

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ahmet Sait YILMAZ

**SELÜLAZ AKTİVİTESİ GÖSTEREN *Clostridium sp.* SUŞLARININ
İZOLASYONU ENZİM KARAKTERİZASYONU VE BU SUŞLARDAN
ÜRETİLEN SELÜLAZIN PİLOT BİYOGAZ SİSTEMİNDE
KULLANILMASI**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA - 2020

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SELÜLAZ AKTİVİTESİ GÖSTEREN *Clostridium sp.* SUŞLARININ
İZOLASYONU ENZİM KARAKTERİZASYONU VE BU SUŞLARDAN
ÜRETİLEN SELÜLAZIN PİLOT BİYOGAZ SİSTEMİNDE
KULLANILMASI**

Ahmet Sait YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 27/01/2020 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Fatih MATYAR
ÜYE

.....
Doç. Dr. Nebil YÜCEL
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

**Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma, Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FYL-2018-10538**

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SELÜLAZ AKTİVİTESİ GÖSTEREN *Clostridium Sp.* SUŞLARININ
İZOLASYONU ENZİM KARAKTERİZASYONU VE BU SUŞLARDAN
ÜRETİLEN SELÜLAZIN PİLOT BİYOGAZ SİSTEMİNDE
KULLANILMASI

Ahmet Sait YILMAZ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
Yıl: 2020, Sayfa: 51
Jüri : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
: Prof. Dr. Fatih MATYAR
: Doç.Dr. Nebil YÜCEL

Bu çalışmada Osmaniye ili katı atık düzenli depolama sahasından alınan numunelerden izole edilen 3 adet selülaaz pozitif anaerobik bakteri *Clostridium sp.* olarak tanımlanmıştır. Bu bakterilerden en yüksek selülaaz aktivitesi olan 4 nolu suş kullanılarak enzim üretilmiş ve üretilen enzimin karakterizasyonu yapılmıştır. Enzimin en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık 60 °C ve en iyi aktivite gösterdiği pH 8.0 olarak belirlenmiştir. Enzim optimum şartlarda %1 CMC substrat çözeltisinde 12 saat süre sonunda 6.95 mg/mL indirgen şeker açığa çıkarmıştır. İzole edilen selülaaz kullanılarak gerçekleştirilen biyogaz üretiminde 37 °C 12 günde toplamda 5110 mL biyogaz üretilirken, enzim eklenmeyen kontrol grubunda 4890 mL gaz üretilmiştir. 55 °C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12 günde toplamda enzim bulunan deney grubunda 7050 mL, enzim bulunmayan kontrol grubunda ise 5640 mL biyogaz üretimi gerçekleşmiştir. Üretilen enzimin termofil olarak belirlenmiş ve kontrol grubuna göre%20 artışı sağlamıştır.

Bu çalışmada, Osmaniye çöp sahasından alkali termofil *Clostridium sp.* bakterileri izole edilmiş ve bu bakterilerden selülaaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Enzim alkali termofil olarak karakterize edilmiştir. Bu enzim biyogaz sistemlerinde başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Anahtar kelimeler: Selülaaz, *Clostridium sp.*, Biyogaz, Enzim aktivitesi

ABSTRACT

MSc THESIS

<p>THE ISOLATION OF CELLULASE ACTIVE <i>Clostridium Sp.</i> BACTERIA CHARACTERIZATION OF ENZYME AND THE USE OF CELLULASE PRODUCED FROM THESE BACTERIA IN THE PILOT BIOGAS SYSTEM</p>

Ahmet Sait YILMAZ

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY**

Supervisor : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
Year: 2020, Page: 51
Jury : Prof. Dr. Osman GÜLNAZ
: Prof. Dr. Fatih MATYAR
: Assoc. Prof. Dr. Nebil YÜCEL

In this study, three cellulase positive *Clostridium sp.* were isolated and identified from the Osmaniye landfill biogas system. The highest cellulase activity was obtained from the clostridium sp 4 and these bacteria was used for enzyme production and assay studies. The enzyme was characterised as alkaline thermophile cellulase and optimum operating temperature and an optimum operating pH range was determined as 60 °C and pH 8.0 respectively. The 1% CMC was used as a substrate and 6.95 mg / mL reducing sugar realised after 12 hours enzyme treatment. The use of enzyme in biogas production pilot sytem were shows that 12 days biogas production capacity increaed from 4890 to 5110 mL. However the enzyme activity was increased with increasing of the temperature from 37 to 55 °C. The biogas capacity were determined as 5640 mL and 7050 mL for enzyme free control group and enzyme applied group respectively. Enzyme is defined as thermophile and 20% biogas increased agains the control grup.

In this study, the alkaline thermophile *Clostridium sp.* bacteria were isolated from the landfill of Osmaniye and these bacteria was used for cellulase production, enzyme was charaterised as alkaline thermophile cellulase. This enzyme can be used in thermophile biogas systems as succesfully.

Key words: Cellulase, *Clostridium sp.*, biogas, enzyme activity

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Lignoselülozik materyallerin anaerobik sistemlerde çürütülerek biyogaza dönüştürülmesinde maliyeti düşürmek ve verimliliği arttırmak için yapılan birçok uygulama bulunmaktadır. Biyolojik ön işlemler genellikle işletme maliyetlerini düşürmek için tercih edilmektedir (Sindhu ve ark., 2016).

Bu çalışmada çöp sahasından toplamda 8 adet bakteri izole edilmiş ve bu bakterilerin selüloz aktivitesi olanlarının 3 tanesi BD anaerob bakteri tanımlama test kiti kullanılarak *Clostridium sp.* olarak tanımlanmıştır. Sıvı besiyerinde enzim üretimi anaerob selüloz besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde 5 g/L CMC kullanılarak selüloz üretilmiştir. Anaerobik şartlarda hazırlanan ve steril edilen besiyeri 55°C sıcaklıkta ağzı kapalı cam şişelerde 7 gün inkübe edilmiştir. inkübasyon sırasında kültür ortamı hergün elle çalkalanarak çökelek oluşturan bakterilerin besiyerine dağılması sağlanmıştır. 7. gün sonunda enzim izolasyonu için besiyeri santrifüj edilip süpernatant soğuk alkol ile presipitasyon yapılarak enzim izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Santrifüj ile toplanarak alınan enzim sodyum fosfat tamponunda pH 7'de diyaliz etmek için çözülmüştür. Enzim +4°C derecede 24 saat pH 7 sodyum fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrasında enzim çalışmalarda kullanmak üzere +4°C'de saklanmıştır.

İzole edilen enzimin selüloz aktivitesi %1 CMC çözeltisinden alınan 0.5 mL örnek üzerine eklenen 0.5 mL enzim çözeltisi 55°C sıcaklıkta pH 7'de bir saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda yapılan DNS analizi ile çözeltinin rengi kiremit kırmızısına dönüşmüş ve çözeltideki CMC'nin parçalandığı belirlenmiştir.

Çalışmada enzim izolasyonunda kullanılan bakterinin üreme sıcaklığı 55°C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Sıcaklığın ve pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi pH 3.0-10.0 ile 30-80°C sıcaklıklar arasında çalışılmıştır. İzole edilen enzim 60°C sıcaklıkta maksimum aktivite göstermiş ve termofilik özelliktedir. 60°C sıcaklık ve pH 8.0'de enzim aktivitesinin çalışılan diğer pH değerlerine göre çok yüksek olması, enzimin alkali ve termofilik özellikte olduğunu göstermiştir. Zamana bağlı

olarak yapılan çalışmalarda enzimin substrat parçalama üzerindeki etkisi zamanla artmış ve 10. saatten sonra açığa çıkan indirgen şeker oranı sabit kalmıştır. Bunun sebebi enzimin zamanla bozulmasından, ortamda oluşan son ürünlerin enzimi inhibe etmesi veya substrat ile son ürünün ortamdaki çözünürlüğü gibi etkenlerden ileri gelebileceği söylenebilir.

Bu çalışmadaki temel amaçlardan biri olan anaerobik enzimlerin biyogaz sistemlerinde uygunabilirliği olup laboratuvarında batch anaerobik sistemlerde enzimin biyogaz verimi üzerine etkisi 37°C ve 55°C sıcaklıklarda belirlenmiştir. 37 °C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12 günde enzim bulunmayan kontrol grubunda 4890 mL gaz üretilirken, enzim eklenen deney grubuna 5110 mL toplam biyogaz üretimi gerçekleşmiştir. Enzimin 37°C sıcaklıkta biyogaz verimi üzerine etkisi % 4.3 olarak belirlenmiştir. Ancak 55°C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12 günde enzim bulunmayan kontrol grubunda 5640 mL, enzim bulunan deney grubunda 7050 mL toplam biyogaz üretimi sağlanmıştır. Enzim bulunan sistemde enzim bulunmayan sisteme göre 1410 mL fazla biyogaz üretilmiş olup, enzim eklenmesinin 55°C sıcaklıkta biyogaz verimliliğini %20 arttırdığı görülmüştür.

Enzim uygulaması ile %20 daha fazla gaz üretimi sağlanmış olması; sistemde kullanılacak olan substrat miktarının azaltılması, sistemin dizaynı sırasında daha küçük hacimlerde, alıkonma sürelerinin daha kısa tutulması gibi biyogaz sistemlerinin tasarlanmasında oldukça etkili olacağı görülmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda; alkali termofil enzim dışında, diğer mikroorganizmalardan üretilen selülazların, biyogaz sistemlerinde incelenmesi oldukça önemli olacaktır. Biyogaz sistemlerinde verimlilik oldukça önemli olup, verimliliği artırıcı sürdürülebilir biyoteknolojik uygulamalar üzerinde çalışmalar yapılmasına dikkat çekilmelidir.

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her aşamasında zaman ve mekan gözetmeksizin büyük bir özveriyle destek veren, tez danışmanı hocam sayın Prof. Dr. Osman GÜLNAZ'a, Hayatımın her aşamasında yanımda olan babam; Haluk YILMAZ ve annem; Ülkü YILMAZ'a,

Benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen İbrahim YILMAZ ve İslam YILMAZ'a,

Laboratuvar çalıőmalarımda bana yardımcı olan; Deniz ÜNAL, Mehmet KAYA ve Metin AKYÜZ'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
1.1. Lignoselülozik Biyokütle.....	2
1.1.1. Selüloz	3
1.1.2. Hemiselüloz.....	4
1.1.3. Ksilan.....	4
1.1.4. Lignin	5
1.2. Lignoselülozik Biyokütlenin Biyolojik Parçalanması	5
1.2.1. Enzimler	5
1.2.2. Selülaz	6
1.2.3. Selülozom.....	7
1.3. Selülaz Endüstriyel Uygulamaları	8
1.4. Anaerobik Parçalama ve Biyogaz.....	9
1.5. <i>Clostridium</i> Cinsi	10
1.6. Çalışmanın Amacı.....	10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
3. MATERYAL ve METOD	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Çöp Numunesi	15
3.1.2. RCM Agar (Reinforced <i>Clostridial</i> Medium)	15
3.1.3. Brewer Anaerobik Agar.....	16

3.1.4 Anaerob Selüloz Besiyeri	17
3.1.5. Biyogaz Aktivitesi Sentetik Selüloz Besi Ortamı	18
3.1.6. NaCl Çözeltisi (1 M).....	18
3.1.7. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0).....	18
3.1.8. Kongo Kırmızısı (%0.1)	19
3.1.9. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)	19
3.1.10. Sitrat Tamponu	19
3.1.11. Sodyum-Fosfat Tamponu	19
3.1.12. Glisin-NaOH Tamponu.....	20
3.2. Metod	20
3.2.1. Anaerob Bakterilerin İzolasyonu	20
3.2.2. Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi	21
3.2.3. Selülaz İzolasyonu	21
3.2.4. DNS ile Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi	23
3.2.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	23
3.2.7. Zamana Bağlı Enzimin Aktivitesi.....	24
3.2.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonun Etkisi	24
3.2.9. Enzimin Biyogaz Verimliliği Üzerine Etkisi.....	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Bakteri İzolasyon Sonuçları.....	27
4.2. Enzim İzolasyonu ve Enzim Aktivite Sonuçları	29
4.3. Sıcaklık ve pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	32
4.4. Zamana ve Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Enzim Aktivitesi	34
4.5. Biyogaz Sistemine Enzim Uygulaması	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Sitrat Tampon Çözeltisinin Hazırlanması.....	19
Çizelge 3.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması.....	20
Çizelge 3.3. Glisin Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması.....	20
Çizelge 3.4. Glikoz Standart Eğirisi.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Selülozun Genel Yapısı (Haworth, 1929).....	4
Şekil 1.2. Selülozun Enzimatik Hidrolizi (Beguin ve Aubert, 1994).....	7
Şekil 3.1. 37°C Sıcaklıkta Enzim Uygulaması Yapılan Anaerob Sistem	25
Şekil 3.2. 55°C Sıcaklıkta Enzim Uygulaması Yapılan Anaerob Sistem.....	26
Şekil 4.1. 4 Nolu Suşun Gram Boyaması.....	28
Şekil 4.2. 4 Nolu İzolatın Stok Kültürü	28
Şekil 4.3. 4 Nolu Bakterinin Katı Besiyerinde Selülaz Aktivitesi	30
Şekil 4.4. Selülaz Aktivitesi.....	31
Şekil 4.5. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	33
Şekil 4.6. pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	34
Şekil 4.7. Zamana Bağlı Enzim Aktivitesi.....	35
Şekil 4.8. Kosantrasyona Bağlı Enzim Aktivitesi.....	36
Şekil 4.9. Enzim Uygulamasının Farklı Sıcaklıklarda Biyogaz Üretimine Etkisi ..	37

1. GİRİŞ

Ekonomik ve çevreci bir yaklaşımla yenilenebilir hammaddelerin sanayide kullanılması, bu hammaddelerin devamlılığının sağlanması, proseslerin sürdürülebilir olması, gelişen dünyada oldukça önemli konulardan biridir. Sanayide ve endüstride değişen dünya şartları açısından verimliliğin artırılması, ekonomik açıdan oldukça önemlidir. Enerjiye duyulan ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Enerjiye duyulan ihtiyacın önemli bir kısmı günümüzde fosil yakıtlardan elde edilmektedir. Fosil yakıtların kullanılmasının çevresel etkileri düşünüldüğünde, sera gazı emisyonları, küresel ısınma, iklim değişikliği, deniz seviyelerinin yükselmesi, biyolojik çeşitliliğin yok olması ve hava kirliliğine neden olmaktadır (Azmah ve ark., 2016).

Modern biyoteknolojik çalışmalar endüstriyel enzim üretiminde hızlı ve ekonomik çözümler ortaya koymaktadır. Yenilenebilir enerji sistemleri; gıda, tarım, ekonomi ve çevre konularıyla da yakından ilişkilidir. Enzim teknolojilerindeki hızlı gelişmeler, kullanılan kimyasal işleme teknikleri hem biyolojik olması hem de ekonomik olması gibi nedenlerle yerini enzimatik işlemlere bırakmıştır (Waldron ve ark., 2010).

Dünyamızdaki karbon döngüsü, mikroorganizmaların varlığının bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve karbon döngüsündeki mikrobiyal selüloz kullanımı, anaerobik parçalama, bitki atıklarının çürümesi ve kompost üretimi gibi yaygın olarak kullanılan proseslerin ayrılmaz bir bileşenidir (Waldron ve ark., 2010).

Selülozik malzemeler, düşük maliyetli ve doğada bol bulunması nedeniyle oldukça önemlidir. Selüloz, özellikle biyoyakıt kullanımında önemli hammadde kaynağıdır (Lynd ve ark., 2002).

Dünyada selülozik hammaddelerin toplam miktarının 7×10^{11} ton olduğu tahmin edilmektedir. Selülozun kristal yapısı suda çözünmez, kimyasal işlenmiş formları; hidrofilik olup tatsız, kokusuz bir maddedir (Coughlan, 1985).

Bitki biyokütlesi, organik yakıtların, kimyasalların ve malzemelerin en önemli sürdürülebilir kaynağıdır. Bitki hücre duvarının yapısı, temel olarak hemiselüloz ve lignin ile bağlantılı selüloz liflerinden oluşan lignoselülozik malzemeden oluşur (Deobald ve ark., 1997).

Payen ilk olarak, Dünya'daki en yaygın organik bileşik olan bu bitki bileşeni için selüloz terimini kullanmıştır (Payen, 1938). Selüloz, β -1,4 bağlı, 2000 ila 25,000 arasında değişen D-glukoz birimlerinin doğrusal polimeridir. Selüloz zincirleri sert, çözünmez, kristalin mikrofibrillerin oluşumunu sağlayan çok sayıda moleküller arası hidrojen bağı bulundurur. Doğal selüloz bileşikleri yapısal olarak heterojendir ve hem amorf hem de yüksek derecede düzenlenmiş kristal bölgelere sahiptir. Kristallik derecesi selülozun kaynağına bağlıdır ve özellikle selülozun kristal bölgeleri enzimatik parçalamaya karşı oldukça dirençlidir (Kuhad ve ark., 1997).

Enzimler, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği'nin (IUBMB) esaslarına göre substrat özelliklerine göre belirlenir. Lignoselülozik biyokütlenin parçalanmasında kullanılan selüloolitik enzimlerin üretimi oldukça önem arz etmektedir (Henrissat, 1991).

Genel olarak, mikroorganizmalar tarafından selülozun parçalanması ile ilgili iki yol bulunur. İlkinde, organizma, bitki hücre duvarını parçalamak için sinerjik olarak çalışan bir dizi serbest enzim üretir. İkincisinde, parçalama enzimleri, enzimatik kompleksler halinde bağlanarak substrata etki etmeye başlarlar. Aerobik bakteriler ve mantarlar, selüloza zayıf bir şekilde etki ederler. Anaerobik bakteriler polisakarit yapısına bağlanan 'selülozom' adı verilen, enzimatik kompleksleri, selülozu daha etkili bir şekilde parçalamak için üretmektedir (Lynd ve ark., 2002).

1.1. Lignoselülozik Biyokütle

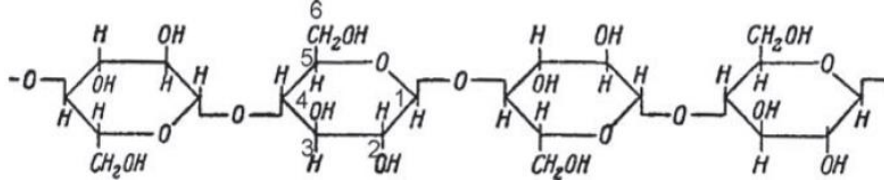
Lignoselülozik biyokütle, sanayinin birçok alanında kullanılan yenilenebilir hammadde kaynaklarından en önemlilerinden birisidir. Zirai ürünler

ve orman atıkları, lignoselülozik biyokütlenin ana kaynağını oluşturmakla birlikte, atık kağıtlar ve selüloz gibi geri dönüşüm ürünleri de önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Lignoselülozik ürünler biyoyakıt üretiminde kullanılan sürdürülebilir ve yenilenebilir enerji kaynakları arasında yer almaktadır. Genel olarak lignoselülozik ürünler; %35–%50 selüloz, %20–%35 hemiselüloz ve %12–%20 ligninden oluşmaktadır. Bunun yanı sıra az miktar olsa da; nişasta, pektin, proteinler, mineraller bitki bileşenlerinin ana yapısını oluşturmaktadır (Gomez ve ark., 2002).

Lignoselülozik materyaller, genel kompleks yapılarından dolayı fiziksel, kimyasal ve enzimatik hidrolize karşı dayanıklı polimerik yapılardır. Bu durum, mikrobiyal proseslerde lignoselülozik materyallerin biyogaz, biyoetanol üretiminde kullanılması konusunda olumsuz etkiler yaratmaktadır. Bu nedenle, lignoselülozik materyallerin fermentasyon teknolojisinde kullanılmasını uygun hale getirmek için ısı, kimyasal ve biyolojik işlemler gibi uygulamalar bulunmaktadır (Knauf ve ark., 2004).

1.1.1. Selüloz

Selüloz, lignoselülozik materyallerin yapısında en fazla bulunan organik moleküldür. Bitki ve alglerin hücre duvarlarının yapısında bulunmakla birlikte, bakteriler tarafından da üretilmektedir (Lynd ve ark., 2002). Selülozun ana yapısı birbirine β -1,4 glikozidik bağlarla bağlı D-glikozdan oluşmaktadır. Şekil 1.1’de selüloz molekülünün genel yapısı görülmektedir. Selülozun iki formu bulunmaktadır. Kristalin selüloz; selülozun ana bölümünü oluştururken diğer kısmında, amorf formunda bulunmaktadır (Lynd ve ark., 2002). Selüloz zincirleri, bitki hücre duvarlarına, mikro-iplikçikler ile bağlanmaktadır. Selüloz mikro-iplikçikleri, yüksek kristalli bölgelere ve daha düşük amorf bölgelere sahiptir (Himmel ve ark., 1999).



Şekil 1.1. Selülozun Genel Yapısı (Haworth, 1929)

1.1.2. Hemiselüloz

Hemiselüloz lignoselülozik materyalin yapısında ikinci en çok bulunan organik moleküldür. Yapısal olarak amorf zincirlerinden oluşan bir polimerdir. Yapısında α -D-galaktoz, β -D-glukoz, β -D-mannoz, β -D-ksiloz ve α -L-arabinoz bulunmaktadır. Bunun yanı sıra az miktarda asetik asit ve üronik asit (α -D-glukuronik asit ve α -4-O-metil-D-glukuronik asit), ksilanlar (β -1,4-bağlı D-ksiloz üniteleri), mannanlar (β -1,4-bağlı D-mannoz), arabinan (α -1,5-bağlı L-arabinoz) ve galaktanlar(β -1,3-bağlı D-galaktoz) bulunabilmektedir (Wood ve ark., 1972).

Ksilan hemiselülozun grupları içinde en fazla bulunan polimerik yapıdır. Polimerik yapısı β -1,4-D-ksilanopiranozil yapılarından oluşur (Caffall, 2009). Doğada saman, sorgum, şeker kamışı, mısır sapları ve koçanları ve orman atıkları sert ve yumuşak odunlar ksilan içermektedir (Ebringerova ve ark., 1999).

1.1.3. Ksilan

Ksilan, hemiselüloz grubu içinde en fazla bulunan polimerdir. Polisakaritleri β -1,4-D-ksilanopiranosil kısımlarına bağlanarak doğrusal zincirler oluştururlar. Aynı zamanda O-2 veya O-3 içerikleriyle asetil grupları ile birlikte dallanmış yapı oluştururlar. Bitkilerin ksilanları ayrıca O-4 metilglukronik asit ve glukuronoksilanazlar hücre duvarının yapısına katılır. Ksilan hücre duvarlarının primer yapısında üretilmez (Caffall ve ark., 2009). Ksilan; saman, sorgum, şeker kamışı, mısır sapları ve koçanı gibi birçok bitkide bulunmaktadır (Ebringerova ve ark., 1999).

1.1.4. Lignin

Lignin doğada lignoselüloz yapısında hemiselüloza ve selüloza bağlı bir şekilde bulunmaktadır. Lignin, bitki hücre duvarının en sert bileşenidir ve ayrıca lignoselülozik bitkileri biyolojik bozulmaya karşı korur ve ekstrem şartlarda bitkiye dirençlilik vermektedir. Lignin, şeker bazlı bir yapıya sahip değildir. Alkollerin aromatik polimerlerinden oluşur. Başlıca mono bileşenleri; p-kumaril, koniferil ve sinapil alkoldür (Caffall ve ark., 2009).

1.2. Lignoselülozik Biyokütlenin Biyolojik Parçalanması

Lignoselülozik biyokütlenin oligo ve monosakkaritlere verimli bir şekilde ayrılması farklı mikrobiyal enzimlerin kullanılmasını gerektirir. Yapısal olarak, endo-enzimler ve ekzo-enzimler lignoselülozların bozunmasında önemli rol oynar. Endo-enzimler polimer zincirinin içindeki bağları keser. Ekzo-enzimler ise polimer zincirinin uçlarını ve hidroliz oligomerlerini monomerlere indirerek bu sayede endo-enzimler için daha kolay parçalanabilir substratlar oluştururlar (Schattauer ve ark., 2011).

En çok kullanılan lignoselüloz parçalayıcı enzimler bakterilerden ve mantarlar tarafından üretilen selülaz, ksilanaz, amilaz ve lakkaz gibi enzimlerdir. Biyoteknolojide bakterilerden ve mantarlardan üretilen enzimler lignoselülozik biyokütleyi hidrolize etme yeteğine sahiptir (Wan ve Li, 2012).

Enzim sistemleri arasında selülazlar, selülozik yapının enzimatik parçalanmasında önemli rol oynamaktadır (Zheng ve ark., 2014).

1.2.1. Enzimler

Enzimler girdiği kimyasal tepkimeleri katalizleyen herhangi bir şekilde değişime uğramadan çıkan, tepkimenin hızını arttıran katalizörlerdir. Enzimler katalizleyeceği moleküller için özel bağlanma bölgesi olan proteinlerdir (Binner ve ark., 2011). Enzimler birçok alanda önemli uygulama alanlarına sahiptirlerdir. Gıda sanayi, tekstil sanayi, kimya endüstrisi, gen klonlama ve ileri tedavi tekniklerine

kadar birçok alanda yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Lerner, 1992). Enzimler canlılarda metabolik olayları hücrenel koşullarda gerçekleşebildiği gibi yüksek veya düşük sıcaklık, pH, tuzluluk gibi ekstrem koşullarda çalışabilmekte ve bir çok reaksiyonu katalizleyebilmektedir (Ahring ve ark., 2001).

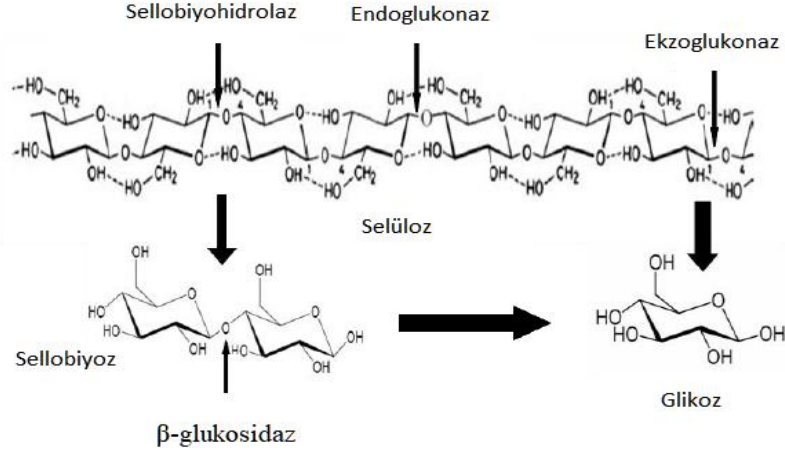
1.2.2. Selülaz

Günümüzde kullanılan selülaz enzimleri, selülozun hidrolizasyonunda çok önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte sanayide ve endüstride yüksek maliyetleri düşürmek açısından, daha verimli prosesler oluşturmak için önem arz etmektedir. Substrat ve hidroliz ürünlerinin bulunduğu yere göre selülaz enzimleri, ekzoglukanaz, endoglukanaz ve β -glukozidaz olarak sınıflandırılmaktadır (Saddler ve ark., 1986). Selülaz enzimleri selüloz kompleksini parçalamak ve fermente edilebilir bir enerji kaynağı (glukoz) üretmek için başarılı bir işbirliği içinde görev yapmaktadırlar. Selülaz enzimleri, glukoz birimleri arasındaki glikozidik bağları parçalayabilen hidrolazlar olarak da adlandırılmaktadır (Lynd ve ark., 2002).

β (1-4) endoglukanazlar (E.C. 3.2.1.4) ile temsil edilmektedir. Amorf selüloz kısmının iç glikozid bağlarını rastgele parçalayarak, düşük polimerizasyon derecesi ve çözünür oligosakkaritler ile polisakkaritleri serbest bırakmaktadır (Kumar ve ark., 2009).

Ekzoglukanazların en önemli enzimlerinden olan sellobiyohidrolazlar (E.C. 3.2.1.74) sellobiyohidrolaz ve glukanohidrolazlar (E.C. 3.2.1.91) olarak selüloz zincirinin indirgeyici ve indirgeyici olmayan kısımlarından parçalamaktadır. Glukanohidrolazlar selüloz zincirinin uçlarından glukoz birimlerini serbest bırakmaktadır. Sellobiohidrolazlar, glukanohidrolazların selülozun parçalanması ile oluşan son ürün olan glukoz inhibe etmektedir (Labes ve ark., 2008).

β -glukosidazlar Selülaz kompleksinden β (1-4) bağlarını hidrolize eden β (1-4) glukozidazı (E.C. 3.2.1.21) içermektedir. Bu enzim aynı zamanda son üründe glukoz tarafından da inhibe edilebilmektedir (Nidetzky ve Claeysens, 1994).



Şekil 1.2. Selülozun Enzimatik Hidrolizi (Beguin ve Aubert, 1994).

1.2.3. Selülozom

Selülozom birçok bakteri ve mantar tarafından sentezlenen enzim kompleksleridir. Selülozomlar, bitkinin büyümesiyle selüloza bağlanırlar. Tüm selülozomal proteinler, peptitler ile birlikte hücrenin dış yüzeyinde bulunmaktadır (Sabathe ve ark 2003). Bitki hücre çeperini parçalayabilen tüm mikroorganizmalar karmaşık selülaz enzim sistemleri üretirler (Tomme ve ark., 1995). Hem bakteriler hem de mantarlar aerobik olarak selülozu parçalayan, hücre dışı serbest enzim üretirler (Schwarz, 2001). Anaerobik mikroorganizmalar selülozik substratları temel olarak "selülozomlar" olarak bilinen hücreye bağlı çoklu enzim sistemleri yoluyla parçalamaktadır (Wachinger ve ark., 1989).

Selülozomun ortaya çıkışı ilk olarak termofilik bakteri *Clostridium thermocellum*'da gözlenmiştir (Bayer ve ark., 1983), *C. cellulovorans* (Shoseyov ve ark., 1992), *C. cellulolyticum* (Pages ve ark., 1999), *C. acetobutylicum* (Sabathe ve ark., 2002), *C. josui* (Kakiuchi ve ark., 1998), *C. papyrosolvans*, *Bacteroides cellulosolvans*, *Acetivibrio cellulolyticus* (Pages ve ark., 1997), *Ruminococcus flavefaciens* (Rincon ve ark., 2003) anaerobik mantarların *Neocallimastix*,

Piromyces ve *Orpinomyces*'in (Bayer ve ark., 2004) selülozomal sistemler ürettiği gösterilmiştir.

Selülozomlar, iki genel bileşenin varlığı ile karakterize edilir: 'kohezin' adı verilen enzim bağlanma bölgelerine sahip katalitik olmayan iskele proteini ve Mantarlar ve Bakterilerden gelen 'dockerin' adı verilen yüksek oranda korunmuş katalitik olmayan yapılarıdır.

Selülozom enzimatik bileşenleri sadece selülazları değil aynı zamanda hemiselülazlar (Kosugi ve ark., 2002), pektinazlar (Tamaru ve Doi, 2001), kitinazlar, likenler, mannazlar ve esterazlar gibi çok çeşitli hidrolitik aktiviteler içerir. Bu olağanüstü enzim çeşitliliği, selülozlu substratın, bitki hücre duvarının kimyasal ve yapısal karmaşıklığını yansıtır (Fontes ve Gilbert, 2010).

1.3. Selülaz Enziminin Endüstriyel Uygulamaları

Gıda, yem, kağıt, tekstil, pişirme, atık işleme ve biyokütleden alkol üretimi gibi birçok alanda mikrobiyal enzimler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu enzimler 30 yıldan uzun bir süredir ticarileştirilmektedir (Hu ve ark., 2008).

Selülaz enzimi uygulayarak kağıt sanayisinde büyük ölçüde enerji tasarrufu sağlamaktadır. Selülazlar aynı zamanda kağıttan boya uzaklaştırmak için kullanılmaktadır (Tomme ve ark., 1988). Tekstil endüstrisinde selülozik dokuların biyolojik olarak parlatılması için selülazlar kullanılmaktadır. Tekstilde selülazlar iplik yüzeyindeki selüloz kumaşları parçalayarak kumaşa daha güzel bir görünüm kazandırmaktadır (Csiszar ve ark., 2001).

Fermentasyon endüstrisinde alkollü içeceklerin üretiminde glukanazlar kullanılmaktadır. Bu enzimler, fermente ürünlerin kalitesini ve verimini artırmaktadır. Glukanazlar, glukani hidrolize etmek, wort viskozitesini azaltmak ve ürünün filtre edilebilirliği arttırmak için kullanılmaktadır (Bayer ve ark., 2007). Selülaz enzimi meyve sularının üretimi, ekstraksiyonu, arıtımı, stabilizasyonu için kullanılmaktadır. Ksilanazlar; amilazlar, glukozoksidaz ve proteazlarla birlikte kullanılmaktadır (Evans ve ark., 2005).

.4. Anaerobik Sistemler ve Biyogaz

Hidrolitik anaerobik bakteriler, selülozom olarak bilinen özel bir multienzim kompleksi geliştirmiştir. Anaerobik bakteriler, selüloz olmadan lignoselülozik biyokütleyi parçalamak için gerekli enzimleri üretemez. Bu nedenle, selülozomlar, anaerobik bakteri, enzimler ve substratlar arasında bir köprü kurulmasında önemli bir role sahiptir (Doi ve ark., 2004).

Selülozomlar ilk olarak anaerobik *Clostridium thermocellum* ile keşfedilmiştir. *Acetivibrio*, *Bacteroides* ve *Ruminococcus* cinsleri lignoselülozik materyallerin parçalanmasında tespit edilmiştir (Schwarz ve ark., 2001)

Biyogaz, organik malzemelerin anaerobik koşullarda mikrobiyal parçalanması yoluyla üretilmektedir. Bu işlem sırasında, metan, (% 55-70), karbondioksit (% 30-45) ve hidrojen sülfür açığa çıkmaktadır (Dinamarca ve ark., 2003). Metan, metanojenez olarak adlandırılan anaerobik sistemlerin son aşamasında üretilmektedir. Biyogaz üretiminde organik maddelerin parçalanması dört adımdan oluşmaktadır. Birinci adımda, polisakaritler, proteinler ve lipitler gibi kompleks yapılar monomerlere dönüştürülmektedir (Lynd ve ark., 2002). Fermentasyon aşamasında, anaerobik bakteriler, ürünleri hidroliz ederek asetat karbondioksit ve hidrojen üretiminde kullanırlar. Metanojenez aşamasında, metanojenler tarafından lignoselülozik ürünler metana dönüştürülür (Schnürer ve Nordberg, 2008). Ve son aşamada ise metan elektrik enerjisine dönüştürülerek kullanılmaktadır (Lynd ve ark., 2002).

Lignoselülozik materyallerin anaerobik sistemlerde çürütülerek biyogaza dönüştürülmesinde maliyeti düşürmek ve verimliliği arttırmak için yapılan birçok uygulama bulunmaktadır. Biyolojik ön işlemler genellikle işletme maliyetlerini düşürmek için tercih edilmektedir (Sindhu ve ark., 2016). Fungal ön işlem genel olarak, ligninin parçalanması için uygulanmaktadır. Karışık kültürler aerobik / anaerobik ön işlemler genellikle ligninden selüloz ve hemiselülözün ayrılması ile birlikte anaerobik hidroliz aşamasını kolaylaştırmak için kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2010).

Günümüzde enzimatik uygulamalar yapılarak biyogaz tesislerinde verimliliği arttırmak için araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla selüloz enzimleri kullanılıp lignoselülozik biyokütlenin parçalanması sağlanarak biyogaz sistemlerinde %50'ye varan artışlar elde edilmektedir (Alvira ve ark., 2010).

1.5. *Clostridium* Cinsi

Clostridium cinsi bakteriler, anaerob Gram pozitif, çubuk şekilli ve endospor oluşturan bakterilerdir. Biyoteknolojik açıdan *Clostridium* cinsleri selülozik biyokütleyi parçalama yetenekleriyle bilinir. Bu bakteriler yeni cins *Ruminiclostridium*' olarak adlandırılmaktadır (Yutin ve Galperin, 2013).

Doğada birçok yerde bulunabileceği gibi, bilinen selüloz parçalayan *Clostridium* türleri arasında; *Clostridium thermocellum*, *C. aldrichii*, *C. alkalicellulosi*, *C. caenicola*, *C. cellobioparum*, *C. cellulolyticum*, *C. cellulosi*, *C. clariflavum*, *C. hungatei*, *C. josui*, *C. leptum*, *C. methylpentosum*, *C. papyrosolvans*, *C. sporosphaeroides*, *C. stercorarium*, *C. straminisolvans*, *C. sufflavum*, *C. termitidis*, *C. thermosuccinogenes*, *C. viride*, *Bacteroides cellulosolvans* (*Pseudobacteroides cellulosolvans*), *Eubacterium siraeum* ve *Clostridium* sp. Suşları yer almaktadır (Blumer ve ark.,2008). *Clostridium* cinsinin üyeleri, biyogaz tesislerinde mikrobiyal popülasyonun önemli bir parçasıdır (Horino ve ark., 2014).

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmanın amacı Osmaniye ili katı atık düzenli depolama sahasından alınan çöp numunelerinden selüloz aktivitesi gösteren anaerobik bakterilerin izolasyonu, tanımlanması, bu bakterilerden selüloz üretimi ve izolasyonu, üretilen enzimin sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonu karşısındaki aktivitelerinin belirlenmesi ve enzimin biyogaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesidir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zhao ve ark, (2014) biyoetanol üretiminde lignoselülozik ürünlerin hidrolizi için kaplıcalardan izole edilen 21 selülaaz aktivitesi olan bakteriyi 16S rRNA ya göre tanımlamışlar ve 8 farklı cins bakteri tespit etmişlerdir. Bu izole edilen bakterilerden SV792'un filtre kâğıdı, selülaaz aktivitesi FPase, 9.41 U/ml karboksilmetil selülaaz aktivitesi CMCCase, 6.35 U/ml, ksilanaz aktivitesi 4.28 U/ml olarak belirlenmiştir. *Miscanthus floridulus* substrat olarak kullanıldığında SV79'dan alınan selülozik enzim ile biyokütleden 2.63 mM etanol/g üretildiği belirtilmiştir.

Maryam ve ark, (2018) *Bacillus cellulosilyticus* bakterisinden üretilen selülaaz enzimi kullanılarak çim hidrolizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Üretilen selülaaz enziminin, karboksilmetil selülaaz aktivitesi 1,998.79 IU/ml/min, filtre kâğıdı selülaaz aktivitesi 1,621.16 IU/ml/min belirlemişlerdir. Bermuda çimlerine alkali ön işlemde sonra selülaaz enzimi uygulanmış ve enzimatik işlemlerden sonra açığa çıkan toplam şeker oranı (179.84±0.2 mg/ml), indirgen şeker oranı 126.72±0.1 mg/ml, glikoz oranı 105.40±0.1 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Swathy ve ark, (2018) *Cellulomonas uda* bakterisinden üretilen selülaaz enzimin aktivitesinin pH 7 ve 50°C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Üretilen selülaaz enziminin lignoselülozik biyokütleden biyohidrojen üretiminde kullanılmasıyla 187.44 mmol / L'lik yüksek bir verim artışı elde edilmiştir.

Moreau ve ark, (2015) selülozik biyokütleden etanol ve hidrojen üretmek için kağıt sanayisinden izole edilen *Clostridium thermocellum* kullanmışlardır. Selülozun tamamı 60 saatlik inkübasyondan sonra hidrolize edilmiş pH 5.83 ve sıcaklık 55°C olarak belirtilmiştir. 60 saatlik fermantasyondan sonra üretilen asetat 8.50 mol/m³, etanol 11.30 mol/m³, laktat 8.75 mol/m³, format 0.27 mol/m³, hidrojen 11.20 mol/m³ ve karbon dioksit 18.41 mol/m³ olarak bulunmuştur. Üretilen selülaazın 72. saatte aktivitesinin 0.25 U/cm³ olduğu tespit edilmiştir.

Cebreiros ve ark, (2019) anaerobik olarak *Clostridium beijerinckii* suşlarından izole edilen selüloz enzimi kullanılarak Okalıptüs talaşından izopropanol-bütanol-etanol üretmişlerdir. 180°C, 45 dakika otohizoliz ön işlemine tabi tutulmuş olan talaş selüloz enzimiyle muamele edildikten sonra 48 saat sora kültürde 8.7 g/L izopropanol-bütanol-etanol konsantrasyonuna ulaşılmıştır.

Lin ve ark, (2017) lignoselülozik biyokütleden biyohidrojen üretiminde *Clostridium thermocellum* tarafından üretilen selüloz enzimlerini kullanmışlardır. Üretilen selüloz enziminin termofilik olarak 60°C de aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Enzim uygulamasında biyohidrojen üretiminin 2.61 kat artırdığını gözlemlenmiştir.

Susan ve ark, (2002) *Rhodothermus marinus*' tan izole edilen termofilik selüloz enziminin optimum aktivitesinin pH 7.0'de olduğu ve enzimin 100°C de 3.5 saat bekletildikten sonra aktivitesinin %50 oranında koruduğu belirtilmiştir.

Tantayotai ve ark, (2018) pirinç kavuzlarından biyogaz üretmek için at ve büyükbaş hayvan atıklarından alınan numunelerden mikrobiyal aşı kültürü elde edilmiştir. Mikrobiyal kütlelerin selüloz aktivitesi numunelerin alındığı yere göre farklılık göstermiştir. Her iki numunede de β -glukonaz aktivitesi sırasıyla 0.417 ve 0.43 u/mg, eks- β -glükaz 0.116 ve 0.184 u/mg, β -glükosidaz 1.069 ve 3.184 u/mg olarak belirtmişlerdir. Biyogaz dengelerinde ise at gübresinden alınan mikroorganizmaların selüloz aktiviteleri oldukça yüksek olup biyogaz verimi 109.60 dan 161.49 m/gr olarak artış göstermiştir.

Miettinen ve ark, (2003) *Melanocarpus albomyces*, *Myceliophthora thermophila*, *Chaetomium thermophilum* ve *Sporotrichum thermophilum* suşlarından 3 selüloz enzimi saflaştırmışlardır. Selülozların ikisinin 20 ve 50 kDa ağırlıklarında endoglukanaz olduğunu belirtmişlerdir. Saflaştırılan 20 kDa ağırlığındaki endoglukanazın pH 7'de kumaşlarda iyi etki gösterdiği, 50 kDa ağırlığındaki endoglukanaz ve sellobiyohidrolazın ilavesinin ise geri boyamayı azalttığını açıklamışlardır.

Singh ve ark (2009) *A. heteromorphus*' dan selüloz üretimi yapmışlar ve üretilen selüloz enziminden, buğday samanının substrat olarak kullanıp şeker üretmişlerdir. En yüksek indirgen şeker pH 5.0 ve 30°C'de 5 günde açığa çıkmıştır. Bu koşullarda 5 gün inkübasyonun ardından *A. heteromorphous*, 3.2 EU/mL filtre kağıdı, 83 EU/mL CMCaz aktivitesi bulunduğunu belirtmişlerdir.

Norsalwani (2016), lignoselülozik ürünlerden *Trichoderma spp.* ile selüloz enzimi üretimi yapmışlardır. Selüloz üretimi için optimum koşullar pH 5.0, inkübasyon sıcaklığı 30°C, inokülasyon konsantrasyonu 2x 10⁸ KOB/mL ve substrat partikül boyutu 500 µm altında belirlenmiştir. Ham palmiye çekirdeği pastası, yağdan arındırılmış ve bitkisel atık ile fermantasyon yapılarak gerçekleştirilmiştir. Katı hal fermantasyonu yoluyla enzim üretimine bakıldığında, *Trichoderma spp.* tarafından üretilen selüloz etkinliğinin yaklaşık bir kat yüksek olduğu ortaya koyulmuştur. Endüstriyel bir atık olan palm yağı küspesinin selüloz üretimi için uygun bir ürün olduğu belirtilmiştir.

Saravanakumar ve Kathiresan (2013), lignoselülozik ürün olan talaştan enzimatik olarak biyoetanol üretmeyi amaçlamışlardır. Lignoselülozik ürünler önce asit ile muamele edilmiş ve *Trichoderma spp.*'dan üretilen selüloz enzimi ile enzimatik reaksiyona sokulmuştur. 36.5°C'lik sıcaklık, 102 saatlik inkübasyon süresi ve 45.14 mL'lik enzimle muamele edilmiş 330 dev/dakika lık karıştırma altında % 85.6'lık biyoetanol üretimi gerçekleşmiştir.

3. MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çöp Numunesi

Çalışmada, selüloz aktivitesi olan bakterilerin izole edildiği çöp numuneleri Osmaniye ili katı atık düzenli depolama sahasından kepçe ile yapılan kazıyla çöpün 4m derinliğinden alınmış, ağzı kapalı plastik kutularda laboratuara getirilmiştir. Biyogaz üretimi yapılan tesisteki biyogaz toplama borularından akan sızıntı sularından ağzı kapalı şişelerde alınıp laboratuvara getirilmiştir.

3.1.2. RCM Agar (Reinforced *Clostridial* Medium)

Clostridium cinsi bakterilerin izolasyonunda kullanılmıştır (Gibbs ve Hirsch, 1956).

Bileşimi	g/L
Et Peptonu	10
Et özütü	10
Maya	3
Nişasta	1
D(+)Glukoz	5
L-Sistein	0.5
NaCl	5
Sodyum Asetat	3
Amonyum Demir III Sitrat	0.5
Agar	15
Distile su	1000 mL

Besiyerinin pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra agar eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine oksijen difüzyonunu engellemek

için otoklavdan çıkarılan besiyerleri %20 CO₂ ve %80 N₂ içeren anaerobik kabine alınarak ekimler anaerobik kabinde yapılmıştır.

3.1.3. Brewer Anaerobik Agar

Anaerobik bakterilerin üretilmesinde ve stok kültürlerde kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

Bileşimi	g/L
Kazein Peptonu	10
Soya peptonu	5
Maya	5
L-Sistein	0.4
D(+)Glukoz	10
NaCl	5
Na-thioglukolat	2
Metilen Mavisi	0.002
Agar	17
Distile Su	1000mL

Besiyerinin pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra agar eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine oksijen difüzyonunu engellemek için otoklavdan çıkarılan besiyerleri %20 CO₂ ve %80 N₂ içeren anaerobik kabine alınarak ekimler anaerobik kabinde yapılmıştır.

3.1.4 Selüloz Besiyeri

Clostridium sp. bakterilerinden sıvı besiyerinde selüloz üretimi ve enzim izalasyonu için kullanılmıştır. 15 g/L agar eklenerek katı besiyerinde selüloz aktivitesi belirlenmiştir (Sleat ve ark., 1984).

Bileşimi	g/L
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	1
NH ₄ Cl	1
KCl	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
L-Sistein	0.15
Triptikaz	0.5
Maya Özeti	0.5
CMC	5
Resaurin	0.001
Distile Su	1000mL

Besiyerinin pH'sı 7.5'a ayarlandıktan sonra agar eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyerine oksijen difüzyonunu engellemek için otoklavdan çıkarılan besiyerleri %20 CO₂ ve %80 N₂ içeren anaerobik kabine alınarak ekimler anaerobik kabinde yapılmıştır.

3.1.5. Biyogaz Aktivitesi Besi Ortamı

Üretilen enzimin biyogaz üretimine etkisinin belirlenmesi için hazırlanan batch sistem sentetik selüloz besi ortamı kullanılarak beslenmiştir. (Sagnak ve ark., 2011).

Bileşimi	g/L
CMC	10
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.25
K ₂ HPO ₄	1
KH ₂ PO ₄	1
L-cysteine HCl.H ₂ O	0.1

Besiyerinin pH'sı 7 ayarlandıktan sonra anaerobik kabinde içinden 5 dakika azot gazı geçirilerek çözülmüş oksijenin uzaklaştırılması sağlanmış ve steril edilmeden biyogaz sistemine besleme yapmak için kullanılmıştır (Sagnak ve ark., 2011).

3.1.6. NaCl Çözeltisi (1 M)

Katı besiyerinde selülaz aktivitesinin belirlenmesi için besiyerindeki Kongo kırmızısı boyasının uzaklaştırılması için kullanılmıştır (Voget ve ark., 2006).

3.1.7. Sodyum Fosfat Tamponu (100 mM, pH 7.0)

Enzim üretiminde soğuk alkol ile çöktürme işlemi yapıldıktan sonra santrifüj ile toplanan enzimin çözülerek sıvılaştırılması için kullanılmıştır (Srivastava, 1987).

3.1.8. Kongo Kırmızısı (%0.1)

Katı besiyerinde selülaz aktivitelerinin saptanması için kullanılmıştır. 0.1 g kongo kırmızısı 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır (Voget ve ark., 2006).

3.1.9. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)

Enzim reaksiyonunu durdurmak ve aktivite sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacı ile kullanılmıştır. 1 g DNS 50 mL distile su içerisinde çözülür, üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 mL, 2M NaOH ilave edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanır (Miller, 1959).

3.1.10. Sitrata Tamponu

Enzimin pH 3-5 arasındaki aktivitesini saptamak amacı ile kullanılmıştır. Solüsyon A (19.21 gr/L, 0.2M sitrik asit) ve solüsyon B (53.65 gr/L, 0.2M Na₂HPO₄·7H₂O) stok çözeltileri kullanılarak istenilen pH değerlerindeki tampon çözeltiler Çizelge 3.1'e göre hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.1. Sitrata Tampon Çözeltisinin Hazırlanması

PH	Solüsyon A mL	Solüsyon B mL	Distile su mL
3	30.7	19.3	50
3,5	26.7	23.3	50
4	24.3	25.7	50
4,5	21.0	29.0	50
5	17.9	32.1	50

3.1.11. Sodyum-Fosfat Tamponu

Enzimin pH 6.0-8.0 arasındaki aktivitesinin saptanmasında kullanılmıştır. Solüsyon A (27.8 g/L, 0.2M NaH₂PO₄) ve Solüsyon B (53.65 g/L, 0.2 M Na₂HPO₄·7H₂O) stok çözeltileri kullanılarak istenilen pH değerindeki tampon çözeltiler Çizelge 3.2'ye göre hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.2. Fosfat Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması

pH	Solusyon A mL	Solusyon B mL	Distile Su mL
6.0	87.7	12.3	100
6.5	68.5	31.5	100
7.0	39.0	61.0	100
7.5	16.0	84.0	100
8.0	5.3	94.7	100

3.1.12. Glisin-NaOH Tamponu

Enzimin pH 8.5-10.5 arasındaki aktivitesini saptamak için kullanılmıştır. Tamponun hazırlanmasında Solusyan A (15.01g/L, 0.2M Glisin) ile Solusyon B (8g/L, 0.2M NaOH) stok çözeltileri kullanılarak istenilen pH değerindeki tampon çözeltiler Çizelge 3.3'e göre hazırlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3.3. Glisin Tamponu Çözeltisinin Hazırlanması

pH	Solusyan A mL	Solusyan B mL	Distile Su mL
8.5	4.0	50	146
9	8.8	50	141.2
9,5	22.4	50	127.6
10	32.0	50	118
10,5	45.5	50	104.5

3.2. Metod

3.2.1. Anaerob Bakterilerin İzolasyonu

Çalışmada selülaz aktivitesi olan bakterilerin izolasyonu için Osmaniye katı atık düzenli depolama tesisinin sızıntı suyu ve çöp örneklerinden alınan numuneler anaerobik şartlar korunacak şekilde ağzı kapalı şişelerde, ağzı silikon contalı plastik kap içine konularak getirilmiştir.

Laboratuvara getirilen örneklerin içindeki metanojen bakterilerin öldürülmesi ve sporlu bakterilerin kalması için 5 g örnek 80°C'de 10 dakika ısı ön

işleme maruz bırakılarak selektif işlem uygulanmıştır. Isıl işleme maruz bırakılan numunelerden bakteri izolasyonunu gerçekleştirilmiştir. Önceden steril edilmiş 100 mL RCM sıvı besiyerine anaerobik kabin içinde ısıl ön işleme alınmış çamur ve sızıntı suyu örneklerinden ekimler yapılmış, şişeler 37°C ve 55°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır (Gibbs ve Freame, 1965).

Anaerobik kabin içinde RCM katı besiyerine tek koloni düşecek şekilde öze ile ekim yapılmış ve 15 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ekimden sonra katı besiyeri üzerine 2. kat olarak 10 mL RCM agar besiyeri dökülmüştür. Örnekler 37°C ve 55°C sıcaklıkta koloni oluşumu görülünceye kadar inkübe edilmiştir. Tek düşen kolonilerden alınarak stok kültürler tüpte hazırlanan brewer agar besiyerine iğne öze ile batırma kültür şeklinde yapılmıştır (Anonymous, 1978).

3.2.2. Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Selülaz aktivitesinin belirlenmesi için selüloz agar kullanılmıştır. İzole edilen bakteriler Selüloz Agar besiyerine çizgi ekim yapılarak Anareobik jarda 37°C ve 55°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. Selülaz aktivitesi olan bakterileri belirlemek için besiyeri %0.1 kongo kırmızısı ile boyanmış, yapılan ekimlerin çevresinde sarı zon pozitif olarak değerlendirilmiştir (Wood, 1988).

Selülaz aktivitesi olan bakteriler BD Crytal anaerobik bakteri identifikasyon test kiti kullanılarak tanımlanmıştır (Wood, 1988).

3.2.3. Selülaz İzolasyonu

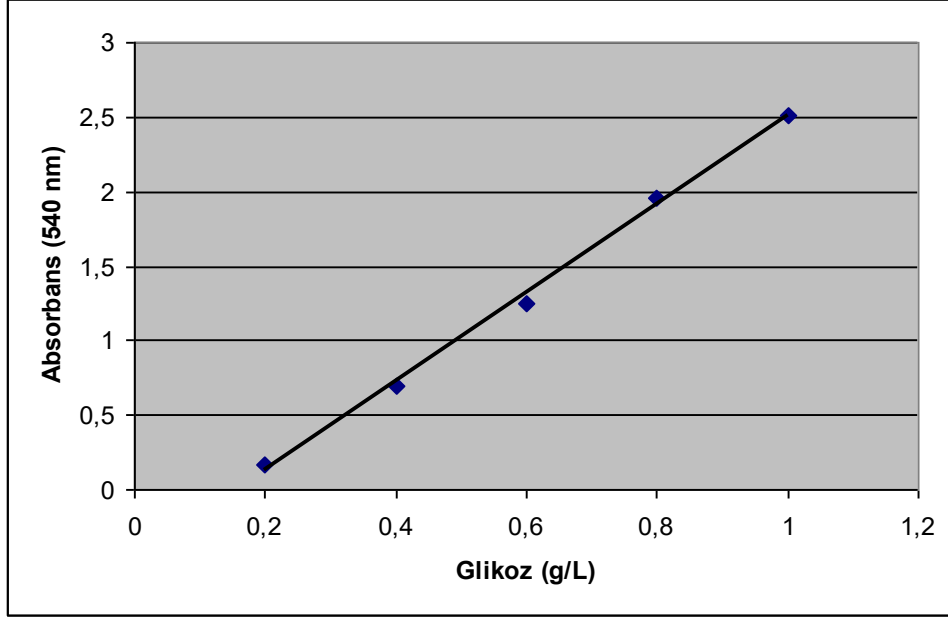
Selülaz enzim üretimi için selüloz sıvı besiyeri kullanılmıştır. Selülaz aktivitesi olan örnekten yapılan ekimden sonra kültür 55°C sıcaklıkta ağzı kapaklı şişede inkübe edilmiş ve 7 gün sonra kültür 9000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant toplanmıştır. Süpernatant üzerine daha önceden -33°C'de bulunan soğuk etanol yavaş yavaş ilave edilerek alkol presipitasyon yöntemi ile enzimin çökmesi sağlanmıştır (Sleat ve ark., 1984). Çözelti 24 saat boyunca -33°C'de bekletilmiş ve çöken kısım 9000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek

süpernatant atılmış, pellet fosfat tamponuna alınmıştır. Fosfat tamponunda toplana örnekler diyaliz tüpü kullanılarak +4°C sıcaklıkta diyaliz edilmiş ve çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C'de saklanmıştır (Wood, 1988).

3.2.4. DNS ile Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

DNS ile enzim aktivitesinin tayini için izole edilen enzimden 0.5 mL ve substrattan 0.5 mL alınarak uygun sıcaklık ve pH koşullarında inkübe edildikten sonra örnek üzerine 3 mL DNS ayırıcı konularak kaynar su banyosunda 5 dakika kaynatma işlemi yapılmıştır. Kaynatma işleminden sonra örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve spektrofotometrede köre karşı 550 nm dalga boyunda okunmuştur. Kör olarak 0.5 mL substrat ve 0.5 mL destile su kullanılmıştır (Miller, 1959). Çalışmada hesaplama için kullanılan standart eğri oluşturulurken glikoz substrat olarak kullanılmıştır. Çizelge 3.4'deki standart eğrinin regresyon analizinden $y=2.9819x-0.4704$ denklemi elde edilmiş ve r değeri 0.997 bulunmuştur. Tüm çalışmalarda bu eğriden elde edilen denklem kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Glikoz Standart Eğrisi



3.2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Çalışmada izole edilen selülozün çalışması üzerine pH etkisinin belirlenmesi için Sitrata (pH 3-5), Na-Fosfat (pH 6.0-8.0) ve Glisin-NaOH (pH 8.5-10.5) tamponları kullanılmış enzim aktivitesi pH 3-10 arasında belirlenmiştir.

Her bir pH değeri için tampon içinde %1 CMC olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Enzim aktivitesi için 0.5 mL enzim ve 0.5 mL substrat alınarak farklı sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilmiştir. inkübasyon sonrasında DNS ile indirgen şeker analizi yapılmıştır (Miller, 1959).

3.2.6. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Çalışmada izole edilen selülozün çalışması üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi için 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C sıcaklıklarda denemeler yapılmıştır. Her bir sıcaklık testi için, pH 3-10 tampon çözeltisi içinde %1 CMC olacak şekilde substrat çözeltisi hazırlanmıştır. Aktivite tayini için 0.5 mL enzim

ve 0.5 mL substrat alınarak 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C sıcaklıklarda su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda DNS ile indirgen şeker analizi yapılmıştır (Miller, 1959).

3.2.7. Zamana Bağlı Enzim Aktivitesi

Çalışmada izole edilen selülazın zamana bağlı aktivitesi enzimin optimum çalıştığı sıcaklık 60°C ve pH 8'de gerçekleştirilmiştir. Tampon çözeltisi içinde substrat çözeltisinden 0.5 mL ve enzimden de 0.5 mL alınarak hazırlanan örnekler için sıcak su banyosunda 0-12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince saat başı bir alınarak DNS ile enzim aktivitesi belirlenmiştir (Miller, 1959).

3.2.8. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonun Etkisi

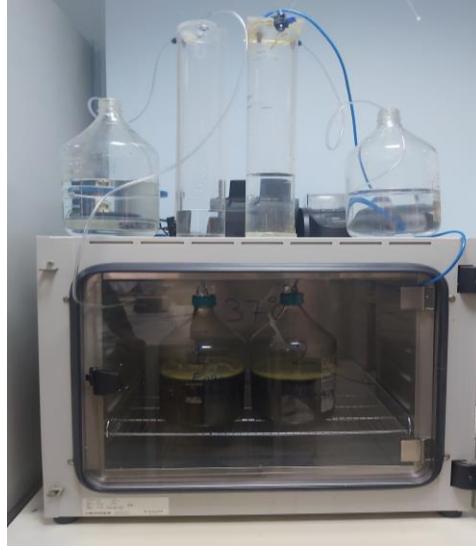
Çalışmada izole edilen selülazın aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi enzimin optimum çalıştığı sıcaklık olan 60°C ve pH 8'de belirlenmiştir. Tampon çözeltisi içinde %0.5, 1 ve 2 olacak şekilde hazırlanan CMC substrat çözeltilerinden 0.5 mL ve enzimden de 0.5 mL alınarak, örnekler enzim aktivitesinin belirlenmesi için sıcak su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda örneklerdeki enzim aktivitesi DNS yöntemi ile belirlenmiştir (Miller, 1959).

3.2.9. Enzimin Biyogaz Verimliliği Üzerine Etkisi

Çalışmada izole edilen ve optimum çalışma şartları belirlenen selülazın biyogaz sistemlerinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi için mikrobiyal aşı kültürü Osmaniye katı atık düzenli depolama sahasından alınan sızıntı suyu kullanılarak hazırlanmıştır. Laboratuarda 5 L ağzı kapalı cam reaktörlerde yapılan batch biyogaz denemesi için kültür sentetik selüloz besi ortamı ile beslenerek 37°C ve 55°C olarak iki farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. 37°C sıcaklıkta selülaz enzimi kullanılarak biyogaz üretiminin belirlenmesi Şekil 3.1'de verilmiştir. 55°C

sıcaklıkta selüloz kullanılarak biyogaz üretiminin belirlenmesi Şekil 3.2’de verilmiştir. Enzim aktivitesinin belirleneceği reaktöre 30 mL izole edilen selüloz enzimi eklenmiştir. Kontrol grubuna sadece sentetik besi ortama ilave edilmiş ve enzim eklenmemiştir.

5 günlük inkübasyon süresince oluşan gazın miktarı ve içeriği, gaz analizörü kullanılarak belirlenmiştir (Sagnak ve ark., 2011).



Şekil 3.1. 37°C Sıcaklıkta Enzim Uygulaması Yapılan Anaerob Sistem



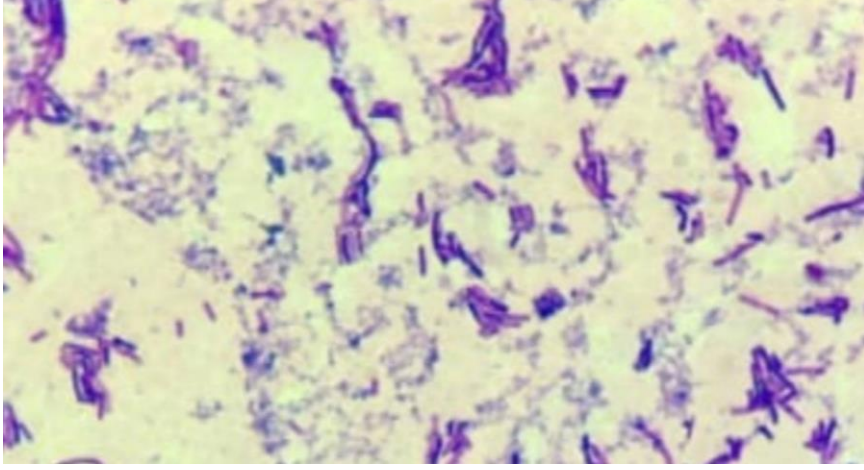
Şekil 3.2. 55°C Sıcaklıkta Enzim Uygulaması Yapılan Anaerob Sistem

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

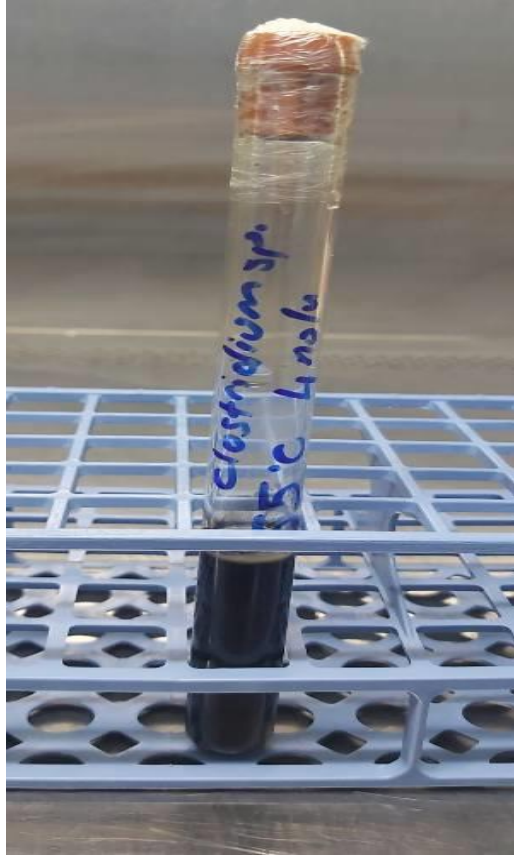
4.1. Bakteri İzolasyon Sonuçları

Çalışmada kullanılan anaerobik bakteriler Osmaniye katı atık düzenli depolama sahasından alınan örneklerden izole edilmiştir. Çöp sahası biyogaz üretim tesisi olup sahaya alınan çöplerden biyogaz üretilmektedir. Sahada evsel nitelikli çöpler biriktirilmektedir. Sahada biriktirilen çöpler mikrobiyal faaliyet ile parçalanarak biyogaz gibi ürünlere dönüşmektedir. Sahadan alınan su ve katı numune örnekleri siyah gri, çürük yumurta kokusunda olup, içerisinde saprofit ve anaerobik bakteriler bulunmaktadır. Bu çalışmada metanojen bakterilerin elemine olması, sporlu anaerobik bakterilerin izolasyonu için örnekler 80°C’de 10 dakika ısıtılma tabii tutulmuştur. Isıtılma tabii tutulan örnekler 37°C ve 55°C sıcaklıklarda anaerobik koşullarda inkübe edilmiştir. 55°C sıcaklıkta inkübe edilen besiyerlerinde 12 gün sonra renk değişimi ve üreme gözlenmiştir.

Bu ortamdan alınan örnekler katı besiyerine ekilmiş ve katı besiyerinde üreyen kolonilerden stok kültürler hazırlanarak selülaz aktivite testleri yapılmıştır. Çalışmada toplamda 8 adet bakteri izole edilmiş bu bakterilerin katı besiyerinde selülaz aktivitesi gösteren 3 tanesine gram boyama yapılmış, üç izolatında gram pozitif çomak oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu üç bakterinin spor boyamaları yapılmış ve yine üç bakterinin sporlu olduğu belirlenmiştir. Bu üç bakteri BD anaerob bakteri identifikasyon testi kullanılarak yapılan bakteri tanımlamasında, üç bakterininde *Clostridium sp.* olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. 4 Nolu Suşun Gram Boyaması



Şekil 4.2. 4 Nolu İzolatın Stok Kültürü

Clostridium'lar, anaerobik, gram pozitif, çomak formunda spor oluşturabilen bakterilerdir. Biyoremediasyonda oldukça etkili olan bu bakterilerin kompleks bileşikleri parçalama yetenekleri çok yüksektir. Vejetatif formları oksijene hassas olup uzun süre havadaki oksijenle temas etmeleri durumunda ölmektedirler. Organik molekülleri parçalayarak asetat, bütirat gibi metabolik yan ürünler oluştururlar (Angelidaki ve ark.,2011). *Clostridium*'ların geniş karbon kaynağı kullanma yetenekleri vardır. Selüloz, hemiselüloz gibi lignoselülozik ürünleri hücre dışı enzimler ile parçalayarak karbon kaynağı olarak kullanırlar (El-Mashad ve ark., 2004).

Lignoselülozik biyokütle hidrolizasyonunda, sakkarolitik enzimlerin kullanılmasının yanında, mikroorganizmalarında kullanılması birleştirilmiş biyoprosesler olarak tanımlanmaktadır. Bir lignoselülozik biyokütlenin birleştirilmiş biyoproseslerde, enzim yada mikroorganizma kullanılarak işlenmesi dört aşamada gerçekleşir. Bunlardan ilki selülaz ve ksilanaz ile gerçekleştirilen hidroliz, ikinci aşama biyokütlenin şekerlere indirgenmesi, üçüncü aşama fermantasyon aşaması ve son aşama ürün oluşumudur. Enzimatik hidroliz yöntemleri lignoselülozik ürünlerin parçalanmasında termokimyasal yöntemlerin yanında proses maliyetini düşüren ve uygulamalarda oluşabilecek ara ürünlerin ortadan kaldırılması için avantajlı uygulamalardır (Naresh ve ark., 2019). Doğal selüloolitik organizmalar arasında birleştirilmiş biyoproseslerde özellikle anaerob bakteriler dikkat çekmektedir. Bu canlılara birleştirilmiş biyoproselerde doğal yolla geliştirilmiş stratejiler olarak bakılmaktadır (Tanimura ve ark., 2015).

4.2. Enzim İzolasyonu ve Enzim Aktivite Sonuçları

Çalışmada kullanılan bakterilerin selülaz aktivitesi gösterenlerin belirlenmesi için selüloz içeren katı besiyeri hazırlanmış ve izolatlar katı besiyerine ekilerek *Clostridium*'ların hücre dışı enzim salgılayarak selülozu parçalama özelliklerine bakılmıştır. İzole edilen üç bakterinin selülaz aktivite testi, anaerob selüloz agarda yapılmıştır. 4 numaralı suşta yapılan ekim çizgisi etrafında oluşan

zon çapı 22 mm olarak belirlenirken diğer iki suşta 5 mm ve altı zon çapı belirlenmiştir. Bu 4 numaralı suş enzim üretimi çalışmalarında kullanılmıştır. Şekil 4.3'de petride 4 nolu suşun selüloz aktivitesi verilmiştir.



Şekil 4.3. 4 Nolu Bakterinin Katı Besiyerinde Selüloz Aktivitesi

Sıvı besiyerinde enzim üretimi anaerob selüloz besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde 5 g/L CMC kullanılarak selüloz üretilmiştir. Anaerobik şartlarda hazırlanan ve steril edilen besiyeri 55°C sıcaklıkta ağzı kapalı cam şişelerde 7 gün inkübe edilmiştir. inkübasyon sırasında kültür ortamı hergün elle çalkalanarak çökelek oluşturan bakterilerin besiyerine dağılması sağlanmıştır. 7. gün sonunda enzim izolasyonu için besiyeri santrifüj edilip süpernatant soğuk

alkol ile presipitasyon yapılarak enzim izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Santrifüj ile toplanarak alınan enzim sodyum fosfat tamponunda pH 7’de diyaliz etmek için çözülmüştür. Enzim +4°C derecede 24 saat pH 7 sodyum fosfat tamponuna karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrasında enzim çalışmalarda kullanmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

İzole edilen enzimin selülaz aktivitesi %1 CMC çözeltisinden alınan 0.5 mL örnek üzerine eklenen 0.5 mL enzim çözeltisi 55°C sıcaklıkta pH 7’de bir saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda yapılan DNS analizi ile çözeltinin rengi kiremit kırmızısına dönüşmüş ve çözeltideki CMC’nin parçalandığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Selülaz Aktivitesi

4.3. Sıcaklık ve pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

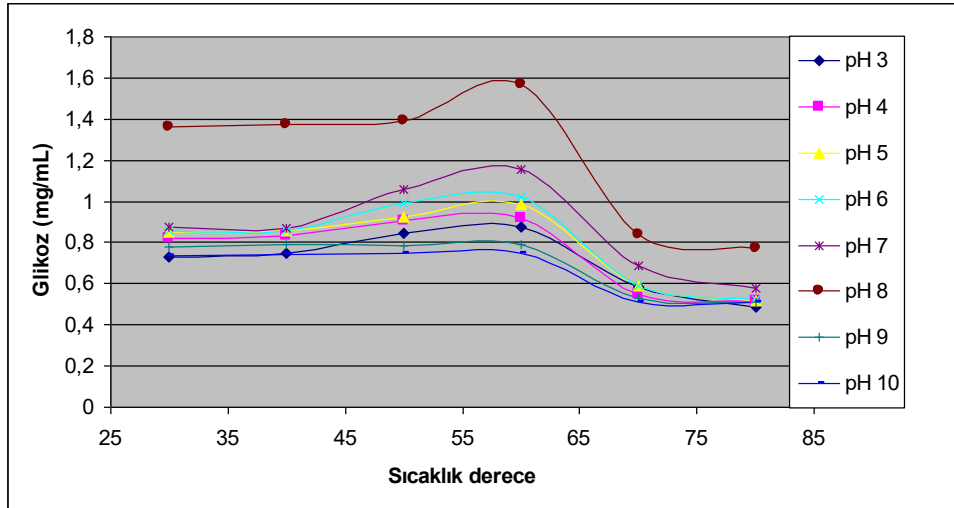
Sıcaklık ve pH enzim faaliyetleri için oldukça önemli parametreler olup sıcaklık ve pH'ın enzimatik aktivite üzerindeki etkisi enzimin biyokimyasal yapısına göre değişiklik göstermektedir. Çalışmada izole edilen enzimin sıcaklık aktivitesi belirlenirken pH'ın sıcaklık ile ilişkisi aynı anda belirlenmiştir. Birçok çalışmada optimum sıcaklık veya pH bulunup bu optimum şartlarda diğer değişkenleri değiştirerek çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bu çalışmada enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi 30°C- 80°C sıcaklıklar arasında denenirken her bir sıcaklık değerinde pH 3-10 arasında aktivite testi yapılmıştır. Böylece pH ve sıcaklık ilişkisinde optimum nokta belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan bakterinin üreme sıcaklığı ve enzimin üretildiği sıcaklık 55°C'dir. Çalışma koşullarının termofilik olması nedeniyle izole edilen enzimde termofilik aktivite göstermektedir. Sıcaklığın ve pH'ın enzim aktivitesi üzerine etkisi şekil 4.5 ve şekil 4.6'da verilmiştir. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık 60°C olarak belirlenmiş, optimum pH değeri olarakta enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH 8.0 olarak belirlenmiştir. 60°C sıcaklıkta ve pH 8.0'de %1 CMC çözeltilisinden 0.5 mL ve 0.5 mL izole edilen enzim kullanılarak enzimatik reaksiyon sonucunda DNS yöntemi ile 1.567 mg/ml indirgen şeker elde edilmiştir. Bu değer çalışılan tüm pH ve sıcaklık skalası içinde en yüksek değer olup enzimin optimum sıcaklık pH değeri olarak belirlenmiştir.

Optimum sıcaklık ve pH değerine göre farklı sıcaklıklardaki ve pH'lardaki enzim aktivitesi kıyaslandığında; 30°C, 40°C ve 50°C sıcaklıklarda pH 3'te enzim aktivitesi sırası ile %46.45, %47.73 ve % 53.83 iken pH'ın artışı ile aktivitede artış olduğu pH 8'de % 86.98, 87.56 ve %88.95 aktiviteye ulaştığı belirlenmiştir. pH'ın arttığı 9 ve 10 değerlerinde ise enzim aktivitesi pH 9'da %49, 50.5 ve % 50.1 pH 10.0'da ise üç sıcaklık değerinde %47 aktivite gösterdiği belirlenmiştir. pH'ın artışı ile çalışılan tüm sıcaklık değerlerinde aktivite artışı olduğu, ancak pH 8.0'in üzerinde ise aktivitede hızlı bir düşüş olduğu belirlenmiştir.

60°C sıcaklıkta enzim maksimum aktivite göstermiş olup, termofilik özelliktedir. Bu sıcaklıkta pH 3, 4, 5, 6, 7, 8'de sırası ile enzim aktivitesinin %56, 58, 62, 65, 73 ve 100 olduğu belirlenmiştir. pH 9 ve 10'da enzim aktivitesi diğer sıcaklık değerlerinde olduğu gibi hızlı bir düşüşle azalmıştır. Bu pH değerlerine sırası ile %50 e %47 enzim aktivitesi olduğu belirlenmiştir.

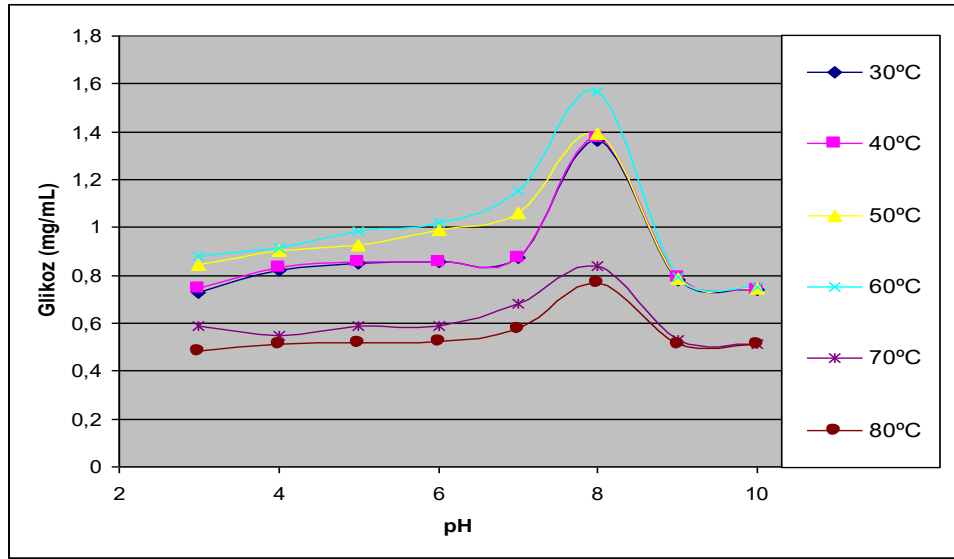
Sıcaklığın 70°C ve 80°C olduğu değerlerde enzim aktivite kaybederek 60°C sıcaklıkta gösterdiği aktiviteyi koruyamamış olup, hiper termofilik özellik gösterememiştir. 80°C sıcaklıkta enzim aktivitesi pH 3.0'de %30.9 olarak belirlenmiş ve bu aktivite bu sıcaklıkta en düşük aktivite olup 80°C sıcaklıkta en yüksek aktivite pH 8.0'de % 49.13 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Lee ve Blackburn, (1975) hayvan dışkısından izole ettikleri *Clostridium* 'ların selüloz aktivitesini en yüksek olduğu sıcaklık 67°C ve maksimum aktivite gösterdiği pH'ın 6.5 olduğunu belirtmektedir. Xu ve ark, (2010) *Clostridium thermocellum*'un selülozomlarının yüksek sıcaklıklarda bozulduğunu ve maksimum 70°C sıcaklıkta çalışabildiğini belirtmişlerdir.

Ng ve ark., (1981) etanol üretiminde kullanmak üzere izole ettikleri *Clostridium thermocellum* LQRI ve *C. thermohydrosulfuricum* 39E suşlarının selülozik substratları parçalama çalışmalarında enzimatik aktivitenin optimum sıcaklığı olarak 60°C'yi belirtmişlerdir. Anaerob termofilik bakterilerden *Clostridium* 'lar selülozu parçalamak için selülozom üretirler. Selülozomlar multi enzim kompleksleri olup gerçek selüloz aktivitesi gösterirler özellikle kristal yapıdaki selülozun'da parçalanmasını sağlayabilirler. *Clostridium absonum*-CFR-702'dan 65 °C sıcaklıkta çalışan enzim üretmişlerdir (Rani ve Nand, 2000). Waeonukul ve ark., (2012) *Clostridium thermocellum* selülozomlarının 60°C sıcaklıkta aktif olduğunu belirtmişlerdir.

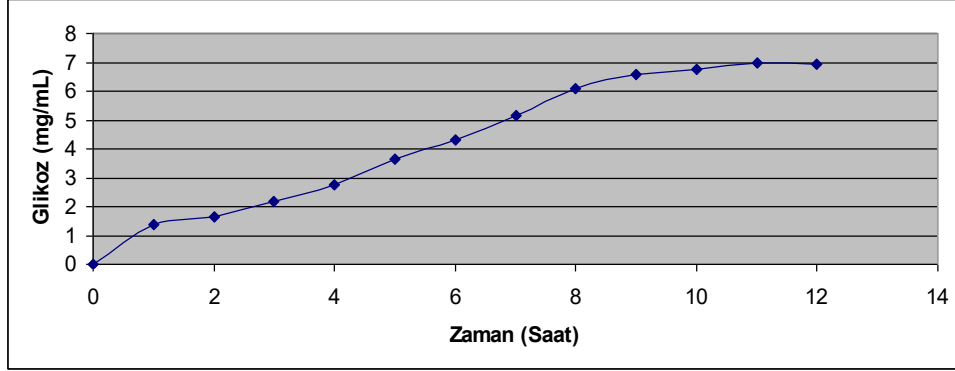


Şekil 4.6. pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

4.4. Zamana ve Substrat Konsantrasyonuna Bağlı Enzim Aktivitesi

Çalışmada izole edilen enzimin pH ve sıcaklık optimizasyonu yapılmış ve enzimin optimum çalışma koşulları pH 8.0 ve 60°C sıcaklık olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık koşullarında enzimin zamana bağlı substrat dönüşümünü belirlemek için, 0.5 mL substrat çözeltisi ve 0.5 mL enzim kullanılarak pH 8.0'de

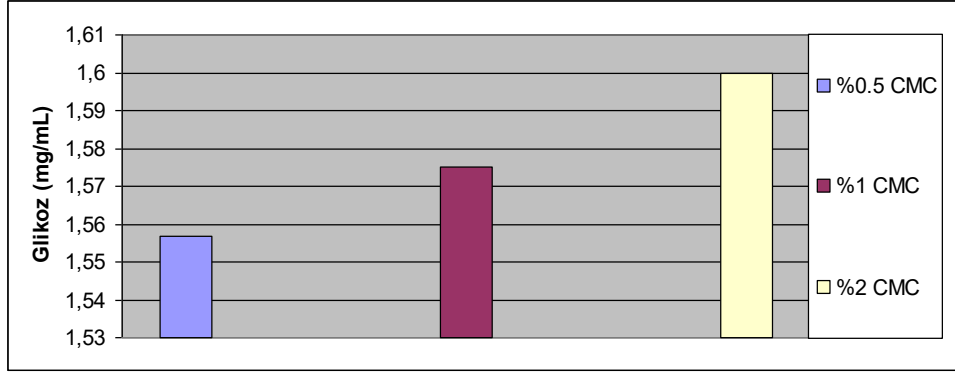
ve 60°C sıcaklıkta 12 saat süre ile ağzı kapalı cam tüplerde sıcak su banyosunda inkübe edilen örneklerin zamana bağlı olarak selülozun parçalanması ile oluşan indirgen şeker değerleri Şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.7. Zamana Bağlı Enzim Aktivitesi

Zaman bağlı olarak yapılan çalışmada enzimin substrat parçalama düzeyi zamanla artmakta 10. saatten sonra stabil bir hal almaktadır. Çalışma 12 saat süre ile devam ettirilmiş ve enzimin 12 saat içinde açığa çıkardığı indirgen şeker oranı 6.95 mg/ml olup, bu değer 1. saatte açığa çıkan (1.39 mg/ml) değerden 5 kat daha fazladır. Enzim zamana bağlı olarak daha fazla substratı katalizleyerek parçalamaktadır. Enzimatik sürenin kısa olması enzimin endüstriyel alanda kullanımı için bir avantaj oluşturmaktadır. Zamana bağlı olarak enzimin substrat ile ilişkisi arttıkça enzimin katalizleyebileceği madde miktarı da artış göstermektedir. Bu artış başlangıçta hızlı ilerleyen, ancak zamanla yavaşlayan bir süreçtir. Bunun sebebi enzimin zamanla bozulmaya başlaması olabileceği gibi ortamda oluşan son ürünün enzimi inhibe etmesi veya substrat çözünürlüğü ile birlikte son ürünün ortamdaki çözünürlüğü gibi etkenlerden kaynaklı olması öngörülmektedir (Carrilo ve ark., 2005). Ortamdaki substrat konsantrasyonunun enzimatik aktivite üzerine etkisinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda substrat kullanılmış ve bir saat

süre ile enzimatik inkübasyondan sonra elde edilen indirgen şeker oranları Şekil 4.8’de verilmiştir.



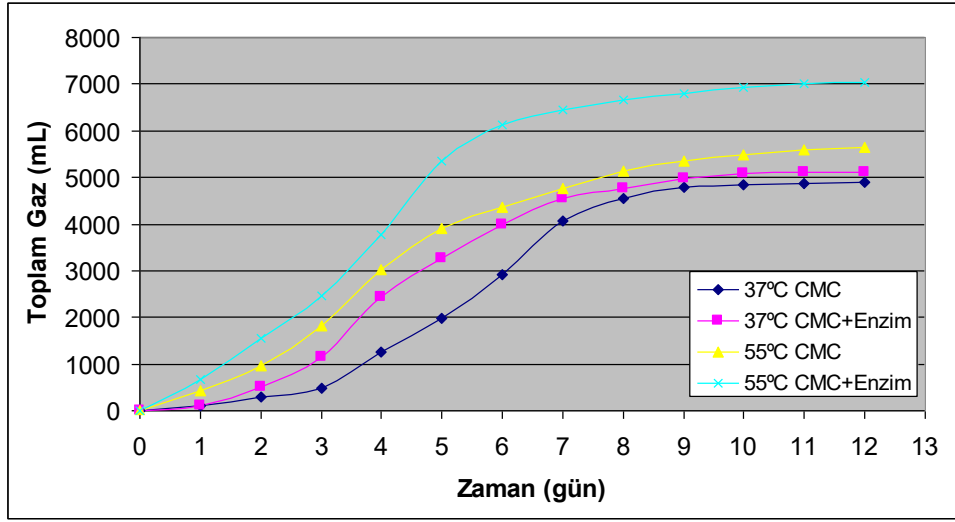
Şekil 4.8. Kosantrasyona Bağlı Enzim Aktivitesi

Substrat konsantrasyonu %0.5, 1 ve 2 CMC olacak şekilde yapılan çalışmada, 1 saat süre inkübasyondan sonra açığa çıkan indirgen şeker oranları sırası ile 1.55, 1.59 ve 1.6 mg/mL olarak belirlenmiştir. Enzim konsantrasyonunun sabit olduğu substrat konsantrasyonunun değiştiği bu çalışmada substrat konsantrasyonunun enzimatik aktivite üzerine bir saatlik inkübasyon süresinde etkisi olmamıştır.

4.5. Biyogaz Sisteminde Enzim Uygulaması

Bu çalışmadaki temel amaçlardan biri olan anaerobik enzimlerin biyogaz sistemlerinde uygunabilirliği olup, bu amaçla anaerobik olarak izole edilen *Clostridium*’lardan elde edilen ve bazı özellikleri belirlenen enzim biyogaz sisteminde kullanılmıştır. Bu çalışmada laboratuvarında batch sistem olarak hazırlanan anaerobik biyogaz sistemi 37°C ve 55°C sıcaklıklarda çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan 3 L anaerobik bakteri aşısı kültürü Osmaniye katı atık düzenli depolama tesisinden alınmış ve mikrobiyal aşının gelişimi sentetik besi ortamı ile sağlanmıştır. Sentetik besi ortamına karbon kaynağı olarak 10g/L CMC eklenmiş

ve 37°C ve 55°C sıcaklıklarda biyogaz üretimi belirlenmiştir. Çalışmada enzim kullanımının biyogaz verimi üzerine etkisinin belirlenmesi için reaktöre 30 mL enzim eklenmiş kontrol grubuna ise enzim eklenmeden 12 gün süre ile biyogaz verimliliği ortaya çıkarılmıştır. Enzim uygulamasının biyogaz üretimine etkisinin sonuçları Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Enzim Uygulamasının Farklı Sıcaklıklarda Biyogaz Üretimine Etkisi

37°C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12. günde enzim bulunmayan kontrol grubunda 4890 mL %55 CH₄, % 44 CO₂ gazı oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenen deney grubundan elde edilen toplam biyogaz miktarı 5110 mL olarak bulunmuştur. Enzim bulunan reaktörde elde edilen biyogaz miktarı 220 mL fazla olup enzim eklenmesinin 37°C sıcaklıkta %4.3 biyogaz verimi artırdığı tespit edilmiştir.

55°C sıcaklıkta yapılan çalışmada 12. günde enzim bulunmayan kontrol grubunda 5640 mL %55 CH₄, % 44 CO₂ gazı oluşan biyogaz üretilmiştir. Enzim eklenen deney grubundan elde edilen toplam biyogaz miktarı 7050 mL olarak bulunmuştur. Enzim bulunan reaktörde elde edilen biyogaz miktarı 1410 ml fazla

olup enzim eklenmesinin 55°C sıcaklıkta %20 biyogaz verimi arttırdığı tespit edilmiştir.

Üretilen selülozün 60°C sıcaklıkta ve pH 8.0'de maksimum aktivite göstermesi enzimin farklı sıcaklıklardaki biyogaz sistemlerinde kullanılabilceği yapılan biyogaz deneylerinde görülmektedir. 37°C sıcaklıkta enzim bulunan grup ile enzim olmayan grup arasında üretilen gaz miktarındaki farkı %4.3 iken sıcaklığın artışı ile %20'ye kadar çıkmıştır. Yapılan bu çalışmada anaerob *Clostridium* 'lardan izole edilen selülozün optimum 60°C sıcaklıkta ve pH 8.0'de çalışıyor olması enzimin termal biyogaz tesisleri için uygun bir enzim olabileceği tespit edilmiştir.

Bu çalışmada çıkan sonuçlara göre; enzim uygulaması ile %20 daha fazla gaz üretimi sağlanmış olması; sistemde kullanılabilcek olan substrat miktarının azaltılması, sistemin dizaynı sırasında daha küçük hacimlerde çürütücü planlanması, alıkonma sürelerinin daha kısa tutulması gibi pozitif etkiler ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada çöp sahasından izole edilen *Clostridium sp.* suşları kullanılarak selüloz üretilmiş ve üretilen selülazın optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. İzole edilen bu enzim kullanılarak biyogaz sistemlerine enzim eklenmesinin, biyogaz verimine etkisi belirlenmiştir.

Çalışmada izole edilen bakteri termofil olup üreme sıcaklığı 55°C'dir. Bu bakteriden üretilen enzim çalışmalarında enzim üzerine pH ve sıcaklığın etkisi belirlenmiş. Enzimin optimum 60°C sıcaklıkta maksimum aktivite gösterdiği termofilik özellikte olduğu belirlenmiştir. 60°C sıcaklıkta enzimin optimum çalışma pH şartları pH 8.0 olarak bulunmuş ve enzimin alkali özellikte olduğu belirlenmiştir. Çalışmada alkali termofil enzim izole edilmiş ve anaerobik biyogaz sistemlerinde bu enzimin kullanılabilirliği iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Enzim eklenmeyen grupta 37 °C sıcaklıkta, 12 günde 4890 mL biyogaz gaz üretilirken, enzim eklenen deney grubunda 5110 mL gaz üretilmiştir. Enzimin 37°C sıcaklıkta biyogaz verimi üzerine etkisi %4.3 olarak belirlenmiştir. Ancak 55°C sıcaklıkta 12 günde toplamda enzim bulunmayan kontrol grubunda 5640 mL, enzim eklenen deney grubunda 7050 mL biyogaz üretimi gerçekleştirilmiş, enzim eklenmesinin biyogaz verimini 55°C sıcaklıkta %20 arttırdığı belirlenmiştir.

Öneriler:

Biyolojik olarak enerji üretim sistemlerinde biyoteknolojik ürünlerin kullanılması verimliliği arttıran ve maliyeti düşüren uygulamalar olup, bu konuda daha fazla araştırma ve çalışmalar yapılması önerilir.

Bu çalışmada kullanılan alkali termofil enzim dışında diğer mikroorganizmalardan üretilen enzimlerinde biyogaz sistemlerinde çalışmalarının yapılması oldukça önemlidir.

Verimliliği arttırıcı, sürdürülebilir biyoteknoloji üzerine yapılacak uygulamalara dikkat çekilmelidir.

Enzim uygulaması ile daha az substrat daha fazla enerji elde edilip, biyogaz sistemlerinin verimliliği artırılabilir.

KAYNAKLAR

- Ahring, B.K., Ibrahim, A.A., Mladenovska, Z., 2001. Effect of Temperature Increase from on Performance and Microbial Population Dynamics of an Anaerobic Reactor Treating Cattle Manure. *Water Resarch*, 35,2446-2456.
- Alvira, P., Tomas, E., Ballesteros, M., Negro, M.J., 2010. Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review *Bioresourch Technology* 101,4851-4861
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D.J., Plugge, C.M., Stams, A.J., 2011. Biomethanation and Its Potential Methods *Enzym*, 494,327–351.
- Anonymous, 1978. Buffer Solutions. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, 370-382.
- Azmah, S. Abdulla, R. Hajar, S. Azhar, M., Marbawi, H., Azlan, J. Ravindra, P. A., 2016. Review on Third Generation Bioethanol Feedstock. *Renewable Sustainable Energy Review*, 65,756–769.
- Bayer, E.A., Belaich, JP., Shoham, Y., Lamed, R., 2004. The Cellulosomes: Multienzyme Machines for Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Annuaance Review Microbiology*, 58:521–554.
- Bayer, E.A., Kenig, R., Lamed, R., 1983. Adherence of *Chlostridium thermocellum* to Cellulase. *Journal of Bacteriology*, 156:818-827.
- Bayer, E.A., Lamed R., Himmel M.E., 2007. The Potential of Cellulases and Cellulosomes for Cellulosic Waste Management. *Currient Opinion Biotechnology*, 18,237-245
- Beguin, P., Aubert, J.P., 1994. The Biological Degradation of Cellulose. *FEMS Microbiology Review*, 13, 25-58.
- Biner, R., Menath, V., Huber, H., Thomm, M., Bischof, F., Schmack, D., Reuter, M., 2011. Comparative Study of Stability and Half-life of Enzymes and Enzyme Aggregates Implemented in Anaerobic Biogas Processes. *Biomass Conversionel Biorefinery*, 1:1-8

- Blumer-Schuette, S.E., Kataeva, I., Westpheling, J., Adams, M.W.W., Kelly, R.M., 2008. Extremely Thermophilic Microorganisms for Biomass Conversion: Status and Prospects. *Current Opinion Biotechnology*, 19:210-217
- Caffall, K.H., Mohnen, D., 2009. The Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Wall Pectic Polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344:1879–1900
- Carrillo, F., Lis M.J., Colom X., Lopez-Mesas M., Valdeperas, J., 2005. Effect of Alkali Pretreatment on Cellulase Hydrolysis of Wheat Straw. *Kinetic Study Process Biochemistry*, 40:3360–3364
- Cebreiros, F., Ferrari, M.D., Lareo, C., 2019. Cellulose Hydrolysis and IBE Fermentation of Eucalyptus Sawdust for Enhanced Biobutanol Production by *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 *Industrial Crops and Products*, 50-61
- Chen, H., Qiu, W., 2010. Key Technologies for Bioethanol Production from Lignocellulose *Biotechnology Advances*, 28:556-562
- Coughlan, M.P., 1985. The Properties of Fungal and Bacterial Cellulases with Comment on Their Production and Application. *Biotechnology Genetic Engineering Review*, 3:39-109.
- Csiszar, E., Urbanszki, K., Szakacs, G., 2001. Biotreatment of Desized Cotton Fabric by Commercial Cellulase and Xylanase Enzymes. *Journal Molecular Catalysis Biology Enzymatic*, 11:1065–1072
- Deobald, L.A., Crawford, D.L., Hurst C.J., Knudsen, G.R., Stetzenbach, L.D., Walter, M.V., 1997. Lignocellulose Biodegradation. *Manual of Environmental Microbiology*, 730–737.
- Dinamarca, S., Aroca, G., Chamy, R., Guerrero, L., 2003. The Influence of pH in The Hydrolytic Stage of Anaerobic Digestion of The Organic Fraction of Urban Solid Waste. *Water Science Technology*, 48:249-251
- Doi, R.H., Kosugi, A., 2004. Cellulosomes: Plant-Cell-Wall-Degrading Enzyme Complexes *National Review Microbiology*, 2:541-551

- Ebringerova, Z.N., Hromadkova, A.P., 1999. Valachovic Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Republic Drug Research Institute Modra, Horna 36:900
- El-Mashad, H.M., Zeeman, G., van Loon, W.K.P., Bot, G.P.A., Lettinga, G., 2004. Effect of Temperature and Temperature Fluctuation on Thermophilic Anaerobic Digestion of Cattle Manure. *Bioresourch Technology*, 95:191-201.
- Evans, D.E., Collins, H., Eglinton, J., Wilhelmson, A., 2005. Assessing The Impact of The Level of Diastatic Power Enzymes and Their Thermostability on The Hydrolysis of Starch During Wort Production to Predict Malt Fermentability. *Journal of The Amercian Society of Brewing Chemists* 63:185–198
- Fontes, C.M.G.A., Gilbert, HJ., 2010. Efficient Nanomachines Designed to Deconstruct Plant Cell Wall Complex Carbohydrates. *Annuaance Review Biochemistry*, 79:231–237.
- Gibbs, B.M., Frame, A., 1965. Spore Formation By *Clostridium* Species In An Artificial Medium. *The Society for Applied Microbiology* 67:162
- Gomez, I., Gomes, J., Steiner, W., Esterbauer, H., 2002. Production of Cellulase and Xylanase by A Wild Strain of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 36:701-707.
- Haworth, W.N., 1929. *The Constitution of Sugars*. Edward, Arnold, London.
- Henrissat, B.A., 1991. Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities *Biochemistry Journal*, 280:309-316.
- Himmel, M.E., Ruth, M.F., Wyman, C.E., 1999. Cellulase for Commodity Products from Cellulosic Biomass. *Currient Opinion Biotechnology*, 10: 358–64.
- Horino, H., Fujita, T., Tonouchi, A., 2014. Description of Anaerobacterium *Clostridium* rRNA Cluster III Isolated from Soil of A Japanese Rice Field,

- and Reclassification of Bacteroides. *Evolution Microbiology*, 64:1296-1303
- Hu, Y., Zhang, G., Li, A., Chen, J., Ma, L., 2008. Cloning and Enzymatic Characterization of A Xylanase Gene from A Soil-Derived Metagenomic Library with An Efficient. Approach *Apply Microbiology Biotechnology*, 80:823–30.
- Knauf, M., Moniruzzaman, M., 2004. “Lignocellulosic Biomass Processing: A Perspective” *Introduction Sugar Journal*, 106:147–150,.
- Kosugi, A., Murashima, K., Doi, R.H., 2002. Xylanase and Acetyl Xylan Esterase Activities of XynA, a Key Subunit of The *Clostridium cellulovorans* Cellulosome for Xylan Degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 68:6399–6402.
- Kuhad, R.C., Singh, A., Eriksson, K.E.L., 1997. Microorganisms and Enzymes Involved in The Degradation of Plant Fiber Cell Walls. *Advance Biochemistry Engineering Biotechnology*, 57:45-125.
- Kumar, R., Wyman C.E., 2009. Access of Cellulase to Cellulose and Lignin for Poplar Solids Produced by Leading Pretreatment Technologies. *Biotechnology Programme*, 25(3): 807–19.
- Labes, A., Karlsson, E.N., Fridjonsson, O.H., Turner, P., Hreggvidson, G.O., Kristjansson, J.K., Holst, O., Schonheit, P., 2008. Novel Members of Glycoside Hydrolase Family 13 Derived from Environmental DNA. *Applied Environmental Microbiology*, 74(6):1914–21.
- Lee, B., Blackburn, T., 1975. Cellulase Production by A Thermophilic *Clostridium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 30:3:346–353
- Lerner, R., 1992. The Gene for Stinging Nettle Lectin (*Urtica dioica* agglutinin) Encodes Both A Lectin and A Chitinase *Journal Biology Chemistry*, 267: 11-85.

- Lin, H.N., Wang Y.T., Zhu M. J., 2017. Evaluation of Spent Mushroom Compost as A Lignocellulosic Substrate for Hydrogen Production by *Clostridium thermocellum* International Journal of Hydrogen Energy, 26687-26694
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization Fundamentals and Biotechnology Microbiology Molecular Biology Review, 66:506-577.
- Lynd, L.R., Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M., 2002. Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass an Update. Current Opinion Biotechnology, 16-577-583.
- Maryam, B., Qadir, A., Zameer, M., Ahmad, S.R., Nelofer, R., Jamil, N., Arzoo, S., Afzaal, R., 2018. Production of Cellulases by *Bacillus Cellulosilyticus* Using Lignocellulosic Material Pollution Journal Environmental Studies, 6: 2659-2667
- Miettinen-Oinonen, A., Londesborough, J., Joutsjoki, V., Lantto, R., Vehmaanperä J., 2003. Three Cellulases from *Melanocarpus albomyces* for Textile Treatment at Neutral pH. Enzyme and Microbial Technology, 34:332–341.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31(3):426-428.
- Moreau, A., Montplaisir D., Sparling R., 2015. Hydrogen, Ethanol and Cellulase Production from Pulp and Paper Primary Sludge by Fermentation with *Clostridium thermocellum*. Biomass Bioenergy, 72:256–62.
- Naresh, M., Rajarathinam, K., Senniyappan, R., Moorthy, T., Kumar, R., 2019, Choice of Pretreatment Technology for Sustainable Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass. Bottle Necks and Recommendations. Waste Biomass Valoriz, 10, 1693–1709
- Ng, T.K., Ben-Bassat A., Zeikus J. 1981. Ethanol Production by Thermophilic Bacteria: Fermentation of Cellulosic Substrates by Cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium*

- thermohydrosulfuricum*. Applied Environmental Microbiology, 41:1337–1343
- Nidetzky, B., Cleysens, M., 1994. Specific Quantation of *Trichoderma reesei* Cellulases in Reconstituted Mixtures and Its Application to Cellulase-Cellulose Binding Studies. Biotechnology Bioengineering, 44:961-966
- Norsalwani, T., Lah, T., Norulaini, R., Shahadat, M., Nagao, H., Hossain, S., Omar, M., 2016. Utilization Industrial Waste for the Production of Cellulase by the Cultivation of *Trichoderma* Via Solid State Fermentation. Environmental Processes, 3(4): 803-814.
- Pages, S., Belaich, A., Fierobe, H.P., Tardif C., Gaudin, C., Belaich, J.P., 1999. Sequence Analysis of Scaffolding Protein CipC and ORFXp, a New Cohesin-Containing Protein in *Clostridium cellulolyticum*: Comparison of Various Cohesin Domains and Subcellular Localization of ORFXp. Journal Bacteriology, 181:1801–1810.
- Payen, A., 1938. Mémoire Sur la Composition du Tissu Propre des Plantes et du Ligneux. C. R. Hebd. Seances. Acadademic Science, 7:1052–1056.
- Rani, D.S., Nand K., 2000. Production of Thermostable Cellulase-Free Xylanase by *Clostridium absonum* CFR-702 Process Biochemistry, 355-362
- Rincon, M.T., Ding, S.Y., McCrae, SI., Martin, J.C., Aurilia, V., Lamed, R., 2003. Novel Organization and Divergent Dockerin Specificities in The Cellulosome System of *Ruminococcus flavefaciens*. Journal Bacteriology, 185:703–713.
- Sabathe, F., Bélaïch, A., Soucaille, P., 2002. Characterization of The Cellulolytic Complex (Cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiology Letter, 217:15-22.
- Sabathe, F., Soucaille, P., 2003. Characterization of the CipA Scaffolding Protein and in Vivo Production of A Minicellulosome in *Clostridium acetobutylicum*. Journal Bacteriology 185:1092–1096.

- Saddler, J.N., 1986. Factors Limiting The Efficiency of Cellulase Enzymes. *Microbiology Science*, 3:84-7
- Sagnak, R., Kargi, F., Kapdan, I.K., 2011. Bio-hydrogen Production from Acid Hydrolyzed Waste Ground Wheat by Dark Fermentation. *Introduction Journal Hydrogen Energy* 36:12803–12809.
- Saravanakumar, K., Kathiresan, K., 2013. Bioconversion of Lignocellulosic Waste to Bioethanol by *Trichoderma* and Yeast Fermentation. *Biotech Original Article*, 4:493–499.
- Schattauer A., Abdoun E., Weiland P., Plöchl M., Heiermann M., 2011. Abundance of Trace Elements in Demonstration Biogas Plants. *Biosysteme Engineering* 108:57-65
- Schnürer, A., Nordberg, A., 2008. Ammonia, A Selective Agent for Methane Production by Syntrophic Acetate Oxidation at Mesophilic Temperature *Water Science Technology*, 57:735–740.
- Schwarz, W.H., 2001. The Cellulosome and Cellulose Degradation by Anaerobic Bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 56:634-649.
- Shoseyov, O., Takagi, M., Goldstein, M.A., Doi, R.H., 1992. Primary Sequence Analysis of *Clostridium cellulovorans* Cellulose Binding Protein A Procton *National Acadamia Science* 89:3483–3487.
- Sindhu, R., Binod P., Pandey A., 2016. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass – an Overview. *Bioresour Technology*, 199:76-92
- Singh, A., Singh, N., Bishnoi, N.R., 2009. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. *International Journal of Civil and Environmental Engineering*, 1(1),23-26.
- Sleat, R., Mah, R.A., Robinson, R., 1984. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. *Applied Environmental Microbiology*, 48:88-93.

- Srivastava, R.A.K., 1987. Purification and Chemical Characterization of Thermostable Amylase Produced by *Bacillus Stearotherophilus*. *Enzyme Microbiolgy Technology*, 9:749-754.
- Susan, J.C., Hreggvidsson G.O., Karlsson E.N., 2002. The Structure of *Rhodothermus marinus* Cel12A, A Highly Thermostable Family 12 Endoglucanase, at 1.8 Å Resolution, 883-897
- Swathy, R., Rambabu K., Banat F., Ho S.H., Chu D.T., Show P.L., 2019. Production and Optimization of High Grade Cellulase from Waste Date Seeds by *Cellulomonas uda* NCIM 2353 for Biohydrogen Production., *International Journal of Hydrogen Energy*, 3:456-74
- Taherzadeh, M., Karimi, K., 2007. Enzyme-based Hydrolysis Process for Ethanol from Lignocellulosic Material A Review *Bioresources*, 2(4):707–738.
- Tamaru, Y., Doi, R.H., Pectate A., 2001. An Enzymatic Subunit of The *Clostridium cellulovorans* Cellulosome. *National Acadamica Science*, 98:4125–4129.
- Tanimura, A., Kikukawa, M., Yamaguchi, S., Kishino, S., Ogawa, J., Shima, J., 2015 Direct Ethanol Production from Starch Using A Natural Isolate, *Scheffersomyces Shehatae*. *Toward Consolidated Bioprocessing Science Reply*, 5:95-93.
- Tantayotai, P., Pornwongthong, P., Muenmuang, C., Phusantisampan, T., Sriariyanun, M., 2017 Effect of Cellulase-producing Microbial Consortium on Biogas Production from Lignocellulosic Biomass., *Energy Procedia* 180-183
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. *Nobel Tıp Kitabevi*, İst.345s.
- Tomme, P., Warren, R.A., Gilkes, N.R., 1995. Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. *Advance Microbiology Physiology*, 37:1-81.
- Voget, S., Steele, H.L., Streit, W.R., 2006. Characterization of Metagenomederived Halotolerant Cellulase. *Journal Biotechnology* 126:26-36.

- Wachinger, G., Bronnenmeier, K., Staudenbauer, W.L., Schrempf, H., 1989 Identification of Mycelium-associated Cellulase from *Streptomyces Reticuli*. *Applied Environmental Microbiology*, 55:2653-2657.
- Waeonukul, R., Kosugi, A., Tachaapaikoon, C., 2012. Efficient Saccharification of Ammonia Soaked Rice Straw by Combination of *Clostridium thermocellum* Cellulosome and *Thermoanaerobacter brockii* β -Glucosidase. *Bioresourch Technology*, 107:352–357.
- Waldron, K.W., 2010. Bioalcohol Production. *Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass* (Woodhead Publishing Series in Energy).
- Wan C., Li Y., 2012. Fungal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Biotechnology of The Advance*, 30:1447-1457.
- Wood, T.M., 1988. Preparation of Crystalline, Amorphous and Dyed Cellulase Substrate. *Methods Enzymology*, 166:19-45
- Wood, T.M., McCrae, SI., 1972. The Purification and Properties of The C1 Component of *Trichoderma koningii* Cellulase *Biochemistry Journal* 128:1183–1192.
- Xu, C., Qin, Y., Li, Y., Ji, Y., Huang, J., Song, H., Xu, J., 2010. Factors Influencing Cellulosome Activity in Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Ethanol *Bioresourch Technology*, 101(24):9560-9
- Yutin, N., Galperin, M.Y., 2013. A Genomic Update on *Clostridial phylogeny*: Gram-negative sporeformers and other misplaced *Clostridia*. *Environmental Microbiology*, 15:2631-2641.
- Zhao, C., Deng, Y., Wang, X., Li Q., Huang, Y., Liu, B., 2014. Identification and Characterization of An Anaerobic Ethanol-producing Cellulolytic Bacterial Consortium from Great Basin Hot Springs with Agricultural Residues and Energy. *Crops Journal Microbiology Biotechnology*. 9:1280-90.
- Zheng Y., Zhao J., Xu F., Li Y., 2014. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Biogasproduction. *Programme Energy Combust Science*, 42:35-53 .

ÖZGEÇMİŞ

12.01.1994 yılında Adana'da doğdu. Kozan İnkılâp İlköğretim okulunda 5 yıl okudu. Hatay Öğretmen Lisesinde 3 yıl okuduktan sonra, Ceyhan öğretmen lisesinden mezun oldu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünden 2016'da mezun oldu. 2016'da Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı.