerler, Origin Pro 8.1 programı ile hesaplanmıştır. GthFAE'nin *p*-nitrofenil butirat (C4) için K_m , K_{cat} , K_{cat}/K_m değerleri

sırasıyla 0,59 mM, 14.793 s⁻¹, 25.072 s⁻¹mM⁻¹ olarak hesaplanmıştır. *Streptomyces cinnamoneus* FAE'nin *p*-nitrofenil butirat (C4) için K_m 'si 0,17 mM (Uraji vd., 2014), *B. proteoclasticus* FAE'nin *p*-nitrofenil butirat (C4) için K_m 'si (Goldstone vd., 2010) 24 mM'dir. *B. proteoclasticus* FAE'nin *p*-nitrofenil butirat (C4) için K_{cat} değeri 0,24 s⁻¹, uncultured bacterium FAE'nin (Sang vd., 2011) K_{cat} değeri 203,2 s⁻¹'dir. Uncultured bacterium FAE'nin K_{cat}/K_m değeri 1286 s⁻¹mM⁻¹ ve *B. proteoclasticus* FAE'nin K_{cat}/K_m değeri 100 s⁻¹'dir. Endüstriyel alanlarda kullanılabilir esterazların K_m değeri genellikle 0,1 M-0,00001 M arasında değişmektedir. *G. thermoglucosidasius* FAE'nin tüm substratlarda K_m 'sinin 1 mM'ın altında olduğu görülmüştür ve bilinen FAE'lara göre iyi bir K_m 'ye sahiptir. Zaten literatüre bakıldığında karakterize edilen bakteriyel FAE'lerin sayısının az olması ve bu çalışmada kullanılan substratların çok da çalışılmaması nedeniyle bu anlamda bu çalışma ile literatüre yeni bilgiler kazandırılacaktır.

Endüstride özellikle kağıt endüstrisinde, daha çok alkalik FAE'leri tercih edilmektedir. Bununla birlikte çok az sayıda alkali ortamlarda kararlı kalan FAE rapor edilmiştir (Li vd., 2011). GthFAE'nin optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH'si ise 8,5 olarak hesaplanmıştır. GthFAE'nin, yapılan pH kararlılığı araştırmalarının sonucunda, 50°C'de 120 dakikanın sonunda, alkali ortamlarda daha kararlı kalabildiği (%90 üstü) belirlenmiştir. pH 5 ve 5,5'de ise enzim yine kararlı kalarak aktivitesinin %80'nin üstünde kaldığı gözlemlenmiştir. Isıl kararlılık deneylerine göre, GthFAE'nin, 40, 50 ve 60°C'de 49 saate kadar inkübasyonlarının sonucunda ise, 40 ve 50°C'de enzimin aktivitesinin %64'e, 60°C'de ise 36'ya indiği görülmüştür. Sekiz saatin sonunda ise, her üç sıcaklıkta da aktivitesinin %80'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre enzim, iki günün sonunda hala kararlı kalabilmektedir. Literatür incelendiğinde, *Thermobacillus xylanilyticus* FAE'nin optimum sıcaklığı 65°C'dir (Rakotoarivonina vd., 2011). *Thermobacillus xylanilyticus* 50°C'de 24 saatten fazla, 55°C'de sekiz saat kararlı kalmaktadır. 50°C'de 24 saatin sonunda aktivitesinin %16'sını kaybetmiştir. Enzim, 65°C'de kararlılığını kaybederek, 30 dakikada aktivitesinin %50'sini kaybetmiştir. 70 ve 80°C'de de 10 dakikada inkübasyonla aktivitesi %50'nin altına inmiştir. *L. plantarum* FAE'nin 45 ve 65°C de beş dakika inkübasyonu sonucunda, aktivitesinin %68 and 98'ini kaybetmiştir. 75°C'de beş dakika inkübasyonda enzim aktivitesini tamamen kaybetmiştir. pH 8'de *Myceliophthora heterothallica* FAE'nin aktivitesi %80 (Topakas vd., 2005) iken pH 7,7'de *Talaromyces stipitatus* FAE'nin aktivitesi %88'dir. Bu organizmalar dışında, literatürde tanımlanan ve karakterize edilen çoğu FAE mezofiliktir ve mantar orijinlidir ve

çok az sayıda alkali ortamlarda kararlı kalan FAE rapor edilmiştir. Bu nedenle GthFAE'in yüksek sıcaklıklara ve pH'ya dayanıklı olması, kağıt endüstrisinde kullanıma daha uygundur ve literatürde bu enzimi değerli kılacaktır.

G. thermoglucosidasius FAE'si, ekspresyon vektörüne histidin kuyruklu ve histidin kuyruksuz olacak şekilde klonlanmış ve ekspres edilmiştir. Bunların her ikisinin de karakterizasyonu ayrı ayrı yapılmıştır. Genel olarak karakterizasyon çalışmalarına bakıldığında, histidin kuyruğunun, enzimin bazı özelliklerini değiştirdiği görülmektedir. Her ikisinin optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir fakat optimum sıcaklık grafik profilleri birbirinden biraz farklıdır. Optimum pH grafiğine bakıldığında ise, optimum pH değerleri birbirinden farklıdır. GthFAE'in optimum pH'sı 8,5 ve GthFAE-His'in optimum pH'sı 7,5 olarak hesaplanmıştır. Isıl ve pH kararlılık grafikleri incelendiğinde ise GthFAE'in, GthFAE-His'e göre daha kararlı olduğu görülmektedir. GthFAE ve GthFAE-His'in Origin Pro 8.1 programı ile hesaplanan K_m , V_{max} , k_{cat} ve k_{cat}/K_m değerleri incelendiğinde, GthFAE'in substratlara ilgisinin GthFAE-His'e göre biraz daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Histidin kuyruğu aktif bölgesine yakın olan enzimlerde, enzimin aktif bölge geometrisini değiştirerek, substrata olan ilgisini etkileyebilmektedir. Ayrıca kuyruk enzimin yapısal bütünlüğünü değiştirerek, optimum pH'nın da değişmesine sebep olabilmektedir.

Sentetik polimerlerden yapılan petrol kökenli plastiklerden üretilen malzemeler, doğada parçalanmadığı için, ekosistemde kirlilik oluşturmaktadır. Aşırı fazla olan moleküler ağırlıkları, bu kimyasalların biyodegradasyona dirençli olup toprakta uzun yıllar boyunca parçalanmadan kalmalarının bir sebebi olarak gözükmektedir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen biyoparçalanabilir plastikler (PHA'lar), kirlilik sorunu için bir çözüm önerisi olarak karşımıza çıkmaktadır. PHA'lar tamamen biyosentetik ve hiçbir toksik atık açığa çıkarmadan biyoparçalanabilir ve tamamen organik atıklara geri dönüştürülebilir olması, sentetik plastiklerle benzer fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması nedeniyle, sentetik plastiklerin yerini tutabilecek özelliktedir. Fakat PHA'ların bu avantajlarına rağmen, üretimindeki yüksek maliyetinden dolayı, endüstri alanında, büyük ölçekli üretimlerde tercih edilmemesine neden olmaktadır.

Doğal (rekombinant olmayan) PHA üreten bakteriler, uzun generasyon süresine ve nispeten düşük optimum üreme sıcaklığına sahiptirler ve bu PHA üretici bakterileri lizis ederek ürettikleri PHA'ları elde etmek zordur. Buna rağmen *E. coli* gibi, PHA degradasyonu ve sentez yeteneğine sahip olmayan bakteriler, çok hızlı çoğalırlar (aynı

zamanda yüksek sıcaklıklarda bile) ve bu bakteriler çok kolaylıkla lizis edilebilirler. Hızlı üreyebildiklerinden dolayı, büyük miktarlarda polimerin birikmesini sağlarlar. Ayrıca ucuz substratları karbon kaynağı olarak kullanmaları (Hahn vd., 1995; Fidler ve Dennis, 1992), hücrelerin kolay lizis edilerek PHA granüllerinin saflaştırılıp elde edilmesi maliyetin düşmesine sebep olur. Bu nedenlerden dolayı PHA üretiminde rekombinat *E. coli* sıklıkla tercih edilir (Wang ve Bakken, 1998). PHA üreten 300'den fazla farklı mikroorganizma olmasına rağmen, bunlardan sadece birkaçı büyük ölçekli üretimde kullanılmaktadır. Bu organizmalar; *C. necator* (eskiden kullanılan adları, *R. eutropha* ve *A. eutrophus*), *A. latus*, *A. vinelandii*, *P. oleovorans*, *P. denitrificans*, *P. extorquens* ve rekombinant *E. coli* (Steinbuchel ve Valentin, 1995; Lenz ve Merchessault, 2005).

Ticari PHA üretim sistemlerinin başarılı olarak uygulanması için, bütün fermentasyon koşullarını mutlaka standardize etmek gerekir. Ürünün fiyatı tamamen kullanılan substratın maliyetine, kullanılan substrattan üretilen PHA'nın verimine ve diğer süreçler için kullanılması açısından ürünün formülünün etkinliğine bağlıdır (Lee, 1996). Bu nedenle, PHA'ları, fermentörlerde üretim maliyetini düşürme çalışmaları devam etmektedir.

E. coli'den PHA'nın fermentasyonla üretiminde, büyük miktarda hava akışına ihtiyaç vardır. Bu da aşırı derecede enerji tüketimiyle sonuçlanır ve bu süreci ekonomik olarak daha az verimli kılar. Çözülmesi gereken temel sorun, fermentasyon besiyerinde oksijenin çok az çözünmesi ve bundan kaynaklı olarak besiyerini havalandırmak ve çalkalamak için çok fazla enerjiye ihtiyaç olmasıdır. Fermentasyondaki maliyeti düşürmek için PHA'ların ve endüstride önemli bir yeri olan FAE'nin bu çalışma kapsamında mikrobaloncuklarla oksijen transferini ve gaz tutulumunu artırarak, fermentasyon sürecinde kullanılacak olan enerjiyi düşürmek amaçlanmıştır. Mikrobaloncuklar sayesinde fermentördeki çalkalama hızını, gaz akış hızını veya oksijen basıncını arttırmadan, fermentördeki oksijen transferini yükseltmek hedeflenmiştir. Çünkü fermentörlerdeki oksijen transportu, kabaca baloncuk yüzey alanının baloncuk hacmine oranıyla doğru orantılıdır. Genellikle, baloncuklar ne kadar küçükse, fermentördeki oksijen transfer oranı o kadar yüksektir. Küçük baloncuklar fermentörde daha fazla kalabildiğinden dolayı, mikroorganizmalar için daha fazla oksijen sağlanmış olur. Fermentörlerde kullanılacak bu mikrobaloncukların oksijenin kütle transfer oranını arttırdığı kanıtlanmıştır (Hensirisak vd., 2002; Weber ve Agblevor, 2005). Bu sistemin en önemli avantajı, çok düşük çalkalama hızlarında bile kütle transferinin mikrobaloncuklar sayesinde artmasıdır. Mikrobaloncuk

fermentasyonda, fermentör tankına aktarılan baloncukların çapı 20-1000 µm arasında değişir. Oysa klasik fermentasyonda, çalkalama ile oluşan baloncukların boyutları 3-5 mm çapındadır. Yani çok daha büyüktür. Dolayısıyla mikrobaloncuk fermentasyonun baloncukların çapı daha küçük olduğundan dolayı oksijen tutulumu ve miktarı daha fazla olur. Aynı çalkalama hızında mikrobaloncuk fermentasyonda klasik fermentasyona göre kLa değerlerinde %30'lara varan artış görülmüştür (Hensirisak vd., 2002). Ayrıca yine ABD'de 2014 yılında yapılan başka bir çalışmada; mikrobaloncuklarla desteklenen fermentasyon besiyerinde, çözülmüş oksijen miktarının %60'tan %85'e yükseldiği ve yükselen oksijen miktarının *Nicotiana tabacum*'un saçak kök kültürlerinde metabolit üretimini teşvik ederek, besiyerinde üretilen nikotin miktarını arttırdığı tespit edilmiştir (Zhao vd., 2014). Bu sonuçlar, büyük ölçekli fermentasyonlarda daha az enerji harcanarak, maliyetin düşürülebileceğini göstermektedir (Zhang vd., 2005; Weber ve Agblevor, 2005; Hensirisak vd., 2002).

PHA'ların fermentörlerde ekonomik olarak üretilmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Ancak Türkiye'de genellikle PHA'ları üreten mikroorganizmaları tespit etmeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Tüm bunlardan hareketle, PHB ve FAE'in fermentörde mikrobaloncuklarla üretimine karar verilmiştir.

Üretimini karşılaştırmak amacıyla PHB, *E.coli* XL1Blue/pBHR68'den, klasik olarak inkübatörde erlenlerde, fermentörde ve son olarak da mikrobaloncuk üreten cihazla beraber yine fermentörde üretimi gerçekleştirilmiştir. pBHR68 plazmiti, *R. eutropha*'ya ait *phbCAB* genlerini içeren pBluescript SK- vektörüdür (Spiekermann vd., 1999). Fermentasyon süresince, hücre üreme, CFU/mL, kuru hücre ağırlığı ve besiyerinin glukoz konsantrasyonu analizleri yapılmıştır.

E.coli XL1Blue/pBHR68'in, erlenlerde 48 saat üretimi sonucunda bakteri yoğunluğu 9,2'ye ulaşmış ve kuru ağırlığının %43,9'i kadar PHB biriktirdiği belirlenmiştir. CFU-zaman grafiğine göre, bakteriler 12 saatte durgun faza ulaşmışlardır. Bakteri üremesi arttıkça, besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bakteri üremesinin en hızlı olduğu logaritmik fazda glukoz kullanımının en fazla olduğu, yani bakteri üremesiyle paralel bir şekilde besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun düştüğü belirlenmiştir. Bakteriler ortamdaki glukozu 48 saat sonunda tamamen bitirmişlerdir. Maksimum kuru hücre ağırlığına (2,8 g/L) 24 saatte ulaşılmıştır.

E.coli XL1Blue/pBHR68'in klasik fermentörde üretimi yapılarak, bakteri üreme eğrisi çizilmiş, CFU/mL, PHB, glukoz konsantrasyonu ve kuru hücre ağırlığı analizleri

yapılmıştır. Fermentörün çalkalama hızı 350, 500 ve 750 rpm olarak ayarlanmıştır. Bu çalkalama hızlarındaki fermentöre, sırasıyla 0,4 ve 0,8 vvm'lik oksijen sağlanarak üreme gerçekleştirilmiştir. 750 rpm çalkalama hızı ve 0,8 vvm'lik oksijen varlığında bakteri yoğunluğu 13,86'ya çıkmıştır. 350 rpm çalkalama hızı ve 0,4 vvm'lik oksijen varlığında ise, bakteri yoğunluğu 3,67'ye çıkabilmiştir. Diğer çalkalama hızları ve oksijen miktarları da göz önüne alındığında, fermentörün çalkalama hızı arttıkça, klasik fermentördeki hücre yoğunluğu da artmıştır. 750 rpm çalkalama hızlarında da oksijen miktarı arttıkça üremenin artması da, oksijenin fermentörde ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. DO seviyesi, her bir çalkalama hızında oldukça hızlı düşmüştür ve ardından artmaya başlayarak, 12 ve 24. saatlerde sabitlemiştir. Bu sonuç da, oksijenin logaritmik fazda bakteriler tarafından çok hızlı bir şekilde tüketildiğini kanıtlamıştır. CFU/mL analizleri de yine çalkalama hızı arttıkça bakteri sayısının arttığını göstermektedir. Fermentasyonun 48. saatinde, 350, 500 ve 750 rpm çalkalama hızlarında en yüksek % PHB oranlarına ulaşılmıştır fakat 24 ve 48. saatler arasında da çok fark yoktur. 750 rpm çalkalama hızında ve 0,8 vvm oksijen varlığında 48. saatin sonunda, en yüksek PHB (%54,96) elde edilmiştir. Yine 750 rpm çalkalama hızında ve 0,8 vvm oksijen varlığında 48. saatin sonunda en yüksek kuru hücre ağırlığı (4,57 g/L) elde edilmiştir. Oksijen miktarı ve çalkalama hızları arttıkça, kuru hücre ağırlığı ve biriktirdikleri PHB miktarları artmıştır. Tüm bu verilerin beklenen bir sonucu olarak da, besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun, yüksek çalkalama hızı ve oksijen varlığında, daha hızlı tükendiği tespit edilmiştir.

E.coli XL1Blue/pBHR68'in MBD fermentasyonla üretimi yapılarak, yine bakteri üreme eğrisi çizilmiş, CFU/mL, PHB, glukoz konsantrasyonu ve kuru hücre ağırlığı analizleri yapılmıştır. Fermentörün çalkalama hızı sırasıyla 350, 500 ve 750 rpm olarak ayarlanmıştır. MBD diskinin dönme hızı sırasıyla 4000 ve 5000 rpm olarak ayarlanarak, mikrobaloncuk oluşumu sağlanmıştır. Klasik fermentörden farklı olarak 0,8 vvm'lik oksijen, MBD cihazına verilerek buradan, mikrobaloncuklar halinde fermentöre dağılması sağlanmıştır. Klasik fermentasyonda; 24 saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken bakteri yoğunluğu 4,22'dir. MBD fermentasyonda ise; 24 saat sonunda, MBD hızı 5000 rpm ve fermentör reaktörünün çalkalama hızı 350 rpm iken bakteri yoğunluğu 7,73'e ulaşmıştır. MBD cihazı aynı çalkalama hızında bakteri üremesini hemen hemen iki katına çıkarmıştır. MBD diskinin hızı da arttıkça, fermentöre daha fazla mikrobaloncuk ve bu sayede oksijen sağlayarak, üremenin yine arttığı tespit edilmiştir. CFU/mL grafiğine bakıldığında ise, MBD diskinin hızı 4000 rpm iken, 500 rpm çalkalama hızı ve 0,8 vvm'lik

oksijen sağlanan klasik fermentördeki bakteri sayısını yakalamıştır. MBD diskinin hızı 5000 rpm iken ise, 750 rpm çalkalama hızı ve 0,8 vvm'lik oksijen sağlanan klasik fermentördeki bakteri sayısına hemen hemen ulaşılmıştır.

MBD fermentasyonda; 48 saat sonunda, MBD hızı 5000 rpm ve reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken, kuru hücre ağırlığı 4,43 g/L'dir. Klasik fermentasyonda ise; 48 saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken, kuru hücre ağırlığı 2,23 g/L'dir. Kuru hücre ağırlığı, aynı çalkalama hızında MBD fermentasyonu ile iki katına çıkmıştır. MBD diskinin hızı 5000 rpm iken ise, 750 rpm çalkalama hızı ve 0,8 vvm'lik oksijen sağlanan klasik fermentördeki bakteri kuru ağırlığını hemen hemen ulaşılmıştır. Yine MBD diskinin hızı arttıkça, kuru ağırlığın da arttığı görülmektedir.

MBD fermentasyonda, MBD hızı 5000 rpm iken, PHB üretimi 48 saat sonunda %56'ya çıkmıştır. 350 rpm çalkalama hızındaki klasik fermentasyonda ise; 48 saat sonunda PHB üretimi % 23,93'dür. MBD fermentasyonla PHB üretimi, aynı çalkalama hızlarındaki klasik fermentasyonla PHB üretiminin iki katından fazladır. MBD diskinin hızı 5000 rpm iken ise, klasik fermentördeki 750 rpm çalkalama hızı ve 0,8 vvm'lik oksijen sağlanan PHB üretimine hemen hemen ulaşılmıştır. MBD diskinin hızı arttıkça da, PHB üretimi artmıştır.

750 rpm çalkalama hızındaki klasik fermentörde ve diskin hızı 5000 rpm olan MBD fermentöründe, 48 saat sonunda ortamdaki glukozun tamamen tükendiği tespit edilmiştir.

kLa, fermentörün havalandırma kapasitesini belirler. Reaktörün çalkalama hızı(rpm) ne kadar fazla olursa, besiyeri o kadar hızlı bir şekilde doymuş çözünmüş oksijen konsantrasyonuna ulaşır. kLa'nın yüksek olması, sistemin havalandırma kapasitesinin iyi olduğunun göstergesidir. kLa değeri, "non fermentative method (gas out-gas in)" ile hesaplanmıştır. MBD sisteminde diskin hızı 4000 rpm iken, kLa değerleri, 350 rpm ve 500 rpm (0,4 ve 0,8 vvm)'de sırasıyla 18,108, 23,124, 30,606, 32,802 h⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin de aynı çalkalama hızlarındaki klasik fermentördeki değerlerden yüksek olduğu gözlenmektedir.

Tüm bu sonuçlardan sonra, MBD cihazının Türkiye'de bizim laboratuvarımızda kullanılmasına karar verilmiştir. Fakat cihaz Türkiye'de bulunmadığından dolayı, Kocaeli Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü'ne yaptırılarak bu cihazın laboratuvarımızdaki üretimlerde de kullanılmasına karar verilmiştir. Bu çalışma kapsamında, *G. thermoglucosidasius* FAE'ı kullanılmıştır. FAE üretimi için yine rekombinant *E. coli* kullanılmıştır. *E. coli* BL21(DE3)LysS/pETGthFAE-His'in, klasik olarak inkübatörde,

erlenlerde, fermentörde ve son olarak da mikrobaloncuk üreten cihazla beraber yine fermentörde üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda, MBD diskinin hızı 4000 rpm, klasik fermentörün çalkalama hızı 350 rpm olarak ayarlanmıştır.

Klasik fermentasyonda; üç buçuk saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken bakteri yoğunluğu 3,8, MBD fermentasyonunda ise; bakteri yoğunluğu 4,5'tir. Klasik fermentasyonda; üç buçuk saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken protein miktarı 244,48 µg/mL, MBD fermentasyonda ise; protein miktarı 278 µg/mL'dir. Klasik fermentasyonda; üç buçuk saat sonunda, reaktörün çalkalama hızı 350 rpm iken kuru hücre ağırlığı 1,2 g/L, MBD fermentasyonda ise; kuru hücre ağırlığı 1,5 g/L'dir. Genel olarak yine MBD cihazı kullanıldığında, bakteri üremesini arttırdığı, bununla birlikte kuru hücre ağırlığını ve üretilen protein miktarlarını da arttırdığı tespit edilmiştir.

Tüm bu çalışmalar ışığında, özetlemek gerekirse, çalkalama hızının ve oksijen miktarının, üremeyi ve ürün eldesini ne kadar etkilediği görülmektedir. PHB'nin üretiminin hücre üremesiyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bakteriler, logaritmik fazın sonunda daha fazla PHB üretmişlerdir. Çalkalama hızı arttırıldığında, besiyerindeki oksijen transferi artmıştır. Oksijen transferi de ne kadar artarsa üreme o kadar artmıştır. Hücre üremesi ve PHB üretimi çalkalama hızından oldukça fazla etkilenmektedir. MBD cihazı, fermentör düşük çalkalama hızlarında kullanıldığında bile, fermentöre etkili bir şekilde daha fazla oksijen sağlamaktadır.

Sonuç olarak, rekombinant *E. coli*'den PHB ve FAE üretimi, fazla miktarda oksijene ihtiyaç duymaktadır. Bu sorun da endüstride özellikle PHB'nin üretimini maliyetinden dolayı kısıtlamaktadır. MBD cihazının kullanımı, fermentördeki oksijen tutulumunu arttırarak daha düşük çalkalama hızlarında daha fazla ürün eldesi sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, fermentörün hacmi arttıkça kazanılan enerjinin daha fazla olacağını göstermektedir. Küçük hacimli fermentörlerde, düşük çalkalama hızında, oksijen tutulumunun az da olsa arttırılması, büyük ölçekli fermentörlerde enerjiden çok daha fazla kazanım olacağını gösterir. Dolayısıyla endüstriyel boyutta büyük ölçekli üretimlerde bu metot ile beraber maliyet oldukça düşebilecektir (Hensirisak vd., 2002; Zhang vd., 2005).

5. SONUÇLAR

'Polihidroksibutirat ve termofilik bir ferulik asit esterazın klasik ve mikrobaloncuk fermentasyon yöntemi ile üretimi' başlıklı bu çalışmadan şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T bakterisinde FAE aktivitesi için model bir substrat olan etil ferulat içeren besiyeri kullanılarak FAE varlığı belirlenmiştir.
2. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T'un 759 bp'lik FAE geni, histidin kuyruğu içerecek ve içermeyecek şekilde, pET-28a(+) ekspresyon vektörüne klonlanarak *E. coli* BL21 (DE3) LysS suşunda ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Histidin kuyruğunun enzimin biyokimyasal özelliklerini değiştirdiği belirlenmiştir.
3. GthFAE'in aminoasit sırası incelendiğinde, iki adet Gly-X-Ser-X-Gly motifine sahip olduğu tespit edilmiştir. Protein Homology/Analogy Recognition Engine online program ile GthFAE'in üç boyutlu yapısı çizilerek, bu enzimin aktif bölgesi tespit edilip incelenmiştir. Enzimin, birbirine paralel 8 adet β -sheet ve α -heliks tabakasına sahip ve katalitik bölgesinde esterazlarda klasik olarak bulunan serin, histidin ve aspartik asit aminoasitleri olduğu tespit edilmiştir (Ser 113, Asp 201, His 231).
4. Bakteriyal FAE'lara ait filogenetik ağaç, Mega 6.06 programı kullanılarak Neighbour-Joining methodu ile çizilerek, enzimin şube II'ye ait olduğu görülmüştür. GthFAE'in moleküler ağırlığı ve izoelektrik noktası, ExPasy Bioinformatics Resource Portal'da, sırasıyla 28,11 kDa ve 5,53 olarak hesaplanmıştır.
5. Metal iyonlarının GthFAE'in aktivitesi üzerine etkisi; Mg^{+2} , Li^+ , Ca^{+2} , K^+ , Zn^{+2} , ve Co^{+2} metal iyonlarının klorür tuzları ile, deterjan ve organik çözücülerin GthFAE'in aktivitesi üzerine etkileri de; DMSO, β -merkaptöetanol, etanol, izopropanol, EDTA, PMSF ve DTT, SDS, Tween 20, Triton X-100 kimyasalları ile gerçekleştirilmiştir. Bunlardan; K^+ , Mg^{+2} , β -merkaptöetanol, tritonX-100, DTT, Tween 20, DMSO, EDTA'nın enzimin aktivitesini arttırdığı, Li^+ , Ca^{+2} , Zn^+ , Co^{+2} , SDS, PMSF, etanol ve izopropanolün ise enzimin aktivitesini düşürdüğü tespit edilmiştir.

6. GthFAE'in substrat olarak *p*-NP butirat (C4), *p*-NP kaprilat (C8), *p*-NP kaprat (C10), ve *p*-NP laurat (C12) varlığında substrat-aktivite grafikleri Origin Pro 8.1 programı ile çizilerek ile K_m , K_{cat} , K_{cat}/K_m değerleri hesaplanmıştır. GthFAE'in *p*-nitrofenil butirat (C4) için K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,59 mM, 31.591 $\mu\text{mol/dk/mg}$, 14.793 s^{-1} , 25.072 s^1mM^{-1} olarak hesaplanmıştır. GthFAE'in *p*-nitrofenil kaprilat (C8) için K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,035 mM, 11.735 $\mu\text{mol/dk/mg}$, 5491 s^{-1} , 156.885 s^1mM^{-1} olarak hesaplanmıştır. GthFAE'in *p*-nitrofenil kaprat (C10) için K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,034 mM, 9787 $\mu\text{mol/dk/mg}$, 4579 s^{-1} , 134.676 s^1mM^{-1} olarak hesaplanmıştır. GthFAE'in *p*-nitrofenil laurat (C12) için K_m , V_{max} , K_{cat} , K_{cat}/K_m değerleri sırasıyla 0,11 mM, 7902 $\mu\text{mol/dk/mg}$, 3700 s^{-1} , 33.636 s^1mM^{-1} olarak hesaplanmıştır.
7. GthFAE'in optimum sıcaklığı 50°C, optimum pH'sı ise 8,5 olarak hesaplanmıştır. Sıcaklık ve pH'nın enzimin aktivitesi üzerine etkileri incelenerek, enzimin oldukça kararlı olduğu tespit edilmiştir.
8. *E.coli* XL1Blue/pBHR68'in; erlenlerle, klasik ve MBD fermentasyonla PHB üretimi gerçekleştirilmiştir. Üreme ortamından belirli zaman aralıklarında numuneler alınarak, PHB (%), glukoz, kuru hücre ağırlığı ve CFU/mL analizleri yapılmıştır. MBD fermentasyonla elde edilen PHB (%) ve kuru hücre ağırlıklarının, aynı çalkalama hızlarındaki klasik fermentasyonla elde edilen PHB (%) ve kuru hücre ağırlıklarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Besiyerideki glukoz, MBD fermentasyonla üretim esnasında daha hızlı tükenmiştir.
9. Fermentörlerin k_La değerleri, "non fermentative method (gas out-gas in)" ile hesaplanarak, fermentör tankının havalandırma kapasitesi ölçülmüştür. MBD fermentasyonun k_La değerlerinin, aynı çalkalama hızlarındaki klasik fermentasyonun k_La değerlerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.
10. MBD cihazı Türkiye'de bulunmadığından dolayı, Kocaeli Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü'ne yaptırılarak, bu cihazın laboratuvarımızdaki üretimlerde de kullanılmasına karar verilmiştir. Bu çalışma kapsamında, GthFAE'in ekspresyonunda kullanılmıştır.
11. *E. coli* BL21(DE3) LysS/pETGthFAE-His'in; erlende, klasik ve MBD fermentasyonla FAE üretimi gerçekleştirilmiştir. MBD cihazının, bakteri

üremesi, kuru hücre ağırlığı ve üretilen protein miktarını arttırdığı tespit edilmiştir.

12. MBD cihazı, fermentör düşük çalkalama hızlarında kullanıldığında bile, fermentöre etkili bir şekilde daha fazla oksijen sağlayarak, bakteri üremesini ve ürün eldesini arttırarak, üretim maliyetini düşürebileceği belirlenmiştir.



6. ÖNERİLER

1. FAE'ların sınıflandırılmasında kullanılan dört model substrat olan metil kafeat, metil ferulat, metil p-kumarat ve metil sinapat kullanılarak bunların HPLC analizleri yapılabilir.
2. FAE üzerinde mutasyon ve immobilizasyon çalışmaları yapılabilir.
3. FAE, hemiselülotik enzimler olan ksilanaz, selülaz ve pektinazlarla birlikte kullanılarak, endüstriye yönelik kağıt ağartma çalışmaları yapılabilir.
4. FAE'a prolin kuyruğu eklenerek, enzimin özelliklerini etkileyip etkilemediği incelenebilir.
5. Üretilen MBD cihazı, kullanılan fermentörün şartları değiştirilerek, cihazın verimliliği araştırılabilir.
6. MBD cihazıyla birlikte başka enzimlerin de üretimi yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

- Adamian, L. ve Liang, J., 2002. Interhelical hydrogen bonds and spatial motifs in membrane proteins: Polar clamps and serine zippers, Proteins-Structure Function and Genetics, 47, 2, 209-218.
- Altschul, S., F., Gish, W., Miller, W., Myers, E., W. ve Lipman, D., J., 1990. Basic local alignment search tool, Journal of Molecular Biology, 215, 403-410.
- Anderson, A., J. ve Dawes, E., A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, Microbiological Reviews, 54, 4, 450-472.
- Ash, C., Farrow, J., A., E., Wallbanks, S. ve Collins, M., D., 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative-analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences, Letters in Applied Microbiology, 13, 4, 202-206.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., ve Stockinger, H., 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, Nucleic Acids Researchs, 40, 597-603.
- Balasubashini, M., S., Rukkumani, R., Viswanathan, P. ve Menon, V., P., 2004. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats, Phytotherapy Research, 18, 4, 310-314.
- Bhat, K., M. ve Maheshwari, R., 1987. Sporotrichum-thermophile growth, cellulose degradation, and cellulase activity, Applied and Environmental Microbiology, 53, 9, 2175-2182.
- Benoit, I., Asther, M., Sulzenbacher, G., Record, E., Marmuse, L., Parsiegla, G., Gimbert, I., Asther, M. ve Bignon, C., 2006. Respective importance of protein folding and glycosylation in the thermal stability of recombinant feruloyl esterase A, FEBS Letters, 580, 25, 5815-5821.
- Benson, D., A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D., J., Ostell, J. ve Wheeler, D., L., 2005. GenBank, Nucleic Acids Researchs, 33, 34-38.
- Borneman, W., S., Ljungdahl, L., G., Hartley, R., D. ve Akin, D., E., 1992. Purification and partial characterization of 2 feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain Mc-2, Applied and Environmental Microbiology, 58, 11, 3762-3766.

- Brandl, H., Gross, R., A., Lenz, R., W., Lloyd, R. ve Fuller, R., C., 1991. The Accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter-Sphaeroides*, Archives of Microbiology, 155, 4, 337-340.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. ve Genser, K., F., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, Journal of Biotechnology, 65, 2-3, 127-161.
- Chanprateep, S., 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, Journal of Bioscience and Bioengineering, 110, 6, 621-632.
- Chen, G., Q., 2009. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry, Chemical Society Reviews, 38, 8, 2434-2446.
- Chen, G., Q., 2010. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates, Microbiology Monographs, 14, 17-37.
- Dave, H., R., C. ve Desai, J., D., 1996. Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403, Indian Journal of Experimental Biology, 34, 216-219.
- Dawes, E., A. ve Senior, P., J., 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms, Advanced Microbiology and Physiology, 10, 135-266.
- Delano, W., L., 2002. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- Donaghy, J., Kelly, P., F. ve McKay, A., M., 1998. Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli, Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 2, 257-260.
- Dunlop, W., F. ve Robards, A., W., 1973. Ultrastructural study of poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*, Journal of Bacteriology, 114, 3, 1271-1280.
- Ernst, G., 1992. Antioxidant potential of ferulic acid, Free Radical Biology Medicine, 13, 435-448.
- Esteban-Torres, M., Reveron, I., Mancheno, J., M., de las Rivas, B.ve Munoz, R., 2013. Characterization of a feruloyl esterase from *Lactobacillus plantarum*, Applied and Environmental Microbiology, 79, 17, 5130-5136.
- Faulds, C., B. ve Williamson, G., 1993. Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*- Purification and partial characterization of 2 forms from a commercial source of pectinase, Biotechnology and Applied Biochemistry, 17, 349-359.
- Faulds, C., B. ve Williamson, G., 1994. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (fae-III) from *Aspergillus niger* - Specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose, Microbiology-Sgm, 140, 779-787.

- Fazary, A., E. ve Ju, Y., H., 2007. Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives, Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 39, 11, 811-828.
- Fidler, S. ve Dennis, D., 1992. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letters, 103, 2-4, 231-235.
- Findlay, R., H. ve White, D., C., 1983. Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental-samples and *Bacillus megaterium*, Applied and Environmental Microbiology, 45, 1, 71-78.
- Galehdari, H., Alaei, S. ve Mirzaei, M., 2009. Cloning of poly (3-hydroxybutyrate) synthesis genes from *Azotobacter vinelandii* into *Escherichia coli*, Jundishapur Journal of Microbiology, 2, 1, 31-35.
- Galtier, N., Tourasse, N. ve Gouy, M., 1999. A nonhyperthermophilic common ancestor to extant life forms, Science, 283, 5399, 220-221.
- Garcia-Conesa, M., T., Kroon, P., A., Ralph, J., Mellon, F., A., Colquhoun, I., J., Saulnier, L., Thibault, J., F. ve Williamson, G., 1999. A cinnamoyl esterase from *Aspergillus niger* can break plant cell wall cross-links without release of free ferulic acids, European Journal of Biochemistry, 266, 2, 644-652.
- Garcia, B., L., Ball, A., S., Rodriguez, J., Perez-Leblic, M., I., Arias, M., E. ve Copatino, J., L., 1998. Production and characterization of ferulic acid esterase activity in crude extracts by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339, Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 2, 213-218.
- Goldstone, D., C., Villas-Boas, S., G., Till, M., Kelly, W., J., Attwood, G., T. ve Arcus, V., L., 2010. Structural And functional characterization of a promiscuous feruloyl esterase (est e) from the rumen bacterium *Butyrivibrio Proteoclasticus*, Proteins-Structure Function and Bioinformatics, 78, 6, 1457-1469.
- Gonthier, M., P., Remesy, C., Scalbert, A., Cheynier, V., Souquet, J., M., Poutanen, K. ve Aura, A., M., 2006. Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota in vitro, Biomedicine & Pharmacotherapy, 60, 9, 536-540.
- Hahn, S., K., Chang, Y., K. ve Lee, S., Y., 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*, Applied and Environmental Microbiology, 61, 1, 34-39.
- He, W., N., Zhang, Z., M., Hu, P. ve Chen, C., Q., 1999. Microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by dg17 from glucose, Acta Polymerica Sinica, 6, 709-714.
- Hensirisak, P., Parasukulsatid, P., Agblevor, F., A., Cundiff, J., S. ve Velander, W., H., 2002. Scale-up Of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation, Applied Biochemistry and Biotechnology, 101, 3, 211-227.

- Hermoso, J., A., Sanz-Aparicio, J., Molina, R., Juge, N., Gonzalez, R. ve Faulds, C., B., 2004. The crystal structure of feruloyl esterase a from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family, Journal of Molecular Biology, 338, 3, 495-506.
- Holmes, P., A., 1985. Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic, Physics in Technology, 16, 1, 32-36.
- Inan, K., 2011. İzmir ve Aydın illerindeki bazı kaplıcalardan izole edilen termofilik bakteri izolatlarının moleküler taksonomisi ve d1021 izolatının glukoz izomerazının karakterizasyonu, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J., N. ve Seguin, J., P., 1996. H-1 NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, Enzyme and Microbial Technology, 18, 3, 195-201.
- Johnson, K., G., Silva, M., C., Mackenzie, C., R., Schneider, H. ve Fontana, J., D., 1989. Microbial-degradation of hemicellulosic materials, Applied Biochemistry and Biotechnology, 20-1, 245-258.
- Kalendar, R., Lee, D. ve Schulman, A., H., 2009. FastPCR software for pcr primer and probe design and repeat search, Genes, Genomes and Genomics, 3, 1-14.
- Kampa, M., Alexaki, V., I., Notas, G., Nifli, A., P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A. ve Castanas, E., 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on t47d human breast cancer cells: potential mechanisms of action, Breast Cancer Research, 6, 2, 63-74.
- Khanna, S. ve Srivastava, A., K., 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, Process Biochemistry, 40, 2, 607-619.
- Kroon, P., A., Faulds, C., B., Ryden, P., Robertson, J., A. ve Williamson, G., 1997. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3, 661-667.
- Kroon, P., A., Garcia-Conesa, M., T., Fillingham, I., J., Hazlewood, G., P. ve Williamson, G., 1999. Release of ferulic acid dehydromers from plant cell walls by feruloyl esterases, Journal of the Science of Food and Agriculture, 79, 3, 428-434.
- Kroon, P., A. ve Williamson, G., 1996. Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*, Biotechnology and Applied Biochemistry, 23, 263-267.
- Kumar, C., G., Kamle, A. ve Kamal, A., 2013. Purification and biochemical characterization of feruloyl esterases from *Aspergillus terreus* MTCC 11096, Biotechnology Progress, 29, 4, 924-932.

- Lai, K., Vu, C., Valladares, R., B., Potts, A., H. ve Gonzalez, C., F., 2012. Identification and characterization of feruloyl esterases produced by probiotic bacteria. Protein Purification, 151-166.
- Lai, K., K., Lorca, G., L. ve Gonzalez, C., F., 2009. Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a *Lactobacillus johnsonii* strain isolated from stool samples of diabetes-resistant rats, Applied and Environmental Microbiology, 75, 15, 5018-5024.
- Lai, K., K., Stogios, P., J., Vu, C., Xu, X., Cui, H., Molloy, S., Savchenko, A., Yakunin, A. ve Gonzalez, C., F., 2011. An inserted alpha/beta subdomain shapes the catalytic pocket of *Lactobacillus johnsonii* cinnamoyl esterase, Plos One, 6, 8.
- Lee, S., Y., 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49, 1, 1-14.
- Lee, S., Y., 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria, Trends in Biotechnology, 14, 11, 431-438.
- Lenz, R., W., 2007. Bacterial polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Polymers And Biotechnology, Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 234.
- Lenz R., W. ve Merchessault R., H., 2005. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology, Biomacromolecules, 6, 1-8.
- Lesca, P., 1983. Protective effects of ellagic acid and other plant phenols on benzo[a]pyrene-induced neoplasia in mice, Carcinogenesis, 4, 12, 1651-1653.
- Levasseur, A., Benoit, I., Asther, M., Asther, M. ve Record, E., 2004. Homologous Expression of the feruloyl esterase b gene from *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme, Protein Expression and Purification, 37, 1, 126-133.
- Li, G., L., Wang, J., J., Wang, J., Z., Liu, Y., Y. ve Jin, Y., 2003. Effect of ferulic acid on the proliferation of nerve cells of retinas in vitro, zhonghua yan ke za Zhi, 39, 650-654.
- Lin, F., H., Lin, J., Y., Gupta, R., D., Tournas, J., A., Burch, J., A., Selim, M., A., Monteiro-Riviere, N., A., Grichnik, J., M., Zielinski, J. ve Pinnell, S., R., 2005. Ferulic acid stabilizes a solution of vitamins c and e and doubles its photoprotection of skin, Journal of Investigative Dermatology, 125, 4, 826-832.
- Linton, E., Rahman, A., Viamajala, S., Sims, R., C. ve Miller, C., D., 2012. Polyhydroxyalkanoate quantification in organic wastes and pure cultures using a single-step extraction and H-1 NMR analysis, Water Science and Technology, 66, 5, 1000-1006.

- Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K., P. ve Becher, B., 2001. Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate, Biomaterials, 22, 18, 2447-2452.
- Mackenzie, C., R. e Bilous, D., 1988. Ferulic acid esterase-activity from *Schizophyllum commune*, Applied and Environmental Microbiology, 54, 5, 1170-1173.
- Madison, L., L. ve Huisman, G., W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from dna to plastic, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63, 1-21.
- Marguet, E. ve Forterre, P., 1994. DNA Stability at temperature typical for hyperthermophiles, Nucleic Acid Research, 22, 1681-1686.
- Mathew, S. ve Abraham, T., E., 2006. Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid, Critical Reviews in Microbiology, 32, 3, 115-125.
- McCool, G., J., Fernandez, T., Li, N. ve Cannon, M., C., 1996. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, FEMS Microbiology Letters, 138, 1, 41-48.
- Mccrae, S., I., Leith, K., M., Gordon, A., H. ve Wood, T., M., 1994. Xylan-degrading enzyme-system produced by the fungus *Aspergillus awamori*- isolation and characterization of a feruloyl esterase and a p-coumaroyl esterase, Enzyme and Microbial Technology, 16, 10, 826-834.
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y., M., Buso, N., Cowley, A., P. ve Lopez, R., 2013. Analysis tool web services from the EMBL-EBI, Nucleic acids research, 41, 597-600.
- Miquel, P., 1888. Monographie d'un Bacille Vvant Au-Dela de 70°C, Ann Micrographic, 1, 1-3.
- Mukherjee, G., Singh, R., K., Mitra, A.ve Sen, S., K., 2007. Ferulic acid esterase production by *Streptomyces* sp., Bioresource Technology, 98, 1, 211-213.
- Nazina, T., N., Tourova, T., P., Poltarau, A., B., Novikova, E., V., Grigoryan, A., A., Ivanova, A., E., Lysenko, A., M., Petrunyaka, V., V., Osipov, G., A., Belyaev, S., S. ve Ivanov, M., V., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic Bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp nov and *Geobacillus uzensis* sp nov from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G-stearothermophilus*, *G-thermocatenulatus*, *G-thermoleovorans*, *G-kaustophilus*, *G-thermoglucosidasius* and *G-thermodenitrificans*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 433-446.

- Nickerson, K., W., Zarnick, W., J. ve Kramer, V., C., 1981. Poly-beta-hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, FEMS Microbiology Letters, 12, 4, 327-331.
- Nietera, A., Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M. ve Berger, R., G., 2014. A halotolerant type a feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*, Fungal Biology, 118, 3, 348-357.
- Oosterveld, A., Beldman, G. ve Voragen, A., G., J., 2000. Oxidative cross-Linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp, Carbohydrate Research, 328, 2, 199-207.
- Ou, S., Y. ve Kwok, K., C., 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods, Journal of the Science of Food and Agriculture, 84, 11, 1261-1269.
- Panagiotou, G., Granouillet, P. ve Olsson, L., 2006. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation, Applied Microbiology and Biotechnology, 72, 6, 1117-1124.
- Poirier, Y., 2002. Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, Progress in Lipid Research, 41, 2, 131-155.
- Querol, E., PerezPons, J., A. ve MozoVillarias, A., 1996. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability, Protein Engineering, 9, 3, 265-271.
- Rahman, A., Linton, E., Hatch, A., D., Sims, R., C. ve Miller, C., D., 2013. secretion of polyhydroxybutyrate in *Escherichia coli* using a synthetic biological engineering approach, Journal of Biological Engineering, 7, 1.
- Rainey, F., A., Fritze, D. ve Stackebrandt, E., 1994. The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16s rDNA Analysis, Fems Microbiology Letters, 115, 2-3, 205-211.
- Rakotoarivonina, H., Hermant, B., Chabbert, B., Touzel, J., P. ve Remond, C., 2011. A thermostable feruloyl-esterase from the hemicellulolytic bacterium *Thermobacillus xylanilyticus* releases phenolic acids from non-pretreated plant cell walls, Applied Microbiology and Biotechnology, 90, 2, 541-552.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J., H. ve Hatfield, R., D., 1994. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls, Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, 23, 3485-3498.
- Record, E., Asther, M., Sigoillot, C., Pages, S., Punt, P., J., Delattre, M., Haon, M., van den Hondel, C., A., M., J., J., Sigoillot, J., C., Lesage-Meessen, L. ve Asther, M., 2003. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application, Applied Microbiology and Biotechnology, 62, 4, 349-355.

- Reddy, C., S., K., Ghai, R., Rashmi ve Kalia, V., C., 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview, Bioresource Technology, 87, 2, 137-146.
- Rinia, H., A., Boots, J., W., P., Rijkers, D., T., S., Kik, R., A., Snel, M., M., E., Demel, R., A., Killian, J., A., van der Eerden, J., P., J., M. ve de Kruijff, B., 2002. Domain formation in phosphatidylcholine bilayers containing transmembrane peptides: specific effects of flanking residues, Biochemistry, 41, 8, 2814-2824.
- Rumbold, K., Biely, P., Mastihubova, M., Gudelj, M., Gubitz, G., Robra, K., H. ve Prior, B., A., 2003. Purification and properties of a feruloyl esterase involved in lignocellulose degradation by *Aureobasidium pullulans*, Applied and Environmental Microbiology, 69, 9, 5622-5626.
- Sang, S., L., Li, G., Hu, X., P. ve Liu, Y., H., 2011. Molecular cloning, overexpression and characterization of a novel feruloyl esterase from a soil metagenomic library, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 20, 4, 196-203.
- Sebba, F., 1985. An improved generator for micron-sized bubbles, Chemistry & Industry, 3, 91-92.
- Senes, A., Gerstein, M. ve Engelman, D., M., 2000. Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: The Gxxxg motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions, Journal of Molecular Biology, 296, 3, 921-936.
- Steinbuchel, A. ve Valentin, H., E., 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, Fems Microbiology Letters, 128, 3, 219-228.
- Spiekermann, P., Rehm, B., H., A., Kalscheuer, R., Baumeister, D., ve Steinbüchel, A., 1999. A sensitive, viable- colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds, Archives of Microbiology, 171, 73-80.
- Stothard, P., 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences, Biotechniques, 28, 1102-1104.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., ve Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, Molecular Biology and Evolution, 30, 2725-2729.
- Tenkanen, M., Schuseil, J., Puls, J. ve Poutanen, K., 1991. Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic-acids from lignocellulosics, Journal of Biotechnology, 18, 1-2, 69-84.
- Thibault, J., F., Asther, M., Ceccaldi, B., C., Couteau, D., Delattre, M., Duarte, J., C., Faulds, C., Heldt-Hansen, H., P., Kroon, P., Lesage-Meessen, L., Micard, V., Renard, C., M., G., C., Tuohy, M., Van Hulle, S. ve Williamson, G., 1998. Fungal bioconversion of agricultural by-products to vanillin, Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 31, 6, 530-536.

- Topakas, E., Stamatis, H., Mastihobova, M., Biely, P., Kekos, D., Macris, B., J. ve Christakopoulos, P., 2003. Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters, Enzyme and Microbial Technology, 33, 5, 729-737.
- Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P. ve Christakopoulos, P., 2004. Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*, Applied Microbiology and Biotechnology, 63, 6, 686-690.
- Topakas, E., Vafiadi, C., Stamatis, H. ve Christakopoulos, P., 2005. *Sporotrichum thermophile* Type C feruloyl esterase (Stfaec): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis, Enzyme and Microbial Technology, 36, 5-6, 729-736.
- Trent, D., J., 2000. Extremophiles in astrobiology: per ardua ad astra, Gravitational and Space Biology Bulletin, 13, 2, 5-11.
- Tribe, L., A., Briens, C., L. ve Margaritis, A., 1995. Determination of the volumetric mass-transfer coefficient (k_la) using the dynamic gas out-gas in method - analysis of errors caused by dissolved-oxygen probes, Biotechnology and Bioengineering, 46, 4, 388-392.
- Uraji, M., Arima, J., Inoue, Y., Harazono, K. ve Hatanaka, T., 2014. Application of two newly identified and characterized feruloyl esterases from *Streptomyces* sp in the enzymatic production of ferulic acid from agricultural biomass, Plos One, 9, 8.
- URL-1, www.originlab.com. 1 Ekim 2007.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Suckling, I., D. ve Christakopoulos, P., 2005. Mapping the hydrolytic and synthetic selectivity of a type C feruloyl esterase (Stfaec) from *Sporotrichum thermophile* using alkyl ferulates, Tetrahedron-Asymmetry, 16, 2, 373-379.
- Valentin, H., E. ve Dennis, D., 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose, Journal of Biotechnology, 58, 1, 33-38.
- Valentin, H., E., Lee, E., Y., Choi, C., Y. ve Steinbuchel, A., 1994. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, Applied Microbiology and Biotechnology, 40, 5, 710-716.
- Wang, J., G. ve Bakken, L., R., 1998. Screening of soil bacteria for poly-beta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation, Microbial Ecology, 35, 1, 94-101.
- Wang, X., K., Geng, X., Egashira, Y. ve Sanada, H., 2004. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the intestinal bacterium *Lactobacillus acidophilus*, Applied and Environmental Microbiology, 70, 4, 2367-2372.

- Weber, J. ve Agblevor, F., A., 2005. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production, Process Biochemistry, 40, 2, 669-676.
- Williamson, G., Kroon, P., A. ve Faulds, C., B., 1998. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases, Microbiology-Sgm, 144, 2011-2023.
- Williamson, G. ve Vallejo, J., 1997. Chemical and thermal stability of ferulic acid esterase-III from *Aspergillus niger*, International Journal of Biological Macromolecules, 21, 1-2, 163-167.
- Wong, D., W., S., 2006. Feruloyl esterase a key enzyme in biomass degradation, Applied Biochemistry and Biotechnology, 133, 87-112.
- Wu, Q., Sun, S., Q., Yu, P., H., F., Chan, A., X., Z. ve Chen, G., Q., 2000. Environmental dependence of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates, Acta Polymerica Sinica, 6, 751-756.
- Xie, W., P. ve Chen, G., Q., 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *PhapcJ*, Biochemical Engineering Journal, 38, 3, 384-389.
- Yılmaz, M., B., Y., 2003. Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB), Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi 01, 1-33.
- Zeigler, D., R., 2014. The *Geobacillus* Paradox: Why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?, Microbiology, 160, 1-11.
- Zhang, W., Li, Z., H. ve Agblevor, F., A., 2005. Microbubble fermentation of recombinant *Pichia pastoris* for human serum albumin production, Process Biochemistry, 40, 6, 2073-2078.
- Zhao, B., Agblevor, F., A. ve Jelesko, J., G., 2014. Enhanced production of hairy root metabolites using microbubble generator, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 117, 2, 157-165.
- Zinn, M., Witholt, B. ve Egli, T., 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, Advanced Drug Delivery Reviews, 53, 1, 5-21.

8. EKLER

Ek-1. *G. thermoglucosidasius* DSM 2542^T'nin ferulik asit esteraz geninin açık okuma çerçevesi

GTGCAAAAAGCGATAACATTGACTCATCGGGGCATGACGCTGCGCGGGATGGAGCATATCC
CGGAAAAATCGCTTGATGAAAAGGTCCCTGCGGTTATTTTGTTCACGGATTTACCGGCAC
GAAGCTGGAGCCGCATCGCTTGTTTTTAAAAATATCGCGCGCGCTTGAGAAGCAAGGAATT
GCCAGCTTCCGCTTTGACTTTTTAGGCAGCGGGGAAAGCGACGGCGATTTTGAAGAGATGA
CCGTGTCTAAAGAAATAGAGGAAGCGCATGCGATTGTCGACTTTGTCAAACGCGATGGGCG
CATTGATCCATCGCACATTTACTTGCTCGGTCTCAGCATGGGCGGGCTTGTTGCCAGCGTC
GTTGCTGGCGAAAGACCGAATGATGTCGCGAAATTAATTCTTATGGCGCCGGCGGGAAATA
TGTACGAGTTGATTACGGAGACGATTCGGCAAGAAAATATCGATGTGACTGCTCCTTATTT
TGACCATGGGGGCAACTTAGTCGGACGCTCGTTTTTGGAAAGATTTACAAACGATCAACGTA
TTTGAACGGGCTAAGCCGTACGACGGCCCTGTGCTGCTGATTCATGGAACGGAGGATGATG
TTGTGCCGCATCGCGTCAGCCATCTGTATGAGCAATTATGCTATGGCAGCCGCGCTACCGT
CCATTTGATTGAAGGAGCCAACCATACGTTTTGACGGACATCGCTGGGAAACGGAAGTCATT
AAGACGATTCTCGGGTTTGTTCCTAA

759 nt

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Sinop'ta doğdu. İlköğrenimini Trabzon 24 Şubat İlkokulu'nda, Orta ve Lise öğrenimini Trabzon Kanuni Anadolu Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2003-2004 öğretim yılında K.T.Ü Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, Lisans öğrenimine başladı. 2007 yılında bu bölümden üçüncülük ile mezun oldu ve aynı yıl, K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ danışmanlığında 2010 yılında “*Anoxybacillus sp.* PDF1 lipaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve karakterizasyonu” adlı tezi ile yüksek lisans eğitimini tamamlayarak aynı yıl K.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsünde Doktora programına başladı. 2013'te TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu kazanarak 6 ay, Utah Science Technology and Research (USTAR) ve Utah State Üniversitesi'nde araştırmacı olarak çalıştı. 2009-2010 yılları arasında K.T.Ü Fen-Edebiyat Fakültesi, 2010-2016 yılları arasında da K.T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.

Uluslararası Yayınlar (SCI&SCI Exp)

1. Ay, F., Karaoglu, H., Inan, K., Canakci, S., ve Belduz, A. O., 2011. Cloning, Purification and Characterization of a Thermostable carboxylesterase from *Anoxybacillus sp.* PDF1, Protein Expression and Purification, 80:74–79.
2. Canakci, S., Cevher, Z., Inan, K., Tokgoz, M., Bahar, F., Kacagan, M., Sal F., ve Belduz, A. O., 2012. Cloning, Purification and Characterization of an Alkali-Stable Endoxylanase from Thermophilic *Geobacillus sp.* 71, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28-5:1981.
3. Karaoglu H., Yanmis D., Ay Sal F., Celik A., Çanakci S., ve Belduz A. O., 2013. Biochemical characterization of a novel glucose isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T that displays a high level of activity and thermal stability, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 7-215:224.
4. Yanmis D., Karaoglu H., ÇOLAK D.N, Ay Sal F., Çanakci S., ve Belduz A. O., 2014. Characterization of a Novel Xylose Isomerase from *Anoxybacillus gonensis* G2^T, Turkish Journal of Biology, 38:586-592.
5. Rahman A., Putman R. J., Inan K., Ay Sal F., Sathish A., Smith T., Nielsen C., Sims R. C., ve Miller C. D., 2015. Polyhydroxybutyrate production using a wastewater microalgae based media, Algal Research, 8:95–98.