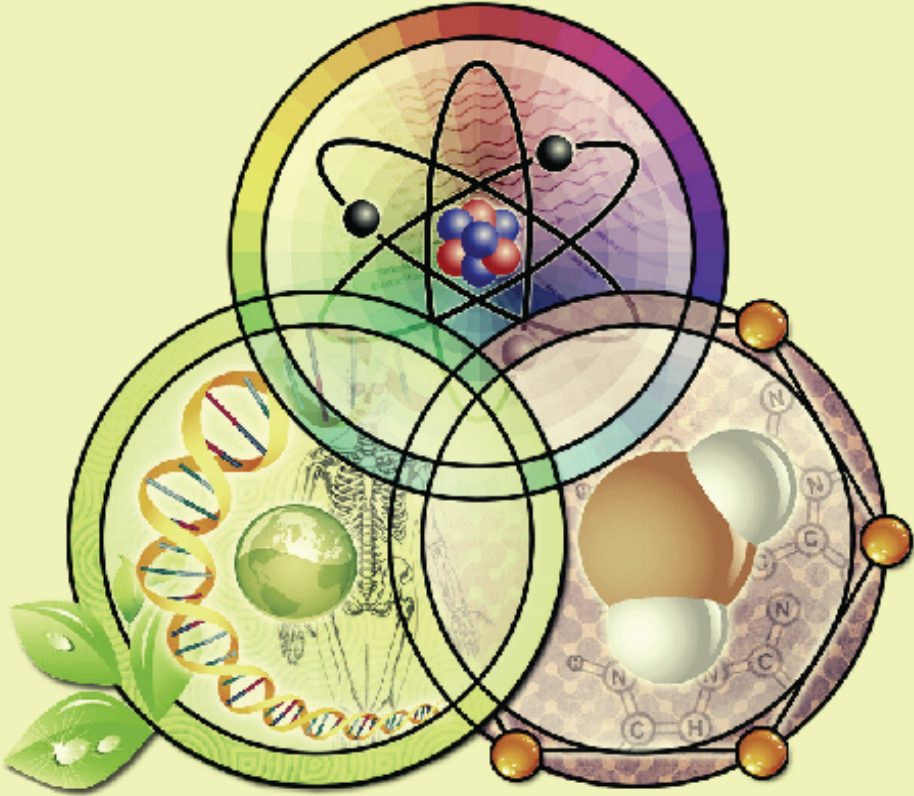


BİYOLOJİ ALANINDA TEORİK VE UYGULAMALI AKADEMİK ÇALIŞMALAR-II

EDİTÖR
Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU



BİYOLOJİ ALANINDA TEORİK VE UYGULAMALI AKADEMİK ÇALIŞMALAR-II

EDİTÖR

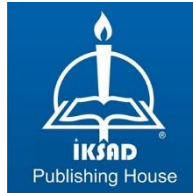
Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU

YAZARLAR

Prof. Dr. Arif PARMAKSIZ

Doç. Dr. Hüseyin BULUT

Dr. Öğr. Üyesi Demet HANÇER AYDEMİR



Copyright © 2024 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or
transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical
methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of
brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses
permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social
Researches Publications®

(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)

TURKEY TR: +90 342 606 06 75

USA: +1 631 685 0 853

E mail: iksadyayinevi@gmail.com

www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.

Iksad Publications – 2024©

ISBN: 978-625-378-086-9

Cover Design: İbrahim KAYA

December / 2024

Ankara / Türkiye

Size = 16x24 cm

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU 1

BÖLÜM 1

YAPAY EVRİME AÇILAN KAPI; REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Doç. Dr. Hüseyin BULUT 3

BÖLÜM 2

BUĞDAYDA Cd AĞIR METAL STRESİNİN RETROTRANSPOZON HAREKETLİLİĞİNE ETKİSİ

Doç. Dr. Hüseyin BULUT 15

BÖLÜM 3

BAZI PISTACIA L. TÜRLERİNİN KLOROPLAST DNA DATASI KULLANILARAK FİLOGENETİK ANALİZİ

Prof. Dr. Arif PARMAKSIZ 23

BÖLÜM 4

TERMOFİLLERİN BİYOTEKNOLOJİ VE ENDÜSTRİDEKİ KULLANIM ALANLARI

Dr. Öğr. Üyesi Demet HANÇER AYDEMİR 37

ÖNSÖZ

Biyoloji bilimi canlılığın öğretisidir. Doğduğumuz andan öldüğümüz ana kadar birçok biyolojik olay içinde hayatımızı geçiririz. Bununla birlikte biyoloji sadece şimdi ile sınırlı değildir. İlk canlıların oluşumuyla birlikte başlayan biyolojik süreç birçok bilim insanı tarafından araştırılmış ve şaşırtıcı sonuçlarıyla heyecan verici bir dönemi de önümüze sermiştir. Biyoloji alanının genişliği düşünüldüğünde bugün hala araştırılacak ve keşfedilecek birçok konunun olduğu da aşikardır. Bu kitapta yer alan çalışmaları gerçekleştiren ve size sunulmasında rol alan bilim insanları olarak sürece katkıda bulunmanın gurur ve mutluluğunu yaşıyoruz. Kitapta yer alan bölümler biyolojik araştırmalara ışık tutacak şekilde organize edilmiştir. Bölüm yazarlarımıza ve bu kitabın size ulaşmasında rol oynayan yayınevi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

11-12-2024

Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU

BÖLÜM 1

YAPAY EVRİME AÇILAN KAPI; REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Doç. Dr. Hüseyin BULUT¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14553556>

¹ Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Erzincan.

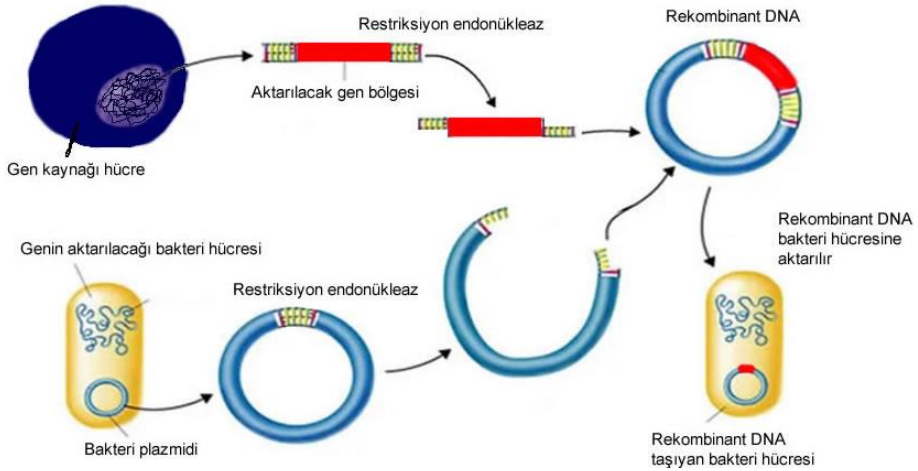
Orcid No: 0000-0003-3424-7012. huseyinbulut@erzincan.edu.tr

GİRİŞ

Rekombinant DNA teknolojisi, genetik materyalin laboratuvar ortamında kesilmesi, değiştirilmesi ve yeniden birleştirilmesi işlemidir. Kelime anlamı normalde bir arada bulunmaması gereken, farklı kaynaklardan elde edilmiş DNA'yı ifade eder. 1970'lerin başlarında Paul Berg ve diğer bilim insanları tarafından geliştirilen bu teknoloji, genetik mühendisliğin temellerini atmıştır. Özellikle bakterilerin virüs istilasına karşı savunma mekanizması olarak tanımlanan, DNA'yı belirli dizilerde kesen restriksiyon enzimlerinin keşfi bu sihirli dünyanın kapılarını aralamıştır. Bu teknolojinin gelişimi, doğada var olan organizmaların genetik yapılarının daha hızlı ve kesin bir şekilde değiştirilebilmesine olanak tanımıştır.

1. Rekombinant DNA Teknolojisinin Temelleri

Rekombinant DNA teknolojisinin temel adımları, DNA'nın izole edilmesi, kesilmesi, yeniden birleştirilmesi ve aktarılması süreçlerini içerir. Şekil 1'de Rekombinant DNA teknolojisinin çalışma prensibi ifade edilmiştir.



Şekil 1. Rekombinant DNA oluşumu

Bu süreçte kullanılan başlıca araçlar arasında restriksiyon enzimleri ve ligazlar yer alır. Restriksiyon enzimleri, DNA'yı belirli bölgelerden keserken, ligazlar kesilen DNA parçalarını birbirine bağlar. Ayrıca, genetik materyalin taşıyıcıları olan vektörler kullanılarak genetik materyalin başka hücrelere taşınması sağlanır. Bu teknolojinin temel prensipleri, biyoteknolojik uygulamalarda genetik mühendisliğin farklı alanlarında kullanılmak üzere uyarlanabilir. Rekombinant DNA teknolojisi, evrimsel biyolojiyle de derin bir ilişki içindedir. Bu teknoloji, organizmaların genetik yapısını değiştirme, yeni genetik kombinasyonlar oluşturma ve genetik materyali farklı organizmalar arasında transfer etme yeteneği sağlar.

2. Genetik Mühendislik ve Evrimsel Süreçler

Evrim, canlı organizmaların zaman içinde genetik materyallerindeki değişimlere dayalı bir süreçtir. Bu süreç, doğal seleksiyon yoluyla, çevresel koşullara en iyi uyum sağlayan organizmaların hayatta kalmasına ve üremesine olanak tanır. Rekombinant DNA teknolojisi, bu süreci hızlandırarak ve yönlendirerek evrimsel değişimlere etki edebilir. Genetik mühendislik sayesinde, istenilen genetik özelliklerin bir organizmaya eklenmesi veya silinmesi mümkün hale gelir.

Genetik mühendislik ile evrimsel süreçlerin hızlandırılması, bazı çevresel koşullara hızlı adaptasyon gereksinimlerini karşılamak adına faydalı olabilir. Ancak, bu müdahaleler uzun vadeli evrimsel etkiler yaratabilir ve doğal evrimsel dengeyi bozabilir. Bu noktada, genetik mühendislik ve doğal seleksiyon arasındaki farklar önemlidir. Genetik mühendislik, belirli genetik özellikleri doğrudan müdahale ederek değiştirirken, doğal seleksiyon rastgele mutasyonlar ve çevresel baskılar sonucu bu özelliklerin evrimsel süreç içinde gelişmesini sağlar.

Rekombinant DNA teknolojisinin evrimsel boyutlarından biri de yapay seleksiyondur. Bu kavram, doğada meydana gelen doğal

seleksiyonun insan kontrolünde yapılması anlamına gelir. Yapay seleksiyon, belirli özelliklere sahip organizmaların seçilmesi ve bu özelliklerin sonraki nesillere aktarılmasını sağlamaktır. Gıda üretiminde, özellikle tarımda, bu teknoloji sıklıkla kullanılır. Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO'lar) bu tür yapay seleksiyon örneklerindedir. Örneğin, pestisitlere karşı dirençli bitkiler ya da hastalıklara karşı daha dayanıklı hayvanlar üretilmesi gibi.

Yapay seleksiyonun evrimsel etkileri, yalnızca organizmaların fizyolojik ve morfolojik özelliklerini değil, aynı zamanda genetik çeşitliliği de etkileyebilir. Genetik çeşitliliğin kaybı, bir organizmanın çevresel değişimlere adaptasyon yeteneğini kısıtlayabilir. Dünyada canlı oluşumundan beri türlerin soylarının tükenmemesinde genetik varyasyonlar etkili olmuştur. Çok önemli salgınlarda dahi türlerin nesilleri devam etmiştir. Diğer taraftan, yapay seleksiyon, çevresel koşullara hızla uyum sağlayabilen organizmaların yaratılması açısından faydalı olabilir. Örneğin, tuzluluğa dayanıklı bitkiler, kuraklık gibi zorlu çevresel koşullarda tarım yapmayı mümkün kılabilir.

3. Genetik Modifikasyon ve Ekosistemler Üzerindeki Etkiler

Rekombinant DNA teknolojisinin ekosistemler üzerindeki etkileri, genetik mühendislik uygulamalarının en tartışmalı evrimsel boyutlarından biridir. Genetik modifikasyon, yalnızca hedef organizmalar üzerinde değişiklik yapmayı değil, aynı zamanda çevrelerindeki diğer organizmaları da etkileyebilir. Özellikle, genetik materyalin türler arası transferi, evrimsel süreçleri çok daha hızlı ve karmaşık hale getirebilir.

Rekombinant DNA teknolojisi, özellikle tarımda, genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. GDO'lar, doğada doğal olarak meydana gelmeyen genetik değişiklikleri içeren organizmalardır. GDO'ların yaygınlaşması, çevresel dengeyi bozma riski taşır. Özellikle, GDO'ların doğal türlerle

melezleşmesi, genetik çeşitliliğin azalmasına ve ekosistemlerde beklenmeyen değişimlere yol açabilir. Örneğin genetik olarak modifiye edilmiş mısır, Bt mısırı olarak bilinir ve *Bacillus thuringiensis* bakterisinin genini içeren bir türdür. Bu mısır, zararlılara karşı dirençlidir, ancak bazı eleştirmenler, GDO'ların ekosistem üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceği konusunda endişelerini dile getirmiştir. GDO'ların çevresel etki açısından bilinmeyen uzun vadeli sonuçları, ekosistemlere zarar verebilir ve biyolojik çeşitliliği tehdit edebilir. Ayrıca, GDO'ların, doğal bitkilerle melezleşmesi durumunda, genetik materyalin istenmeyen şekilde yayılma riski de vardır.

GDO'ların tarımdaki kullanımı, çevresel etik açısından da tartışılmaktadır. Doğal bitkiler ile GDO'ların arasında genetik geçişlerin yaşanması, doğal çeşitliliğin azalmasına yol açabilir ve ekosistemlerin dengesini bozabilir.

Genetik mühendislik, organizmaların çevresel faktörlere hızla adapte olmasına olanak tanırken, aynı zamanda direnç gelişimi gibi evrimsel zorlukları da beraberinde getirebilir. Örneğin, pestisitlere karşı genetik direnç kazanan bir bitki türü, zamanla bu bitkiye karşı bağışıklık geliştiren zararlılar yaratabilir. Bu durum, genetik mühendislik ile sağlanan yararın zamanla azalmasına ve çevresel dengeyi bozan daha güçlü organizmaların evrimsel olarak ortaya çıkmasına yol açabilir.

Bu tür evrimsel süreçler, genetik mühendislik uygulamalarının kısa vadede sağladığı faydaların uzun vadede sürdürülemez olmasına yol açabilir. Örneğin, genetik olarak modifiye edilmiş pestisitlere dirençli bitkilerle yapılan tarımda, zamanla bu direnç, doğadaki diğer organizmalar arasında da yayılabilir ve bu da tarım sisteminde yeni bir ekosistemsel mücadeleye yol açabilir.

4. İnsanların Evrimsel Yönü: Genetik Modifikasyonun İnsanlara Etkisi

Rekombinant DNA teknolojisinin evrimsel boyutunu tartışırken, insanların evrimsel geleceği üzerine de etkilerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. İnsan genomunun modifikasyonu, potansiyel olarak evrimsel süreçleri çok daha hızlı bir şekilde yönlendirebilir. Bu, genetik tedavi, genetik mühendislik ve hatta genetik seçim gibi uygulamaları içerir. İnsanlar üzerindeki genetik değişiklikler, yalnızca biyolojik özelliklerimizi değil, toplumsal yapıyı ve bireysel kimlikleri de dönüştürebilir. Örneğin, genetik mühendislik ile genetik hastalıkların tedavi edilmesi veya fiziksel ya da zihinsel özelliklerin iyileştirilmesi mümkün olabilir.

Bununla birlikte, genetik mühendisliğin insan genomu üzerinde yapacağı değişikliklerin evrimsel sonuçları da oldukça karmaşıktır. İnsanlar üzerinde yapılan genetik müdahalelerin, gelecekteki nesiller üzerinde beklenmeyen genetik etkiler yaratıp yaratmayacağı hâlâ netlik kazanmamıştır. Bunun yanında, insan evriminde etik sınırların çizilmesi de önemli bir tartışma konusudur.

5. Rekombinant DNA Teknolojisinin Neden Olduğu Etik Tartışmalar

Rekombinant DNA teknolojisi, genetik mühendislik alanında devrim yaratmış ve biyoteknolojinin çeşitli alanlarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Ancak, bu teknolojinin kullanımı, bilimsel toplulukta ve toplumda bazı etik tartışmalara yol açmıştır. Genetik mühendislik, canlı organizmaların genetik yapılarının değiştirilmesiyle, doğanın işleyişini değiştirme potansiyeline sahiptir. Bu da bazı önemli etik sorunları gündeme getirmektedir. Aşağıda, rekombinant DNA teknolojisinin yol açtığı bazı etik tartışmaları ve bu tartışmalarla ilgili örnekleri bulabilirsiniz.

Rekombinant DNA teknolojisinin insan genomu üzerinde kullanımı, bireylerin genetik yapısının değiştirilmesi ve potansiyel olarak "insan ırkı" üzerinde genetik müdahaleler yapılması konusunda etik tartışmaları gündeme getirmiştir. İnsanlar üzerinde yapılan genetik mühendislik uygulamaları, genetik hastalıkların tedavi edilmesi gibi faydalı sonuçlar doğurabileceği gibi, cinsiyet seçimi, genetik seçim ve tasarım bebekleri gibi daha karmaşık etik sorunlara da yol açabilir.

Örneğin, genetik hastalıkların tedavisi adına yapılan somatik genetik mühendislik çalışmaları, yalnızca bireyi etkileyen ve sağlığını iyileştirme üzerine etki ederken, germ hattı (üreme hücreleri) üzerinde yapılan müdahaleler, bu müdahalelerin sonraki nesillere aktarılmasına neden olabilir. Germline modifikasyonu, bireylerin genetik yapısının değiştirilmesiyle ilgili etik soruları beraberinde getirir, çünkü bu tür bir değişiklik, genetik miras üzerinde kalıcı bir etkiye sahip olabilir ve bireylerin genetik özgürlüğünü tehdit edebilir.

Örnek: 2018'de Çinli bilim insanı He Jiankui, dünyada ilk kez insan embriyosunun genetik mühendislik yoluyla değiştirilmesini gerçekleştirdiğini duyurdu. Bu araştırma, genetik mühendislik uygulamalarının etik sınırlarını aşan bir müdahale olarak büyük tepki aldı. He, genetik olarak HIV'ye dirençli bebekler yaratmayı amaçladığını belirtmişti, ancak bu tür bir müdahale, insan genomunun uzun vadeli evrimsel etkilerini değiştirebilir ve genetik ayrımcılığa yol açabilir. Bu olay, genetik mühendisliğin insanlara uygulanmasının etik açıdan ne kadar karmaşık ve riskli olabileceğini gözler önüne sermektedir.

Biyoteknolojik ürünlerin (örneğin, genetiği değiştirilmiş tohumlar) yüksek maliyetleri, küçük çiftçiler ve yoksul ülkeler için erişilebilir olmayabilir. Bu durum, özellikle tarımsal biyoteknoloji alanında, biyoteknolojik ürünlere erişimi sınırlayabilir ve ekonomik eşitsizlikleri derinleştirebilir. Örnek: 1990'larda, Terminator teknolojisi adı verilen bir biyoteknolojik uygulama geliştirilmiştir. Bu teknoloji,

genetik olarak değiştirilmiş tohumların, bir sonraki nesilde verim verememesi için tasarlanmıştır. Bu durum, özellikle küçük çiftçilerin, tohumlarını tekrar kullanamamaları ve biyoteknoloji şirketlerinin tohum pazarına daha fazla bağımlı hale gelmeleri anlamına gelmektedir. Terminator teknolojisinin yaygınlaşması, biyoteknolojinin büyük şirketlerin denetimine girmesi ve küçük çiftçilerin biyoteknolojiye olan bağımlılığını artırması açısından ciddi etik ve ekonomik sorunlar yaratabilir.

Genetik mühendislik ve biyoteknoloji, genetik verilerin toplandığı ve paylaşıldığı bir ortamda çalışır. Bu durum, genetik verilerin mahremiyeti konusunda endişelere yol açabilir. Bireylerin genetik bilgileri, kişisel sağlık bilgileri gibi hassas veriler içermektedir. Bu verilerin kötüye kullanımı, genetik ayrımcılığa neden olabilir. Örneğin, bir bireyin genetik yatkınlıkları, iş gücü piyasasında ya da sigorta şirketleri tarafından ayrımcılık amacıyla kullanılabilir. Mesela genetik testler, bazı hastalıkların gelişme riskini belirleyebilir. Ancak bu testlerin sigorta şirketleri tarafından, genetik hastalık riski taşıyan kişilere yüksek primler uygulamak için kullanılması, genetik ayrımcılık sorununu doğurur. ABD’de, Genetik Bilgi Ayrımcılığı Yasası (GINA), genetik bilgilerin sigorta şirketleri ve işverenler tarafından kullanılması konusunda bazı sınırlamalar getirse de, bu alandaki etik sorunlar hala devam etmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisinin yaygınlaşması, toplumların genetik mühendislik ile ilgili tutumlarını ve kültürel değerlerini değiştirebilir. Özellikle, genetik mühendislik ile yapılan uygulamalar, toplumların dini ve kültürel değerleriyle çatışabilir. Hindistan’da, genetiği değiştirilmiş organizmaların tarımda kullanımı konusunda ciddi toplumsal karşıtlıklar bulunmaktadır. Hindistan’da GDO’ların tarımsal kullanımı, çevresel, ekonomik ve kültürel kaygılarla karşı karşıyadır. Bazı gruplar, GDO’ların çevreye zarar verebileceğini ve geleneksel tarım yöntemlerini tehdit edebileceğini savunmaktadır.

SONUÇ

Rekombinant DNA teknolojisi, evrimsel süreçlere müdahale etme yeteneğine sahip güçlü bir araçtır. Bu teknoloji, canlı organizmaların genetik yapılarının değiştirilmesi ve yeni genetik kombinasyonlar oluşturulması yoluyla evrimsel süreçlerin hızlanmasına ve yönlendirilmesine olanak sağlar. Ancak, doğal evrimsel süreçlerle karşılaştırıldığında, genetik mühendislik ve yapay seleksiyon uygulamalarının evrimsel sonuçları, bilinmeyen ve karmaşık etkiler doğurabilir. İnsan genomu üzerindeki genetik mühendislik müdahaleleri, çevresel etkiler, biyoteknolojik ürünlere erişim, genetik verilerin mahremiyeti ve kültürel değerlerle ilgili tartışmalar, biyolojik silah tasarımları, salgın hastalıkların oluşturulması bu teknolojinin etik yönlerinin ne kadar karmaşık ve çok boyutlu olduğunu gösterir. Bu nedenle, genetik mühendislik ve biyoteknolojinin gelişimi, yalnızca bilimsel ve teknolojik değil, aynı zamanda etik ve toplumsal boyutlarıyla da ele alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Berg, P., et al. (1972). "Recombinant DNA: The Experimental Approach." Science.
- Cyranoski, D. (2019). "Chinese scientist who created world's first genetically edited babies condemned." Nature.
- Doudna, J.A., & Charpentier, E. (2014). "The New Frontier of Gene Editing." Science.
- Gasser, C. S. (2018). "Genetic Modification and Evolutionary Considerations." Nature Biotechnology.
- James, C. (2011). "Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011." ISAAA Brief No. 43.
- Séralini, G.E., et al. (2012). "Long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize." Environmental Sciences Europe.
- Shiva, V. (2000). Stolen Harvest: The Hijacking of the Global Food Supply. South End Press. ISTA (International Seed Testing Association) (2013) International Rules for Seed Testing Edition, Zurich, Switzerland.
- Watson, J.D., et al. (2007). Molecular Biology of the Gene. Pearson.

BÖLÜM 2

BUĞDAYDA Cd AĞIR METAL STRESİNİN RETROTRANSPOZON HAREKETLİLİĞİNE ETKİSİ

Doç. Dr. Hüseyin BULUT¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14553560>

¹ Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Erzincan.

Orcid No: 0000-0003-3424-7012. huseyinbulut@erzincan.edu.tr

GİRİŞ

Retrotranspozonlar, genetik materyalin önemli bir parçasını oluşturan mobil DNA elemanlarıdır. Genetik materyal içinde belirli bölgelerde bulunan retrotranspozonlar, kendilerini bir konumdan diğerine taşımak için ters transkripsiyon (reverse transcription) mekanizmasını kullanır. Bu hareketlilik, organizmanın genomunda genetik çeşitliliği ve potansiyel olarak evrimsel değişiklikleri teşvik eder. Bununla birlikte, retrotranspozonların hareketliliği yalnızca genetik yapıyı değil, aynı zamanda epigenetik değişiklikleri de etkileyebilir.

Epigenetik değişiklikler, DNA dizisini değiştirmeksizin gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilişkilidir ve retrotranspozonlar, gen ekspresyonunu modüle eden önemli epigenetik mekanizmaları tetikleyebilir. Retrotranspozonlar, genomda hareket edebilen ve RNA aracılığıyla kendi kendilerini kopyalayarak bir konumdan diğerine taşınabilen DNA elementleridir. Retrotranspozonların temel özelliği, genetik materyaldeki hareketliliklerinin, genomdaki DNA dizisinin büyük bölümlerinin veya küçük elemanlarının tekrar çoğalmasına yol açabilmesidir. Bu süreç, retrotranspozonların genomda kopyalanmalarına ve genişlemelerine yol açabilir.

Retrotranspozonlar, genomda çeşitli bölgelere yerleşebilir ve bu da genlerin doğrudan ekspresyonunu değiştirebilir. Retrotranspozonların genetik hareketliliği, genlerin bulunduğu bölgelerdeki kromatin yapısını değiştirebilir ve bu da gen ekspresyonunu etkileyebilir. Retrotranspozonlar, yerleştikleri bölgenin çevresindeki genlerin susturulması veya aktive edilmesi için epigenetik mekanizmaları tetikleyebilir.

Retrotranspozonların bu hareketliliği neticesinde genomda meydana gelen değişimler Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) marker sistemi ile analiz edilmekte ve genomda

oluşan farklılıklar değerlendirilebilmektedir. Bu yöntemin temel mekanizmasının bazı başmakları mevcuttur. Bunlar;

- ✓ DNA'nın izolasyonu
- ✓ PCR ile DNA'nın klonlanması
- ✓ Elektroforez ile DNA'nın elektrik akımında yürütülerek büyüklüğüne göre sıralanması
- ✓ UV kamera ile DNA bant motiflerinin görüntülenmesi
- ✓ Elde edilen görüntülerden bant büyüklük, sayı gibi farklılıkların tespiti
- ✓ İstatiksel olarak benzerlik ya da farklılıkların tespiti.

Bu bölümde farklı dozlarda kadmiyum ağır metale maruz kalan buğday örneklerinde etkili olan stresin retrotranspozon hareketliliğindeki rolü analiz edilecektir.

1. Örneklerin yetiştirilmesi ve Cd uygulaması

Aynı büyüklükte seçilen buğday (*Triticum aestivum* L.) tohumları sterilize edildi ve ardından saf suyla durulandı. Tohumlar çift katmanlı kurutma kâğıdı bulunan pedrilere yerleştirildi. Kontrol, 50 µM, 100 µM ve 150 µM olarak 4 grup oluşturuldu. Cd stresini değerlendirmek için, deney gruplarındaki her pedri kabına 50, 100 ve 150 µM konsantrasyonlarında 20 ml CdCl₂ ile muamele edildi. Kontrol grubu sadece su ile sulandı.

2. DNA izolasyonu

Bitki örneklerinden DNA izolasyonu, PCR tabanlı bir işaretleyici sistem olan Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) yöntemi kullanılarak analiz için gerçekleştirildi. Shagai-Marooft ve meslektaşlarının protokolü, buğday örneklerinden genomik DNA izole etmek için biraz değiştirildi. Ekstraksiyon çözeltisi 1 M TRIS-HCl, 5 M NaCl, 0,5 M EDTA, %2 CTAB, %0,2 β-merkaptotanol ve %0,1 Na₂S₂O₃ ile hazırlandı.

3. PCR Aşaması

Genomik DNA, toplam hacmi 500 µl olan bir PCT tüpüne PCR ana karışımı ile eklendi ve PCR uygulaması yapıldı. PCR uygulaması için PCR buffer, dNTPs, ultra saf su, primer, genomik DNA ve MgCl₂ karışımı hazırlandı. PCR döngü sayısı, süresi ve sıcaklıkları ayarlanarak gerçekleştirildi.

4. Elektroforez

PCR ile çoğaltılan genomik DNA ürünlerinin görüntülenebilmesi ve bant büyüklüklerinin tespiti için agaroz jel üzerinde elektrik akımında yürütüldü. Bu işlem 90 voltta 100 dakika gerçekleştirildi. UV kamera ile elde edilen DNA bant desenleri görüntülendi.

5. Görüntü Analizi

Elde edilen bant sayıları, bantların büyüklüğü, yeni oluşan veya kaybolan bantlar analiz edildi ve genomun kararlılığı hesaplandı.

6. Elde Edilen Veriler

Bant büyüklükleri, yeni oluşan bant varlığı ve/veya var olan bantın kaybolması gibi değişkenler kontrol gurubu örnekler ile karşılaştırılarak ortaya çıkan farklılık polimorfizm olarak ifade edilir. En yüksek polimorfizm oranı 150 µM CdCl₂ uygulamasında %61.48 olarak bulundu. Polimorfizm değerleri 100 µM CdCl₂ uygulamasında %44.12 ve 50 µM CdCl₂ uygulamasında %30.42 olarak bulundu. Stres kaynaklı polimorfizmlerin oluşması genetik kararlılığın azalması anlamına gelir yani polimorfizm ile genetik kararlılık ters orantılıdır. Bu çalışmada uygulanan CdCl₂ stresinin neden olduğu polimorfizmlerin buğdayın GTS değerini negatif yönde etkilediği belirlenmiştir. CdCl₂ dozundaki artış GTS değerini ters yönde etkilemiştir. En düşük GTS değerleri sırasıyla 150 µM CdCl₂, 100 µM CdCl₂ ve 50 µM CdCl₂ uygulamalarında %38,52, %55,88 ve %69,58 olarak bulunmuştur. IRAP analiz sonuçlarının ayrıntıları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Elde edilen GTS değerleri ve polimorfizm oranları

	50 μM CdCl ₂	100 μM CdCl ₂	150 μM CdCl ₂
Polimorfizm Oranı	%30.42	%44.12	%61.48
GTS Değeri	%69.58	%55.88	%38.52

Elde edilen veriler Şekil 1’de ifade edilmiştir.



Şekil 1. Elde edilen GTS ve polimorfizm oranları

SONUÇ

Retrotranspozonlar, genomda hareket edebilen ve epigenetik değişimlere yol açabilen önemli genetik elementlerdir. Bu elementlerin hareketliliği, genetik çeşitliliği ve organizmanın fenotipik özelliklerini etkileyebilir. Bu çalışmada da Cd ağır metalinin neden olduğu stresin retrotranspozonların hareketliliğine neden olduğu belirlenmiştir. Bu durum genetik kararlılığı olumsuz yönde etkileyerek istikrarsızlığa neden olmaktadır.

KAYNAKLAR

- Hohjoh, H., & Matsumoto, T. (1998). "L1 retrotransposition is regulated by DNA methylation." *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 30779–30782.
- Kazazian, H. H. (2004). "Mobile elements: drivers of genome evolution." *Science*, 303(5656), 1626–1632.
- Saghai-Marroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW, 1984. Ribosomal DNasepacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population Dynamics. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 81: 8014-8019.
- Slotkin, R. K., & Martienssen, R. A. (2007). "Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes." *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 272-285.
- Wilke, C. M., & Nüsslein-Volhard, C. (2014). "Epigenetic regulation of transposon activity." *Nature Reviews Genetics*, 15(10), 650–664.

BÖLÜM 3

BAZI PISTACIA L. TÜRLERİNİN KLOROPLAST DNA DATASI KULLANILARAK FİLOGENETİK ANALİZİ

Prof. Dr. Arif PARMAKSIZ¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14553562>

¹ Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 63100, Şanlıurfa, Türkiye. E mail: aprmksz@gmail.com; ORCID: 0000-0003-0321-8198.

GİRİŞ

Anacardiaceae familyasına ait olan Pistacia cinsi taksonomik çalışmalara bağlı olarak tür sayısı değişmektedir (Zohary 1952, Whitehouse 1957; Zohary 1962; Ribakov ve Ostrouhova 1972; Parfitt ve Badenes 1997; Katsiotis ve ark. 2003). Bu cins, genellikle kuzey yarımküredeki tropikal ve subtropikal bölgelerde yayılış gösterir (Khanazarov ve ark. 2009). Pistacia L. cinsine ait türler ekonomik öneme sahip olup, bazı türleri halk arasında içecek ve gıda katkı maddesi, aromatik tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Kafkas ve ark., 2002; Ateş ve ark., 2018). Bu ekonomik özelliklerden dolayı, bu türler üzerine morfolojik, ekolojik ve genetik çalışmalar yapılmaktadır. Bunun sonucunda Pistacia L. türlerinde tür içi melezleşmenin yüksek bulunduğu ve tozlaştırıcı ajanların etkisiyle, kontrolsüz melezleşmeye eğilimli gösterdikleri ve böylece yeni türlerin oluştuğunu tespit edilmiştir (Ateş ve ark., 2018). Pazouki ve ark., (2010) genetik çalışmasında; İran çeşitlerinin yabancı çeşitlerden farklı bir genetik geçmişe sahip olduğunu, bu nedenle genetik koruma ve gelecekteki ıslah programlarının planlanması açısından önemini konusunu vurgulamışlardır. Ayrıca, farklı türler ve popülasyonlar arasında içlerinde farklı genetik çeşitlilik seviyelerinin mevcut olduğunu ve İran çeşitleri ile yabancı *P. vera* popülasyonları arasında gen akışının meydana geldiğini belirlemişlerdir. Mevcut çalışma, tüm türlerin korunması ve sürdürülebilir kullanımı için politika yapıcılar ve bilim insanları için pratik bilgiler sunmaktadır (Pazouki ve ark., 2010). İran, aynı zamanda üç yabancı antepfıstığı türüne ev sahipliği yapmaktadır: *P. vera*, *P. khinjuk* ve *P. atlantica* (Pazouki ve ark., 2010). *P. atlantica*, üç alt türden oluşmaktadır (mutica, kurdica ve cabolica) (Khatamsaz 1988). İran, dünyadaki en büyük antepfıstığı üreticisi olmasına rağmen, İran antepfıstığı endüstrisi, çoğunlukla Ohadi, Ahmad Aghaei, Fandoghi, Akbari ve Kalle Ghoochi gibi sınırlı sayıda çeşide dayanmaktadır ve bu çeşitler, ekili alanın %95'inden fazlasını

kapsamaktadır (Pazouki ve ark., 2010). *Pistacia vera* L. adlı tür ise bu cinste yetiştirilen ve ticari olarak üretilen tek türdür (Zohary 1996). *Pistacia* L. cinsine ait türlerin yaşadığı doğal habitatların tahrip edilmesi ve geleneksel tarım yöntemlerinden modern yöntemlere geçiş, genetik erozyona ve önemli genetik kaynakların kaybına yol açabilir (Hormaza ve ark. 1998; (Pazouki ve ark., 2010). Ayrıca *Pistacia* türlerinin tür içi hibritleşmeye açık olmaları sebebiyle moleküler seviyede taksonomi çalışmalara ve moleküler filogenetik ilişkilerin de yapılması gerekmektedir (AL-Saghir,2010; (Ateş ve ark., 2018).

Bu bölümde, gen bankasında (NCBI=National Center of Bionformatic Information) kayıtlı *Pistacia* L. türlerine ait sekanslar kullanılarak *Pistacia* L. türlerinin Kloroplast DNA gen bölgelerine dayalı moleküler filogenetik ilişkileri belirlenmiştir.

BAZI PISTACIA TÜRLERİ ve ÖZELLİKLERİ

***Pistacia lentiscus* L.**

Sakız ağacı olarak bilinen bu tür, Dünyada Avrupa, Asya, Afrika olmak üzere birçok bölgede Akdeniz ikliminin hâkim olduğu kıyı kesimlerinde doğal olarak yayılış göstermektedir (Ak ve Parlakçı, 2009). *P. lentiscus* L. herdem yeşil ve çalı formunda bir bitki olmasından dolayı diğer yaygın türlerden ayırt edilebilir (Akdemir ve ark., 2013). *P. lentiscus* bitkisinin hem yaprak hem de meyvesindeki uçucu yağlar ve reçineden dolayı endüstri ve sağlık bakımından ekonomik öneme sahiptir (Akdemir ve ark., 2013). Farklı kısımları, gallik asit, antosiyaninler, flavonol glikozitler, triterpenoidler, tokoferol ve arabinogalaktan proteinleri gibi tıbbi açıdan önemli çeşitli kimyasal bileşenler içerir (Bouyahya ve ark., 2018). Lentiskin sağlık artırıcı özellikleri, ayrıca fenolik bileşikler gibi çeşitli biyolojik olarak aktif bileşiklerin (BAC'ler) varlığına da bağlanmaktadır (Bampouli ve ark., 2015). Bu bitkide birçok fenolik asit tespit edilmiştir ve bunlar arasında gallik asit ve galloyl türevleri başlıca bileşiklerdir (Sehaki ve ark.,

2023). Flavonoidler açısından, myricetin-3-O-ramnosid'in baskın flavonol glikozit olduğu, quercetin-3-glukozid'in ise *P. lentiscus*'taki başlıca flavonol olduğu bulunmuş olup, *P. lentiscus* özlerinin, bu bitkinin geleneksel kullanımlarıyla uyumlu olarak, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (Sehaki ve ark., 2023).

***Pistacia chinensis* Bunge**

Çin sakız ağacı veya Çin fıstığı (*Pistacia chinensis* Bunge) olarak bilinen bu tür, Anacardiaceae familyasına ait, yaprağını döken odunsu bir yağlı ağaç türü olup Çin'e özgüdür ve geniş bir alana yayılmaktadır (Guo ve ark., 2022). Çin fıstığının dağılımı, Orta Asya ve Güney Çin'de iki ana merkezden oluşmakta olup, bazı bölgeleri de Güney Japonya ve Endonezya Adaları'nda bulunmaktadır (Kozhoridze ve ark., 2015). Biyodizel üretimi için uygun bir hammadde olarak öne çıkmakta olup, tohumlarından elde edilen yağ, biyodizel üretiminde kullanılabilir (Qin ve ark., 2010; Qin ve ark., 2012). Tıbbi açıdan da önemli özelliklere sahiptir. Bitkinin metanol özütü, trombosit agregasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler koruyucu etki gösterebilir (Park et al., 2012). Ayrıca, anti-enflamatuvar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu da belirlenmiştir (Yayeh et al., 2012).

***Pistacia terebinthus* L.**

Menengiç, Bıttım veya Çitlembik olarak (*Pistacia terebinthus*) bilinen bu tür, iki ila üç metre boyunda çalı formunda veya on metreye kadar uzanan ağaç formunda görülebilir. Olgun meyvelerinden yapılan bir içecek, "menengiç kahvesi" olarak bilinir ve Anadolu halkı tarafından yaygın bir şekilde tüketilmektedir (Akyüz ve ark., 2022). Terebinth meyvelerinden üretilen "bıttım sabunu", özellikle Güneydoğu Anadolu'da saçları güçlendirmek ve dökülmesini önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Akyüz ve ark., 2022). Ayrıca bu bitki, farklı biyolojik aktivitelere sahip olup, yanık tedavisi, astım gibi

geleneksel tedavilerde kullanılmakta ve Türkiye'de bronşit için antiseptik olarak kullanılmaktadır (Kavak ve ark., 2010). Meyve özleri, apigenin, luteolin, luteolin 7-O-glukozit, kuersetin ve kempferol gibi flavonoidler içermektedir (Kavak ve ark., 2010).

***Pistacia vera* L., 1753**

Pistacia vera L., yaygın adıyla Urfa fıstığı ve Antep fıstığı olarak bilinen bu tür ekonomik, besleyici değeri bulunan bir sert kabuklu meyvesi olan bir ağaç türü olup özellikle meyveleri tekli doymamış yağ asitleri, proteinler, mineraller ve tokofenoller, steroller ve fenolik bileşikler gibi biyolojik olarak aktif bileşenler bakımından zengindir (Ismail et al., 2022). FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Database) 2022 verilerine göre, Fıstık üretimi son birkaç on yılda dramatik bir şekilde artmıştır; 1970'te yaklaşık 50 bin ton olan küresel üretim, 2000'de 500 bin tona çıkmış ve 2020'de ise 1 milyon tondan fazla olmuş, en önemli alan artışları, neredeyse üç katına çıkarak, Ürdün, Madagaskar, Kırgızistan, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki California, Türkiye, Özbekistan, Azerbaycan ve Meksika'da gerçekleşmiştir. Ancak, İran, Türkiye ve ABD en yüksek Antep fıstığı üretimini sürdürmeye devam etmektedir.

***Pistacia atlantica* Desf., 1799**

Atlas Sakızı olarak bilinen bu tür, dünyanın dört bir yanında yaygın olarak dağılmış bir kserofitik ağaç türüdür (Zohary, 1996; AlSaghir & Porter, 2012). Bu tür nemli, yarı kurak veya kurak bölgelerde yetişebilmekte olup, İran-Turan ve Akdeniz bölgesinde dağılım gösterir (Yılmaz ve ark., 2023). *P. atlantica*, antik zamanlardan beri Orta Doğu ve Akdeniz bölgelerinde yaygın olarak kullanılan başlıca bitkisel ilaç olup, mide hastalıkları, böbrek rahatsızlıkları, yaralar ve öksürük gibi birden fazla amaç için kullanılmıştır (Mahjoub ve ark., 2018).

***Pistacia integerrima* JLStewart 1969**

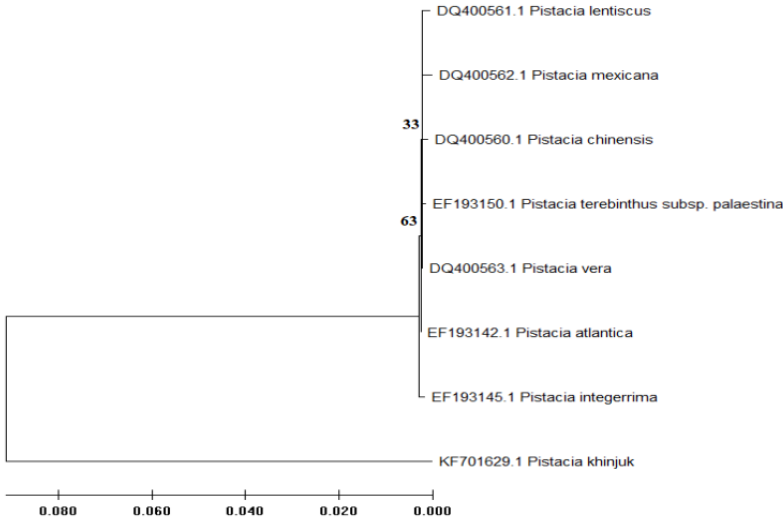
P. integerrima, tek gövdeli, dioik bir bitki türü olup, Himalaya bölgesinde eşit şekilde yayılmakta olup, steroidler, flavonoidler, tanenler, saponinler ve fenoller gibi ikincil metabolitlerin deposu olarak kabul edilmektedir (Grover, 2021). Ayurveda, Unani ve Siddha gibi geleneksel tıp sistemlerinde ve halk tedavi uygulamalarında astım, ishal, dizanteri, ateş, kusma, cilt hastalıkları, solunum rahatsızlıkları ve sedef hastalığı, iştah açıcı, hepatit, karaciğer hastalıkları, oksidatif stres ve hiperürisemiye karşı tedavi amacıyla yaygın bir şekilde kullanılan bir bitkidir (Rauf ve ark., 2017; Sharwan ve ark., 2017; Grover, 2021).

***Pistacia khinjuk* Stocks, 1852**

P. khinjuk, Türkiye, İran, Irak ve Suriye gibi bazı Asya ülkelerinde doğal olarak yetişir (Karimi ve ark., 2012). Yaprak dökün, dioik ve kserofit bir bitki türü olup, çoğunlukla kaya ve dik yamaçlarda, orman içinde yada sesil bir şekilde bulunmaktadır (Ghaemmaghami ve ark., 2009). Küçük ila orta büyüklükte bir ağaç veya büyük bir çalı formunda bulunabilir. *P. khinjuk*'un meyvesi, çiçeklenme döneminden sonra yeşil renkte başlayıp, olgunlaştıkça kırmızımsı bir renk alır. Bu meyve, yenilebilir olan ve içerdiği yüksek yağ oranı ile bilinen kabuklu bir meyvedir. *P. khinjuk*'un bazı bileşenleri, geleneksel olarak iltihaplanma ve mikroplara karşı mücadelede kullanılmıştır. Yağı, cilt üzerinde yatıştırıcı etkiler yaratabilir ve cilt yaralarının iyileşmesini hızlandırabilir. *P. khinjuk* doğal ortamlarında genellikle yaygın olsa da, bazı bölgelerde habitat kaybı ve aşırı kesim gibi tehditlerle karşı karşıya kalmıştır. Çevresel faktörler ve iklim değişikliği de bu bitkinin gelecekteki popülasyonunu etkileyecektir. Bu tür yalnızca çevresel ve tıbbi faydalarıyla değil, aynı zamanda yenilebilir yağı ve ekonomik kullanımlarıyla da önemli bir bitki türüdür.

FİLOGENETİK ANALİZ

NCBI gen bankasında *Pistacia* türlerine ait kloroplast DNA dizileri taranmış ve BLAST tekniği uygulanarak buradan alınan sekans verileri kullanılarak analiz edilmiştir. Bu bölümde kullanılan türlere ait diziler, BioEdit 7.2.5 yazılımı ile hizalanmıştır. Daha sonra MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılmış ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur.



Şekil 1. *Pistacia* cinsine ait bazı türlerin kloroplast gen bölgesi dizilerine Dayalı Filogenetik Ağaç

Şekil 1’ de kloroplast DNA bölgesine dayalı En Yüksek Olasılık yöntemine göre *Pistacia* türlerinin gen bankasından alınan dizileri ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Buna göre *P. khinjuk* türünün diğer türlerden bariz bir şekilde ayrıldığı ve ayrı dal üzerinde yerleştiği görülmüştür. Ayrıca birbirine en yakın türlerin ise *P. lentiscus* ve *P.*

mexicana olduğu ve genetik olarak birbirine çok benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Filogenetik çalışmalar, organizmaların evrimsel ilişkilerini anlamak ve türler arasındaki atasal bağları belirlemek amacıyla yapılır. Bu çalışmalar, farklı organizmaların ortak atalardan nasıl evrimleştiğini ve zaman içinde nasıl değiştiklerini ortaya koymak için genetik, morfolojik ve diğer biyolojik verileri kullanır. Filogenetik analizler şu amaçlarla yapılabilir: Türlerin, ailelerin veya diğer taksonomik grupların evrimsel olarak birbirleriyle nasıl bağlantılı olduklarını anlamak. Yeni keşfedilen türlerin evrimsel ağaçta hangi konumda olduğunu belirlemek. Farklı türlerin evrimsel tarihleri ve çeşitliliği hakkında derinlemesine bilgi edinmek. Genetik verileri kullanarak organizmaların genetik çeşitliliğini ve evrimsel değişimlerini incelemek. İnsanlar veya diğer hayvanlardaki genetik hastalıkların evrimsel bir perspektiften nasıl evrimleştiğini araştırmak. Türlerin coğrafi dağılımını anlamak ve bu dağılımın evrimsel tarihleriyle nasıl ilişkili olduğunu belirlemek. Filogenetik analizler, biyolojik ve ekolojik verilerle birleştirildiğinde organizmaların geçmişi ve geleceği hakkında önemli bilgiler sunar.

KAYNAKÇA

- Ak, B. E., & Parlakcı, H. (2009). *Pistacia lentiscus* in the Mediterranean Region in Turkey. *Acta Horti*, 818, 77-82.
- Akdemir, Ö. F., Tilkat, E., Onay, A., Kılınç, F. M., Süzerer, V., & Çiftçi, Y. Ö. (2013). Geçmişten günümüze sakız ağacı *Pistacia lentiscus* L. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 3(2), 1-28.
- Akyuz, M., Yabo-Dambagi, L., Kilic, T., & Cakir, A. (2022). Antidiabetic, neuroprotective and antioxidant potentials of different parts of *Pistacia terebinthus* fruits. *South African Journal of Botany*, 147, 443-456.
- Al-Saghir, M.G. & Porter, D.M. (2012). Taxonomic revision of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae). *American Journal of plant sciences*, 3, 12-32
- Ateş, M. A., Yıldırım, Z., & Yağan, D. (2018). Türkiye’de Doğal Yayılış Gösteren Bazı *Pistacia* L. Türlerinin ITS Gen Bölgesi Kullanılarak Dünya’da ki Diğer Türlerle Moleküler Filogenetik İlişkilerinin Belirlenmesi. *21. Yüzyılda Fen ve Teknik*, 2(10), 59-68.
- Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Aligiannis, N., Magoulas, K., & Krokida, M. (2015). Evaluation of total antioxidant potential of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering*, 167, 25-31.
- Bouyahya, A., Dakka, N., Talbaoui, A., Moussaoui, N. E., Abrini, J., & Bakri, Y. (2018). Phenolic contents and antiradical capacity of vegetable oil from *Pistacia lentiscus* (L). *J. Mater. Environ. Sci*, 9(5), 1518-24.
- Ghaemmaghami, L., Attar, F., Ghahreman, A., & Rahiminejad, M. R. (2009). Geographical, morphological and taxonomic status of *Pistacia khinjuk* Stocks ex Stocks in Iran. *Iranian Journal of*

- Science, 33(1), 23-29.
- Grover, M. (2021). *Pistacia integerrima* (Shringi)-a plant with significant pharmacological activities. *The Journal of Phytopharmacology*, 10(5), 323-330.
- Guo, H., Liu, Y., Wang, H., & Li, S. (2022). Study on the dormancy characteristics of Chinese pistache (*Pistacia chinensis* Bunge) seeds. *Forests*, 13(9), 1521.
- Hormaza JI, Dollo L, Polito VS (1994) Determination of relatedness and geographic movements of *Pistacia vera* (Pistachio; Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. *Econ Bot* 48:349–358
- Ismail, N., Chan, K. W., Mastuki, S. N., Saad, N., & Razis, A. F. A. (2022). Biological activities of pistachio (*Pistacia vera*) oil. In *Multiple Biological Activities of Unconventional Seed Oils* (pp. 279-293). Academic Press.
- Kafkas, S., Kafkas, E., and Perl-Treves, R. (2002). Morphological diversity and a germplasm survey of three wild *Pistacia* species in Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49(3), 261-270.
- Karimi, H. R., Abadi, M. H. H., & Kohbanani, A. M. (2012). Genetic diversity of *Pistacia khinjuk* Stocks. using RAPD markers and leaf morphological characters. *Plant systematics and evolution*, 298(5), 963-968.
- Katsiotis A., Hagidimitriou, M., Drossou, A., Pontikis, C., Loukas, M. (2003). Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. *Euphytica* 132:279–286.
- Kavak, D. D., Altıok, E., Bayraktar, O., Ülkü, S. (2010). *Pistacia terebinthus* extract: As a potential antioxidant, antimicrobial and possible β -glucuronidase inhibitor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(3-4), 167-171.
- Khanazarov, A. A., Chernova, G. M., Rakhmonov, A. M., Nikolyi, L. V., Ablaeva, E., Zaurov, D. E., Funk, C. R. (2009). Genetic

- resources of *Pistacia vera* L. in Central Asia. Genetic resources and crop evolution, 56, 429-443.
- Khatamsaz, M. (1988) Flora of Iran No. 30: Anacardiaceae. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran.
- Kozhoridze, G., Orlovsky, N., Orlovsky, L., Blumberg, D. G., & Golan-Goldhirsh, A. (2015). Geographic distribution and migration pathways of *Pistacia*—present, past and future. *Ecography*, 38(11), 1141-1154.
- Mahjoub, F., Rezayat, K. A., Yousefi, M., Mohebbi, M., & Salari, R. (2018). *Pistacia atlantica* Desf. A review of its traditional uses, phytochemicals and pharmacology. *Journal of medicine and life*, 11(3), 180.
- Parfitt, D.E., Badenes, M.L. (1997) Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7987–7992.
- Park, J. Y., Hong, M., Hyun, E., Jia, Q., Rhee, M. H., Cho, J. Y., Lee, Y.-C., Yayeh, T., & Kwak, D.-M. (2012). *Pistacia chinensis* Methanolic Extract Attenuated MAPK and Akt Phosphorylations in ADP Stimulated Rat Platelets In Vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012(16), 1–7.
- Pazouki, L., Mardi, M., Shanjani, P. S., Hagidimitriou, M., Pirseyedi, S. M., Naghavi, M. R., ... & Khayam Nekoui, S. M. (2010). Genetic diversity and relationships among *Pistacia* species and cultivars. *Conservation genetics*, 11, 311-318.
- Qin, S., Shi, C., Ren, X., Sun, Y., He, L., & Meng, Y. (2012). Deacidification of *Pistacia chinensis* Oil as a Promising Non-Edible Feedstock for Biodiesel Production in China. *Energies*, 5(8), 2759–2770.
- Qin, S., Sun, Y., Zhang, S., & Meng, X. (2010). Production and Analysis of Biodiesel from Non-Edible Seed Oil of *Pistacia Chinensis*. *Energy Exploration & Exploitation*, 28(1), 37–46.

- Rauf, A., & Patel, S. (2017). Pistagremic acid as a broad spectrum natural inhibitor from *Pistacia integerrima* Stewart. *Natural product research*, 31(4), 367-368.
- Ribakov, A.A., Ostrouhova, S.A. (1972) *Horticulture of Uzbekistan*, 3rd edn. Ukituvchi, Tashkent, pp 43–44.
- Sehaki, C., Jullian, N., Ayati, F., Fernane, F., & Gontier, E. (2023). A review of *Pistacia lentiscus* polyphenols: Chemical diversity and pharmacological activities. *Plants*, 12(2), 279.
- Sharwan, G., Jain, P., Pandey, R., & Shukla, S. S. (2016). Toxicity and safety profiles of methanolic extract of *Pistacia integerrima* JL Stewart ex Brandis (PI) for Wistar Rats. *Journal of pharmacopuncture*, 19(3), 253.
- Whitehouse, W.E. (1957) The pistachio nut—a new crop for the western United States. *Econ Bot* 11:281–321
- Yayeh, T., Rhee, M. H., Jia, Q., Hyun, E., Hong, M., Lee, Y.-C., Kim, H.-J., & Kim, T.-W. (2012). *Pistacia chinensis* Inhibits NO Production and Upregulates HO-1 Induction via PI-3K/Akt Pathway in LPS Stimulated Macrophage Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 40(05), 1085–1097.
- Yılmaz, A., Özuslu, E., & Sarpkaya, K. (2023). *Pistacia atlantica* Desf. türünün Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde Yayılış Alanları ve Taksonomik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 26(6), 1259-1267.
- Zohary M (1952) A monographical study of the genus *Pistacia*. *P J Bot Ser* 5(4):187–228.
- Zohary M (1962) A monographical study of *Pistacia*. *Palestine J Bot* 5:187–228.
- Zohary, D. (1996). The genus *pistacia*. (Taxonomy, distribution, conservation and uses of *pistacia* genetic resources). *International Plant Genetic Resources Institute*, Palermo, Italy: Eds. Padulosii S, Caruso T, & Barone E, 1-11.

BÖLÜM 4

TERMOFİLLERİN BİYOTEKNOLOJİ VE ENDÜSTRİDEKİ KULLANIM ALANLARI

Dr. Öğr. Üyesi Demet HANÇER AYDEMİR¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14553565>

¹ Süleyman Demirel University, Isparta Vocational School of Health Services, Department of Medical Services and Techniques, Isparta, Türkiye, demetaydemir@sdu.edu.tr, ORCID ID 0000-0003-0174-8769

GİRİŞ

Termofiller, 45°C ile 70°C arasındaki sıcaklıklarda yaşayan türlerdir. 60°C'nin üzerinde yaşayan termofilik mikroorganizmaların çoğunluğu Arkelere aittir. Termofilik mikroorganizmalar üç sınıfa ayrılır: 45°C sıcaklıkta hayatta kalan orta derecede termofilik; 70°C ile 80°C arasında hayatta kalabilen aşırı termofilik; ve 80°C'de optimum büyüme sergileyen hipertermofilik mikroorganizmalar (Saxena vd., 2015; Mirete vd., 2016; Mohammad vd., 2017). Yüksek sıcaklıklarda büyümenin ve benzersiz makromoleküler özelliklerin bir sonucu olarak termofiller yüksek metabolizmaya, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı enzimlere ve benzer mezofilik türlere göre daha düşük büyüme ancak daha yüksek son ürün verimine sahiptirler (Haki ve Rakshit, 2003).

Jeotermal alanlar, termofilik mikroorganizmaların ana yaşam alanlarının kaynağı olarak kabul edilir (Mohammad vd., 2017). Termofilik mikroorganizmaların yüksek sıcaklıklar, yüksek tuzluluk, asidik ve alkali pH değerleri ve yüksek radyasyon gibi çeşitli aşırı koşullarda hayatta kaldığı bilinmektedir (Mirete vd., 2016). Termofillerin her yerde bulunabilen doğası, kaplıcalardan (Ghelani vd., 2015) Sahra Çölü'nün kumlarına (Charlier ve Droogmans, 2005) kadar izole edildikleri çok çeşitli kaynaklarla kanıtlanmıştır. Deniz tabanının jeotermal olarak ısıtılan bölgelerinde bulunan *Pyrodictium* cinsi bir hipertermofil olup minimum, optimum ve maksimum gelişme sıcaklıkları sırasıyla 82°C, 105°C ve 110°C şeklindedir (Charlier ve Droogmans, 2005; Sar vd., 2013). Bilinen en termofilik organizma olan *Pyrolobus fumarii* ise 90-113°C sıcaklık aralığında gelişebilmektedir. Yaşamın mümkün olduğu üst sıcaklık hala bilinmemektedir, ancak muhtemelen 120°C'nin çok üzerinde değildir (Vieille ve Zeikus, 2001).

Termofilik organizmaların ısı toleransını etkileyen faktörler aşağıdaki gibidir:

1. Geçirgenlik: hücre zarları, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin içeri ve dışarı akışını kontrol eden etkili bir geçirgenlik bariyeri olarak işlev görür. Lipid membranlarının geçirgenliği yüksek oranda sıcaklığa bağlıdır, bu nedenle büyüme sıcaklığı değiştiğinde membran lipidlerinin yağ asidi bileşimi hızla düzenlenir.

2. Kimyasal stabilite: Termofilik organizmalar membran lipidlerinin kimyasal stabilitesi sayesinde yüksek sıcaklıkta büyüyebilirler (Koga, 2012). Termofilik (ve asidofilik) arkelerin hücre zarı, bakteriyel hücre zarlarında esterler yoluyla gliserole bağlanan açıl zincirlerinden oluşan çift tabakaların aksine, gliserole veya alternatif bir alkole bağlı doymuş izoprenoid zincirleri ile tüm zarı tek bir tabaka halinde kaplayan tetraeter lipidlerden oluşur (Sprott vd., 1997). Sonuç olarak, arkelerin hücre membranları termostabil, sert, geçirimsiz ve oksidasyona dirençlidir.

3. Sıcaklık: Büyüme sıcaklığındaki artışla orantılı olarak artan lipidler "termofilik lipidler" olarak adlandırılabilir. Aşırı termofilik ortamda, metanoarke *Methanocaldococcus jannaschii* rapor edilmiştir. Büyüme sıcaklığı 45°C'den 65°C'ye çıktığında, dieter lipidler (arkeol bazlı lipidler) %80'den %20'ye düşerken, standart kaldarkaeol bazlı ve siklik arkeol bazlı lipidler sırasıyla %10'dan %40'a çıkmaktadır (Sprott vd., 1991).

4. G+C içeriği: Termofilik bakterilerin rRNA ve tRNA molekülleri mezofillere göre daha yüksek G+C içeriğine sahiptir (Galtier ve Lobry, 1997). GC baz çifti AT baz çiftinden daha fazla hidrojen bağı oluşturduğundan, çift sarmallı kök bölgesinde daha yüksek GC içeriği RNA moleküllerinin termostabilitesini artırır (Lao ve Forsdyke, 2000; Paz vd.,2004).

5. Proteinler: Termofilik proteinlerin yüzey bölgelerinde daha az (yüksüz) polar amino asit ve daha fazla yüklü amino asit bulunur ve

bu yüklü kalıntılar molekül içi tuz köprülerinin sayısının artmasına neden olur (Thompson ve Eisenberg, 1999).

Mikroorganizmaların zorlu koşullar altında hayatta kalma becerisi, araştırmacıları bu organizmaları özelliklerini daha iyi anlamak ve nihayetinde çeşitli uygulamalarda kullanmak için incelemeye sevk etmiştir. Termofilik mikroorganizmalar, hem insan hem de veterinerlik alanında biyoteknoloji ve tıp uygulamaları olan enzim ve diğer biyolojik materyallerin kaynakları olması nedeniyle önemlidir. Dünyanın dört bir yanındaki biyoteknoloji şirketleri, benzersiz özellikleri nedeniyle onları takip etmektedir.

Biyoteknolojik uygulamalarda termofilik mikroorganizmaların kullanılmasının avantajları:

- Isıya dayanıklı makromoleküllerin ve metabolitlerin ve termostabil enzimlerin üretimi
- Yüksek metabolik aktivite, ürün oluşum oranlarının artmasına yol açar
- Metabolik reaksiyonlar substratların çözüldüğü yüksek sıcaklıkta meydana gelir
- Isıtma adımlarından sonra soğutma adımı gerekmez
- Kimyasalların iyonizasyonu ve çözünürlüğü artar
- Uçucu ürünlerin doğrudan geri kazanımı

Biyoteknolojik uygulamalarda termofilik mikroorganizmaların kullanılmasının dezavantajları:

- Yeterince anlaşılmamış genetik ve metabolizma
- Biyomühendislik araçlarının eksikliği
- Mezofiller üzerine kurulu altyapı ve fermantasyon uzmanlığı (Vavitsas vd., 2022).

Termofiller, hipertermofiller ve bunların biyoürünleri çeşitli endüstriyel, tarımsal ve tıbbi uygulamaları kolaylaştırır ve çevresel zararlara ve biyoyakıt talebine potansiyel çözümler sunar. Bu bölümde, termofillerin ve bunların enzimler de dâhil olmak üzere ürünlerinin biyoteknoloji ve endüstrideki mevcut kullanımları ve bazı potansiyel yeni uygulamaları vurgulanmıştır.

1. Ekstremozimler

Termofil ve hipertermofil organizmalar tarafından üretilen enzimlere ekstremozim (termoenzim veya termozim) denilmektedir. Termostabil olan ve yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında hücre içi hasara ve parçalanmaya direnebilen birçok ekstremozimin termofillerde ve hipertermofillerde bol miktarda bulunduğu gösterilmiştir (Vieille ve Zeikus, 2001). Hipertermofillerden gelen enzimler, 70°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda yüksek termostabilite ve optimum aktivite gibi benzersiz özellikler kazandıran yapı-fonksiyon özellikleri geliştirmiştir ve birkaç enzim 100°C'nin üzerinde katalitik aktivite göstermektedir. Amilaz, selülaz, glukozidaz, galaktosidaz, proteaz, pullulanaz ve ksilanaz gibi termostabil enzimler, termofilik organizmalardan elde edilmiştir ve 90-105°C aralığında stabildir (Adams ve Kelly, 1998). *T. litoralis*'in termostabil l-aminoasilaz enzimi, *Escherichia coli*'de klonlanmış, dizilenmiş ve aşırı eksprese edilmiştir (Singleton vd., 2000). Endüstriyel biyotransformasyon reaksiyonlarında kullanımını iyileştirmek için *T. litoralis*'ten termostabil arkeal l-aminoasilaz üzerinde immobilizasyon deneyleri yapılmıştır (Toogood vd., 2002).

Geobacillus, *Alycyclobacillus*, *Anoxybacillus* gibi termofillerden elde edilen enzimler, endüstriyel biyokatalizde mevcut olan çeşitli engellerin üstesinden gelmek için bir alternatif sunmaktadır. Örneğin, termofilik enzimler daha sağlamdır ve aynı anda termostabil ve termoaktiftir, bu da yüksek sıcaklıktaki biyoproseslerde optimum performans göstermelerini sağlar (Zhang vd., 2016). Ayrıca, birçok

endüstriyel uygulamada bulunan yüksek basınç ve protein denatüre edici çözücülere karşı da toleranslıdırlar. Bu benzersiz özellikler onları mezofilik muadillerinden üstün kılmaktadır. Endüstriyel proseslerde daha yüksek sıcaklıkların kullanılması ayrıca substrat ve ürün çözünürlüğünü artırır, hidroliz süresini azaltır ve mikrobiyal kontaminasyon riskini en aza indirir. Bu nedenlerden dolayı, termostabil enzimler biyokatalizör olarak özellikle tercih edilmektedir.

Termozimlerin artan kararlılığının yapısal temeli mutageniz, dizi hizalamaları, amino asit içeriği ve kristal yapı karşılaştırması ile araştırılmıştır. Sonuçlar, termozimler ile mezofilik ve psikrofilik enzim homologlarının çok benzer olduğunu göstermektedir. Dikkat çekici termal kararlılıklarından tek bir mekanizma değil, az sayıda oldukça spesifik modifikasyon sorumludur (Sammond vd., 2016). Artan hidrofobiklik, artan kompaktlık, artan iyonik bağ sayısı, azalan döngü uzunluğu ve esnekliği, daha güçlü N ve C-termini etkileşimleri ve termolabil amino asitlerin azalan kullanımının termostabiliteyi etkilediği kabul edilmiştir. İlginç bir şekilde, mezofilik konakçılarda klonlanıp ifade edildiklerinde, termozimler ebeveyn suşlar ve konakçı arasındaki filogenetik mesafeye rağmen genellikle termal özelliklerini korurlar, bu da bu özelliklerin genetik olarak kodlandığını gösterir (Vieille ve Zeikus, 2001).

Termofilik mikroorganizmalar tarafından üretilen termostabil enzimler, endüstride ve biyoteknolojide kullanılan temel biyokatalizörlerdir (Elleuche vd., 2014). Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) (Ishino ve Ishino, 2014) kullanılan termostabil DNA polimerazlar, biyoyakıt yapımında kullanılan çeşitli enzimler (Barnard vd., 2010), madencilik sürecinde kullanılan organizmalar (Johnson, 2014) ve gıda ve kozmetik endüstrilerinde kullanılan karotenoidler (Oren, 2010) bu alandaki önemli başarı öyküleridirler. Diğer potansiyel uygulamalar arasında laktozsuz süt yapımı (Coker ve Brenchley, 2006); antibiyotik, antikanser ve antifungal ilaçların üretimi

(Herbert, 1992); ve elektrik üretimi ya da daha doğru bir ifadeyle, kullanılabilir ya da depolanabilecek akım üretmek için elektronların süzülmesi (Dopson vd., 2016) yer almaktadır.

Termofilik mikroorganizmalar biyoteknoloji alanında, özellikle endüstriyel süreçlerde (yani 'beyaz biyoteknoloji') büyük ilgi çekmiştir (Bergquist vd., 2014, Elleuche vd., 2014). Beyaz biyoteknoloji, organizmaların ve enzimlerin endüstriyel işleme ve malzeme, kimyasal ve enerji üretimi için kullanılması olarak tanımlanabilir. Termofiller liç proseslerinde ve ağır metallerin atıklardan uzaklaştırılmasında kullanılabilir (Ilyas, 2014). Termofiller ayrıca önemli endüstriyel enzimler de üretirler. Ayrıca termofiller yenilenebilir enerji üretiminde doğrudan ve dolaylı olarak kullanılabilir (Parmar vd., 2011; McClendon vd., 2012; Bhalla vd., 2013, Bhandiwad vd., 2013, Goh vd., 2013).

1.1. Termofil DNA Polimerazları

Termofilik organizmalar termostabil DNA polimerazları kullanır ve bu nedenle termofiller, endüstriyel kullanım için DNA polimerazların ve diğer enzimlerin genetik kaynakları olarak oldukça popüler hale gelmiştir. Enzimlerin ısı stabilitesi, organizmanın geliştiği sıcaklıkla doğrudan ilişkilidir. Termofillerden elde edilen DNA polimerazların termostabilitesinde bir fark vardır. Orta derecede termofilik *Bacillus* türlerinden üretilen DNA polimeraz, yetersiz stabilite nedeniyle PCR için önerilmez. Ekstrem bir termofil olan *Thermus aquaticus*'tan elde edilen *Taq* DNA polimeraz ise PCR'da kullanım için uygundur (Zhang vd., 2010). *Thermophilus*, ilk olarak Japonya'daki doğal bir termal ortamdan izole edilen, halo toleranslı, oldukça termofilik bir bakteridir. *Thermus* cinsinin üyelerinden izole edilen birçok termostabil protein, araştırma ve endüstriyel uygulamalarda önemlidir, bu nedenle bu organizma çok fazla biyoteknolojik potansiyele sahiptir. *T. thermophilus*'ta biyoteknolojik vaatlerde bulunan bir dizi yeni gen keşfedilmiştir. *Thermus* cinsinden,

DNA replikasyonu, DNA onarımı ve RNA olgunlaşması gibi diğer temel biyolojik süreçlerde yer alan proteazlar ve anahtar enzimler izole edilmiştir (Henne vd., 2004). Termofilik türler olan *T. aquaticus* ve *T. litoralis*, DNA parmak izi ve diğer uygulamalarda kullanılan DNA polimeraz enziminin kaynağı olarak kullanılır. Bu organizmaların enzimleri, hidrojen bağlarını kırmak ve tekrar tekrar kopyalanabilen tek iplikçikler bırakmak için DNA'nın döngüler halinde ısıtılmasını içeren PCR işlemi için gerekli olan yüksek sıcaklıklarda stabildir (Bertoldo ve Antranikian, 2001). DNA polimerazlar, PCR'de kullanılmak üzere *T. litoralis*, *T. aquaticus*, *T. maritime*, *P. woesii* ve *P. furiosus*'tan elde edilmiştir (Satyanarayana vd., 2004).

1.2. Hipertermofil DNA Polimerazları

Hipertermofilik organizmaların çoğunu arkealar oluşturur, ancak bazı termofilik bakteriler de vardır. Hipertermofiller potansiyel olarak termofillerden daha fazla ısıya dayanıklı enzim üretebilir. Bunun nedeni hipertermofillerin daha yüksek sıcaklıklara dayanabilmesidir. Anaerobik bir hipertermofil olan *Pyrococcus furiosus*'un DNA polimerazı (*Pfu* polimeraz) *Taq* polimerazdan daha karardır. Hipertermofilik arkeler, hem moleküler biyoloji çalışmaları için ilgi çekici model organizmalar hem de pratik uygulamalar için önemli bir enzim kaynağı olarak ün kazanmıştır (Ishino ve Ishino, 2014). *Thermotoga maritima* DNA polimerazı, hipertermofilik bakterilerden elde edilen ilk ticari üründür (ULTIMA DNA polimerazı). Bu enzim, 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve bu nedenle proofreading aktivitesi ile PCR'yi daha doğru bir şekilde gerçekleştirmesi beklenir (Diaz ve Sabino, 1998). *Thermus aquaticus*, *Pyrococcus furiosus* ve *Thermococcus litoralis*'den elde edilen ve sırasıyla *Taq* (Tindall ve Kunkel, 1988), *Pfu* (Lundberg vd., 1991) ve *Vent* (Mattila vd., 1991) olarak bilinen DNA polimerazlar olmadan PCR'ın otomatikleştirilmesi mümkün olamazdı. Patent ömrü boyunca PCR, hak sahiplerine 2 milyar doların üzerinde telif ücreti kazandırmıştır (Fore vd., 2006). Bununla

birlikte, bir zamanlar bilimden uzak olduğu düşünülen kolluk kuvvetleri gibi alanlar da, DNA profillerine dayanarak şüphelileri tanımlamayı ve elimine etmeyi daha kolay hale getirerek PCR'dan büyük fayda sağlamıştır (Gurvitz vd., 1994). Adli tıp ve PCR tabanlı teknolojilere odaklanan çok sayıda film, roman ve TV şovuyla eğlence endüstrisi bile PCR'dan büyük ölçüde faydalanmıştır. Bu üç hipertermofilik enzimin biyoteknoloji ve mevcut kültürümüz üzerindeki etkisi ancak muazzam olarak tanımlanabilir.

1.3. DNA Ligazlar

DNA ligazlar (ATP'ye bağımlı DNA ligazlar, EC 6.5.1.1 ve NAD⁺ bağımlı DNA ligazlar, EC 6.5.1.2), DNA'daki kırılmaları bağlayan enzimlerdir. İlk termostabil ligaz, *Thermus thermophilus* HB8 bakterisinde keşfedilmiştir. Bu enzimlerin çoğu termofilik ve hiper/termofilik arkelerden *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus sp.* 1519, *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfophobococcus zilligii*, *Archaeoglobus fulgidus* (Petrova vd., 2012), *Hyperthermus butylicus* (Kim vd., 2013), *Methanocaldococcus jannaschii* (Wang vd., 2013), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Sriskanda vd., 2000), *Aeropyrum pernix* K1 (Jeon ve Ishikawa, 2003) gelir. Bakteriyel DNA ligazların aksine, bu enzimler kofaktör olarak ATP'ye ihtiyaç duyar.

Termostabil DNA ligazları, yüksek sıcaklıklarda (90-100 °C) çentik birleştirme reaksiyonu için katalitik aktiviteleri nedeniyle dizileme primerlerinin yapımında ve LDR/LCR enzimleri olarak kullanılır. Ligaz tespit reaksiyonu (LDR)/ligaz zincir reaksiyonu (LCR), DNA zincirindeki tek baz mutasyonunu tespit etmek için kullanılan bir tekniktir ve genetik hastalıkların teşhisi için kullanılır (Shi vd., 2023).

2. Biyoyakıt (Biyoenerji) Üretimi

Azalan fosil yakıt rezervleri ve iklim değişikliğine ilişkin endişelerin artması nedeniyle, başta biyoenerji olmak üzere yeni enerji üretimi kaynaklarının arayışı dünya çapında ilgi konusu haline geldi. Biyoyakıtlar katı, sıvı ve gaz halinde bulunabilir.

Sıvı biyoyakıtlar (yani biyoetanol, biyodizel, biyobutanol ve biyokerosen), nişasta ve lignoselülozik biyokütle gibi materyallerin fermente edilmesiyle veya lipit fraksiyonlarının bitkiler ve mikroorganizmalar gibi çeşitli kaynaklardan ekstraksiyonu ile elde edilir. Termofiller, sıvı biyoyakıt üretimi için lignoselülozik biyokütleyi (yani ksilan, selüloz ve hemiselüloz) verimli bir şekilde parçalayan termostabil enzimler üretebilmektedir. Örneğin, *Caldicellulosiruptor*, *Caldanaerobius* ve *Clostridium spp.*'den elde edilen selülazlar ksilanazlar çeşitli sıvı biyoyakıtların üretiminde potansiyel uygulamalarla etkili lignoselüloz parçalayıcı aktivite sergilerler (Bhalla vd., 2013; Han vd., 2012; Su vd., 2013). Biyobutanol üretimini içeren yakın tarihli bir çalışmada, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* ile bütiril CoA oluşumundan sorumlu *bcs* operonunun spesifik genlerini aşırı ekspresye ettikleri ve vahşi tip suşa kıyasla n-butanol üretimini %180 artırdıkları çok ilginç sonuçlar yayınlanmıştır (Bhandiwad vd., 2013).

Metan ve hidrojen, farklı hammaddelerin ve atık malzemelerin anaerobik fermantasyonu ile elde edilebilen gaz biyoyakıt örnekleridir. Biyohidrojen, selülozun glikoza dönüştürülmesi ve ardından glikoz ürününün ve yan ürününün (glukonik asit) hidrojene dönüştürülmesiyle elde edilebilir (Woodward vd., 2000). Woodward ekibi enerji üretimi için yararlı olabilecek ekstremozimleri belirleyip, izole etmiş ve saflaştırdıktan sonra karakterize etmiştir. Glikozun hidrojene dönüştürülmesi işlemi yüksek sıcaklıklarda daha verimlidir; bu nedenle standart enzimlerin ekstremozimlerden (yani hidrojenaz) elde edilenlerle değiştirilmesi mantıklıdır. *Pyrococcus furiosus*

hyperthermophile, 85°C'de oldukça verimli çalışan bir hidrojenaz üretir bu enzim aynı zamanda hidrojen üretmek için NADPH'den elektronları kabul ettiği bilinen iki enzimden biridir (Raven vd., 1992).

Kömür yataklarında hapsolmuş metan başka bir alternatif enerji kaynağıdır. Biyometan, kömürün belirli anaerobik bakteriler tarafından metana dönüştürüldüğü bir dizi biyokimyasal reaksiyonun sonucudur (Kotelnikova, 2002). Kömürün metana mikrobiyal dönüşümü uzun zamandır araştırma konusu olmuştur (Jones vd., 2008; Thielemann vd., 2004). Hindistan'daki Jharia kömür madenlerinden farklı kömür substratlarının kullanıldığı bir araştırmada, metanojenik mikrobiyal topluluk kullanılarak 65°C'de %49 metan üretimi rapor edilmiştir. Topluluğun filogenetik bir çalışmasında, *Methanoculleus thermophilus*'un söz konusu olan baskın tür olduğunu gösterilmiştir (Lavania vd., 2014).

Yukarıda bahsedilen termofillerin umut verici kullanımına rağmen, biyoyakıt üretiminde termofilik mikroorganizmaların kullanımı bir dizi dezavantajı da beraberinde getirmektedir (Lin ve Xu, 2013). Termofillerin çoğunluğu karbon kullanımında düşük verimlilik sergiler ve bazı durumlarda, selüloz gibi belirli polimerlerin tamamen parçalanması için birden fazla türe ihtiyaç duyulabilirler. Benzer şekilde, termofiller daha yüksek enzimatik reaksiyon hızlarına sahip olsalar da çoğu termofil kültürü yüksek hücre sayısına ulaşamaz. Termofiller tarafından üretilen biyoyakıtların toplam verimi hala endüstriyel ihtiyaçların altındadır. Ayrıca, termofiller genetik manipülasyona karşı mezofillere göre daha dirençlidirler (Rastogi vd., 2009).

Gezegenin azalan fosil yakıt arzını desteklemek amacıyla, biyokütle (örneğin mısır, pancar, buğday ve şeker kamışı) kullanarak yakıt üretmek için ortak bir çaba gösterilmiştir. Belirli bir kaynağa bağlı olarak, biyoyakıtlar birinci ve ikinci nesil olarak kategorize

edilebilir. Birinci nesil biyoyakıtlar, mevcut mahsullerin kolay hidrolize olan şeker, nişasta ve yağlarından elde edilirken, ikinci nesil biyoyakıtlar hidrolize daha dayanıklı olan lignoselülozik malzemeden elde edilir.

Biyoyakıtlar nihai son ürünlere göre de kategorize edilebilir: bütanol, etanol, hidrojen, metan ve biyodizel. Geleneksel biyobütanol ve biyoetanol üretim yöntemleri, *Saccharomyces cerevisiae* ve *Clostridium* türleri gibi mezofilik mikroorganizmaların kullanımıyla desteklenen kimyasal bir sürecin kullanımını içerir (Lee vd., 2008). Hidrojen üretimi geleneksel olarak bir kimyasal/katalizör sürecine dayanmaktadır (Das ve Veziroglu, 2001); ancak son zamanlarda *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ve *Thermotoga elfii* termofillerini kullanan daha büyük ölçekli mikroorganizma tabanlı sistemler geliştirilmiştir (de Vrije vd., 2002). Diğer ürünlerin aksine, metan her zaman metanojenleri (metanın bilinen tek biyolojik üreticileri olan ekstremofiller) içeren bir mikroorganizma konsorsiyumu kullanılarak üretilmiştir (Barnard vd., 2010).

Biyoyakıt üretimindeki adımların çoğu yüksek sıcaklıklar ve aşırı pH değerlerini içerir; bu nedenle ekstremofiller, geleneksel yöntemlerde kullanılan mezofilik organizmaların yerini almak için ideal adaylardır. Örneğin, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* hemiselüloz ve ksiloz gibi pentoz şekerleri etanol üretmek için başlangıç malzemesi olarak kullanabilmektedir (Demain vd., 2005). Bu termofilin tasarlanmış versiyonları, büyük miktarlarda etanol üretme ve diğer yan reaksiyonları/ürünleri en aza indirme konusunda büyük umut vaat etmektedir (Basen vd., 2014). Anaerobik fermantasyon ve hidrojenazlar yoluyla hidrojen üretiminde ekstremofiller için de çok sayıda uygulama vardır. *Caldicellulosiruptor*, *Thermoanaerobacterium* (Ren vd., 2008), *Pyrococcus* (Baker vd., 2009) ve *Aeropyrum* (Nishimura ve Sako, 2009) suşlarının kullanımı büyük bir potansiyel göstermektedir. Araştırmalar henüz çok ön aşamadadır; ancak

hipertermofil mühendisliği gibi son gelişmeler oldukça umut vericidir (Antoni vd., 2007; Lipscomb vd., 2014)

Mikroorganizmalar tarafından üretilen ve ticari açıdan en fazla başarı gösteren iki ürün biyodizel ve bütanoldür. Butanol, etanolle karşılaştırıldığında mikroorganizmaların büyümesini oldukça inhibe eder (çoğu organizma %2'den fazlasını tolere edemez). Bu nedenle, ürün inhibisyonunun üstesinden gelmek ve büyük miktarlarda bütanole dayanabilmek için organizmaların modifiye edilmesi gerekir. Biyodizel, çoğu petrolde bulunanlar gibi uzun zincirli hidrokarbonlar içeren yüksek lipit içerikli (>%75 kuru ağırlık) alglerden elde edilir. Bu gereklilikleri karşılayan çeşitli ekstremofilik algler (örn. *Cyanidium caldarium* ve *Galdieria sulphuraria*) mevcuttur (Luca vd., 1981; Pulz ve Gross, 2004). Tasarlanmış halofilik algler, büyümeleri için gereken yüksek tuzluluk diğer mikropları engellediği için açık kaplarda yetiştirilebildikleri için büyük umut vaat ediyor. Bu, okyanuslar ve kurak/çöl ortamları gibi yeterince kullanılmayan ortamlarda yetiştirilebilecekleri anlamına gelir (DasSarma vd., 2009).

3. Biyomadencilik

Biyoyakıtlara ek olarak ekstremofiller ve enzimlerinin bir diğer önemli uygulaması da madencilik sektörüdür (Podar ve Reysenbach, 2006). Biyomadencilik, metallerin cevherlerden geri kazanılmasını arttırmayı amaçlayan farklı biyolojik süreçleri içerir. Biyoliç ve biyooksidasyon, biyomadencilikte yer alan sülfid minerallerine uygulanan iki biyo-ekstraktif işlemdir. Her iki biyoproses de aynı mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir ve aynı mekanizmaları kullanır; bununla birlikte biyo-filtreleme sırasında ilgili metal biyolojik kataliz yoluyla çözündürülürken biyo-oksidasyonda mikroorganizmalar geri kazanılacak metali tıkayan mineral matrisini çözer ve bu daha sonra diğer kimyasal liç maddeleri kullanılarak çözülebilir. En uygun biyomadencilik mikroorganizmaları, metal sülfidlere saldıran ve ilgili metalin çözünebilir sülfatlar olarak asidik su çözeltisine salınmasına

izin veren oksitleyici ve asidik koşullar oluşturma yeteneğini gerektirir. Asidofilik demir ve kükürt oksitleyici prokaryotlar, Fe (II)'yi Fe (III)'e ve kükürt bileşiklerini sülfürik asite oksitleyebildikleri için biyo-filtreleme ve biyo-oksidadasyon süreçlerinde yer alırlar. Metal sülfürler için uygun bir oksitleyici madde olan Fe (III), demir oksitleyici mikroorganizmaların etkisiyle sürekli olarak yenilenir ve metali mineralden çözeltiye bırakır. Ayrıca sülfürü oksitleyen mikroorganizmalar tarafından üretilen sülfürik asit, metal iyonlarını çözeltide tutmak için pH'ı düşük değerlerde tutar (Donati ve Sand, 2007).

Çeşitli çalışmalar, termoasidofilik mikroorganizmaların, mezofilik mikroorganizmalarla elde edilenlerden çok daha yüksek, tatmin edici bakır geri kazanım verimleri üretebildiğini kanıtlamıştır (Qin vd., 2013; Abdollahi vd., 2014). Biyomadencilik teknikleri altın, gümüş, bakır, çinko, nikel ve uranyum gibi metallerin çıkarılmasında başarıyla uygulanmıştır. Bu işlemde kullanılan organizmalar *Asidithiobacillus* ve *Ferropozma* gibi asidofillerdir. Ancak koşullara bağlı olarak *Sulfolobus* ve *Metallosphaera* gibi daha termofilik türlerin kullanılması gerekebilir (Podar ve Reysenbach, 2006).

4. Karotenoidler

Karotenoidler doğal pigmentlerdir ve ekstremofillerden çoğunlukla halofilik arkeler ve algerle ilişkilidir (Schiraldi vd., 2002). Karotenoidlerin çoğu organizmalardan endüstri için yararlı seviyelerde sentezlenemez/ekstrakte edilemez; ancak bunun üç istisnası vardır: bakteriorhodopsin, kantaksantin ve β -karoten (Chandi ve Gill, 2011).

Bakteriorhodopsin, membrana bağlı bir retina pigmentinin yanı sıra, fotosentezin ilkel bir formu olarak işlev gören bir proton pompasıdır. Oldukça stabil bir moleküldür ve aşırı halofilik arke *Halobacterium salinarum*'dan elde edilmiştir (Schiraldi vd., 2002). Holografi, yapay retinalar, fotokromik boyalar, uzaysal ışık modülatörleri ve biyokimyasal enerjinin yenilenmesi gibi geniş bir

uygulama yelpazesinde kullanılmak üzere uyarlanmıştır (Charlesworth ve Burns, 2015).

Canthaxanthin, gıda boyası ve yem katkı maddesi olarak kullanılan, yağda çözünen bir antioksidandır. Yem katkı maddesi olarak balık, kabuklu hayvan ve kümes hayvanı çiftliklerinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda kozmetik endüstrisinde de kullanılır ve genellikle bronzlaşma haplarının ana bileşenidir (Saito vd., 1992). Bakteriorhodopsinde olduğu gibi halofilik arkeler tercih edilen üreticilerdir ve *Haloferax alexandrinus* tercih edilen türdür (Asker ve Ohta, 2002).

β -karoten kırmızı/turuncu bir pigmenttir ve havuç, balkabağı ve halofilik mikroorganizmalardaki ana renklendiricidir. Halofilik alg *Dunaliella salina*, β -karoten için ana kaynaktır (DasSarma vd., 2009). Kimyasal yapısından dolayı yağ ve suda çözünebilen bir moleküldür, bu da onu pişirme işleminde (örneğin gıda boyası) ve emülsiyonlarda (örneğin şekerleme ve hazır gıdalar) bir katkı maddesi olarak mükemmel kılar.

5. Biyoremediasyon

Modern toplumda farklı sektörlerin teknolojik ve endüstriyel genişlemesi, atıkların karmaşıklığının ve toksisitesinin artmasına neden olmuştur (Gavrilescu vd., 2015). Sonuç olarak, bu kalıntıların suya, toprağa ve havaya atılımı artmakta ve bu ekosistemlerin kirliliği halk ve çevre sağlığı açısından endişe verici hale gelmektedir (Azubuike vd., 2016).

Biyoremediasyon, toprakta, çökeltilerde, suda ve havada bulunan çevresel kirleticilerin kimyasal yapısını hareketsizleştirmek veya değiştirmek için genellikle düşük maliyetlerle mikroorganizmaları uygulayarak bileşiğin kısmi bozulmasına, mineralleşmesine veya dönüşümüne yol açan çevre dostu bir kirlilik arıtma teknolojisi olarak tanımlanabilir (Tabak vd., 2005). Ekstremofilik mikroorganizmaların

kullanımı, metalle kirlenmiş bölgelerin tedavisinde umut verici bir alternatif haline gelmiştir (Sen vd., 2014). Cd, Cu, Ni, Zn ve Mn gibi farklı metallerin biyosorpsiyonu *Geobacillus* türleri, *Thermus thermophiles*, *Thermococcus zilligii* ve *Anoxybacillus flavithermus* ile değerlendirilmiştir (Chatterjee vd., 2010, Sar vd., 2013). Termofiller, ısıtılmış nükleer atık akıntılarının arıtılmasında toksik metallerin ve radyonüklidlerin (U, Cr, Tc, Co) çökeltmesi ve/veya hareketsizleştirilmesi için büyük avantajlar sunmuştur. Enzimatik uranyum ve teknetyum indirgemesi *Thermusscotoductus*, *Pyrobaculum islandicum*, *Thermoanaerobacter* sp. ve *Thermoterrabacterium ferrireducens* 'te gösterilmiştir (Chernyh vd., 2007). Cr (VI), Se (IV) ve Te (IV)'ün termofilik türler tarafından indirgendiği de rapor edilmiştir (Sar vd., 2013).

Geçtiğimiz birkaç yılda termofiller, çeşitli endüstrilerden yayılan gazların kokularını gidermek için biyofiltrelerin yapımında test edilmiştir. Termofilik biyofiltrasyon, gazların soğutulmasını gerektirmemesi ve dolayısıyla prosesin ekonomik maliyetini azaltma avantajına sahiptir. Etanol, benzen, etil asetat ve kükürt içeren gazlar gibi uçucu organik bileşiklerin uzaklaştırılması için umut verici sonuçlar rapor edilmiştir (Ryu vd., 2009). İnorganik ve organik kirleticilerin biyolojik olarak arıtılmasının pek çok avantajı olmasına rağmen, yani geleneksel temizleme yöntemlerine göre daha düşük işletme maliyetleriyle daha çevre dostu olmasına rağmen, hızının yavaş olması ana dezavantajdır ve bu teknolojinin benimsenmemesinin olası nedenidir. Bu çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, termofilik türlerin biyoremediasyonda kullanılması, proseslerin verimliliğinin artırılması için umut verici bir araç gibi görünmektedir.

6. Biosürfaktanlar

Biyosürfaktanlar, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve suda çözünmeyen bileşiklerin emülsifikasyonunu ve dispersiyonunu arttırmaya yardımcı olan amfifilik bileşiklerdir. Biosürfaktanlar

glikolipitler, lipopolisakkaritler, lipoproteinler, fosfolipidler ve yağ asitlerini içeren kompleks moleküllerdir. Biyosüpfaktanların kullanımı, düşük toksisiteleri nedeniyle gıda, tarım, ilaç, petrol ve kağıt/hamur ile ilgili endüstrilerde önemli ölçüde artmıştır (Sharafi vd., 2014). Diğer alanlarda olduğu gibi termofiller, daha yüksek sıcaklık stabilitesine, pH ve tuzluluk gibi diğer aşırı fizikokimyasal parametrelere karşı artan dirence sahip biyosüpfaktanların üretimi için potansiyel organizmalardır. Şu ana kadar belirlenen performans artışına sahip türler *Aneurinibacillus*, *Geobacillus*, *Alcaligenes*, *Bacillus* ve *Brevibacillus* cinsleriyle ilişkilendirilmiştir (Joshi vd., 2008, Bharali vd., 2011, Mnif vd., 2011, Sharafi vd., 2014).

7. Diğer Endüstrilerdeki Uygulamalar

Deterjan, deri ve kağıt endüstrilerindeki uygulamalar için aşırı pH ve sıcaklıkta aktif olan yüksek derecede kararlı enzimlerin tanımlanması gereklidir. Endüstriyel uygulamalar için uygun özelliklere sahip termostabil enzimler elde etmek için ekstremofilik türler kullanılmaktadır. Selülazlar, amilazlar, ksilanazlar, proteazlar, pektinazlar, keratinazlar, lipazlar, esterazlar, katalazlar, peroksidazlar ve fitazlar, biyoteknolojik süreçlerde geniş bir uygulama alanına sahip olan ekstremozim örnekleridir (Gomes ve Steiner, 2004). Amilazlar, pullulanazlar, siklodekstrin glikosil transferazlar, selülazlar, ksilanazlar, kitinazlar ve glikoz izomerazlar, gıda, kimya ve ilaç endüstrilerinde ve ayrıca çevresel biyoteknolojide kullanılan polimer parçalayıcı enzimlerdir (Aguilar, 1996).

Termofilik enzimler, saf farmasötikler için kiral bileşiklerin geliştirilmesi de dâhil olmak üzere endüstriyel uygulamalarda bir dizi faydaya sahiptir. Termofil *Aspergillus terreus*'tan meme kanseri hücrelerinin baskılayıcısı olan terrein izole edilmiştir. Terrein, MCF-7 meme kanseri hücrelerine karşı yüksek sitotoksositeye sahiptir. Terrein ile tedavinin, meme kanseri hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir (Liao vd., 2012).

Her termofil grubu, çeşitli uygulamalarda kullanılacak farklı özelliklerde enzimlere sahiptir. *P. furiosus*, *T. hydrothermalis*, *T. profundus*, *S. acidocaldarius* ve *S. solfataricus* gibi termofilik Arkelerden yüksek oranda ısıya kararlı α -amilazlar elde edilir (Hernández vd., 2006; Arikian, 2008). *Geobacillus sp.*'den izole edilen α -amilaz enzimi, deterjan endüstrisinde endüstriyel amaçlarla kullanılmaktadır (Mathew ve Rathnayake, 2014).

Nişastanın enzimatik sıvılaştırılması ve sakrifikasyonu yüksek sıcaklıklarda (100-110°C) gerçekleştirildiğinden, ekstremofillerden elde edilen termostabil ve termoaktif amilolitik enzimler, glikoz, kristal dekstroz, dekstroz şurubu, maltoz ve maltodekstrinler gibi değerli ürünlerin üretimi için büyük ilgi görmektedir. Şu anda, *Bacillus stearothermophilus* veya *Bacillus licheniformis*'in termostabil amilazları nişasta işleme endüstrilerinde kullanılmaktadır. 65°C'de optimum büyümeye sahip aerobik bir deniz termofilik bakterisi olan *Rhodothermus marinus*'un, selüloz, ksilanaz β -mannanaz, α -l-arabinofuranosidaz ve α -galaktosidaz gibi bir dizi yüksek ısıya dayanıklı polisakkarit parçalayıcı enzim ürettiği rapor edilmiştir (Gomes vd., 2003).

Nişasta hidrolizi için kararlı alfa-amilazlar, kâğıt ağartma için ksilanazlar ve gıda işleme, fırınlama, bira yapımı ve çamaşır deterjanları için proteazların tümü termofillerde keşfedilmiştir. Selülozlar, selüloz içeren biyokütle ve yem bitkilerinin sindirilebilirliğini ve besinsel verimliliğini arttırmanın yanı sıra deterjanlarda renk parlaklaştırma amacıyla da kullanılabilir (Niehaus vd., 1999; Poli vd., 2017). Çamaşır ve bulaşık deterjanlarına uygun enzimler içeren *Bacillus* türleri izole edilmiştir (Ito vd., 1998), böylece ekstremofillerin ürünleri temizliği daha da iyileştirebilir. Kumaş işleme aynı zamanda ekstremofil enzimlerden de faydalanabilir. Yünün özelliklerini geliştirmek ve boya penetrasyonunu iyileştirmek için ısıya dayanıklı ve alkaliye dayanıklı bir proteaz kullanılmıştır (Schumacher

vd., 2001). Ekstremofilik mikroorganizmalar henüz keşfedilmemiş yeni tedavilerin kaynağı da olabilir. Örneğin, ekstremofil ekstraktlarının *Candida* ve *Aspergillus sp'*ye ve yeni bir *Pseudomonas*'tan izole edilen demir bağlayıcı bir antifungal bileşik olan pyochelin'e karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Combie vd., 2001).

8. SONUÇ

Termofillerin biyoteknoloji, moleküler biyoloji, ilaç endüstrisi ve tekstil endüstrisi endüstrisinde kullanımları için çok faydalı mikroorganizmalar olduğu sonucuna varılmıştır. Proteazlar, amilazlar, lipazlar, selülozlar, pullulanaz, ksilanaz ve DNA polimerazlar gibi yüksek sıcaklıkta stabilite gösteren benzersiz özelliklere sahip enzimler üretirler ve bu da aşırı sıcaklıklarda hayatta kalmalarına katkıda bulunur.

Laboratuvarda ve endüstriyel ortamlarda ekstremofil yetiştirilmenin zorluğu bir dezavantajdır ve termofilik ve hipertermofilik türlerin yetiştirilmesine yönelik yöntemleri geliştirmek için çok fazla araştırma yapılmaktadır. Ekstremofilik mikroorganizmaların gelişmesini sağlayan koşulları oluşturmak için araştırmacılar sürekli fermantasyon biyoproseslerini ve çeşitli ortamları araştırmaktadırlar. Ekstremofil yetiştiriciliği için gereken aşırı sıcaklık, pH ve tuzluluğa dayanabilen malzemelerden yapılmış biyoreaktörlerin üretimi önemli bir zorluktur.

Artan patent sayısı, termofillerin ticari uygulamalarının daha yaygın hale geldiğini göstermektedir. Son birkaç yılda, termostabil enzim pazarında önemli bir artış olmuştur. Yeni izole edilecek termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmaların sayısındaki artış ve ilgili enzimlerinin keşfi bilimsel ve endüstriyel alanda büyük gelişmelere katkıda bulunacaktır.

Sonuç olarak, termofilik mikroorganizmalar, biyo-tabanlı bir ekonominin gelişmesi için çeşitli biyoteknolojik sektörlerde kullanılacak sürdürülebilir kaynaklardır.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, H., Shafaei, S. Z., Noaparast, M., Manafi, Z., Niemelä, S. I., & Tuovinen, O. H. (2014). Mesophilic and thermophilic bioleaching of copper from a chalcopyrite-containing molybdenite concentrate. *International Journal of Mineral Processing*, 128, 25-32.
- Adams, M. W., & Kelly, R. M. (1998). Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends in Biotechnology*, 16(8), 329-332.
- Aguilar, A. (1996). Extermophile research in European union from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 89-92.
- Antoni, D., Zverlov, V.V. & Schwarz, W.H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 23–35.
- Arikan, B. (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99(8), 3071–3076.
- Asker, D., & Ohta, Y. (2002). Production of canthaxanthin by *Haloferax alexandrinus* under non-aseptic conditions and a simple, rapid method for its extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(6), 743-750.
- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-18.
- Baker, S. E., Hopkins, R. C., Blanchette, C. D., Walsworth, V. L., Sumbad, R., Fischer, N. O., Kuhn, E. A., Coleman, M., Chromy, B. A., Letant, S. E. *et al.* (2009). Hydrogen production by a hyperthermophilic membrane-bound hydrogenase in water-soluble nanolipoprotein particles. *Journal of the American Chemical Society*, 131(22), 7508-7509.

- Barnard, D., Casanueva, A., Tuffin, M., & Cowan, D. (2010). Extremophiles in biofuel synthesis. *Environmental Technology*, 31(8-9), 871–888.
- Basen, M., Schut, G. J., Nguyen, D. M., Lipscomb, G. L., Benn, R. A., Prybol, C. J., Vaccaro, B. J., Poole II, F. L., Kelly, R. M., & Adams, M. W. W. (2014). Single gene insertion drives bioalcohol production by a thermophilic archaeon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(49), 17618-17623.
- Bergquist, P. L., Morgan, H. W., & Saul, D. (2014). Selected enzymes from extreme thermophiles with applications in biotechnology. *Current Biotechnology*, 3(1), 45-59.
- Bertoldo C, & Antranikian G. (2001). Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods in Enzymology*, 330, 269-290.
- Bhalla, A., Bansal, N., Kumar, S., Bischoff, K. M., & Sani, R. K. (2013). Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 128, 751-759.
- Bhandiwad, A., Guseva, A., & Lynd, L. (2013). Metabolic engineering of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* for increased n-butanol production. *Advances in Microbiology*, 3(1), 46-51.
- Bharali, P., Das, S., Konwar, B., & Thakur, A. J. (2011). Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: feasibility in petro-spill bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 682-690.
- Chandi, G. K., & Gill, B. S. (2011). Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: A Review. *International Journal of Food Properties*, 14(3), 503-513.

- Charlesworth, J. C., & Burns, B. P. (2015). Untapped resources: biotechnological potential of peptides and secondary metabolites in archaea. *Archaea*, 282035.
- Charlier, D., & Droogmans, L. (2005). Microbial life at high temperature, the challenges, the strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2974-2984.
- Chatterjee, S., Bhattacharjee, I., & Chandra, G. (2010). Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3): 117-125.
- Chernyh, N. A., Gavrilov, S. N., Sorokin, V. V., German, K. E., Sergeant, C., Simonoff, M., Robb, F., & Slobodkin, A. I. (2007). Characterization of technetium(vII) reduction by cell suspensions of thermophilic bacteria and archaea. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2), 467-472.
- Coker, J. A., & Brenchley, J. E. (2006). Protein engineering of a cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter sp.* SB to increase lactose hydrolysis reveals new sites affecting low temperature activity. *Extremophiles*, 10, 515-524.
- Combie, J., Combie, J., Albert, F. G., Tran, K. V., Cabrera, J., Correia, H. J., Guo, Y., Lindermuth, J., Rauert, N., Galbraith, W., & Selitrennikoff, C. P. (2001). Extremophilic organisms as an unexplored source of antifungal compounds. *The Journal of Antibiotics*, 54(1), 56-65.
- Das, D., & Veziroğlu, T. N. (2001). Hydrogen production by biological processes. A survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), 13-28.
- DasSarma, P., Coker, J. A., Huse, V., & DasSarma, S. (2009). Halophiles, Industrial Applications. In: Flickinger, M. C. (ed) *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. USA, John Wiley & Sons, Inc.

- de Vrije T, de Haas GG, Tan GB, Keijsers, E. R. P., & Claassen P. A. M. (2002). Pretreatment of *Miscanthus* for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. International Journal of Hydrogen Energy, 27(11–12), 1381-1390.
- Demain, A. L., Newcomb, M., & Wu, J. H. (2005). Cellulase, clostridia, and ethanol. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 69(1), 124-154.
- Diaz, R. S., & Sabino, E. C. (1998). Accuracy of replication in the polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritima* DNA polymerase and *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 31(10), 1239-1242.
- Donati, E. R., & Sand, W. (Eds.). (2007). Microbial processing of metal sulfides (Vol. 130). Dordrecht: Springer.
- Dopson, M., Ni, G., & Sleutels, T. H. (2016). Possibilities for extremophilic microorganisms in microbial electrochemical systems. FEMS Microbiology Reviews, 40(2), 164-181.
- Elleuche, S., Schröder, C., Sahm, K., & Antranikian, G. (2014). Extremozymes—biocatalysts with unique properties from extremophilic microorganisms. Current Opinion in Biotechnology, 29, 116-123.
- Fore, J., Jr, Wiechers, I. R., & Cook-Deegan, R. (2006). The effects of business practices, licensing, and intellectual property on development and dissemination of the polymerase chain reaction: case study. Journal of Biomedical Discovery and Collaboration, 1, 7.
- Galtier, N., & Lobry, J. R. (1997). Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures, and optimal growth temperature in prokaryotes. Journal of Molecular Evolution, 44, 632-636.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and

- future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32(1), 147-156.
- Ghelani, A., Patel, R., Mangrola, A., & Dudhagara, P. (2015). Cultivation-independent comprehensive survey of bacterial diversity in Tulsī Shyam Hot Springs, India. *Genomics Data*, 4, 54-56.
- Goh, K. M., Kahar, U. M., Chai, Y. Y., Chong, C. S., Chai, K. P., Ranjani, V., Illias, R., & Chan, K. G. (2013). Recent discoveries and applications of *Anoxybacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(4), 1475-1488.
- Gomes, I., Gomes, J., & Steiner, W. (2003). Highly thermostable amylase and pullulanase of the extreme thermophilic eubacterium *Rhodothermus marinus*: production and partial characterization. *Bioresource Technology*, 90(2), 207-214.
- Gomes, J., & Steiner, W. (2004). The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, 42(4), 223-225.
- Gurvitz, A., Lai, L. Y., & Neilan, B. A. (1994). Exploiting biological materials in forensic science. *Australasian Biotechnology*, 4(2), 88-91.
- Haki, G. D., & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34.
- Han, Y., Agarwal, V., Dodd, D., Kim, J., Bae, B., Mackie, R. I., Nair, S. K., & Cann, I. K. O. (2012). Biochemical and structural insights into xylan utilization by the thermophilic bacterium *Caldanaerobius polysaccharolyticus*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 34946-34960.
- Henne, A., Brüggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., et al. (2004). The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nature Biotechnology*, 22, 547-553.

- Herbert, R. A. (1992). A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. *Trends in Biotechnology*, 10(11), 395-402.
- Hernández, M. S., Rodríguez, M. R., Guerra, N. P., & Rosés, R. P. (2006). Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 73(1), 93-100.
- Ilyas, S., Lee, J. C., & Kim, B. S. (2014). Bioremoval of heavy metals from recycling industry electronic waste by a consortium of moderate thermophiles: process development and optimization. *Journal of Cleaner Production*, 70, 194-202.
- Ishino, S., & Ishino, Y. (2014). DNA polymerases as useful reagents for biotechnology—the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 5, 465.
- Ito, S., Kobayashi, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, S., & Hatada, Y. (1998). Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles*, 2(3), 185-190.
- Jeon, S. J., & Ishikawa, K. (2003). A novel ADP-dependent DNA ligase from *Aeropyrum pernix* K1. *FEBS Letters*, 550(1-3): 69-73.
- Johnson, D. B. (2014). Biomining-biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 24-31.
- Jones, E. J., Voytek, M. A., Warwick, P. D., Corum, M. D., Cohn, A., Bunnell, J. E., Clark, A. C., & Orem, W. H. (2008). Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples. *International Journal of Coal Geology*, 76(1-2), 138-150.
- Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., & Desai, A. J. (2008). Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, 99(1), 195–199.

- Kim, J. H., Lee, K. K., Sun, Y., Seo, G. J., Cho, S. S., Kwon, S. H., & Kwon S. T. (2013). Broad nucleotide cofactor specificity of DNA ligase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Hyperthermus butylicus* and its evolutionary significance. *Extremophiles*, 17, 515-522.
- Koga, Y. (2012). Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea*, 2012, 789652, 6 pages.
- Kotelnikova, S. (2002). Microbial production and oxidation of methane in deep subsurface. *Earth-Science Reviews*, 58(3-4), 367-395.
- Lao, P. J., & Forsdyke, D. R. (2000). Thermophilic bacteria strictly obey Szybalski's transcription direction rule and politely purine-load RNAs with both adenine and guanine. *Genome Research*, 10(2), 228-236.
- Lavania, M., Cheema, S., Sarma, P. M., Ganapathi, R., & Lal, B. (2014). Methanogenic potential of a thermophilic consortium enriched from coal mine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, 177-185.
- Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., & Jung, K. S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209-228.
- Liao, W. Y., Shen, C. N., Lin, L. H., Yang, Y. L., Han, H. Y., Chen, J. W., Kuo, S. C., Wu, S. H., & Liaw, C. C. (2012). Asperjinone, a nor-neolignan, and terrein, a suppressor of ABCG2-expressing breast cancer cells, from thermophilic *Aspergillus terreus*. *Journal of Natural Products*, 75(4), 630-635.
- Lin, L., & Xu, J. (2013). Dissecting and engineering metabolic and regulatory networks of thermophilic bacteria for biofuel production. *Biotechnology advances*, 31(6), 827-837.
- Lipscomb, G. L., Schut, G. J., Thorgersen, M. P., Nixon, W. J., Kelly, R. M., & Adams, M. W. (2014). Engineering hydrogen gas production from formate in a hyperthermophile by heterologous

- production of an 18-subunit membrane-bound complex. The Journal of Biological Chemistry, 289(5), 2873-2879.
- Luca, P. D., Musacchio, A., & Taddei, R. (1981). Acidophilic algae from the fumaroles of Mount Lawu (Java, locus classicus of *Cyanidium caldarium* Geitler. Giornale Botanico Italiano, 115(1), 1-9.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. A., & Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. Gene, 108(1), 1-6.
- Mathew, C., & Rathnayake, S. (2014). Isolation and characterization of alpha amylase isolated from a hot water spring in Sri Lanka. International Research Journal of Microbiology, 5, 50-61.
- Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T., & Pitkänen, K. (1991). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase--an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. Nucleic acids research, 19(18), 4967-4973.
- McClendon, S. D., Bath, T., Petzold, C. J., Adams, P. D., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2012). *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions. Biotechnology for biofuels, 5, 1-10.
- Mirete, S., Morgante, V., & Gonzalez-Pastor, J. E. (2016). Functional metagenomics of extreme environments. Current Opinion in Biotechnology, 38, 143-149.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., & Sayadi, S. (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. Journal of Applied Microbiology, 111(3), 525-536.
- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus*

- licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International Journal of Microbiology*, 2017, 6943952.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M., & Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 711–729.
- Nishimura, H., & Sako, Y. (2009). Purification and characterization of the oxygen-thermostable hydrogenase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum camini*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(4), 299-303.
- Oren, A. (2010). Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental technology*, 31(8-9), 825-834.
- Parmar, A., Singh, N. K., Pandey, A., Gnansounou, E., & Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, 102(22), 10163-10172.
- Paz, A., Mester, D., Baca, I., Nevo, E., & Korol, A. (2004). Adaptive role of increased frequency of polypurine tracts in mRNA sequences of thermophilic prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 2951-2956.
- Petrova, T. E., Bezsudnova, E. Y., Dorokhov, B. D., Slutskaya, E. S., Polyakov, K. M., Dorovatovskiy, P. V., Ravin, N. V., Skryabin, K. G., Kovalchuk, M. V., & Popov, V. O. (2012). Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of a thermostable DNA ligase from the archaeon *Thermococcus sibiricus*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(Pt 2), 163-165.

- Podar, M., & Reysenbach, A. L. (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Current Opinion Biotechnology*, 17(3), 250-255.
- Poli, A., Finore, I., Romano, I., Gioiello, A., Lama, L., & Nicolaus, B. (2017). Microbial diversity in extreme marine habitats and their biomolecules. *Microorganisms*, 5(2), 25.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 635-648.
- Qin, W., Yang, C., Lai, S., Wang, J., Liu, K., & Zhang, B. (2013). Bioleaching of chalcopyrite by moderately thermophilic microorganisms. *Bioresource Technology*, 129, 200-208.
- Rastogi, G., Muppidi, G. L., Gurrarn, R. N., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Apel, W. A., Bang, S. S., Dixon, D. J., & Sani, R. K. (2009). Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(4), 585.
- Raven, N., Ladwa, N., Cossar, D., & Sharp, R. (1992). Continuous culture of the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 263-267.
- Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D., Guo, W., & Zhu, Y. (2008). Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6124-6132.
- Ryu, H-W., Yoo, S-K., Choi, J. M., Cho, K-S., Cha, D. K. (2009). Thermophilic biofiltration of H₂S and isolation of a thermophilic and heterotrophic H₂S-degrading bacterium, *Bacillus sp.* TSO3. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), 501-506.

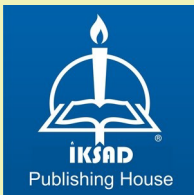
- Saito, M., Koyano, T., Miyamoto, H., Umibe, K., & Kato, M. (1992). ATP synthesizing device. Patent JP4088995.
- Sammond, D.W., Kastelowitz, N., Himmel, M.E., Yin, H., Crowley, M.F., & Bomble, Y.J. (2016). Comparing residue clusters from thermophilic and mesophilic enzymes reveals adaptive mechanisms. *PLoS One*, 11(1), e0145848.
- Sar, P., Kazy, S. K., Paul, D., & Sarkar, A. (2013). Metal bioremediation by thermophilic microorganisms. *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology* (s. 171–201). Dordrecht: Springer.
- Satyanarayana, T., Noorwez, S. M., Kumar, S., Rao, J. L., Ezhilvannan, M., & Kaur, P. (2004). Development of an ideal starch saccharification process using amylolytic enzymes from thermophiles. *Biochemical Society Transactions*, 32(Pt 2), 276-278.
- Saxena, R., Chaudhary, N., Dhakan, D. B., & Sharma. V. K. (2015). Draft genome sequence of *Gulbenkiania mobilis* strain mb1, a sulfur-metabolizing thermophile isolated from a hot spring in central India. *Genome Announcements*, 3(6), e01295-15.
- Schiraldi, C., Giuliano, M., & De Rosa, M. (2002). Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea*, 1(2), 75-86.
- Schumacher, K., Heine, E., & Höcker, H. (2001). Extremozymes for improving wool properties. *Journal of Biotechnology*, 89(2-3), 281–288.
- Sen, S. K., Raut, S., Dora, T. K., & Mohapatra, P. K. D. (2014). Contribution of hot spring bacterial consortium in cadmium and lead bioremediation through quadratic programming model. *Journal of Hazardous Materials*, 265, 47-60.
- Sharafi, H., Abdoli, M., Hajfarajollah, H., Samie, N., Alidoust, L., Abbasi, H., Fooladi, J., Zahiri, H. S., & Noghabi, K. A. (2014). First report of a lipopeptide biosurfactant from thermophilic bacterium *Aneurinibacillus thermoaerophilus* MK01 newly

- isolated from municipal landfill site. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(5), 1236-1249.
- Shi, J., Oger, P. M., Cao, P., & Zhang, L. (2023). Thermostable DNA ligases from hyperthermophiles in biotechnology. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1198784.
- Singleton, M. R., Taylor, S. J., Parrat, J.S., & Littlechild, J. A. (2000). Cloning, expression, and characterization of pyrrolidone carboxylpeptidase from the archaeon *Thermococcus litoralis*. *Extremophiles*, 4(5), 297-303.
- Sprott, G. D., Meloche, M., & Richards, J.C. (1991). Proportions of diether, macrocyclic diether, and tetraether lipids in *Methanococcus jannaschii* grown at different temperatures. *Journal of Bacteriology*, 173(12), 3907-3910.
- Sprott, G. D., Agnew, B.J., & Patel, G. B. (1997). Structural features of ether lipids in the archaebacterial thermophiles *Pyrococcus furiosus*, *Methanopyrus kandleri*, *Methanothermus fervidus*, and *Sulfolobus acidocaldarius*. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(5), 467-476.
- Sriskanda, V., Kelman, Z., Hurwitz, J., & Shuman, S. (2000). Characterization of an ATP-dependent DNA ligase from the thermophilic archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Nucleic Acids Research*, 28(11), 2221-2228.
- Su, X., Han, Y., Dodd, D., Moon, Y. H., Yoshida, S., Mackie, R. I., & Cann, I. K. (2013). Reconstitution of a thermostable xylan-degrading enzyme mixture from the bacterium *Caldicellulosiruptor bescii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1481-1490.
- Tabak, H. H., Lens, P., van Hullebusch, E. D., & Dejonghe W. (2005). Developments in bioremediation of soils and sediments polluted with metals and radionuclides-1. Microbial processes and mechanisms affecting bioremediation of metal contamination

- and influencing metal toxicity and transport. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 4, 115-156.
- Thielemann, T., Cramer, B., & Schippers, A. (2004). Coalbed methane in the Ruhr Basin, Germany: a renewable energy resource? Organic Geochemistry, 35(11-12), 1537-1549.
- Thompson, M. J., & Eisenberg, D. (1999). Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. Journal of Molecular Biology, 290(2), 595-604.
- Tindall, K. R., & Kunkel, T. A. (1988). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Biochemistry, 27(16), 6008-6013.
- Toogood, H. S., Taylor, I. N., Brown, R. C., Taylor, S. J., McCague, R., & Littlechild, J. A. (2002). Immobilisation of the thermostable L-aminoacylase from *Thermococcus litoralis* to generate reusable industrial biocatalyst. Biocatalysis and Biotransformation, 20(4), 241-249.
- Vavitsas, K., Glekas, P. D., & Hatzinikolaou, D. G. (2022). Synthetic biology of thermophiles: taking bioengineering to the extremes? Applied Microbiology, 2(1), 165-174.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. Microbiology and molecular biology reviews, 65(1), 1-43.
- Wang, Y., Xie, J. J., Han, Z., Liu, J. H., & Liu, X. P. (2013). Expression, purification and biochemical characterization of *Methanocaldococcus jannaschii* DNA ligase. Protein Expression and Purification, 87(2), 79-86.
- Woodward, J., Orr, M., Cordray, K., & Greenbaum, E. (2000). Enzymatic production of biohydrogen. Nature, 405(6790), 1014-1015.
- Zhang, Y., An, J., Yang, G., Zhang, X., Xie, Y., Chen, L., & Feng, Y. (2016). Structure features of GH10 xylanase from *Caldicellulosiruptor bescii*: implication for its thermophilic

adaption and substrate binding preference. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(10), 948-957.

Zhang, Z., Kermekchiev, M. B., & Barnes, W. M. (2010). Direct DNA amplification from crude clinical samples using a PCR enhancer cocktail and novel mutants of *Taq*. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 12(2), 152-161.



ISBN: 978-625-378-086-9