

**TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLMİŞ *BACILLUS* sp.  
SUŞLARINDAN SELÜLAZ ENZİM ÜRETİMİNİN TARANMASI,  
BESİNSEL OPTİMİZASYON, ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI,  
KARAKTERİZASYONU VE YÜNLÜ KUMAŞTAKİ BİTKİ  
ATIKLARININ GİDERİLMESİNDE ETKİNLİĞİ**

**Sarra MSAKNİ**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLMİŞ *BACILLUS* sp. SUŞLARINDAN  
SELÜLAZ ENZİM ÜRETİMİNİN TARANMASI, BESİNSEL OPTİMİZASYON,  
ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE YÜNLÜ  
KUMAŞTAKİ BİTKİ ATIKLARININ GİDERİLMESİNDE ETKİNLİĞİ**

**Sarra MSAKNİ**  
0000-0003-4112-9284

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2020  
**Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ ONAYI

Sarra Msakni tarafından hazırlanan "TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLMİŞ *Bacillus* sp. SUŞLARINDAN SELÜLAZ ENZİM ÜRETİMİNİN TARANMASI, BESİNSEL OPTİMİZASYON, ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE YÜNLÜ KUMAŞTAKİ BİTKİ ATIKLARININ GİDERİLMESİNDE ETKİNLİĞİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

**Başkan** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
0000-0002-5292-9482  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Prof. Dr. Dilek KUT  
0000-0002-9059-0838  
Bursa Uludağ Üniversitesi,  
Mühendislik Fakültesi,  
Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

**Üye** : Prof. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN  
0000-0001-8590-8381  
Pamukkale Üniversitesi,  
Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN  
Enstitü Müdürü

**B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

11/06/2020

**Sarra MSAKNİ**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLMİŞ *BACILLUS* sp. SUŞLARINDAN SELÜLAZ ENZİM ÜRETİMİNİN TARANMASI, BESİNSEL OPTİMİZASYON, ENZİMİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE YÜNLÜ KUMAŞTAKİ BİTKİ ATIKLARININ GİDERİLMESİNDE ETKİNLİĞİ

**Sarra MSAKNİ**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada daha önceden topraktan izole edilmiş toplam 100 adet *Bacillus* sp. suşları selülaaz enzim kapasiteleri bakımından taranmıştır. Toplam 54 *Bacillus* sp. suşu ekstraselüler selülaaz üreticisi olarak bulunmuştur. En iyi selülaaz üreten suş 16S rRNA ile tanımlandı ve *Bacillus substilis* 171ES olarak adlandırıldı. Bu yeni izolat 3 farklı içerikli sıvı ortamda enzim üretim kapasitesi kantitatif olarak test edilmiştir. Besinsel faktörler arasında en iyi karbon kaynağı olarak maltoz, en iyi nitrojen kaynağı olarak yağsız süt tozu ve en iyi metal iyonu olarak  $\text{LiSO}_4$  olarak belirlenmiştir. 171ES suşu, besinsel koşulları optimize ederek elde edilen modifiye ortamda enzim üretiminde 6,6 katlık artış göstermiştir. Kısmen saflaştırılmış enzimin optimum sıcaklığı ve pH değeri, sırasıyla  $50^\circ\text{C}$  ve 7.0 olarak belirlenmiştir. Termostabilite çalışmaları, enzimin termostabil olduğunu göstermiştir.  $\text{MnSO}_4$  ve  $\text{BaCl}_2$ , enzim aktivitesi üzerinde aktifleştirici bir etkiye sahipti.  $V_{\max}$  ve  $K_m$  kinetik değerleri sırasıyla 63,7 U/ml ve 0,0064 mM olarak bulunmuştur. Moleküler ağırlık yaklaşık 73 kDa olarak belirlenmiştir. Ham enzim aktivitesinin  $-20^\circ\text{C}$ 'de 90 güne kadar stabil kaldığı bulunmuştur. Enzimin yünlü kumaşlardan bitkisel atıkların giderilme potansiyeli araştırılmış ve enzimin etkili olduğu saptanmıştır. Yeni izole edilen 171ES bakterisinin selülaazı başta tekstil sanayi olmak üzere diğer sanayilerde kullanma potansiyele sahip olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus*, Selülaaz, Tarama, Optimizasyon, Kısmi Saflaştırma, Karakterizasyon, Tekstil uygulama

2020, x+95

## ABSTRACT

MSc Thesis

SCREENING OF CELLULASE ENZYME PRODUCTION BY BACILLUS sp.  
ISOLATED FROM TURKISH SOILS, NUTRITIONAL OPTIMIZATION, PARTIAL  
PURIFICATION OF ENZYME, CHARACTERIZATION AND EFFECTIVENESS OF  
PLANT WASTE REMOVAL IN WOOL FABRIC.

**Sarra MSAKNI**

Bursa Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, 54 out of 100 *Bacillus sp.* strains were found as extracellular cellulase producers. The best cellulase producing strain was identified by 16S rRNA as *Bacillus subtilis* and named 171ES. This new isolate was quantitatively tested for enzyme production capacity in 3 different liquid media. Maltose was determined as the best carbon source, skim milk powder as the best nitrogen source and LiSO<sub>4</sub> as the best metal ion. 171ES strain showed a 6,6 fold increase in enzyme production in the modified medium created by optimizing nutritional conditions. Optimum temperature and pH of the partially purified enzyme were 50°C and 7.0, respectively. Thermostability studies showed that the enzyme is thermostable. MnSO<sub>4</sub> and BaCl<sub>2</sub> ions had an activating effect on enzyme activity. V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> kinetic values of the enzyme were found to be 63,7 U/ml and 0,0064 mM, respectively. The molecular weight of the enzyme was determined to be 73 kDa. The potential of the enzyme to remove vegetable waste from woolen fabrics was investigated and the enzyme was found to be effective. Cellulase produced by 171ES bacteria may have the potential to be used in the textile industry among many other industries.

**Key Words:** *Bacillus*, Cellulase, Screening, Optimization, Partial Purification, Characterization, Textile application

**2020, x+95**

## TEŞEKKÜR

Tez alıőmamın her aőamasında bana yardımcı olan, bilgi, birikimlerini ve deneyimleriyle esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a yüksek lisans öğrenimim boyunca bana ve hayatıma kattıkları için sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Yünlü kumaőtan bitkisel atıkların giderilmesi çalıőmalarında kumaşı temin eden ve değerli bilgilerini esirgemeyen Tekstil Mühendisliği bölümünden sayın Prof. Dr. Dilek KUT'a,

Yüksek lisans süresince maddi olarak destekleyen Yurtdıőı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na (YTB),

Her zaman iyi niyetliyle ve yardımseverliği ile desteklerini esirgemeyen Arő. Gör. Tuba SEVGİ, Dr. Aynur AYBEY'ye ve ekip arkadaşım Vichi Sicha IRIANTO'ya

Her zaman yanımda olduklarını hissettirerek bana güven veren babam Mohamed MSAKNI, annem Najet CHIHA ve kardeőlerime en içten sonsuz teőekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

11/06/2020

Sarra MSAKNİ

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Selülazların Tarihçesi.....	3
2.2. Selüloz.....	4
2.3. Selülaz.....	6
2.3.1. Katalitik alan (CD) ve selüloz bağlayıcı alan (CBD).....	8
2.4. Selüloz Parçalanma Mekanizmaları.....	11
2.4.1. Kompleks olmayan selüloz.....	12
2.4.2. Kompleks selüloz.....	13
2.5. Sinerjizm.....	15
2.6. Selülazların Sınıflandırılması.....	15
2.7. Selülaz Kaynakları.....	16
2.7.1. Hayvansal kaynaklı selülazlar.....	16
2.7.2. Bitkisel kaynaklı selülazlar.....	17
2.7.3. Mikrobiyal selülazlar.....	18
2.7.4. Fungal (mantar) selülazlar.....	18
2.7.5. Bakteriyel selülazlar.....	19
2.8. Endüstriyel Selülazlar.....	20
2.8.1. Tekstil endüstrisi.....	21
2.8.2. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi.....	22
2.8.3. Çamaşır ve deterjan endüstrisi.....	23
2.8.4. Tarım endüstrisi.....	24
2.8.5. Gıda ve hayvan yemi endüstrileri.....	25
2.8.6. Biyoyakıt endüstrisi.....	25
2.9. <i>Bacillus</i> Cinsinin Genel Özellikler.....	25
2.9.1. <i>Bacillus</i> selülazının genel özellikleri.....	26
2.10. 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Yöntemi.....	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal.....	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. Selülaz pozitif <i>Bacillus</i> sp.lerin kalitatif taranması.....	29
3.2.2. 16S rRNA analizi (filogenetik analiz).....	30
3.2.3. Selülaz üretim ortamının belirlenmesi.....	30
3.2.4. Bakteri üretim koşulları.....	31



	<b>Sayfa</b>
3.2.5. Bakteri üremesinin ölçülmesi ve enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	31
3.2.6. Glukoz standart eğrisi grafiği ve hazırlanışı .....	33
3.2.7. Karbon (C) kaynaklarının etkisi.....	34
3.2.8. Azot (N) kaynaklarının etkisi.....	35
3.2.9. Metal iyonunun etkisi.....	35
3.2.10. Organik atıkların etkisi.....	35
3.2.11. Optimal besinsel faktörlerden modifiye ortam eldesi .....	36
3.2.12. Selülaz enziminin kısmi saflaştırılması.....	36
3.2.13. Protein miktarının belirlenmesi.....	37
3.2.14. Selülaz enzimin karakterize edilmesi.....	38
3.2.15. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	38
3.2.16. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.....	39
3.2.17. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi.....	39
3.2.18. Kinetik parametrelerin saptanması.....	39
3.2.19. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti .....	40
3.2.20. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi .....	43
3.2.21. Selülaz enziminin yünlü kumaşlarda bitkisel artıkların gideriminde kullanım potansiyelinin belirlenmesi .....	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. Selülaz Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi.....	45
4.2. 16S rRNA Analizi (Filogenetik Analiz) .....	46
4.3. Selülaz Üretim Ortamının Belirlenmesi.....	48
4.4.1. Karbon (C) kaynaklarının etkisi.....	50
4.4.2. Azot (N) kaynaklarının etkisi.....	52
4.4.3. Metal iyonlarının etkisi .....	54
4.4.4. Organik atıkların etkisi.....	55
4.5. Maksimum Selülaz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Belirlenmesi .....	56
4.6. Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması .....	57
4.7. Kısmi Olarak Saflaştırılan Selülaz Enziminin Karakterizasyonu .....	59
4.7.1. Sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin etkisi .....	59
4.7.2. pH ve pH stabilitesinin etkisi .....	61
4.7.3. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi.....	64
4.7.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	65
4.7.5. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti.....	67
4.8. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi .....	69
4.9. Selülaz Enziminin Yünlü Kumaşlarda Bitkisel Artıkların Gideriminde Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi .....	70
5. TARTISMA ve SONUÇ .....	72
KAYNAKLAR .....	85
ÖZGEÇMİŞ .....	95

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
A	Adenin
NH <sub>4</sub> Cl	Amonyum Klorür
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	Amonyum Nitrat
CuSO <sub>4</sub>	Bakır sülfat
BaCl <sub>2</sub>	Baryum Klorür
ZnSO <sub>4</sub>	Çinko sülfat
Dk	Dakika
FeSO <sub>4</sub>	Demir sülfat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Diamonyum sülfat
HCl	Gram
G	Guanin
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum klorür
CMC	Karboksil metil selüloz
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogram
LiSO <sub>4</sub>	Lityum sülfat
V <sub>max</sub>	Maksimum enzim aktivitesi
MnSO <sub>4</sub>	Manganez (II) sülfat
MgSO <sub>4</sub>	Magnezyum sülfat
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten sabitesi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
KCl	Potasyum klorür
KNO <sub>3</sub>	Potasyum Nitrat
R <sub>2</sub>	Regresyon Katsayısı
°C	Santigrat Derece
C	Sitozin
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum Klorür
NaNO <sub>3</sub>	Sodyum Nitrat
[S]	Substrat Konsantrasyonu
T	Timin

U  
%

Ünite  
Yüzde oranı

**Kısaltmalar**

Tris  
APS  
Bp  
DNA  
dH<sub>2</sub>O  
EC  
EDTA  
Eİ  
CMC  
MW  
NB  
OD  
PCR  
Rpm  
RT  
BSA  
SDS  
SDS-PAGE  
TEMED  
sp.

**Açıklama**

2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol  
Amonyum Per Sulfat  
Baz çifti (Base Pair)  
Deoksiribonukleik Asit  
Distile Su  
Enzim Komisyonu  
Etilendiamin Tetraasetikasit  
Enzimatik İndeksi  
Karboksil metil selüloz  
Molecular Weight  
Nutrient Broth  
Optik Yoğunluk (Optik Dansite)  
Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
Revolutions Per Minute  
Room Temperature (Oda sıcaklığı)  
Sığır serum albümini  
Sodyum dodesil sülfat  
Sodyum dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi  
Tetrametilendiamin  
Tür

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Selülozun yapısı.....	5
Şekil 2.2. Selülozun yapısı.....	6
Şekil 2.3. Selülazın selüloz üzerindeki etki mekanizması .....	8
Şekil 2.4. Katalitik Alan (CD) ve Selüloz Bağlayıcı Alan (CBD) organizasyonu .....	10
Şekil 2.5. Glikozilin katalitik alanları .....	11
Şekil 2.6. Selülozun kompleks olmayan selülaz sistemi ile hidrolizi .....	12
Şekil 2.7. Trichoderma reesei tarafından selülozun paraçalanması .....	13
Şekil 2.8. Selülozun kompleks selülaz sistemi ile hidrolizi.....	14
Şekil 2.9. Selülazlar ve onların substrat hidroliz yerleri .....	16
Şekil 2.10. Rengin yoğunluğu artan şeker konsantrasyonu ile değişmesi .....	28
Şekil 2.11. DNS yönteminin etki mekanizması .....	28
Şekil 3.1. Glukoz standart grafiği .....	34
Şekil 3.2. Protein standart grafiği .....	38
Şekil 4.1. A: Selülaz üreten <i>Bacillus</i> sp. 171ES'in CMC agarlı ortamdaki çizgi ekim görüntüsü B: Tek koloni hidrolitik zon görüntüsü.....	46
Şekil 4.2. <i>Bacillus substilis</i> 171ES suşunun 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı .....	47
Şekil 4.3. <i>Bacillus substilis</i> 171ES'in 3 farklı içerikli besiyerinde bakteri üremelerinin karşılaştırılması .....	49
Şekil 4.4. <i>Bacillus substilis</i> 171ES'in 3 farklı içerikli besiyerinde selülaz enzim üretimlerinin karşılaştırılması .....	49
Şekil 4.5. <i>Bacillus substilis</i> 171ES'in besiyeri 2'de selülaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri. ....	50
Şekil 4.6. Karbon kaynaklarının selülaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri.....	51
Şekil 4.7. Azot kaynaklarının selülaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri.....	53
Şekil 4.8. Metal iyonlarının selülaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri .....	55
Şekil 4.9. Organik atıklarının selülaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri .....	56
Şekil 4.10. Sıcaklığın kısmi saf enzim üzerine etkisi .....	60
Şekil 4.11. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın stabilitesi.....	61
Şekil 4.12. Saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi bağıl aktivite.....	62
Şekil 4.13. Saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın stabilitesi bağıl aktivite .....	63
Şekil 4.14. Farklı potansiyel bileşiklerin saf enzim üzerine etkileri.....	65
Şekil 4.15. Selülaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis-Menten Grafiği) .....	67
Şekil 4.16. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bant görünümü.....	68
Şekil 4.17. Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri.....	68
Şekil 4.18. Farklı sıcaklıkta ham enzimin depolanma stabilitesi.....	70
Şekil 4.19. pH 4.0'de yün kumaştaki pıtrak görüntüleri.....	71
Şekil 4.20. pH 7.0'de yün kumaştaki pıtrak görüntüleri.....	71

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Çizelge 2.1.</b> Selülađ üreten mantarlar, bakteriler ve Aktinomisetler .....	20
<b>Çizelge 3.1.</b> Selülađ üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi yerleri .....	30
<b>Çizelge 3.2.</b> Selülađ aktivite tayini reaksiyon bileşenleri .....	32
<b>Çizelge 4.1.</b> Selülađ pozitif bakterilerin 24. saatteki zon çapları .....	45
<b>Çizelge 4.2.</b> <i>Bacillus substilis</i> 171ES suşunun 27F_D03 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	47
<b>Çizelge 4.3.</b> <i>Bacillus substilis</i> 171ES suşunun 907R_E03 primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	48
<b>Çizelge 4.4.</b> <i>Bacillus substilis</i> 171ES'in 3 farklı ortamdaki üreme ve selülağ enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	48
<b>Çizelge 4.5.</b> Karbon kaynaklarının üreme ve selülağ enzim üretimi üzerine etkileri .....	51
<b>Çizelge 4.6.</b> Farklı azot kaynaklarının selülağ enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri ..	53
<b>Çizelge 4.7.</b> Metal kaynaklarının selülağ aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri.....	54
<b>Çizelge 4.8.</b> Organik atıklarının selülağ aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri.....	56
<b>Çizelge 4.9.</b> Kontrol ortamı ile modifiye ortamda üreme ve selülağ enzim üretim kapasitesinin karşılaştırılması .....	57
<b>Çizelge 4.10.</b> Farklı Konsantrasyonlarda Amonyum Sülfat çöktürmesi .....	58
<b>Çizelge 4.11.</b> Selülađ enziminin kısmi saflaştırma basamakları .....	58
<b>Çizelge 4.12.</b> Selülađ enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi .....	59
<b>Çizelge 4.13.</b> Sıcaklık stabilitesinin selülağ enzimi üzerine etkisi .....	61
<b>Çizelge 4.14.</b> Enzim üzerine pH'nın etkisi .....	62
<b>Çizelge 4.15.</b> pH stabilitesinin selülađ enzimi üzerine etkisi.....	63
<b>Çizelge 4.16.</b> Potansiyel bileşiklerin enzim üzerine etkileri.....	64
<b>Çizelge 4.17.</b> Selülađ aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	66
<b>Çizelge 4.18.</b> Ham enzimin depolanma stabilitesi.....	69

## 1. GİRİŞ

Enzimler, canlıda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonları katalize eden ve genelde protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Enzimsiz gerçekleşen az sayıda ve spesifik reaksiyon olmasına rağmen, canlı vücudundaki tüm reaksiyonlar genelde enzimler sayesinde yürümektedir. Enzimlerin temelde yaptıkları işlem, reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin daha hızlı gerçekleşmesini sağlamaktır ve bu yeteneği sayesinde pek çok çalışma alanlarında ilgi kaynağı olmaktadır (Durur 2016). Hayvanlar ve bitkiler tarafından üretilmesine rağmen, kontrollü koşullarda kısa sürede ürün elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı oluşturmaktadır. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olması, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha kararlı ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleri sebebi ile daha çok tercih edilmektedirler (Wiseman 1987). Enzimler in vitro koşullarda da katalitik aktivite gösterdiklerinden dolayı mikroorganizmalardan bol miktarda enzim üretilmekte ve bunlar çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilir. Endüstriyel uygulamalarda mikrobiyal enzimlerin kullanımını motive eden diğer faktörler arasında, tüketim malları talebinin artması, maliyet azaltma ihtiyacı, doğal kaynakların tükenmesi ve çevre güvenliği sağlanmasıdır (Choi ve ark. 2015). Ayrıca mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimler mikroorganizmaların özelliklerine bağlı olarak çeşitli niteliklere sahip olabilmektedirler. Bu özellikler de onların aynı gruptaki enzimlerden ayrılıp ön plana çıkmalarını sağlamaktadır. Bu özelliklerden bir tanesi de termostabilitedir ve bu özellik endüstriyel işlemlerde oldukça önemlidir (Berikten ve Kıvanç 2018). Günümüzde enzimler, süt ürünlerinin üretiminde, biracılıkta, etlerin işlenmesinde, meyve sularının berraklaştırılmasında, früktoz şurubu üretiminde kullanılmalarıyla gıda sektöründe, protein ve yağ artıklarını parçalamak üzere deterjan endüstrisinde, deri ve dokuma ipliklerinin işlenmesini kolaylaştırarak tekstilde, teşhis ve tedavi amacıyla tıpta kullanılmaktadırlar (Anonim 2019a). 2014 yılında endüstriyel enzimlerin küresel pazarı yaklaşık 4.2 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir ve 2015-2020 yılları arasında yıllık yaklaşık %7'lik bir büyüme hızı geliştirmesi beklenmektedir (Singh ve ark. 2016). Bölgeler açısından, Kuzey Amerika ve Avrupa dünyadaki en büyük endüstriyel enzim tüketicileridir, ancak Asya Pasifik, Afrika ve Orta Doğu bölgelerinin

gelişmekte olan ekonomileri, endüstriyel enzimler için hızlı gelişen pazarlar olarak ortaya çıkmaktadır (Vinod ve ark. 2014). Dünya genelinde proteazlar yaklaşık %60 pazar payı ile pazardaki en çok satan enzimdir ve bunu karbonhidrazlar (amilazlar, selülazlar, glukanaazlar ve diğerleri), fitazlar ve lipazlar takip etmektedir (Kumar ve ark. 2014). Bu enzimler arasında selülaz enzimi, 2016 yılında pazar payı %32.84 ile en büyük tüketici Asya-Pasifik olmuştur. Selülaz en çok hayvan yemi, tekstil endüstrisi, yiyecek ve içecek sektörlerinde kullanılmaktadır. 2016 yılında rapor edilen verilere göre, selülaz pazar talebinin %29,71'inin hayvan yemi endüstrisinde, %26,37'sinin yiyecek ve içecek endüstrisinde ve %13,77'sinin tekstil endüstrisinde olduğunu göstermiştir (Anonim 2019b). Günümüzde selülazlar önemli araştırma konusu haline gelmiş ve dünyanın hemen hemen her yerinde üretilmeye, endüstri ve sanayi alanında kullanılmaya başlanmıştır.

Selülazlar, selülozdaki 1,4-β-D-glikosidik bağlantıları hidrolize eden enzimlerdir (Anonim 2020a). Endüstride daha çok küf kaynaklı selülazlar tercih edilmektedir. Fakat bakteriler içerisinde *Bacillus* türleri önemli bir yer tutmaktadır. Çünkü *Bacillus* cinsi bakterilerin çok çeşitli ortamlardan izolasyonun kolay olması, hem kompleks hem de sentetik besi ortamında gelişebilmeleri sebebi ile biyoteknolojide en fazla kullanılan mikroorganizmalardır (Mabrouk ve ark. 1998). Günümüzde yeni mikrobiyal enzim kaynaklarının doğadan keşfedilmesi yoluna gidilmekte ya mevcut mikroorganizmalardan mutasyonla verimli suşlar elde edilmekte ya da mevcut mikroorganizmalar kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi ile rekombinant enzimler elde edilmektedir. Yani öncelik, enzim üretiminin ilk aşaması uygun mikroorganizmanın doğadan seçimidir. Ayrıca enzim üretimini artırmak için üretim fermentasyon koşulları önemli olduğundan besi ortamının besinsel ve fiziksel parametreleri de ele alınmaktadır (Khalil ve ark. 2003)

Bu tez projesinin amacıyla, Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında topraktan daha önceden izole edilmiş olan 100 adet *Bacillus* sp. suşunun selülaz üretim potansiyellerinin saptanması, en iyi selülaz üreten bir adet *Bacillus* sp.'nin üretim koşullarının optimizasyonu, enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu, ayrıca yünlü kumaşlarda bitkisel artıkların giderimindeki potansiyelinin araştırılması hedeflenmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Selülozların Tarihçesi

70 yıl önce, filamentöz ascomycete *Trichoderma reesei* II. dünya savaşı sırasında Solomon Adaları'nda çürüten ABD Ordusu ekipmanlarından izole edilmiş ve Elwyn T. Reese tarafından adlandırılmıştır (Allen ve ark. 2009). 1950'de Elwyn T. Reese ve arkadaşları ilk olarak selülozun parçalanmasına katılan enzim mekanizmalarını önermişlerdir. Bu konuda iki aşama belirlemişlerdir; birincisi, anhidroglukoz zincirlerinin şiştiği bir prehidrolitik aşama ve ikincisi, bu polimerlerin rastgele veya uçta hidrolitik yarılmadır. Daha sonra ilk olarak *Trichoderma viride*'den selüloz kompleksini tanımlamışlardır (Mandels ve Reese 1957).

Selüloz içeren kumaşlar üzerinde gelişme ve parçalanma kabiliyeti nedeniyle uzun yıllar ilgi çekmiştir (Bischof ve ark. 2016). 1973'te Berghem ve Pettersson, selüloz bozulmasının ilk adımında yer alan *T. reesei* enzimi, kristal selüloz üzerine etki eden bir  $\beta$ -1,4-glukan sellobiyoz rapor etmiştir. Selobiyoz bu reaksiyonun temel ürünüdür. Enzim, 1975'te Berghem, Pettersson ve Axio-Fredriksson tarafından karakterize edilmiştir. Amino asit ve karbonhidrat analizine dayanarak moleküler ağırlığı 42 kD olarak belirtmişlerdir. Enzim kovalent olarak bağlı %9.2 karbonhidrat içeriyordu, ayrıca pH optimumunun yaklaşık 4.8 olduğunu ve reaksiyon hızının, selobiaz ve endo-glukanaz ilavesiyle arttırılabileceğini bildirmişlerdir (Kubicek 2013).

*T. reesei*'nin selüloz kompleksi en kapsamlı incelenen kompleks olmuştur ve 1975 yılında Howell ve Stuck, selüloz kompleksin karbonhidratlar, özellikle sellobiyoz hariç, inhibitörlere karşı oldukça dirençli olduğunu belirtmişlerdir (Howell ve Stuck 1975).

*T. reesei* üzerine yapılan araştırmalar, *T. reesei* tarafından üretilen selülozların, yenilenebilir lignoselülozik biyokütleden yakıtların ekonomik olarak üretilmesi mücadelesinde büyük bir etkiye sahip olabileceği düşünülmüştür. "QM6a" ismi veren son kalan orijinal *Trichoderma* isolat suşu, günümüzde endüstride kullanılan tüm mutantların türetildiği suştur. QM6a, doğal kristal selülozu parçalanma konusunda olağanüstü bir yetenek göstermiştir (Bischof ve ark. 2016)

Ticari olarak en çok kullanılan selüloz *Trichoderma* sp. tarafından üretilmesine rağmen, bakteriler tarafından üretilen selülozlar genellikle daha etkili katalizörlerdir ve günümüzde çeşitli endüstriyel alanlarda bakteriyel selülozlarının kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır (Suto ve Tomita 2001).

## 2.2. Selüloz

Selüloz, yeryüzünde en bol bulunan doğal polisakkarittir ve bitki hücre duvarının lignoselülozik formda bir ana bileşeni olarak bulunmaktadır. Diğer bileşiklerden farklı olarak selüloz suda kolayca çözünmez, bu nedenle selülozun enzimatik olarak parçalanması lignoselülozik malzemelerin biyodegradasyonu için önemlidir (Behera ve ark. 2017).

Karasal ortamlarda, fotosentezin birincil ürünüdür ve biyosferde üretilen en bol yenilenebilir biyo-kaynaktır (100 milyar kuru ton/yıl) (Zhang ve Lynd 2004). Yeşil algler (*Valonia* ve *Micrasterias*), balçık kalıp *Dictyostelium* ve tunikatlar gibi bazı deniz hayvanlar ve az sayıda bakteri tarafından üretilmesine rağmen, tüm bitki hücre duvarlarında bulunmaktadır. Selüloz başlıca hemiselülozlar ve lignin ile ilişkilidir. Selüloz bitki kuru ağırlığının yaklaşık %35-50'sini oluştururken, hemiselülozlar ve lignin sırasıyla bitki kuru ağırlığının %20-35'ini ve %5-30'unu oluşturur (Behera ve ark. 2017).

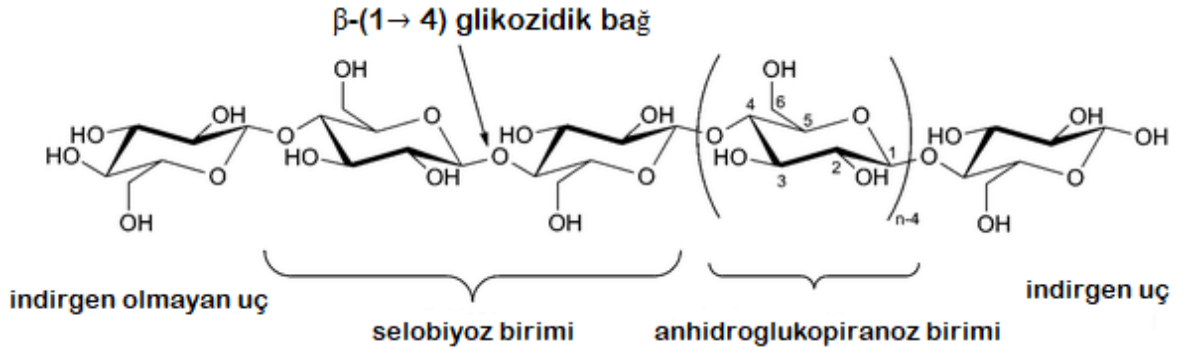
Selüloz dünya çapında muazzam bir ekonomik öneme sahiptir. Selüloz, pamuk (%94+) ve ahşap (%50+) gibi hammaddelerin ana bileşenidir. Selüloz biyosferdeki karbonun yarısından fazlasını oluşturmaktadır (Saranraj ve ark. 2012).

Anselme Payne, 1838 yılında yeşil bitkilerden selülozu keşfeden ve izole eden ilk kişi olmuştur. O zamandan beri selülozik malzemeler günlük insan yaşamında çok önemli bir rol oynamıştır. Bitki yetiştiriciliği için toprağı gübrelemek için kullanılır, sığırlar için yem olarak da kullanılmıştır. Diğer yandan yemek pişirmek ve ısı üretmek için yakacak odun olarak da kullanılmıştır (Jayasekara ve Ratnayake 2019).

Selüloz doğrusal bir polisakkarittir. Bu polimerde, D-glukoz alt birimleri, glukoz moleküllerinin her biri arasında  $\beta$ -1,4-glukozidik bağların oluşturulmasıyla birbirine bağlanmaktadır.  $\beta$ -1,4 bağlantılı D-glukoz birimleri, tekrarlanan birim glukoz yerine selobiyoz olacak şekilde, birbirlerine göre alternatif bir yönde düzenlenir (Lakhundi ve ark.

2015). Selülozun moleküler formülü  $(C_6H_{12}O_6)_n$ 'dir. “n” polimerizasyon derecesini (DP “Degree of Polymerization) gösterir. Birbirine bağlı glukoz alt birimlerinin sayısını sembolize eder. Nişasta gibi, selüloz en az 500 glikoz molekülünden oluşan uzun bir zincirden oluşur. Selüloz bu nedenle bir polisakarittir (Latince "birçok şeker" anlamındadır). Bu polisakarit zincirlerinin birçoğu, selüloz mikrofibriller oluşturmak üzere paralel diziler halinde düzenlenmiştir. Tek tek polisakarit zincirleri, hidrojen bağları ile mikrofibriller içinde birbirine bağlanır. Mikrofibriller, makrofibriller oluşturmak için bir araya getirilir (Anonim 2020b)

Selüloz yapısında birlikte tekrarlanan iki glukoz ünitesine ise “Selobiyoz” denir. Başka bir deyişle, bu polimer  $^4C_1$  konformasyonunda  $\beta$ -(1→4)-D-glukopiranoz birimleri ile yapılıdır. Her bir selüloz molekülünün terminal uçları hariç anhidroglukoz birimi (The anhydroglucose unit, AGU) başına üç hidroksil grubuna sahip olduğu uzun anhidroglukoz birimleri zincirinden oluşur (Şekil 2.1) (Jayasekara ve Ratnayake 2019).

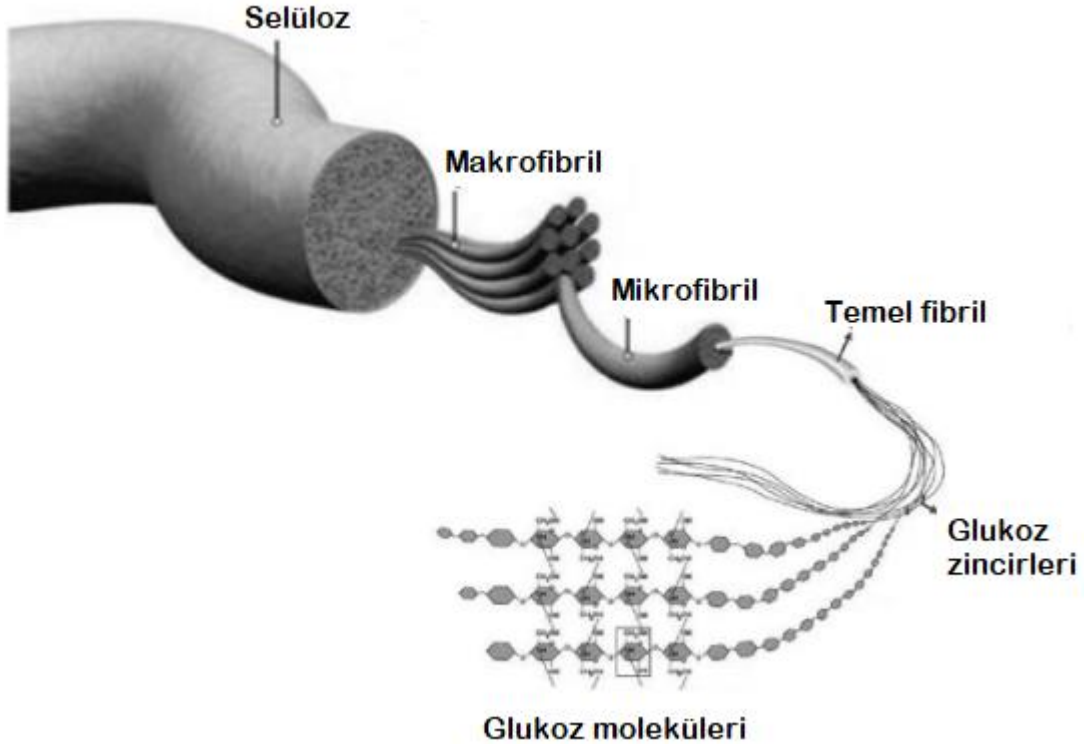


**Şekil 2.1.** Selülozun yapısı (Klemm ve ark. 1988)

Polisakarit dünyasında sıra dışı olan selülozun bir özelliği ise, onun kristalin yapısıdır. (Lynd ve ark. 2002). Selüloz yapısında çeşitli oranlarda hem kristalli hem de amorf bölgelere sahiptir (Ciolacu ve ark. 2011). Bu bölgeler, selülozun yapısını oluşturmak için iç içe geçmiştir. Dört ana kristal form vardır;  $\alpha$ ,  $\beta$ , II ve III. Bu kristal yapı, selülozdaki glukoz monomerleri arasındaki molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlanmasının bir sonucudur. Bu hidrojen bağları, selüloz polimerin kompakt kristal yapısına doğrudan katkıda bulunan büyük bir ağ oluşturur. Öte yandan, bu güçlü molekül içi ve moleküller

arası hidrojen bağı oluşumu selülozun zayıf çözünürlüğüne yol açar (Jayasekara ve Ratnayake 2019).

Selülozun yapısına bakıldığında yaklaşık 30 münferit selüloz molekülü, temel fibriller (protofibriller) adı verilen daha büyük birimlere birleştirilir ve bunlar mikrofibriller adı verilen daha büyük birimlere paketlenir (Şekil 2.2) (Lynd ve ark. 2002). Mikrofibrillerdeki zincirler, yüksek bir gerilme mukavemeti veren hidrojen bağları ile bir arada tutulur. Sıkı paketlenmiş mikrofibrillerin oluşmasıyla sonuçlanan çoklu paralel selüloz tabakaları arasında bu zincirler arası ve zincir içi hidrojen bağıdır. Mikrofibriller daha sonra kristalin selüloz lifleri ile birleşirler (Bishop ve ark. 2002).



**Şekil 2.2.** Selülozun yapısı (Yuan ve Cheng 2015)

### 2.3. Selülaz

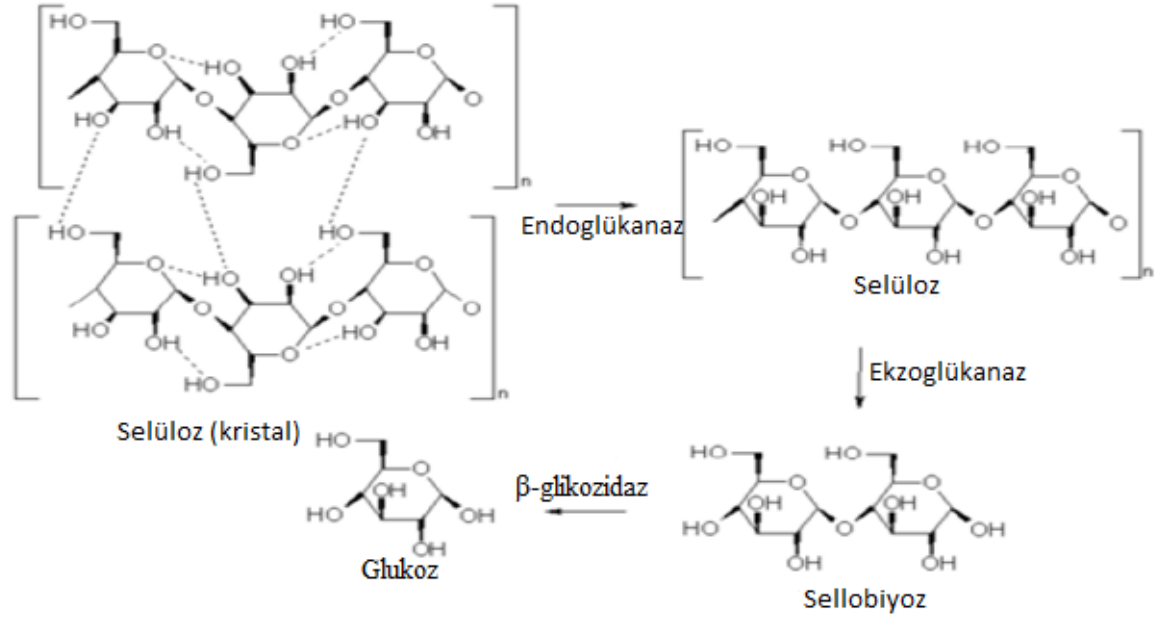
Selülaz, esas olarak selülozu ve bazı ilgili polisakkaritlerin ayrışmasını katalize eden mantarlar, bakteriler ve protozoanlar tarafından üretilen çeşitli enzimlerden biridir. (Anonim 2020a)

Mantarlar, bakteriler ve aktinomisetler doğada etkili selüloz enzim üreticileri olduğu kaydedilmiştir. Bu mikroorganizmalar, serbest veya hücre yüzeyine bağlı selülozları salgılamaktadır. Enzim üretim verimlilikleri ve enzim kompleks bileşimleri her zaman birbirlerinden farklıdır. Hem aerobik hem de anaerobik mikroorganizmalar bu enzimleri üretse de, en çok aerobik selüloolitik mantarlar olan *Trichoderma viride* ve *T. reesei* araştırılmıştır (Jayasekara ve Ratnayake 2019).

Selülozlar selüloz molekülünü  $\beta$ -glukoz veya daha kısa polisakkaritler ve oligosakkaritler gibi monosakkaritlere ayırır. Selüloz yıkımı, ekonomik öneme sahiptir, çünkü bitkilerin önemli bir bileşenini kimyasal reaksiyonlarda tüketim ve kullanım için kullanılabilir hale getirir. Selüloz molekülleri birbirine güçlü bir şekilde bağlandığından, selüloz, nişasta gibi diğer polisakkaritlerin parçalanmasına kıyasla nispeten zordur (Anonim 2020a).

Selüloz parçalanması, selülozda bulunan  $\beta$ -1,4-bağlantılarının hidrolizinden sorumlu olan selülozlar tarafından gerçekleştirilir (Wilson 2008). Kimyasal olarak homojen olmasına rağmen, selüloz kristal ve amorf yapılarından oluşur ve hiçbir enzim tek başına selülozu hidrolize edemez. Çözünmez, kristalin ve heterojen yapısı onu enzimatik hidroliz için dayanıklı ve zorlayıcı bir substrat haline getirir (Schwarz 2001). Selülozun yapısı göz önüne alındığında, enzimin selüloz substrat yerine tutturmasını ve böylece tek bir enzimin selülozu hidrolize etmesini imkansız hale getirir. Bu, diğer polimerler ile birleşmesiyle birlikte, selüloz içeren materyalin sert koşullara dayanmasını ve bozulmaya karşı dayanıklı olmasını ve dolayısıyla yapısal ve koruyucu bir bariyer olarak rolünü yapar. Bu nedenle selüloz, tam hidroliz sağlamak için birbirleriyle etkileşen çeşitli eşzamanlı etkili enzimler tarafından hidrolize edilmektedir. Sonuç olarak, selüloolitik organizmalar bir çoklu-enzim sistemi üretmektedir (Singh ve ark. 1995). Bu çoklu enzim sistemleri, selülozun etkili hidrolizini sağlamak için sinerji içinde hareket eder. Bu polimerik substratın monomerik birimine tam hidrolizi için en az üç farklı tipte enzim aktivitesi gereklidir (Haan ve ark. 2007); Endoglukanaz aktivitesi, Ekzoglukanaz aktivitesi (ayrıca selodekstrinaz veya sellobiohidrolaz da denir) ve  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi. Sadece bu enzim aktivitelerinin ortak işbirliği ile enzimler selülozun yapısını bozabilir ve hidrolize edebilmektedir.

Endoglukanazlar, selüloz molekülündeki amorf bölge içinde rasgele iç kesimler üreterek çeşitli uzunluklarda selo-oligosakkaritleri verir ve böylece yeni zincir uçları oluşturur (Pere ve ark. 2001). Ekzoglukanazlar, yeni oluşan selüloz zincirinin uçlarına etki eder ve son ürün olarak  $\beta$ -selobiyozu oluşturur (Kuhad ve ark. 2011).  $\beta$ -glukozidazlar,  $\beta$ -selobiyoz disakkaritleri glukozu hidrolize etmektedir (Şekil 2.3) (Singh 1999).



**Şekil 2.3.** Selülazın selüloz üzerindeki etki mekanizması (Anonim, 2020a)

### 2.3.1. Katalitik alan (CD) ve selüloz bağlayıcı alan (CBD)

Birçok selülaz iki alandan oluşur: bir katalitik alan (catalytic domain, CD) ve bir selüloz bağlayıcı alan (cellulose-binding domain, CBD) (Şekil 2.4). Katalitik alan, hidroliz reaksiyonundan sorumluyken, selüloz bağlayıcı alan hiçbir katalitik aktiviteye sahip değildir, fakat enzimin çözünmeyen makromoleküler selüloz üzerine adsorpsiyonunu artırır. Doğal enzimlerde bu iki alan bir bağlayıcı peptit ile birbirine bağlanır (Sukumaran ve ark. 2005).

CBD'ler, enzimleri çözünmeyen selülozik yüzeye bir araya getirebildikleri için selüloz kristal bölgelerinin bozulmasında çok önemli bir rol oynarlar. Sadece birkaç

mikroorganizmadan ve daha yüksek bitkilerden kaynaklanan selülazların böyle yapıları yoktur (Herve ve ark. 2010).

CBD'lerin selülozik maddelere göre işlevleri temel olarak üç yönü içerir (Boraston ve ark. 2004):

(i) Yakınlık etkileri: enzimin çözünmeyen substratlara erişilebilirliğini arttırmak için.

(ii) Substrat hedefleme: bitki hücre duvarlarının karmaşık yapılarındaki spesifik karbonhidratları hedeflemek.

(iii) Hidrolitik olmayan selüloz bozulması: selülozun düzenli rijit supramoleküler yapılarını bozmak.

CBD'ler yüksek bir özgüllüğe ve fonksiyonel çeşitliliğe sahiptir. Farklı kaynaklardan gelirler ve işlevleri birbirinden farklıdır. Bugüne kadar, amino asit sekansları, yapıları ve bağlanma spesifisiteleri temelinde 64 farklı ailede sınıflandırılan 50'den fazla farklı türde 300'den fazla CBD sekansı tanımlanmıştır (Shoseyov ve ark. 2006).

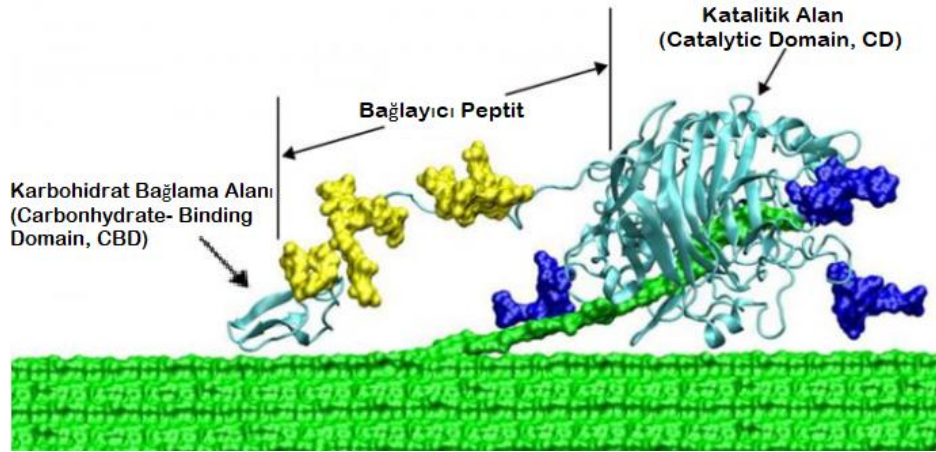
CBD, bir protein içinde tek, çift veya üçlü bir alan olarak bulunur ve 30-200 amino asit içerir. CBD'nin bir polipeptit zincirindeki yeri, C- veya N-terminali olabilir veya protein içinde merkezi olarak konumlandırılabilir.

Selülazlar gibi hidrolitik proteinlerdeki CBD'ler, prolin ve treonin açısından zengin bağlayıcı sekanslar yoluyla CD'lere bağlanır. CBD'nin enzimi, substratı ile yakın ve uzun süreli bir temas sokarak ve böylece kataliz oranını artırarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu nedenle enzimlerin başlatılması ve işlenmesi için önemli sayılırlar. (Lynd ve ark. 2002)

CBD'nin enzimatik alt birimden çıkarılmasının, enzimatik alt birim aktivitesini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. CBD'nin temel rolü, *Trichoderma reesei*'den bir selobiohidrolaz olan CBHI (cellobiohydrolase I) için gösterilmiştir (Lee ve Brown 1997). CBD'siz CBHI enziminin selüloz üzerinde çok sınırlı bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Katalitik birim, tam bir enziminkine benzer hidrolizi başlatabildi, ancak bu aktivite hızla durdu ve selülaz bağlama alanının aktivitesi olmadan selülozun sınırlı olacağı sonucuna

varıldı. Hidrolizasyondan sonra mevcut substrat bölgeleri tükenerek reaksiyonu sona erdirir. Bununla birlikte, CBD varlığında, bağlanma bölgeleri sürekli olarak yeniden düzenlenmiş ve bu da sürekli bir faaliyete izin vermektedir. CBD'lerin ayrıca selülozları katalitik etkinin en aktif olacağı yeni hedef bölgelerine yönlendirdiği düşünülmektedir (Wilson D.B. 2008).

CBD'ler ayrıca selülozik substratlardan selüloz fragmanlarının çıkarılmasında rol oynar ve bu da hidrolizi artırır. Ayrıca, selüloz zincirleri arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin bozulmasını katalizler ve kristallerin yüzeyinde zincirlerin aşınmasına izin vermektedir (Valjamae ve ark. 1998).



**Şekil 2.4.** Katalitik Alan (CD) ve Selüloz Bağlayıcı Alan (CBD) organizasyonu (Clifford 2018)

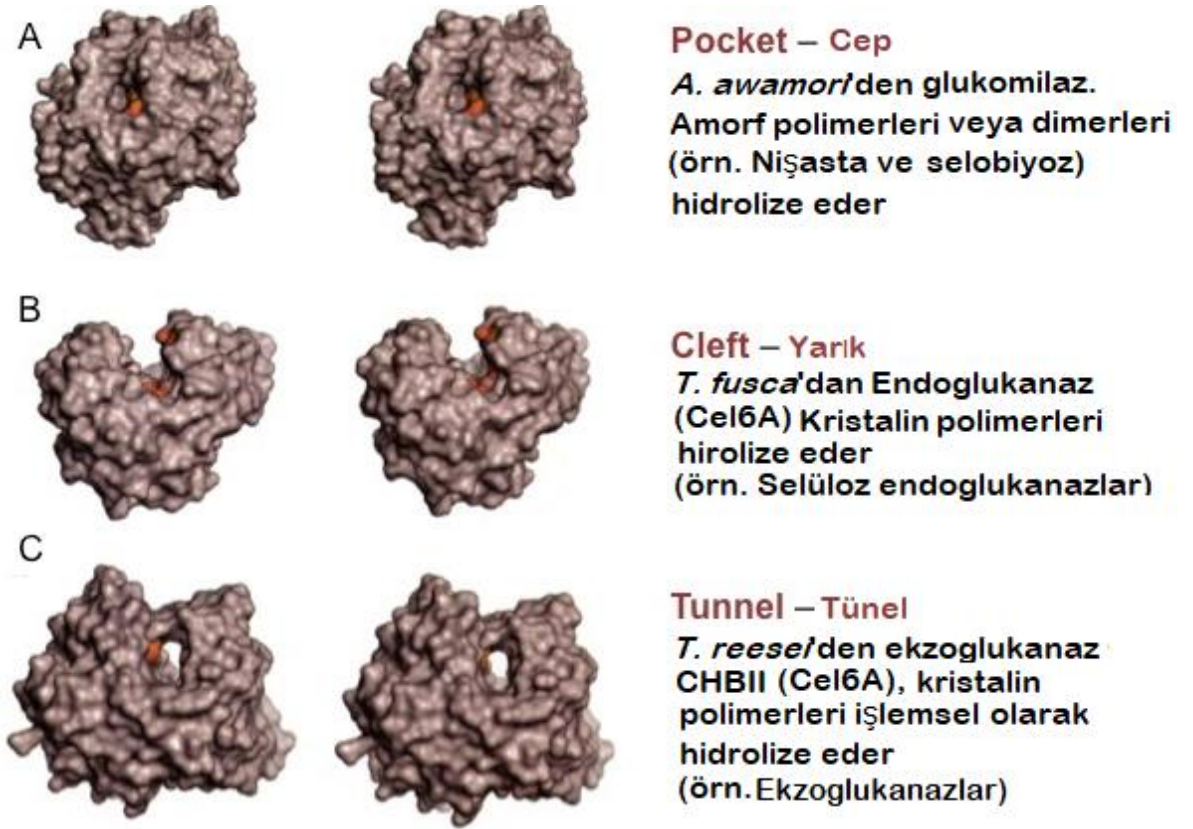
Glikozil hidrolazlar (bir selüloz tipi) ve diğer enzimler arasındaki ana farklılıklardan biri katalitik alanın çalışma mekanizmasıdır. Üç tür katalitik alan vardır: 1) cep, 2) yarık ve 3) tünel (Şekil 2.5).

Cep topolojisi, bir sakaridin indirgeyici olmayan ucun tanınması için idealdir ve monosakaridazlarda görülür. Öte yandan, bu enzimler, neredeyse hiç serbest zincir ucu olmayan selüloz gibi lifli substratlar için çok verimli değildir.



Yarıklı şekilli selüloz katalitik alanlar, polimerik substratlarda birkaç şeker biriminin rastgele bağlanmasına izin veren ve yaygın olarak endoselülozlar gibi endo-etkili polisakkaridazlarda bulunan "açık" yapılardır.

Tünel topolojisi, protein yarıklı kısmını kaplayan uzun döngüler geliştirdiğinde yarıklı topolojisinden kaynaklanır. Şimdiye kadar sadece CBH'de bulunan tünel, bir polisakkarit zincirinin içinden geçirilmesine izin vermektedir.



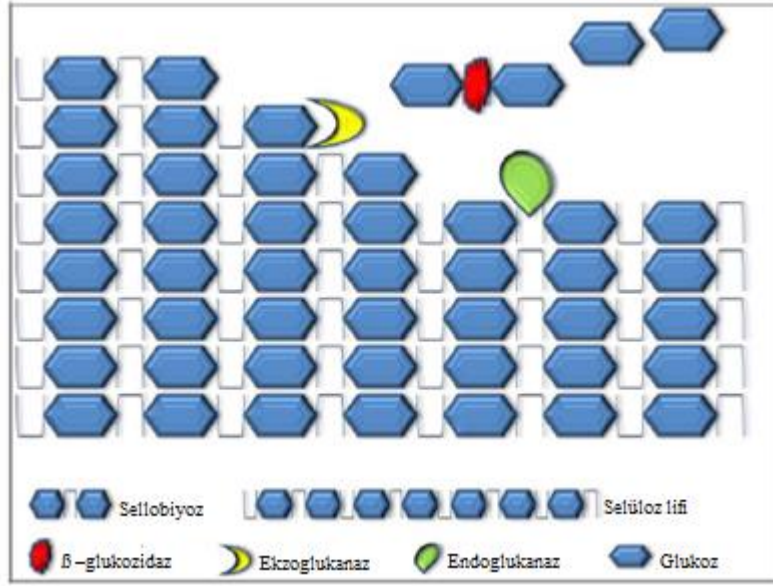
Şekil 2.5. Glikozilin katalitik alanları (Davies ve Henrissat 1995)

#### 2.4. Selüloz Parçalanma Mekanizmaları

Selüloz yıkımı için 2 ana strateji vardır. Bunlar kompleks ve kompleks olmayan selüloz hidrolizidir.

#### 2.4.1. Kompleks olmayan selüloz

Bu sistemde, altı ila on ayrı selüloz enzimi içeren bir set üretilir. Bu selülozlar kompleks oluşturmaz. Kompleks olmayan selüloz sisteminde esas olarak, süpernatanttan geri kazanılabilen hücre dışı serbest selüloz salgılayan aerobik mikroorganizmalarda gözlenir (Xie ve ark. 2007). Enzimler selülozu parçalar ve sonunda hücreler tarafından alınan ve metabolize olan şekerlerin salınmasına neden olur (Şekil 2.6).

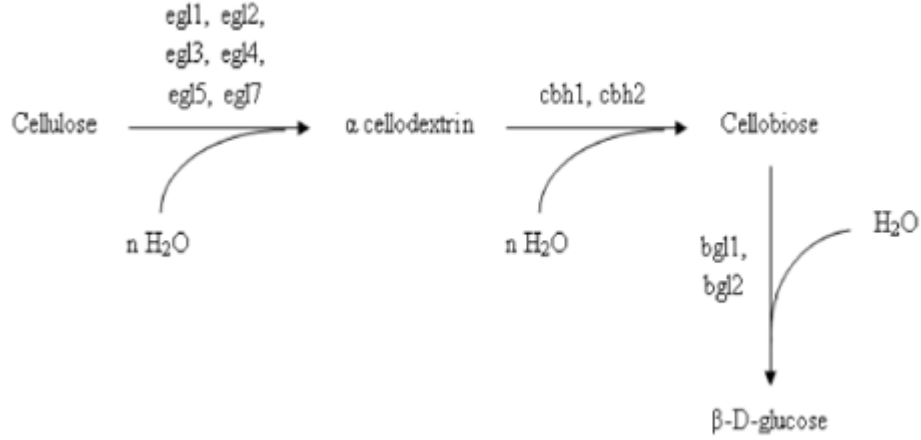


**Şekil 2.6.** Selülozun kompleks olmayan selüloz sistemi ile hidrolizi (Lakhundi ve ark. 2015)

En iyi incelenen kompleks olmayan selüloz sistemleri, *Trichoderma reesei* gibi aerobik mantarlarına ait olanlarıdır (Reese 1956).

*T. reesei* selüloz sistemi beş endoglukanaz, iki ekzoglukanaz ve iki  $\beta$ -glukozidazdan oluşur (Nogawa ve ark. 2001). Endoglukanazların selülozun polimerizasyon derecesini azaltmaktan sorumlu ana bileşenler olmasına rağmen, bunlar sistemin toplam selüloz aktivitesinin sadece %20'sinden azını temsil eder (Lynd ve ark. 2002). Selüloz zincirinin dahili amorf bölgelerde yarılar ve sistemin temel bileşeni olan sellobiohidrolazların etkisine duyarlı yeni zincir uçları oluştururlar (Teeri ve ark. 1992). Sellobiyoz, sellobiohidrolaz

aktivitesinin ana son ürünüdür ve daha sonra glukozu serbest bırakan iki  $\beta$ -glukosidaz tarafından hidrolize edilir (Şekil 2.7).



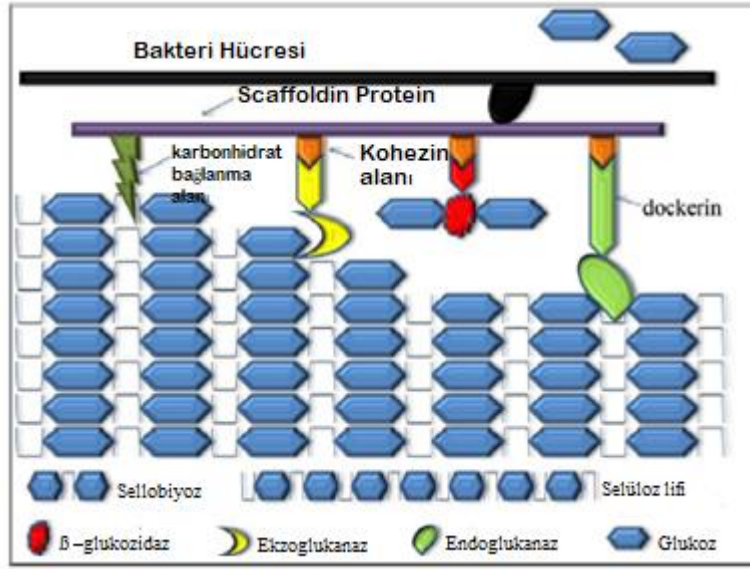
**Şekil 2.7.** *Trichoderma reesei* tarafından selülozun paraçalanması(Lakhundi ve ark. 2015)

#### 2.4.2. Kompleks selüloz

Kompleks selülaz sistemi çoğunlukla anaerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılır ve genellikle organizmanın yüzeyine bağlı “selülozom” adı verilen büyük protein komplekslerinden oluşur (Lynd ve ark. 2002, Teeri 1997) (Şekil 2.8). Bu terim ilk olarak 1983 yılında *Clostridium thermocellum*'un selülaz sistemini incelerken Lamed ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Lamed ve ark. 1983).

Selülozom, bakterilerin selüloza bağlanmasına yardımcı olur ve daha sonra hücreler tarafından alınan hidroliz ürünlerinin lokal olarak salınmasına neden olur. Selülozomlar, “Scaffoldin” denilen iskele alt birimleri tarafından bir arada tutulan çok çeşitli selülazlar ve ilgili enzim alt birimleri içermektedir. Scaffoldin alt birimleri, multimoleküler kompleksi bir arada tutan büyük, modüler polipeptitlerdir. Selülozom bir CBD, işlevi bilinmeyen bir veya daha fazla korunmuş hidrofilik modül, ve en önemlisi birden fazla koheziv alanı içermektedir. Selülozomal enzim alt birimlerinin, enzimlerin selülozom kompleksine entegrasyonuna aracılık eden “dockerin” denilen bir alan içerdiği bilinmektedir. Enzimatik alt birimlerin dockerinler, iskele alt biriminin koheziv alanlarına bağlanır. Selülozomlardaki çeşitli kohezivlerin ve dockerinlerin arasındaki bağlanmalarında çok az özgüllük vardır

veya hiç yoktur. CBD, iskele alt biriminin selülozik substrata tanınmasına ve bağlanmasına yardımcı olur (Bayer ve ark. 1998). Selülozomların büyüklüğü 2 - 16 MDa arasında değişmektedir, ancak poliselülozomlar durumunda, boyut 100 MDa'ya kadar olabilir (Schwarz 2001). Selülozomal bileşenlerin sadece selülazları değil, hemiselülazları da içermesi, doğal ortamda selüloz ile ilişkili diğer polimerlerin parçalanmasından sorumlu enzimleri içermesi dikkat çekicidir.



**Şekil 2.8.** Selülozun kompleks selülaz sistemi ile hidrolizi (Lakhundi ve ark. 2015)

Selülozom yoluyla selüloz genellikle yüksek verimli bir işlemdir ve bir dizi avantaja sahip olabilir:

- Selülozomal yapının bileşenlerinde doğru oranın varlığı sinerjizmi optimize eder.
- Münferit bileşenlerin optimum organizasyonu, verimsiz bağlanmayı önleyerek sinerjiyi en üst düzeye çıkarır.
- Tüm kompleksin tek bir bölgeye bağlanması nedeniyle farklı bileşenler arasındaki rekabet sınırlıdır.
- Bir komplekste farklı spesifisiteye sahip enzimlerin varlığı, selüloz parçalanması işlemindeki aksatmayı önler. (Lakhundi ve ark. 2015)

## 2.5. Sinerjizm

Selülaz sistemi, “Sinerjizm” olarak tanımlanan tüm enzimlerin kolektif etkisi ile selülozu hidrolize eder. Sinerjizm, bireysel enzimlerin aktivitelerinin toplamından daha yüksek bir kolektif aktiviteye sahiptir. Dört sinerjizm biçimi bildirilmiştir (Teeri 1997):

- Endo-exo sinerjisi olarak adlandırılan endoglukanaz ve ekzoglukanaz arasındaki sinerjizm
- Ekzo-ekzo sinerjisi olarak adlandırılan ekzoglukanazlar arasındaki sinerjizm
- Ekzoglukanaz ve  $\beta$ -glukozidaz arasındaki sinerjizm, ekzoglukanaz inhibe eden sellobiyozu gidermek için
- Katalitik (CD) ve selüloz bağlama alanları (CBD) arasındaki sinerjizm

## 2.6. Selülazların Sınıflandırılması

Katalizlenen reaksiyon türlerine göre de selülazlar beş farklı tipte sınıflandırılabilir (Şekil 2.9) (Singh ve ark. 2019);

### Endoselülazlar

Selülazın iç bağları, amorf konumlarda endoselülazlar tarafından rasgele yarılr, böylece farklı zincir uçları oluşturur. örneğin, endoglukanazlar (EC 3.2.1.4).

### Ekzoselülazlar

Endoselülazlar (EC 3.2.1.91) tarafından oluşturulan zincir, açıkta kalan zincirin ucuna yakın 1-3 üniteye bölünerek tetrasakkaritler veya disakkaritler, yani selobiyoz ile sonuçlanır. Eksoselülazlar yine iki sınıfa ayrılır: tip I, bu enzimler selüloz polimerik zincirin indirgeyici uçları üzerinde etkili, tip II ise indirgeyici olmayan uçlar üzerinde etkilidir.

### Selobiazlar

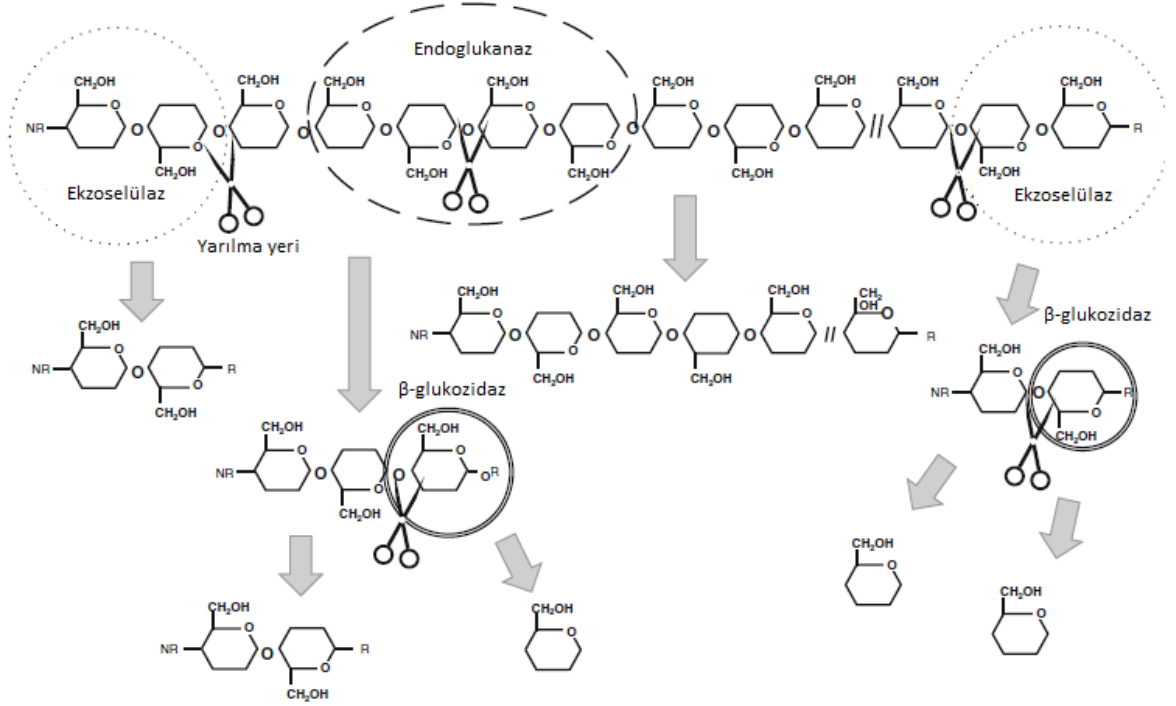
$\beta$ -glukozidaz olarak da adlandırılan selobiazlar (EC 3.2.1.21), ekzoselülazları monosakkarit birimlerine hidrolize ederek sindirirler.

## Oksidatif Selülazlar

Bu selülaz sınıfı, sellobioz dehidrojenazın bir alıcı molekül olarak kullanıldığı radikal reaksiyon mekanizması tarafından polimerik zincirin açılmasına etki etmektedir.

## Selüloz Fosforilazlar

Selüloz fosforilazlar, substratı depolimerize eden enzimlerdir; su yerine fosfat kullanırlar.



Şekil 2.9. Selülazlar ve onların substrat hidroliz yerleri (Tanimura ve ark. 2013)

## 2.7. Selülaz Kaynakları

Selülazlar başlıca mantarlar, ardından bakteriler tarafından üretilir ve bazı durumlarda protozoanlar, bitkiler ve hayvanlar tarafından üretildiği bulunmuştur (Zhang ve Zhang 2013).

### 2.7.1. Hayvansal kaynaklı selülazlar

Selüloz birçok hayvan türü için önemli bir besin kaynağı olmasına rağmen, omnivorlar ve otçul hayvanların çoğu selülaz üretmez ve selülitik mikroorganizmalarla ortak yaşam

içinde yaşamaktadırlar. Örneğin, geviş getiren hayvanların bakteriler ve protozoaların anaerobik koşullar altında selülozu parçaladığı oldukça uzmanlaşmış sindirim yolları vardır. Geviş getirmeyen herbivöz memelilerde ve kuşlarda, selüloz sindirimine mikroorganizmalar da aracılık eder (Attwood ve ark. 1996) .

Simbiyotik protozoa veya bakterilerin varlığı, omurgasızlarda ve otçul sığırlarda selüloz sindirimini açıklamak için kullanılmıştır. Bu teori ilk olarak Cleveland (1924) tarafından, termitlerle yaptığı bir çalışmada, arka bağırsaktan protozoaların çıkarılmasından sonra *Reticuliterm flavipes* termitlerin ölümünü gösterdiği ve böylece konakçıların selüloz sindiriminden bir arka bağırsak protozoa faunasının sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla simbiyotik selülaz üretimi yüksek hayvanlarda selüloz sindirimi için en çok tercih edilen açıklama haline gelmiştir (Martin 1991).

Diğer yandan, endojen selülazlar, bazı termitler, salyangozlar ve solucanlar gibi birkaç tip metazoa hayvan tarafından üretilir (Watanabe ve Tokuda 2001). Bazı çalışmalar, eklembacaklıların ve yumuşakçaların sindirim sistemindeki hepatopankreas (Elyakova ve ark. 1968), yumuşakçaların mide apratı ve çift kabukluların mide gibi (Xu ve ark. 2000) olası endojen enzim kaynaklarını bildirilmiştir.

### **2.7.2. Bitkisel kaynaklı selülazlar**

Selüloz degradasyonunun sadece heterotrofik organizmalar tarafından gerçekleştirilebileceği varsayımı, tek hücreli yeşil alglerin de selülaz üretebildiği keşfedildiğinde yok olmuştur. Selülazlar yeşil mikroalglerde (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Gonium pectoral* ve *Volvox carteri*) bulunmuştur ve bunların GH9 Ailesi'ne ait katalitik alanları (CD) metazoa endojen selülazlara en yüksek sekans homolojisini göstermektedir (Guerriero ve ark. 2018).

Bazı bitkiler selülaz enzimlerini eksprese edecek şekilde tasarlanmıştır. *Acidothermus cellulolyticus* bakterisinden elde edilen selülaz E1, transgenik bitkilerde üretilen bir endoglukanazın en yaygın örneğidir. Bitkilerde E1 üretilmesinin nedeni, 81°C'lik optimum aktivite sıcaklığına sahip hipertermofilik bir enzim olmasıdır. Sonuç olarak, E1 enzimi bitki büyümesini destekleyen sıcaklıklarda aktif olmaz, fakat gerekli olduğunda, örneğin,

biyoyakıt üretimi için bitki dokusu daha yüksek sıcaklıklara maruz bırakıldığında enzim aktive edilebilir. Optimum sıcaklıkları 60°C'den yüksek olan termofilik selülozların kullanılması, konakçı bitkilere çok az zarar verir ve transgenik bitkiler, dönüştürülmemiş muadillerine morfoloji ve gelişim açısından çok benzemektedir. Selüloz E1'i ifade eden ilk bitki tütün olmuştur (Hefforen 2017).

Bugüne kadar, selüloz üretmek için birçok transgenik bitki üretilmiştir. Örneğin, bir termofilik bakteri olan *Thermobifida fusca*'dan endoglukanaz Cel6A yonca, tütün ve patates'te eksprese edilmiştir. Mısır ayrıca *Trichoderma reesei*'den CBH1'i eksprese etmek için kullanılır ve muadili vahşi tipine kıyasla verim veya büyüme performansı açısından farkı göstermez (Garda ve ark. 2015).

### **2.7.3. Mikrobiyal selülozlar**

Mikroorganizmalar doğada meydana gelen selüloz parçalanmasının çoğunu gerçekleştirmektedirler. Bunu çoklu enzim sistemlerinin yardımıyla yaparlar. Selülozlar, selülozik materyaller üzerindeki büyümeleri sırasında hem mantarlar hem de bakteriler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenen indüklenebilir enzimlerdir (Çizelge 2.1) (Sang-Mok ve Koo 2001). Selüloz parçalayan mikroorganizmalar arasında mantarlar, bakteriler, aeroblar, anaeroblar, mezofiller ve termofiller bulunur ve çeşitli habitatlarda bulunabilirler (Saranraj ve ark. 2012). Bunlar arasında *Clostridium*, *Selülomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* ve *Aspergillus* cinsleri en çok incelenen selüloz üreticilerdir (Sukumaran ve ark. 2005)

Az da olsa, aktinomisetler de selüloz üretebilir. Selüloz üreten aktinomisetler arasında en çok *Microbispora bispora* ve *Thermobifida fusca* incelenmiştir (Lynd ve ark. 2002).

### **2.7.4. Fungal (mantar) selülozlar**

Selüloz parçalayan mikroorganizmalar arasında mantarlar önemli selüloz ayrıştırıcılarıdır ve yeryüzündeki selüloz yıkımının %80'inden sorumludur. Bu, özellikle mantarların selüloz ve ligninin ana ayrıştırıcıları olduğu orman ekosistemlerinde belirgindir (Alexopoulos ve ark. 1996).



Selüloz ayırışan mantarlar arasında Ascomycota, Basidiomycota ve Deuteromycota phylum üyeleri bulunur. Verimli selüloolitik mantarlar arasında *Aspergillus*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Acremonium*, *Ceratocystis*, *Myrothecium*, *Humicola*, vb. türler bulunmaktadır (Wood 1985).

Aerobik mantar selülazları genellikle endüstri tarafından tercih edilir, çünkü bunlar hücre dışı, adaptif yapıdadır ve büyüme sırasında genellikle büyük miktarlarda salgılanır. Bakteriyel ve anaerobik mantar selülazları çoklu enzim kompleksleri olarak ve genellikle zara bağlı selozomlar olarak bulunduğundan, aerobik mantar selülazların aksine bireysel aktif enzimlerin geri kazanılmasını zordur ve dolayısıyla ekonomik olarak daha az önemlidir (Mathew ve ark. 2008). Aerobik mantarlardan selüloolitik enzimin üretimi yaygındır; bunların arasında, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ve *Sclerotium* türleri oldukça selüloolitik olarak bulunur ve çoğunlukla ticari olarak kullanılmaktadır (Milala ve ark. 2005).

### **2.7.5. Bakteriyel selülazlar**

Mantarlar, bol miktarda selüloolitik enzim üretme kabiliyetleri, bakteriyel selülazlardan daha az karmaşık olması, ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri daha kolay olması nedeniyle selülaz üretimi için kullanılmıştır. Bununla birlikte, selülazın bakterilerden izolasyonu ve karakterizasyonu son yıllarda önem kazanmıştır. Bunun çeşitli nedenleri vardır;

- i) Bakteriler genellikle mantarlardan daha yüksek bir büyüme oranına sahiptir, bu da daha yüksek enzim üretimi ile sonuçlanır
- ii) Bakteriyel selülazlar genellikle daha karmaşıktır ve daha fazla fonksiyon ve sinerji sağlayan çoklu enzim komplekslerinde bulunur
- iii) Bakteriler çevresel streslere karşı son derece dirençli selüloolitik suşlar üreten termofilik veya psikrofilik, alkalifilik veya asidiyofilik ve halofilik ortamlarda gelişebilir. Bu suşlar dirençli ve aşırı koşullarda stabil selüloolitik enzimler üretebildikleri için biyodönüşüm süreçlerinde kullanılabilirler (Miranda ve ark. 2009).

Bu ayrıca enzimatik hidroliz, fermantasyon ve ürün geri kazanım oranlarını artırabilmektedir. Araştırmacılar, bu enzimleri çeşitli endüstrilerde kullanılmak üzere uygulamaya ve geliştirmeye odaklanıyor (Sadhu ve Maiti 2013)

En iyi karakterize selüloz sistemlerine sahip olan aerobik selüloolitik bakterilerin bazıları: *Cellulomonas* sp., *Cellvibrio* sp., *Microbispora bispora* ve *Thermomonospora* sp. Anaerobik selüloolitik bakteri örnekleri ise : *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteriodes succinogenes*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus* ve *Ruminococcus flavefaciens* (Saranraj ve ark. 2012).

**Çizelge 2.1.** Selüloz üreten mantarlar, bakteriler ve Aktinomisetler (Kuhad ve ark. 2011)

Mantarlar	Yumuşak Çürüklük Mantarları <i>Aspergillus niger</i> ; <i>A. nidulans</i> ; <i>A. oryzae</i> ; <i>A. terreus</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>F. oxysporum</i> ; <i>Humicola insolens</i> ; <i>H. grisea</i> ; <i>Melanocarpus albomyces</i> ; <i>Penicillium brasilianum</i> ; <i>P. occitanis</i> ; <i>P. decumbans</i> ; <i>Trichoderma reesei</i> ; <i>T. longibrachiatum</i> ; <i>T. harzianum</i> ; <i>Chaetomium cellulyticum</i> ; <i>C. thermophilum</i> ; <i>Neurospora crassa</i> ; <i>P. fumigosum</i> ; <i>Thermoascus aurantiacus</i> ; <i>Mucor circinelloides</i> ; <i>P. janthinellum</i> ; <i>Paecilomyces inflatus</i> ; <i>P. echinulatum</i> ; <i>Trichoderma atroviride</i>
	Kahverengi Çürüklük Mantarları <i>Coniophora puteana</i> ; <i>Lanzites trabeum</i> ; <i>Poria placenta</i> ; <i>Tyromyces palustris</i> ; <i>Fomitopsis</i> sp.
	Beyaz Çürüklük Mantarları <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Sporotrichum thermophile</i> ; <i>Trametes versicolor</i> ; <i>Agaricus arvensis</i> ; <i>Pleurotus ostreatus</i> ; <i>Phlebia gigantea</i>
Bakteriler	Aerobik Bakteriler <i>Acinetobacter junii</i> ; <i>A. amitatus</i> ; <i>Acidothermus cellulolyticus</i> ; <i>Anoxybacillus</i> sp.; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>B. pumilus</i> ; <i>B. amyloliquefaciens</i> ; <i>B. licheniformis</i> ; <i>B. circulans</i> ; <i>B. flexus</i> ; <i>Bacteriodes</i> sp.; <i>Cellulomonas biazotea</i> ; <i>Cellvibrio gilvus</i> ; <i>Eubacterium cellulosolvens</i> ; <i>Geobacillus</i> sp.; <i>Microbispora bispora</i> ; <i>Paenibacillus curdlanolyticus</i> ; <i>Pseudomonas cellulosa</i> ; <i>Salinivibrio</i> sp.; <i>Rhodothermus marinus</i>
	Anaerobik Bakteriler <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ; <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> ; <i>Clostridium thermocellum</i> ; <i>C. cellulolyticum</i> ; <i>C. acetobutylium</i> ; <i>C. papyrosolvens</i> ; <i>Fibrobacter succinogenes</i> ; <i>Ruminococcus albus</i>
Aktinomisetler	<i>Cellulomonas fimi</i> ; <i>C. bioazotea</i> ; <i>C. uda</i> ; <i>Streptomyces drozdowiczii</i> ; <i>S. lividans</i> ; <i>Thermomonospora fusca</i> ; <i>T. curvata</i>

## 2.8. Endüstriyel Selülazlar

Onlarca yıldır selülazlar biyokatalizörler olarak çok önemli bir rol oynamıştır. Tekstil, kağıt ve kağıt hamuru, çamaşır ve deterjan, tarım, ilaç gıda ve yem endüstrileri, mikrobiyal selülaz kullanan başlıca endüstrilerden bazılarıdır. Coherent Market Insights raporuna göre, 2017'de selülazlar en çok tekstil endüstrisinde kullanılmıştır. 2018'de yayınlanan enzim pazarı araştırma raporlarının çoğuna göre, yiyecek ve içecek, tekstil, hayvan yemi ve biyoyakıt endüstrilerinin selülaz uygulamalarının ana alanları olduğu bildirilmiştir (Jayasekara ve Ratnayake 2019).

Selülaaz ayrıca *Pseudomonas* tarafından üretilen biyofilmlerin tedavisi için mevcut antibiyotiklere etkili bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, selülaazların antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı savaşıma potansiyeli sağlık sektöründeki sorunların üstesinden gelmek için umut verici bir eğilimdir. (Lavanya ve ark. 2011)

2018'de yayınlanan bir başka Küresel Selülaaz Pazar Araştırma Raporuna göre, Asya-Pasifik, 2016 yılında yaklaşık %32.84 gelir pazar payı ile selülaazın en büyük tüketicisidir. Ayrıca, rapor edilen verilere göre 2016 yılında hayvan yemindeki selülaaz pazar talebinin %29,71'ini, yiyecek ve içeceklerde %26,37'sini ve tekstil endüstrisinde %13,77'sini göstermiştir. Aynı raporda, selülaaz uygulamalarının 2025 yılın sonunda 230 milyon USD'ye ulaşacağı öngörülmüyor. Bu veriler, selülaazların endüstrilere uygulanmasının her yıl ciddi şekilde arttığını göstermektedir. Danimarka'dan Novozymes ve DuPont, bu enzimleri endüstriyel uygulamalar için küresel pazara tedarik eden önemli selülaaz enzim üreticileridir (Jayasekara ve Ratnayake 2019).

### **2.8.1. Tekstil endüstrisi**

Selülaazlar tekstil endüstrisinde en fazla kullanılan enzimlerdendir. Endoglukanazlar bakımından zengin selülaazlar pamuklu kumaşlarda biyoparlatma işlemi için en uygundur. Biyoparlatma işleminde herhangi bir kimyasal kullanmaya ihtiyaç duymadan selülozik kirler ve yüzeydeki gevşek lifler başarılı bir şekilde giderilerek kumaş görünümünü, hissini ve rengini artırırlar (Bhat 2000). Ayrıca selülaaz enzimi ile biyoparlatma yapılan mamüllerde nemin yaklaşık %6 oranında arttığı görülmüştür. Tutumun ve esnekliğin geliştirilmesi, yüzey yumuşaklığı, mercerizeli mamüllerde materyal yapışmasının önlenmesi, yıkamaya dayanım, kullanım sırasında neps oluşumunu engellemede selülaaz enzimi kullanılmaktadır (Doğan 2015). Tekstil Endüstrisinde, kumaşlarda boyanın fazlasını almada (biostoning), birçok yıkama sonunda pamuk kumaşlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde ve pamuk ya da pamuklu kumaşların yıkanması, renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında kullanılır (Aygan 2008).

Yünde ise enzimler, biyolojik temizleme, karbonizasyon ve mukavemet direnci için kullanılmaktadır. Yün ham olarak geldiği ilk aşamada ağırlıklarının %5-40'ı kadar bitkisel artıklar bulundurmaktadır. Pıtrak, diken, ot, yaprak, yem artıklarından oluşan bu bitkisel

kaynaklı maddeler birkaç kat tabakada bulunan binlerce bitki hücresinin meydana getirdiği bitki dokularından oluşan morfolojik yapılardan köken almaktadır. Bitki hücresi ise hücre duvarı, orta lamel, birincil duvarı ve ikincil duvarı olmak üzere 3 tip tabakadan oluşan güçlü bir lif ağından oluşmaktadır. Mevcut hücre duvar modellerine göre birincil duvar, selüloz / hemiselüloz ağı oluşturan hemiselülozik polisakkaritler ile birbirine bağlanmış selüloz mikrofibrillerden oluşur (Gouveia ve ark. 2008).

Tekstil endüstrisinde sıklıkla bitkisel atıklardan kurtulmak için kimyasal yöntemlerden faydalanma yoluna gidilir bu işleme 'karbonizasyon (kömürleştirme)' denir (Tarakçıoğlu, 1983). Karbonizasyonun esasını, mamulün inorganik asitlerle veya ısıtılınca asidik özellik gösteren tuzlarla yüksek sıcaklıklarda işlem görmesi oluşturur. Yünün bu inorganik asitlerle karbonizasyonu life zarar verebilmektedir (Körlü ve ark. 2009). Yün karbonizasyonunda, yünden bitki artıklarını giderme işleminde çoğunlukla sülfürik asit kullanılmakta ve istenmeyen çevresel etkilere neden olmaktadır. Bitki kalıntılarının tam olarak parçalanması için yüksek miktarda sülfürik asitin (%5-7) yanı sıra yüksek sıcaklıklara (120-130°C) ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek sıcaklıklarda pişirilmeden önceki nem içeriği ve kumaşlar üzerindeki heterojen asit dağılımı gibi işlem parametrelerinde kontrolün olmaması yün liflerine zarar verebilmekte ve çevre dostu olmamaktadır (Gouveia ve ark. 2008). Enzimler bu anlamda doğal protein yapısında olduklarından, çok kolay ve hızlı bir şekilde biyolojik olarak parçalanmakta ve atık su yükü oluşturmamaktadırlar.

Yünde enzimler, biyolojik temizleme, karbonizasyon ve mukavemet direnci için kullanılmaktadır. Yün karbonizasyonu için selülozik enzimlerin ticari kullanıma hazır bir duruma getiren BIOCARBO teknolojisi %1-1.5 sülfürik asit kullanılarak bitki artıklarının verimli bir şekilde giderildiğini ve çalışmada yüne hasar gelmediği bildirilmektedirler (Kaur ve ark. 2016). Selülozik enzimlerin sayesinde karbonizasyon işleminde kullanılan sülfürik asit miktarı azaltılmaktadır ve oldukça çevre dostu bir yöntemdir.

### **2.8.2. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi**

Kağıt endüstrisi dünyanın en büyük sanayi sektörlerinden biridir. World Wildlife Fund'a (WWF) göre, ofis ve katalog kağıdı, parlak kağıt, kağıt mendil ve kağıt bazlı ambalaj gibi

ürünleri içeren kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi, küresel olarak kullanılan ahşabın %40'ından fazlasını kullanmaktadır (Shah 2013). Kağıtlar ve kağıt hamuru yenilenebilir kaynaklardır. Bu nedenle, geri dönüşüm ve yeniden kullanım bu endüstride iki popüler kavramdır. Mikrobiyal selülazların uygulanması genellikle bu amaç için kullanılır.

**Kağıt hamuru üretimi;**

Odunsu hammaddelerin mekanik hamurlaştırma işlemlerindeki dezavantajlar arasında, hamurda yüksek miktarda ince tozları ve sertlik sayılabilmektedir. Aynı zamanda, bu yöntem yüksek enerji tüketiyor, dolayısıyla da endüstriler için karlı bir seçenek değildir. Selülazlar gibi enzimleri kullanarak kağıt hamuru üretimi enerji tasarrufu sağlayan çevre dostu bir yöntemdir (Garside 2019). Enerji tasarrufunun %20-40 civarında olduğu bildirilmektedir. Arıtma işlemi sırasında küçük hamur parçacıkları üretilir ve bu parçacıklar kağıt yapma işlemi sırasında drenaj oranını azaltır. Bu parçacıklar, hamurun drenaj kabiliyetini arttırmak için selülazlar tarafından kolayca parçalanabilir. Biyolojik kağıt hamurlaştırma, maliyet ve çevresel etkiyi azaltırken kağıt hamurunun kalitesini ve özelliklerini geliştirme potansiyeline sahiptir (Sharma ve ark. 2016).

**Mürekkep giderme;**

Geleneksel mürekkep giderme işlemi, kirleticilerin salınımını artıran, büyük miktarlarda çevreye zararlı kimyasallar kullanılan pahalı bir yöntemdir (Zhang ve ark. 2013).

Biyo- mürekkep gidermenin ana avantajı, kağıdın sararmasını önleyen asidik enzimlerin kullanılmasıdır. Selülazların tek başına veya ksilanaz ile kombinasyon halinde kullanılması, farklı tipte kağıt atıklarının mürekkep gideriminde faydalıdır. Çoğu durumda, karbonhidrat moleküllerinin kısmi hidrolizi, kağıt elyafı yüzeyinden mürekkep salınmasına neden olur. Bu, tek başına selülazların bir karışımı veya selülazlar ve hemiselülazların kombinasyonu ile yapılır. Enzimatik mürekkep giderme ile ilişkili avantajlar; kağıdın temiz görünümü, gelişmiş parlaklık ve çevre kirliliğinin azaltılmasıdır (Jayasekara ve Ratnayake 2019).

### **2.8.3. Çamaşır ve deterjan endüstrisi**

Enzimlerin yıkama maddelerine veya deterjanlara uygulanması 1960'lara dayanmaktadır. Deterjan formüllerinde enzimlerin kullanılması günümüzde yaygın bir uygulamadır.

Çamaşır deterjanı endüstrisi ile ilgili bir araştırma raporuna göre, küresel pazar büyüklüğü 2016 yılında 133,3 milyar USD olarak değerlendirilmiştir. Sektördeki son trend, alkali enzimleri büyük miktarlarda kullanmaktır. Örneğin, proteaz, selüloz,  $\alpha$ -amilaz, lipaz ve mannanaz, çamaşır ve bulaşık makinesi deterjanlarına geniş çapta uygulanır. Enzimlerin lekeleri çıkarma kapasitesi, bunları imalat deterjanlarında kullanmanın ana odağıdır. Selülozlar piyasada farklı markalarda mevcuttur. Örneğin, Celluzyme® ve Carezyme® deterjan endüstrisinde uygulanan iki ana markadır. Bu deterjanlar esas olarak pamuk ve pamuk karışımlarından yapılmış kumaşlara uygulanır. Bu deterjanlar, renk parlaklığını, yumuşaklığını ve partiküllü kir çıkarma özelliğini arttırmak için kumaşta lif değişiklikleri yapar. Mantarlardan elde edilen selülozlar, *Trichoderma* sp. (*T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. viride* ve *T. harzianum*), *Aspergillus niger*, *Humicola* sp. (*H. insolens* ve *H. griseothermoidea*) ve *Bacillus* sp. deterjanlarda en çok çalışılan mikroorganizmalardır. Alkalik selülozlar, kumaşın interfibriler boşluklarından toprak ve kir parçacıklarını temizleme yetenekleri nedeniyle geleneksel deterjanlara en uygun katkı maddeleridir. Selülozlar, kumaşa bağlı selüloz elyaflarının veya selüloz agregatlarının çıkıntılarını gidermektedir. Bu kumaşa daha fazla parlaklık ve pürüzsüzlük verir (Breen 1999).

#### **2.8.4. Tarım endüstrisi**

Farklı selüloz, hemiselüloz ve pektinaz kombinasyonlarından oluşan çeşitli enzim karışımları, tarımda, mahsullerin büyümesini arttırmak ve bitki hastalıklarını kontrol etmek için uygulamalara sahiptir. Bazı mantarlardan elde edilen selülozlar ve benzeri enzimler, bitki hastalıklarını kontrol ederek bitki patojenlerinin hücre duvarını parçalayabilirler (Bhat 2000). Mantar  $\beta$ -glukanazlar, bitki patojenlerinin hücre duvarlarını parçalayarak hastalıkları kontrol edebilirler. *Trichoderma* sp., *Geocladium* sp., *Chaetomium* sp. ve *Penicillium* sp. dahil olmak üzere birçok selüloolitik mantar gelişmiş tohum çimlenmesini, hızlı bitki büyümesini ve çiçeklenmeyi kolaylaştırarak, kök sistemini iyileştirerek ve ekin verimini artırarak tarımda önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. Bu mantarlar bitkiler üzerinde hem doğrudan (muhtemelen büyümeyi teşvik eden faktörler yoluyla) hem de dolaylı (bitki hastalığı ve patojenleri kontrol ederek) etkilere sahip olsa da, bu mantarların iyileştirilmiş bitki performansını nasıl sağladığı henüz net değildir (Bailey ve Lumsden 1998).

### **2.8.5. Gıda ve hayvan yemi endüstrileri**

Gıda endüstrisinde, selülozlar meyve ve sebze sularının ekstraksiyonu ve berraklaştırılmasında, meyve nektarlarının üretiminde ve zeytinyağının ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Glukanazlar, bira üretiminde ve şarap endüstrisinde arpanın maltlanmasını iyileştirmek için kullanılır, eksojen hemiselülozlar ve glukanazlar kullanılarak daha iyi maserasyon ve renk ekstraksiyonu elde edilir. Selülozlar ayrıca gıda renklendirici maddelerin üretimi için karotenoid ekstraksiyonunda kullanılır. Selülozlara ek olarak hemiselüloz ve pektinaz içeren enzim karışımları, yemlerin besleyici kalitesini arttırmak için kullanılır. Yem endüstrisinde selülozların kullanımı ile gıdaların sindirilebilirliği ve hayvan performansındaki gelişmeler rapor edilmiştir (Saranraj ve ark. 2012).

### **2.8.6. Biyoyakıt endüstrisi**

Çoğu bitki materyali selüloz, hemiselüloz ve lignin içerir. Bitkinin hücre duvarı bu üç ana maddeden oluşur. Hemiselüloz ve selüloz-glukoz zincirleri, birbirlerine kristalize fibriller halinde istiflenir, bu da suya veya enzimlere aşılabilir bir koruyucu duvar görevi görür. Daha karmaşık bir makromolekül olan lignin geri kalanını oluşturur (Schubert 2006). Selüloz ve hemiselüloz önce şekere dönüştürüldükten sonra etanole dönüştürülebilir, ancak lignin dönüştürülemez. Günümüzde kullanılan lignoselülozik etanol teknolojisi üç aşamalı bir süreçtir; ilk aşamada lignoselülozik malzemeler hemiselüloz-lignin bağına kaybetmek ve enzimin selüloza erişimini arttırmak için ön işlemden geçirilmektedir. İkinci aşamada selüloz glukoz hidrolize edilir ve son aşamada glukoz etanole fermente edilmektedir (Magrey ve ark. 2018).

## **2.9. *Bacillus* Cinsinin Genel Özellikler**

*Bacillus*, Latince'de çubuğu anlamına gelen, 266 adlandırılmış türe sahip, Firmicutes filumunun bir üyesi olan Gram-pozitif, çubuk şeklindeki bakteri cinsidir. *Bacillus* türleri zorunlu aeroblar olabilir: oksijene bağımlı; veya fakültatif anaeroblar: oksijen yokluğunda anaerobik olma yeteneğine sahiptirler (Turnbull 1996).

*Bacillus* kendilerini oval endosporlara indirgeyebilir ve yıllarca bu hareketsiz durumda kalabilir. Endospor oluşumu genellikle besin eksikliğiyle tetiklenir: bakteri hücre duvarında bölünür ve sonra bir taraf diğerini içine alır (Anonim 2018). Hücre başına sadece bir endospor oluşur. Sporlar ısıya, soğuğa, radyasyona, kurumaya ve dezenfektanlara karşı dayanıklıdır. *Bacillus* ve *Clostridium* cinsleri *Bacillaceae* ailesini oluşturur. Türler morfolojik ve biyokimyasal kriterler kullanılarak tanımlanır. Birçok *Bacillus* türünün sporları ısıya, radyasyona, dezenfektanlara ve kurumaya karşı dirençli olduklarından, tıbbi ve farmasötik malzemelerden uzaklaştırılması zordur ve sık sık kontaminasyon nedenidir. *Bacillus* türleri gıda endüstrisinde bozulma organizmaları olarak bilinmektedir (Turnbull 1996).

*Bacillus* türleri doğada her yerde bulunur, özellikle toprakta. Yüksek pH (*B. alcalophilus*), yüksek sıcaklık (*B. thermophilus*) ve yüksek tuz konsantrasyonları (*B. halodurans*) gibi aşırı ortamlarda bulunabilirler. Hem serbest yaşayan (parazitik olmayan) türleri hem de iki parazitik patojenik türü içerir. Şarbon nedeni *B. anthracis*; ve gıda zehirlenmesine neden olan *B. cereus*.

Birçok *Bacillus* türü, çeşitli endüstrilerde kullanılan bol miktarda enzim üretebilir. örneğin nişasta hidrolizinde kullanılan alfa amilaz üretimi ve deterjanlarda kullanılan proteaz. *B. subtilis* bakteriyel araştırma için değerli bir modeldir (Favaro ve ark. 2016). *Bacillus subtilis*, moleküler ve hücre biyoloji açısından en iyi anlaşılabilir prokaryotlardan biridir. Üstün genetik uygunluğu ve büyüklüğü, bakterinin tüm yönleriyle araştırılmasına neden olmuştur. *B. subtilis* üzerine yapılan araştırmalar bakteriyel moleküler biyoloji ve sitolojinin ön saflarında yer almıştır. *B. subtilis*, bakterilerde farklılaşma, gen/protein regülasyonu ve hücre döngüsü olayları için model bir organizmadır (Graumann, 2012).

### **2.9.1. *Bacillus* selülazının genel özellikleri**

Selülaz, bileşiminin önemli ölçüde farklı olabileceği çok bileşenli bir enzimdir. Ayrıca, selülazın parçalandığı substratların kendileri karmaşıktır. Bu nedenle, selülaz aktivitesinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi için birçok çalışma yapılmıştır ve farklı selülaz tiplerinin farklı reaksiyon sıcaklıkları, pH, reaksiyon süreleri ve diğer spesifik koşullar gerektirdiğini bildirmiştir (Wang ve ark. 2017).



*Bacillus* sp. tarafından üretilen selülozlar için optimum sıcaklıklar oldukça değişken ve genellikle 40°C ila 60°C arasında maksimum aktivite göstermektedirler. *Bacillus alcalophilus* için optimum sıcaklık 30°C iken (Ray ve ark. 2007), *Bacillus subtilis*, *Bacillus sirkülasyon* ve diğer bir çok *Bacillus* izolat için 40°C'dir (Ariffin ve ark. 2006). *Bacillus amyloliquefaciens* için 45°C iken (Immanuel ve ark. 2006) *Bacillus licheniformis* için 50°C en etkilidir. 50°C'nin üzerindeki sıcaklık artış ile selüloz üretiminin azalmasına neden olur ve 60°C'nin ötesinde selüloz üretimi önemli ölçüde düşmektedir (Acharya ve Chaudary 2012).

Selülozlar genellikle 5 ila 10 arasında geniş bir pH aralığında stabildir (Tahir ve ark. 2009).

*Bacillus* tarafından üretilen selülozların optimum aktivitesi genellikle pH 7.0'da bulunur ve 7.5'in üzerindeki pH değerlerinde selüloz aktivitesi hızla düşmektedir (Gaur ve Tiwari 2015).

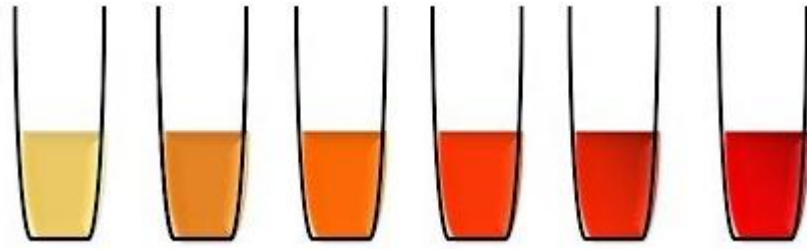
Selülozların molekül ağırlığı basil suşuna göre büyük ölçüde değişebilmektedir. *Bacillus cereus* tarafından üretilen 16.9 kDa kadar düşük ve *Bacillus vallismortis*'ten 80 kDa kadar yüksek moleküler ağırlıklar kaydedilmiştir (Gaur ve Tiwari, 2015, Nema ve ark. 2015)

Selüloz indüklenebilir bir enzimdir, üretimi indükleyici olarak mevcut substrata bağlıdır. *Bacillus*'tan maksimum selüloz üretimi için en iyi karbon kaynağı genellikle CMC'dir, ancak kültür koşullarına bağlı olarak *Bacillus*, fruktoz, laktoz, maltoz, sükroz ve diğer bazı karbon kaynakları arasında yüksek miktarda selüloz üretebilmektedir. Karbon kaynaklarına ek olarak selülozlar, pepton, maya özütü, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ve NaNO<sub>3</sub> gibi azot kaynaklarını gerekmektedir (Lugani ve ark. 2015).

### **2.10. 3,5-Dinitrosalisilik Asit (DNS) Yöntemi**

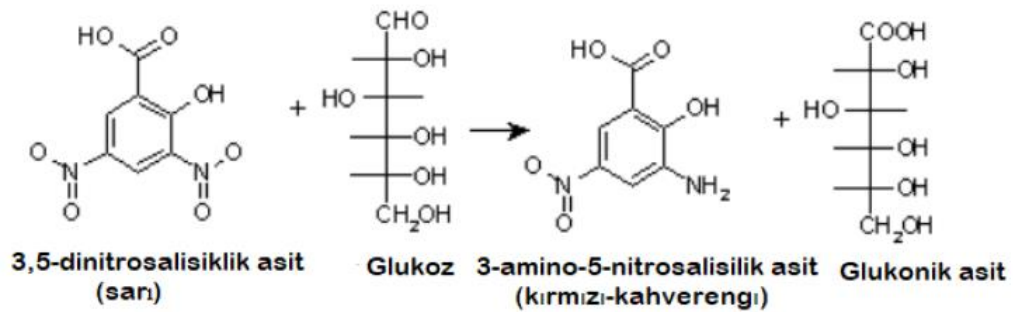
3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS veya DNSA), 3-amino-5-nitrosalisilik asit oluşturmak için indirgen şekerler ve diğer indirgeyici moleküller ile reaksiyona giren aromatik bir bileşiktir. İlk olarak James B. Sumner (1921) tarafından idrarda indirgen maddeleri tespit etmek için bir yöntem olarak tanıtıldı ve o zamandan beri karbonhidrat seviyelerini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang 2009).

DNS yöntemi, 3,5-dinitrosalisilik asit ile örnekte bulunan indirgeyici şekerler arasındaki redoks reaksiyonundan oluşan bir kolorimetrik tekniktir. Şekerlerin indirgeme gücü, oksitleyici ajanlar tarafından karboksil grubuna oksitlenen karbonil gruplarından gelir. Sarı olan DNS, kırmızımsı kahverengi bir 3-amino-5-nitrosalisilik aside indirgenir; bu da maksimum absorbanstın 540 nm dalga boyunda spektrofotometri ile ölçülebilmektedir (Miller 1959). Oluşan kırmızımsı kahverengi rengin yoğunluğu şeker konsantrasyonu ile orantılıdır (Şekil 2.10).



**Şekil 2.10.** Rengin yoğunluğu artan şeker konsantrasyonu ile değişmesi

Glukoz indirgeyici bir şekerdir. İndirgeyici şeker, yapısında diğer atomlardan elektronları kolayca kabul eden serbest keton ( $-CO-$ ) veya aldehit ( $-CHO$ ) grupları nedeniyle indirgeyici ajan (elektron kazanır) olarak da kullanılabilen herhangi bir şekerdir. Bu reaksiyonda, glukoz bir aldehid içerir. Bu indirgeme uç bir reaksiyon başlatarak, DNS'in bir nitro grubun oksidasyonu (elektron kaybı) ile 3-amino-5-nitrosalisilik aside dönüştürülür. Glukozun aldehit grubu ( $-CHO$ ), bir karboksilik asit grubuna ( $-COOH$ ) indirgenerek, glukoz şeker molekülünü glukonik aside dönüştürülür (Şekil 2.11) (Anonim 2016).



**Şekil 2.11.** DNS yönteminin etki mekanizması (Anonim 2016)

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada, Bursa Uludağ Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında topraktan daha önceden izole edilmiş olan 100 adet *Bacillus* sp. suşu selüloz enzimi üretim kapasitelerinin taranması için kullanılmıştır. En iyi selüloz üretimine sahip bir adet *Bacillus* sp. seçilmiştir ve sonraki çalışmalara bu suş ile devam edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Selüloz pozitif *Bacillus* sp.lerin kalitatif taranması

Katı besiyerinde selüloz aktivitesi gösteren bakterilerin belirlenmesi amacıyla besiyeri bileşimi (Kılıçer 2014) (g/L): tripton 10g, maya özütü 5g, NaCl 10g, karboksil metil selüloz (CMC) 1g, agar 15g olarak hazırlandıktan sonra pH 7.0'a 1N NaOH ile ayarlanmıştır ve petrilere dökmek üzere otoklavda steril edilmiştir. *Bacillus* sp. suşları Nutrient Broth (NB) ortamda canlandırılmış ve katı besiyerine çizgi şeklinde ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petri yüzeyi %0.1'lik kongo kırmızısı ile 15-20 dakika boyunca boyanmıştır ve bu süre sonunda boya dökülmüş ve petri kutusuna 1M NaCl çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemler sonucunda etrafında sarı hidroliz zonu oluşturan koloniler selüloz pozitif, sarı zon oluşturmayan koloniler ise selüloz negatif olarak değerlendirilmiştir (Lu ve ark., 2004). Zon çapları cetvelle mm olarak ölçülmüş ve en geniş zon çapına sahip bakterilerin saf kültür izolasyonu için, bakteriler NB'ta 24 saat üretilmiş ve %0.85'lik fizyolojik tuzlu su ile bir seri dilusyon yapılarak 0.1 mL CMC agarlı ortama ekilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda yukardaki boyama işlemleri yapılmış ve en geniş zon gösteren bir adet *Bacillus* sp. seçilerek daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C'de saklanmıştır. Uzun süreli depolamada ise gliserolde -20°C'de saklanmıştır. Aşağıdaki formül kullanılarak enzimatik indeks (EI) hesaplanmıştır (Florenco ve ark. 2012).

$$E.I = \frac{\text{Hidrolitik zon çapı}}{\text{Koloni çapı}}$$

### 3.2.2. 16S rRNA analizi (filogenetik analiz)

En yüksek selüloz aktivitesine sahip *Bacillus* sp. suşunun hizmet alımı ile 16S rRNA analizi yapılmış (Ref Gen, Ankara) ve bakteri tür düzeyinde adlandırılmıştır. Genomik DNA T4 suşu kullanılarak FastDNA kiti (Qbiogene, Montreal, PQ, Canada) ile ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. 16S rRNA geni genomik DNA'dan evrensel primerler olan 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' ve 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiştir. ABI 3100 Genetic Analyzer cihazı kullanılarak sekanslar yürütülmüş ve 1,449 bç sekansı otomatik olarak ABI PRISM 3730 XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) ile tespit edildikten sonra, sekanslar BLAST kullanılarak GenBank database (NCBI) ile karşılaştırılmıştır (Altschul ve ark. 1990). Suşların 16S rRNA gen sekansları CLUSTAL W programı ile alignment yapılmıştır (Thompson ve ark. 1994). Neighbour joining yöntemi ile *Bacillus* sp. suşlarının arasındaki akrabalık ilişkileri MEGA 6.0 software ile belirlenerek filogenetik ağaç çizilmiştir (Tamura ve ark. 2007).

### 3.2.3. Selüloz üretim ortamının belirlenmesi

Kalitatif tarama sonucunda tespit edilen selüloz potent *Bacillus* sp.'nin enzim üretim besi yerinde kapasitesini kantitatif olarak belirlemek üzere 3 farklı içerikli besi yeri denenmiştir. (Çizelge 3.1)

**Çizelge 3.1.** Selüloz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi yerleri

İçerik (%g)	Besi Ortamı 1 (Nkohla ve ark. 2017)	Besi Ortamı 2 (Maryam ve ark. 2017)	Besi Ortamı 3 (Sharma ve ark. 2017)
CMC	0.5	1.0	1.0
Pepton	-	1.0	0.4
Yeast Ekstrakt	0.05	0.6	0.4
MgSO <sub>4</sub>	0.05	0.03	0.02
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	0.2	-
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	-	0.25	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	0.1

**Çizelge 3.1.** Selülaaz üretim ortamının tespitinde kullanılan sıvı besi yerleri (devam)

NaCl	-	-	0.25
NaNO <sub>3</sub>	0.1	-	-
KCl	0.1	-	-
pH	6.8	7.0	7.0

#### **3.2.4. Bakteri üretim koşulları**

Kültür saklama ortamı olan Nutrient agarlı ortamdan steril öze ile alınan bakteri kültürü, içerisinde 30 mL NB bulunan 100 mL'lik erlene aşılansmış, 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmiştir. Bakterinin enzim üretim kapasitesini saptamak amacıyla 18 saatlik bakteri kültürlerinin 600 nm'deki optik yoğunlukları (O.D) spektrofotometre (Beckman Coulter- DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla steril fizyolojik tuzlu su ile 0.3'e ayarlanmıştır. Bu şekilde ayarlanan kültür çözeltilisinden içerisinde 150 mL enzim üretim besi yeri bulunan 500 mL'lik erlenlere %1 oranında aşılansmış ve 37°C' de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Üreme ve enzim aktivite tayinleri 16., 24., 40., 48., 64. ve 72. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum enzim üretim zamanı saptanmıştır.

#### **3.2.5. Bakteri üremesinin ölçülmesi ve enzim aktivitesinin ölçülmesi**

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besi yerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 3.2.3'de belirtildiği şekilde inkübasyona bırakılan besi yerlerinden belirlenen saatlerde örnek alınarak 600 nm dalga boyunda okunmuştur. Selülaaz üretiminde kullanılan besi yeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir (Sarıkaya 1995). Elde edilen OD değişimleri zamana karşı grafiklenerek bakteri üreme eğrisi çıkarılmıştır.

Selülaaz enzim aktivitesinin tayininde Miller'in (1959) kullandığı yöntemden faydalanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle belirlenen saatlerde kültür ortamından 10 ml örnek alınarak 15 dakika süre ile +4°C'de santrifüj edilerek (5000 devir/dk) bakteri hücrelerinin

bulunduğu pelet kısmı ile enzim içeren sıvı kısım birbirinden ayrılmıştır. Süpernatant ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Enzim aktivite tayininde substrat çözeltisi olarak %1 karboksil metil selüloz (CMC) kullanılmıştır (50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponuna CMC eklenmiştir). Bu substrat çözeltisi işlemden önce her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.

Aktivite tayin deneylerinde 1 adet kör tüp ve enzim örneği için 1 adet örnek tüpü kullanılmıştır. Örnek tüpüne 0,5 mL %1 CMC substrat çözeltisi, kör tüpüne ise 0,5 mL DNS çözeltisi ilave edilmiş ve tüpler 37°C'lik su banyosunda 5 dakika bekletilerek reaksiyon sıcaklığına getirilmiştir. Substrat içeren tüplere 0.5 mL enzim çözeltisinden, kör tüpe ise 0,5 mL sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ilave edilerek, vorteks ile iyice homojenize edilmiş ve tüpler 37°C'de 30 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyonun durdurulması amacıyla enzim substrat karışımına 1 mL Dinitrosalisilik asit (DNS) ayıracı (20 mL 2N NaOH içerisinde 1 g DNS ve 50 mL distile su içerisinde 30 g Na-K-Tartarat çözüldükten sonra, iki çözeltiyi alev üstünde homojen olana kadar karıştırılmıştır sonra distile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır (Garriga ve ark. 2017)) eklenerek, 5 dakika kaynar suda kaynatılmıştır sonra soğutulmuştur. Örneklerin absorbanları köre karşı spektrofotometre ile 540 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır.

**Çizelge 3.2.** Selüloz aktivite tayin basamakları

Reaksiyon Bileşenleri	Örnek Tüpü	Kontrol (Kör) Tüpü
Substrat çözeltisi	0,5 mL	-
DNS	-	1
37 °C' de su banyosunda 5 dakika bekletilir.		

**Çizelge 3.2.** Selülaaz aktivite tayini reaksiyon bileşenleri (devam)

Enzim çözeltisi	0,5 mL	-
50mM Na-fosfat Tamponu (pH 6.5)	-	0,5 mL
Vorteksle karıştırılır ve 37 °C' de su banyosunda 30 dakika bekletilir.		
DNS	1 mL	-
Substrat çözeltisi	-	0,5 mL
Vorteksle karıştırılır ve 5 dakika kaynatılır		
Tüpleri soğutulur		
Kör'e karşı örnek OD540 nm'de absorbans ölçümü yapılır		

Bir unite (U) enzim aktivitesi, deneysel koşullar altında dakikada 1 µmol glukozu açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Glukoz standart eğrisi farklı konsantrasyonlarda glukozun hazırlanması ve DNS metodu uygulandıktan sonra 540 nm'de absorbanslarının ölçülmesi ile elde edilmiştir.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Roopa ve ark. 2017):

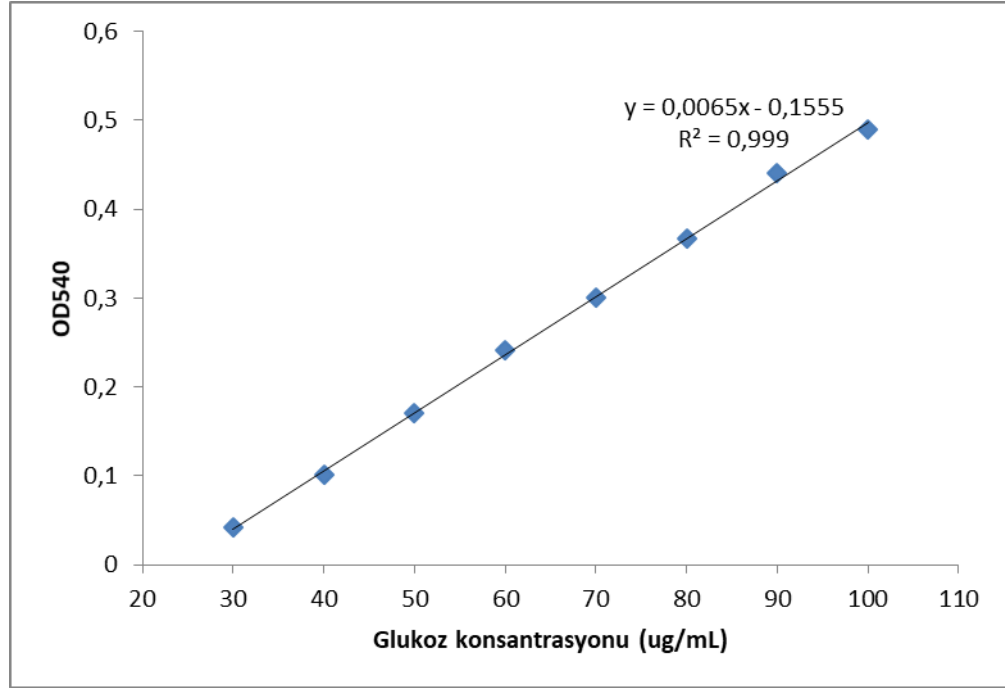
$$U/mL = \frac{\text{Serbestleşen Glukoz}}{\text{Süre (30 dk)} \times \text{Kullanılan Enzim Hacmi (0,5 mL)}} \times \text{Dilüsyon Faktörü (varsa)}$$

$$\text{Serbestleşen Glukoz: } Y = 0.0065x - 0.1555$$

### 3.2.6. Glukoz standart eğrisi grafiği ve hazırlanışı

Enzim aktivitesinin hesaplanmasında, standart eğri için 0-100 µg/mL glukoz çözeltileri hazırlanmıştır. Glukoz miktarı, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği lineer regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin glukoz konsantrasyonu, standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden

hesaplanmıştır (Şekil 3.1). Doğrunun denklemi  $y = 0,0065x - 0,1555$  regresyon katsayısı  $R^2 = 0,999$ 'dir.



Şekil 3.1. Glukoz standart grafiği

### 3.2.7. Karbon (C) kaynaklarının etkisi

Çizelge 3.1'de gösterilen enzim üretim besi yerlerinden, en yüksek selüloz aktivitesinin saptandığı besi yerindeki karbon kaynağı yerine aynı miktarda fruktoz, süktroz, maltoz, nişasta ve gliserol kullanılarak selüloz enzimi üzerine karbon kaynaklarının etkileri araştırılmıştır. Bakterinin üretimi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmıştır. Bakteri maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar üretilmiş, bu saatte bakteri üremesi ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Çalışmada her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.



### **3.2.8. Azot (N) kaynaklarının etkisi**

Çizelge 3.1’de içeriği verilen enzim üretim yerlerinden maksimum selüloz aktivitesinin saptandığı enzim üretim yerindeki azot kaynağı yerine aynı miktarda olmak üzere organik azot kaynakları olarak pepton, yeast ekstrakt, meat ekstrakt, yağsız süt tozu, tripton, ve inorganik azot kaynakları olarak  $KNO_3$ ,  $NH_4Cl$ ,  $NH_4NO_3$ ,  $NaNO_3$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$ , kullanılarak selüloz enzimi üzerine azot kaynaklarının etkileri araştırılmıştır. Bakterinin üretimi 3.2.4’te belirtildiği gibi yapılmıştır. Bakteri maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar üretilmiş, bu saatte bakteri üremesi ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Çalışmada her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### **3.2.9. Metal iyonunun etkisi**

Çizelge 3.1’de içeriği verilen enzim üretim yerlerinden maksimum selüloz aktivitesinin saptandığı enzim üretim yerindeki metal kaynağı çıkarılarak yerine aynı miktarda  $MnSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $LiSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $KCl$  ve  $NaCl$  kullanılarak selüloz enzimi üzerine metal iyonlarının etkileri araştırılmıştır. Bakterinin üretimi 3.2.4’te belirtildiği gibi yapılmıştır. Bakteri maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar üretilmiş, bu saatte bakteri üremesi ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Çalışmada her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### **3.2.10. Organik atıkların etkisi**

Bakterilerinin üreme kapasiteleri ve enzim üretimi etki eden organik atıklarının etkilerinin saptanması amacıyla farklı organik atıkları denenmiştir. Bu amaçla Çizelge 3.1’de gösterilen enzim üretim besi yerlerinden, en yüksek selüloz aktivitesinin saptandığı besi yerindeki CMC yerine aynı miktarda mısır koçanı, buğday kepeği ve filtre kağıdı kullanılarak etkileri araştırılmıştır. Bakterinin üretimi 3.2.4’te belirtildiği gibi yapılmıştır. Bakteri maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar üretilmiş, bu saatte bakteri üremesi ve enzim aktivite tayini yapılmıştır. Çalışmada her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### **3.2.11. Optimal besinsel faktörlerden modifiye ortam eldesi**

Maksimum selülaaz üretiminin görüldüğü besinsel koşulların bir araya getirilmesi ile yeni oluşturulan modifiye ortamda enzimin en yüksek üretim veriminin sağlanması yoluna gidilmiştir. Bakterinin selülaaz aktivite tayini yapılarak temel besiyerindeki verimi ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Bakterinin üretimi 3.2.4'te belirtildiği gibi yapılmış ve belirlenmiş olan maksimum enzim üretim saattine göre üreme ve selülaaz aktivite tayinleri yapılmıştır. Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### **3.2.12. Selülaaz enziminin kısmi saflaştırılması**

*Bacillus* sp.'den elde edilen selülaaz enzimi kısmi olarak saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Bu amaçla, maksimum selülaaz üretiminin görüldüğü besinsel koşulların bir araya getirilmesi ile oluşturulan modifiye ortamda maksimum enzim üretiminin saptandığı saate kadar üretilen kültür ortamı +4°C' de, 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanılmıştır.

Ham enzim üç basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Her bir basamakta enzim aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır. Protein tayini, standart olarak "Sığır Serum Albumin"i kullanılarak Lowry ve ark. (1951) metoduna göre belirlenmiştir.

Amonyum sülfat çöktürmesi;

Ham enzimin en iyi çöktüğü tuz konsantrasyonunun belirlemesi amacıyla süpernatant farklı konsantrasyonlardaki (%60, %70, %80 ve %90) amonyum sülfat ile çöktürülmüştür. Buz dolu kap içerisinde ham enzim çözeltisi içeren behere havanda toz haline getirilmiş amonyum sülfat çok yavaş bir şekilde eklenerek manyetik karıştırıcı üzerinde çözüldürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan örnek manyetik karıştırıcıda karıştırılarak bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Çöktürme sonrası oluşan karışım 10.000 rpm'de 30 dk boyunca santrifüjlenmiş, pellet ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Pellet diyaliz için kullanılmıştır.

Diyaliz;

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen pellet 50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponunda çözülmüştür. Yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz tüpü (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 12.000 Da, 25 mm x 16mm) istenilen uzunlukta kesilmiştir. Membran gözeneklerin temizlenmesi ve kirleticilerin giderilmesi için distile suda geçirilmiştir. Diyaliz tüpü yumuşayınca bir ucu ip ile sıkıca bağlanmıştır ve tampon içerisinde çözdürülmüş pellet örneği tüpüne aktarılmış. Diğer ucu da ip yardımı ile bağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan diyaliz tüpü, 50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tampon içeren 1 L'lik beherin içine alınmış ve behere balık atılarak karışımın sürekli hareketi sağlanmıştır. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Tampon birkaç kez değiştirilerek tuzun giderilmesi sağlanmıştır. Diyalizatın aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır.

Ultrafiltrasyon ile diyalizatın konsantre edilmesi;

Diyalizat, ultra filtrasyon (MW cut-off 30,000) tüpüne alınmış ve +4°C'de 5000 rpm'de 15 dakika sürelerle istenilen hacme ulaşana kadar konsantre edilmiştir. Konsantre edilen örneğin aktivite ve protein tayinleri yapılmıştır.

### **3.2.13. Protein miktarının belirlenmesi**

Her bir saflaştırma basamağında elde edilen protein miktarlarının belirlenmesi için Lowry Metodu kullanılmıştır (Lowry 1951). Protein standart grafiğinin oluşturulması için 5 mg BSA 10 mL distile suda çözülmüştür. Konsantrasyonu 0-500 µg/mL olacak şekilde uygun sulandırma yapılarak hazırlanan örneklerin absorbansları 546 nm'de ölçülmüş (Beckman Coulter-UD 700) ve standart eğri grafiği hazırlanmıştır.

Ayıraç A: %3' lük Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.1 N NaOH'da çözülmüş)

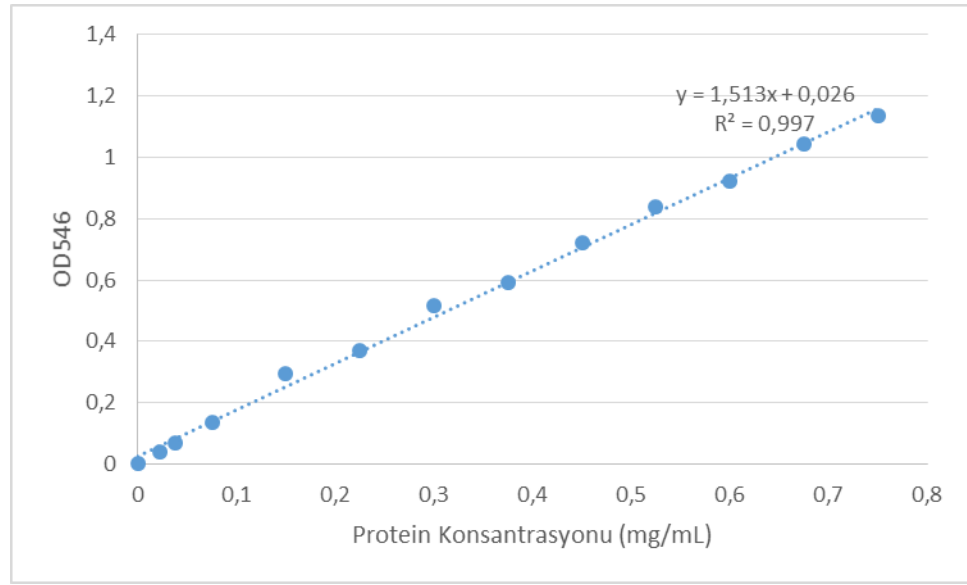
Ayıraç B: %1' lik CuSO<sub>4</sub> (%1' lik K-Na-tartarat'da çözülmüş)

Ayıraç C: %2'lik K-Na-tartarat

Ayıraç D: İhtiyaca göre günlük A, B ve C ayıraçlarından hazırlanır (25:1:1 oranında).

Ayırac E: Folin ciocalteus Fenol Ayıracı (1:1 oranında seyreltilmiş)

1 mL örnek çözeltisi alınmış ve üzerine D ayıracından 5 mL eklenip vortekslenmiştir. Karışım 10 dakika karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Kör için, 1 mL distile su ve 5 mL D ayıracı konularak aynı işlemler uygulanmıştır. Sürenin sonunda örneklerin üzerine 0,5 mL E çözeltisi eklenip ve vorteksledikten sonra karanlıkta 20 dakika bekletilmiştir. Sonra örnekler köre karşı, 546 nm’de absorbansları okunarak sonuçlar elde edilmiştir. Okunan bu absorbanslar standart protein konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Protein standart grafiği

### 3.2.14. Selülaaz enzimin karakterize edilmesi

Kısmi saflaştırılan selülaaz enziminin karakterize edilmesi amacı ile enzim aktivitesi üzerine sıcaklık, pH ve potansiyel bileşiklerin etkisi araştırılmıştır. Bununla birlikte ham enzimin moleküler ağırlığı,  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri de saptanmıştır.

### 3.2.15. Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Kısmi saflaştırılan selülaazın aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak amacıyla, sıcaklık profili olarak 35, 37 (Kontrol), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C değerleri kullanılmış ve enzimin optimum sıcaklık değeri saptanmıştır. Sıcaklık stabilitesini tespit etmek için enzimin en yüksek verimi gösterdiği sıcaklık değeri belli sürelerde inkübe

edilerek aktivite tayinleri yapılmıştır. Her bir sıcaklık derecesinde elde edilen aktivite değerleri, kontrol olarak kullanılan 37 °C'den elde edilen değer (%100) ile kıyaslanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### **3.2.16. Enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi**

Selülaz enzim aktivitesine etkileyen farklı pH değerlerini araştırmak amacıyla 0.1 M glisin-HCl (pH 2,0 ve 3,0), 0,1 M sodyum asetat (pH 4,0-6,0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7,0 ve 8,0), 0,1 M glisin-NaOH (pH 9,0 ve 10,0) kullanılarak pH 2,0-10,0 arasında aktivite ölçümü yapılmış ve enzimin optimum pH değeri tespit edilmiştir. Enzimin pH stabilitesi pH 7,0 değerinde belirli saatlerde belirlenmiştir. Her bir pH değerinde elde edilen aktivite değerleri, kontrol olarak kullanılan pH 6,5'da elde edilen değer (%100) ile kıyaslanarak % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### **3.2.17. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi**

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini tespit etmek üzere enzim 1 ve 5 mM MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, LiSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, SDS, EDTA, 2-merkaptolanol ile inkübe edilerek aktivite tayini yapılmıştır. Aktiviteler % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### **3.2.18. Kinetik parametrelerin saptanması**

Selülaz enziminin V<sub>max</sub> ve K<sub>m</sub> değerleri farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CMC kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiği ile tespit edilmiştir.

Çalışmalarda her deney 3 kez tekrarlanmış olup, grafik ve çizelgelerde ortalama değerler verilmiştir.

### 3.2.19. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti

Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli 1970).

Çözeltilerin ve jelin hazırlanması;

a) Polimer matriksi kurmak için akrilamid ve N,N'-metilen-bisakrilamid kullanılmıştır. Bunun için; 28,8 g akrilamid ve 1,2 g bis akrilamid tartılıp distile su ile toplam 100 mL içerisinde çözdürülmüş ve Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülerek, kahverengi bir şişede karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. Bu çözelti 2 ay süreyle bozulmadan saklanabilmektedir (Sarıkaya 1995).

b) 1 M Tris-HCl (pH 6,8)

Çözeltiyi hazırlamak için 12,11 g Tris Base tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra saf HCl kullanılarak pH 6,8' e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

c) 1 M Tris-HCl (pH 8,8)

Çözeltiyi hazırlamak için 12,11 g Tris Base tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra saf HCl kullanılarak pH 8,8'e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

d) %10' luk Amonyum Per Sulfat (APS)

10 g APS tartılmış ve hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

e) Örnek Tamponu

100 mL stok solüsyonu için;

1 M Tris-HCl (pH 6,8) 6,5 mL

Gliserol 10 mL

SDS 2 g

dH<sub>2</sub>O 100 mL

Her bir örnek için 100 µl stok solüsyondan alınmış ve üzerine 5 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir. Spatül ucu kadar Bromfenol Mavisi eklenip karıştırılmıştır. Solüsyon +4°C’de muhafaza edilmiştir.

f) Yürütme Tamponu (Running Buffer)

Tris Base 3g

Glisin 14,4 g

SDS 1g

dH<sub>2</sub>O 1L

g) Yıkama Çözeltisi

İzopropil alkol 250 mL

Asetik asit 100 mL

dH<sub>2</sub>O 650 mL

h) Boyama Çözeltisi

1,5 g Commassie-brilliant R- 250 mavisi 250 mL izopropil alkolde çözülmüş, daha sonra üzerine 650 mL distile su ve 100 mL asetik asit eklenmiştir.

Jelin hazırlanması;

SDS-PAGE için 2 tip jel hazırlanır.

1) % 10 Ayırma Jeli hazırlanışı (20 mL, 4 jel için)

1 M Tris-HCl (pH: 8,8) 5,0 mL

%30 Akrilamid 6,8 mL

dH<sub>2</sub>O 8,0 mL

%20 SDS 100 µL

%10 Amonyum Persülfat 100 µL

TEMED 10 µL

2) %4 Yükleme Jeli hazırlanışı (5 mL, 2 jel için)

dH<sub>2</sub>O 3,05 mL

0.5 M Tris-HCl (pH: 6,8) 1,25 mL

%10 SDS 50 µL

%30 Akrilamid 650 µL

%10 Amonyum Persülfat 25 µL

TEMED 5 µL

Jellerin hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta TEMED ve APS'nin eklenmesidir. TEMED ve APS polimerleşmeyi sağladığı için, eklendikten sonra pipet ile iyice karıştırmalı ve vakit kaybetmeden çözelti cam plakalar arasına dökülmelidir. Örnekler hazırlandıktan sonra, cam plakalar elektroforez (Bio-Rad) mandalına yerleştirilmiş ve sızma olmayacak şekilde iyice sabitlenmiştir. Ayırma jeli, mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına yavaşça dökülmüştür. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Jel yüzeyinin düzgün olması için üzerine izopropil alkol dökülerek ince bir tabaka oluşturulmuştur. Polimerleşme tamamlandıktan sonra (yaklaşık 30 dakika) alkol kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırmıştır. Daha sonra yükleme jeli de aynı yöntemle plakaların arasından dökülmüş ve polimerleşmesi beklenmeden elektroforez tarağı hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek yerleştirilmiştir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra (yaklaşık 30 dakika) tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat ederek çıkarılmıştır.

Örneklerin hazırlanması ve elektroforez koşulları;

Selülaz enziminin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla 11 farklı protein içeren (Cell Signalling Technology Prestained Protein Marker #13953S) çözelti standart olarak kullanılmıştır. Ham selülaz örneğinden 75 µl, ependorf tüplerine konularak üzerlerine 25 µl



örnek tamponu (bkz. 3.2.19.e) eklenerek hacim 100 µl' ye tamamlanmıştır. Örnekler 5 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiştir. Daha önce hazırlanmış olan jel, elektroforez tankına oturtularak alt ve üst hazneleri yürütme tamponu (bkz. 3.2.19.f) ile doldurulmuştur. Tankın her iki tarafına da konmuş olan jellerdeki kuyucukların içerilerine, mikropipet yardımıyla 10 µl örnek konmuş ve tanka akım verilerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. İzleme boyası jelin 1 cm altında kalacak hale geldiğinde ise elektroforez işlemi sonlandırılmıştır. Jele, örneklerin düzgün sırada ilerlemesi için 150 V sabit akım verilmiştir. Elektroforez işlemi yaklaşık 1 saat sürmüştür.

Boyama ve boyanın uzaklaştırılması;

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatli bir şekilde plakaların arasından çıkarılmıştır. Yükleme jeli, ayırma jelinden ayrılmış ve marker yüklenen kuyucuğun kenarı işaretlenmiştir. Plakların arasından çıkarılan jel, içerisine boyama çözeltisi (bkz. 3.2.19.h) bulunan kaba konarak 1 gece çalkalayıcıda bekletilmiştir. Boyanan jel, içinde yıkama çözeltisi (bkz. 3.2.19.g) bulunan başka bir kaba alınarak boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Örneğin molekül ağırlıkları, standart proteinler baz alınarak belirlenmiştir.

### **3.2.20. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi**

Ham selülaz enzimin farklı sıcaklıklarda depolanma stabilitesini saptamak üzere bakteriden üretilen ham enzimin başlangıç aktivitesi tayin edildikten sonra enzim örnekleri oda sıcaklığında (RT), +4 °C' de ve -20 °C' de her 15 günde bir aktivitelere bakılarak depolama stabilitesi belirlenmiştir.

### **3.2.21. Selülaz enziminin yünlü kumaşlarda bitkisel artıkların gideriminde**

#### **kullanım potansiyelinin belirlenmesi**

Liyofilize edilmiş selülazın %100 yünlü kumaşlarda bulunan, çeşitli büyüklükte ve formda pıtrak olarak adlandırılan bitkisel atığın giderilmesi incelenmiştir. Bu amaçla B.U.Ü. Tekstil Mühendisliği'nden temin edilen %100 yünlü kumaş 30x30 mm boyutunda parçalara kesilmiştir ve çeşme suyu ile yıkanmıştır. Liyofilizasyon işlemi LAB312 marka TOPT-10 Model cihazı ile -55°C'de 2 gün boyunca yapılmıştır.

Kumaşlar steril petri kaplarına alınmış ve 15 mL sodyum fostat tamponu (pH 4,0 (genelde bitkisel atık giderimi pH 4.0'de yapılmaktadır) ve pH 7,0) içerisinde çözülen 2 gr liyofilize edilmiş selülaz enzimi kumaşların üzerine tatbik edilmiş ve kumaş parçaları 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kumaş parçaları oda sıcaklığında kurutulmuştur. Pıtrakların uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı ışık mikroskop (Nikon Eclipse E1000) görüntülemesi ile belirlenmiştir ve fotoğraflanmıştır. Diğer yandan, kumaşlara el ile mekanik sürtünme uygulanıp, pıtrakların daha fazla giderip giderilmediğini ışık mikroskop görüntülemesi ile belirlenmiştir ve fotoğraflanmıştır. Sonuçlar kontrol olarak işlem görmeyen ve önceden ışık mikroskopunda fotoğraflanan kumaşlardaki pıtraklar ile karşılaştırılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. SelülaZ Pozitif Bakterilerin Belirlenmesi

Çalışmada Türkiye'nin farklı illerinden alınan toprak örneklerinden izole edilmiş toplam 100 *Bacillus* sp. suşlarından selülaZ enzimi üretim kapasiteleri kalitatif olarak araştırılmıştır. CMC içeren agarlı ortamda 24 saat boyunca inkübe edilen *Bacillus* sp. suşları arasından 54 tanesinde açık renkli hidrolitik zonlar görülmüştür (Çizelge 4.1). Bu açık renkli zonların varlığı bakterinin selülaZ ürettiğini göstermiştir. Bunlardan EI = 3 olan ve 18 mm hidrolitik zon çapa sahip *Bacillus* sp. suşu seçilmiş ve *Bacillus* sp. 171ES olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda bu suş kullanılmıştır (Şekil 4.1).

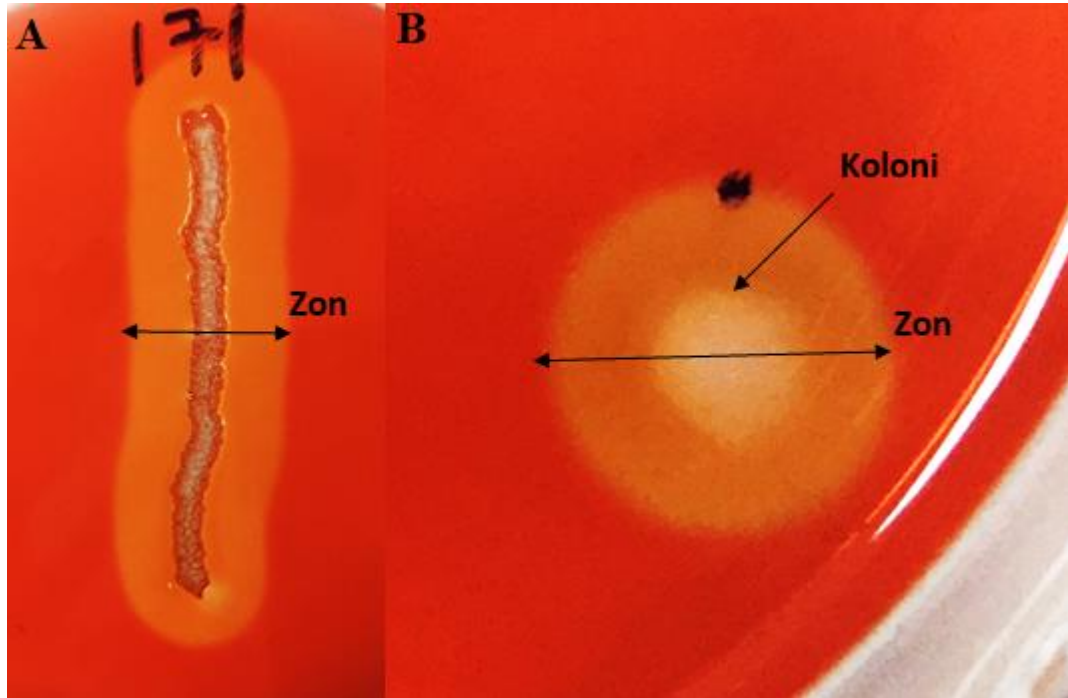
**Çizelge 4.1.** SelülaZ pozitif bakterilerin 24. saatteki zon çapları

Bakteri Sıra ve No	il	Koloni Çapı (mm)	SelülaZ Zon Çapı (mm)	EI*	Bakteri Sıra ve No	il	Koloni Çapı (mm)	SelülaZ Zon Çapı (mm)	EI*
1-154	Eskişehir	10	12	1,2	28-201	Trabzon	9	11	1,2
2-155	Eskişehir	10	11	1,1	29-202	Hatay	10	12	1,2
3-156	Eskişehir	10	11	1,1	30-215	Artvin	12	13	1
4-157	Eskişehir	5	10	2	31-216	Artvin	10	11	1,1
5-163	Kocaeli	3	5	1,7	32-217	Eskişehir	10	13	1,3
6-166	Kocaeli	10	12	1,2	33-221	Kocaeli	9	12	1,3
7-169	Denizli	9	12	1,3	34-224	İstanbul	9	10	1,1
8-170	Denizli	5	10	2	35-226	Balıkesir	3	5	1,6
<b>9-171</b>	<b>Denizli</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>3</b>	36-229	Ankara	11	16	1,5
10-173	Konya	10	13	1,3	37-231	Bilecik	10	12	1,2
11-175	Konya	10	12	1,2	38-236	Edirne	10	13	1,3
12-176	Konya	10	13	1,3	39-239	Sivas	10	12	1,2
13-177	Konya	6	10	1,7	40-240	Niğde	12	20	1,6
14-178	Konya	6	10	1,7	41-241	Niğde	10	12	1,2
15-179	Konya	11	18	1,6	42-242	Adana	11	18	1,6
16-180	Konya	5	10	2	43-243	Adana	12	15	1,2
17-181	Kırklareli	9	11	1,2	44-244	Hatay	10	15	1,5
18-182	Bilecik	9	11	1,2	45-245	Hatay	10	12	1,2
19-183	Kırklareli	14	18	1,3	46-258	Hatay	10	13	1,3
20-184	Amasya	10	12	1,2	47-259	Amasya	3	5	1,6
21-185	Kayseri	8	11	1,4	48-260	Adana	10	16	1,6
22-187	Adana	9	10	1,1	49-261	Muğla	12	15	1,2
23-188	Niğde	10	12	1,2	50-263	Balıkesir	10	13	1,3

**Çizelge 4.1.** Selülaaz pozitif bakterilerin 24. saatteki zon çapları (devam)

24-189	Niğde	10	14	1,4	51-264	Bursa	5	10	2
25-190	Niğde	10	12	1,2	52-266	Konya	3	5	1,6
26-191	Tunceli	5	11	2,2	53-267	İzmir	9	20	2,2
27-192	Burdur	5	10	2	54-268	Tunceli	10	13	1,3

EI\*= Hidroliz zonunun çapı / Koloninin çapı



**Şekil 4.1.** (A) Selülaaz üreten *Bacillus* sp. 171ES'in CMC agarlı ortamdaki çizgi ekim görüntüsü, (B) Tek koloni hidrolitik zon görüntüsü

#### 4.2. 16S rRNA Analizi (Filogenetik Analiz)

Bakterinin mikrobiyal düzeyde tür analizi için RefGen-Biyoteknoloji (Ankara) tarafından 16S rRNA gen sekansına dayalı bir filogenetik ağaç ile tür düzeyinde isimlendirilmesi yapılmış ve *Bacillus substilis* ile %100 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.2). Yeni izole ettiğimiz bakteri *Bacillus substilis* 171ES olarak adlandırılmıştır. *Bacillus substilis* 171ES suşunun 16S rRNA analizini yapmak için bu gen bölgesine özel 27F\_D03 (Çizelge 4.2) ve 907R\_E03 (Çizelge 4.3) primerleri kullanılmıştır. Çizelge 4.2 ve 4.3'de verilen

kromotogram *Bacillus substilis* 171ES suşunun 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisinin bir bölümünün göstermektedir.



**Şekil 4.2.** *Bacillus substilis* 171ES suşunun 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı

**Çizelge 4.2.** *Bacillus substilis* 171ES suşunun 27F\_D03 primeri kullanılarak okunan 6S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

```
TGCTATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATA
AAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCG
AATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAAC
CGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGA
ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGA
AGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
GGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGGTCGCAGACTGA
```

**Çizelge 4.3.** *Bacillus substilis* 171ES suşunun 907R\_E03 primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

```
CCCAGGCGGAGTGCTTATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAACCCCCTA
ACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC
GCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTGCCTTTCG
CCACTGGTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTCCACCGCTACACGTGGAATTCCA
CTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGC
CGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTACGCCCAAT
AATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
AGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTAC
TTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGC
GGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC
CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGG
TCGGCTACGCATCGTTGCCCTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCG
CCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGACCATGC
GGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCC GGAGTATCCCAGTCTTA
CAGGCAGGTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGAGCAAG
CTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGCACGCCGCAGCGTCGTCT
```

### 4.3. Selülaz Üretim Ortamının Belirlenmesi

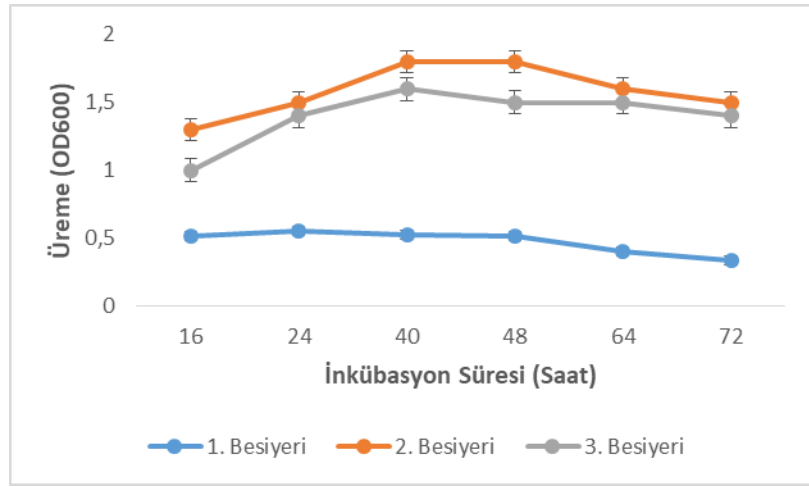
*Bacillus substilis* 171ES suşunun selülaz üretim ortamını belirlemek üzere içeriği farklı olan 3 tane besi yeri kullanılmıştır. 72 saat inkübasyon sonucunda en iyi besi yeri olarak 2 numaralı besi yeri saptanmıştır. Bu besi yerinde maksimum enzim aktivitesi 68 U/mL olarak 40 saatte elde edilmiştir. Maksimum üreme de OD<sub>600</sub> 1,8 olarak 40. saatte elde edilmiştir (Çizelge 4.4, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Bu Daha sonraki çalışmalara besiyeri 2 ile devam edilmiştir.

**Çizelge 4.4.** *Bacillus substilis* 171ES'in 3 farklı ortamdaki üreme ve selülaz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

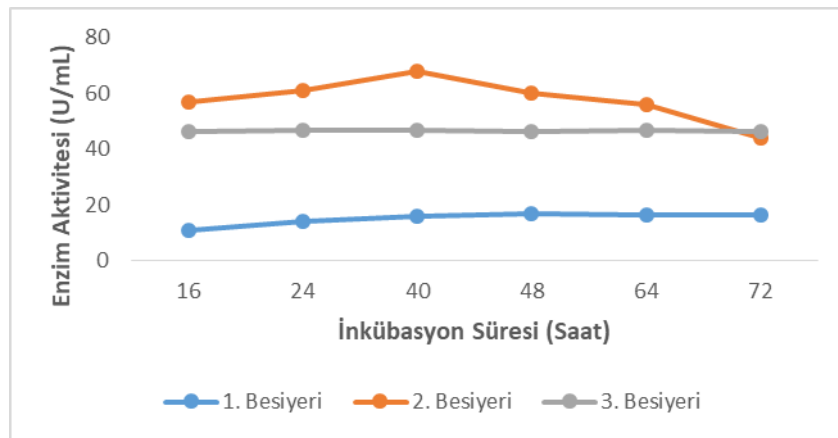
İnkübasyon süresi (saat)	1.Besiyeri (Nkohla ve ark. 2017)		2.Besiyeri (Maryam ve ark. 2017)		3.Besiyeri (Sharma ve ark. 2017)	
	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL	OD <sub>600</sub>	U/mL
16	0,5	11	1,3	57	1,0	46
24	0,6	14	1,5	61	1,4	47

**Çizelge 4.4.** *Bacillus substilis* 171ES'in 3 farklı ortamdaki üreme ve selüloz enzim aktivitelerinin karşılaştırılması (devam)

<b>40</b>	0,5	16	<b>1,8</b>	<b>68</b>	1,6	47
48	0,5	16	1,8	60	1,5	46
64	0,4	16	1,6	56	1,5	46
72	0,3	16	1,5	44	1,4	46

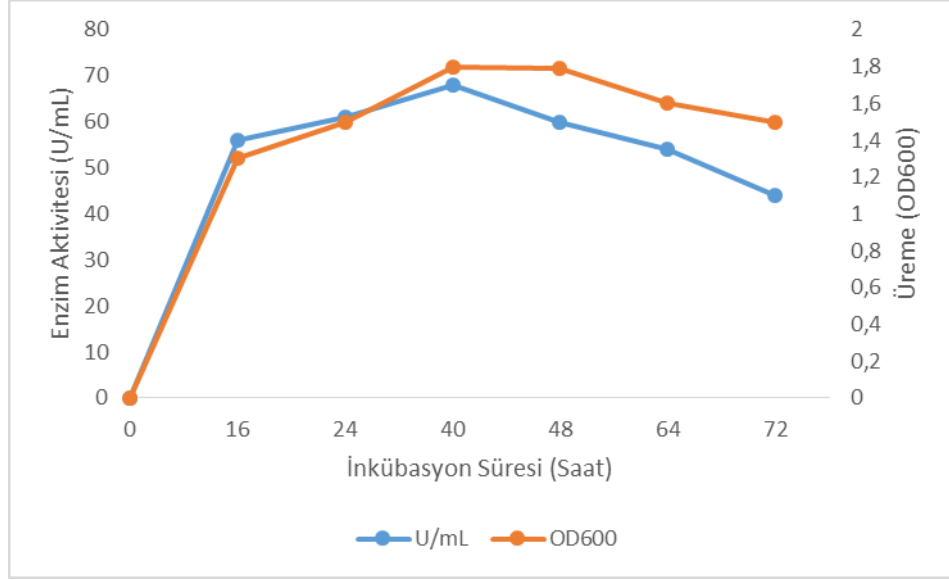


**Şekil 4.3.** *Bacillus substilis* 171ES'in 3 farklı içerikli besiyerinde bakteri üremelerinin karşılaştırılması



**Şekil 4.4.** *Bacillus substilis* 171ES'in 3 farklı içerikli besiyerinde selüloz enzim üretimlerinin karşılaştırılması

*Bacillus substilis* 171ES'nin bakteri üreme eğrisi ve enzim üretimi Şekil 4.5'de verilmiştir. Maksimum enzim üretiminin durağan fazda olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 4.5.** *Bacillus substilis* 171ES'in besiyeri 2'de selülaz üretim kapasitesi ve üreme değerlerinin zamana bağlı değişimleri.

#### 4.4.1. Karbon (C) kaynaklarının etkisi

Üretim ortamında bulunan karbon kaynaklarının bakteri üreme ve selülaz enzim üretimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla 5 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan CMC yerine, aynı oranda (%1) karbon kaynağı olarak Fruktoz, Sukroz, Maltoz, Nişasta ve Gliserol kullanılmıştır. Bakterinin aşılması ve üretimi 3.2.4'de belirtildiği gibi yapılmış olup, maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu süre sonunda alınan örneklerde üreme ve selülaz aktivitesi tayinleri yapılmıştır (Çizelge 3.2).

171ES'nin enzim üretimi açısından karbon kaynağı tercih sıralaması sırayla Maltoz> Nişasta> Sukroz> Fruktoz> Gliserol> Kontrol şeklinde belirlenmiştir. Yapılan çalışmada maksimum enzim üretiminin elde edildiği Maltoz içeren ortamdaki enzim üretimi (428

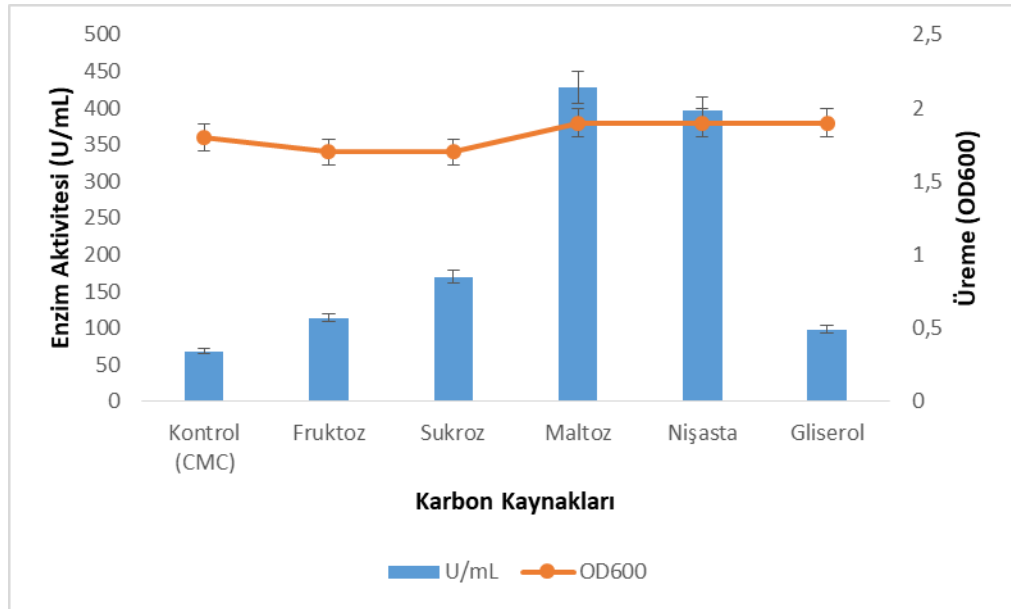


U/mL), kontrol ortamına göre (68 U/mL) 6.29 kat artmıştır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.6). Denemeye alınan tüm karbon kaynağı varlığında yüksek oranda enzim üretimi elde edilmiştir.

Bakteri üremesi açısından ise karbon kaynağı tercih sırası Maltoz= Nişasta= Gliserol > Kontrol > Fruktoz = Sukroz olarak saptanmıştır (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.6).

**Çizelge 4.5.** Karbon kaynaklarının üreme ve selüloz enzim üretimi üzerine etkileri

Karbon Kaynakları	Üreme (OD <sub>600</sub> )	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Kat Artışı
Kontrol (CMC)	1,8	68	1
Fruktoz	1,7	114	1.68
Sukroz	1,7	170	2.5
Maltoz	<b>1,9</b>	<b>428</b>	<b>6.29</b>
Nişasta	1,9	396	5.82
Gliserol	1,9	98	1.44



**Şekil 4.6.** Karbon kaynaklarının selüloz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri

#### 4.4.2. Azot (N) kaynaklarının etkisi

Azot kaynaklarının bakteri üremesi ve enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla kontrol ortamda birlikte bulunan organik azot kaynakları olan pepton, yeast ekstrakt yerine sırasıyla; %1,6 pepton, yeast ekstrakt, meat ekstrakt, skim milk powder (yağsız süt tozu), tripton ve inorganik azot kaynakları için kontrol ortamındaki pepton, yeast ekstrakt ve inorganik azot kaynağı olan  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  yerine sırasıyla; %0,25 oranında  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$  kullanılmıştır. Bakterinin aşılınması ve üretimi Çizelge 3.2.4'de belirtildiği gibi yapılmış olup, maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu süre sonunda alınan örneklerde üreme ve selülaz aktivitesi tayinleri yapılmıştır (Çizelge 3.2).

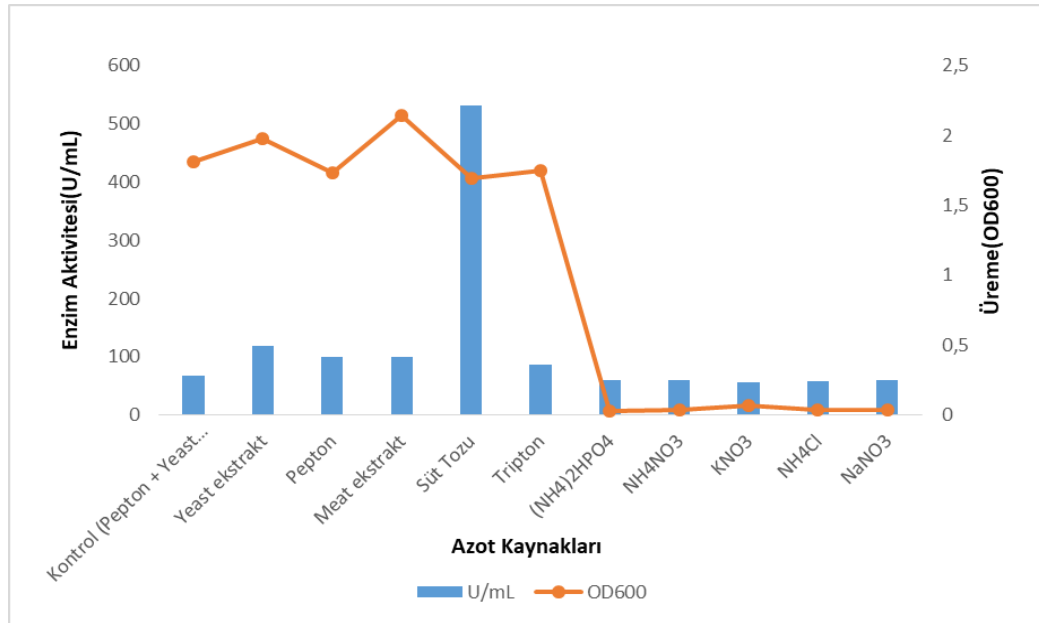
*Bacillus subtilis* 171ES'nin enzim üretimi açısından organik ve inorganik azot kaynağı tercihi sırasıyla Skim Milk > Yeast Ekstrakt > Pepton = Meat Ekstrakt > Tripton > Kontrol (pepton, yeast ekstrakt ve  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) >  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  =  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  =  $\text{NaNO}_3$  >  $\text{NH}_4\text{Cl}$  >  $\text{KNO}_3$  şeklindedir. Maksimum enzim üretiminin organik azot kaynağı olan skim milk powder (yağsız süt tozu) varlığında 532 U/mL olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.7). Bu ortamda enzim verimi kontrol ile kıyaslandığında 7,8 kat artmıştır. Enzim üretimi açısından organik kaynaklar inorganik kaynaklardan daha etkili olmuştur.

Maksimum bakteri üremesinin ise sırayla; Meat Ekstrakt > Yeast Ekstrakt > Kontrol = Tripton > Pepton = Skim Milk Powder >  $\text{KNO}_3$  >  $\text{NH}_4\text{Cl}$  =  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  =  $\text{NaNO}_3$  >  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  ortamlarında gerçekleştiği saptanmıştır (Çizelge 4.6).

İnorganik azot kaynaklarının enzim üretimi üzerinde etkili olmadığı, buna karşın organik azot kaynaklarının yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

**Çizelge 4.6.** Farklı azot kaynaklarının selülaz enzim üretimi ve üremesi üzerine etkileri

Azot Kaynakları	Üreme (OD <sub>600</sub> )	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Kat Artışı
Kontrol (Pepton + Yeast ekstrakt + NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> )	1,8	68	1
Yeast ekstrakt	2,0	118	1.73
Pepton	1,7	100	1.47
Meat ekstrakt	<b>2,2</b>	100	1.47
Süt Tozu	1,7	<b>532</b>	<b>7.82</b>
Tripton	1,8	86	1.26
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03	60	0.88
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,04	60	0.88
KNO <sub>3</sub>	0,08	56	0.82
NH <sub>4</sub> Cl	0,04	58	0.85
NaNO <sub>3</sub>	0,04	60	0.88



**Şekil 4.7.** Azot kaynaklarının selülaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri..

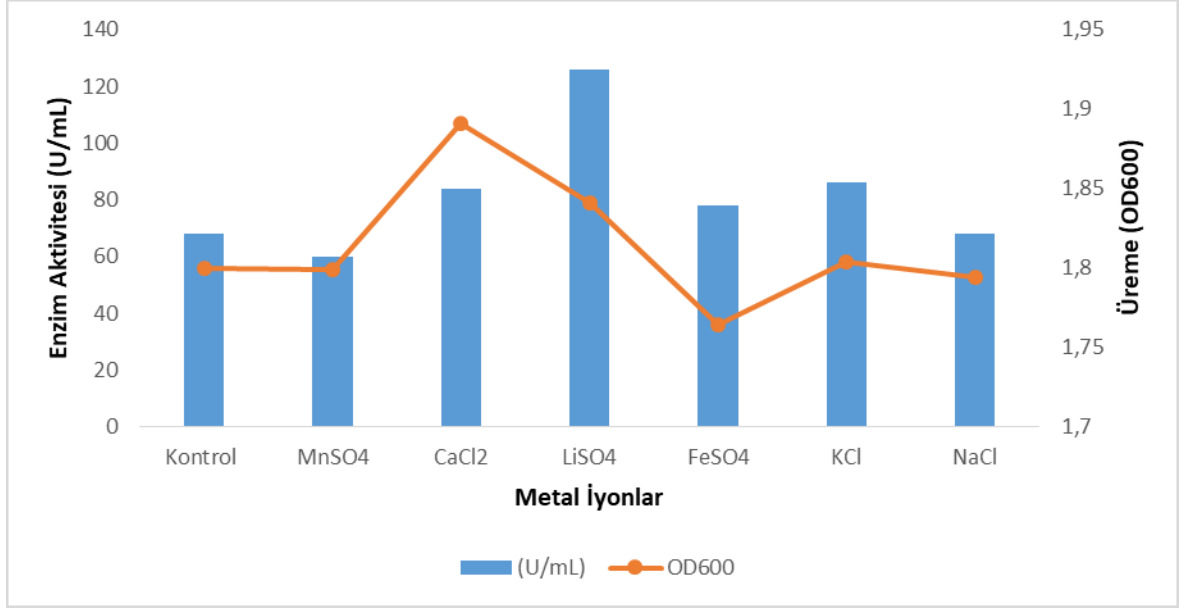
#### 4.4.3. Metal iyonlarının etkisi

Metal iyonlarının bakteri üremesi ve enzim üretimi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan çalışmalarda kontrol ortamındaki %0,03 oranında kullanılan  $MgSO_4$  yerine sırasıyla  $MnSO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $LiSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $KCl$  ve  $NaCl$  kullanılmıştır. Bakterinin aşılınması ve üretimi Çizelge 3.2.4'de belirtildiği gibi yapılmış olup, maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu süre sonunda alınan örneklerde üreme ve selüloz aktivitesi tayinleri yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Bakterinin enzim üretiminde metal kaynağını sırası ile  $LiSO_4 > KCl > CaCl_2 > FeSO_4 > NaCl > MnSO_4$  şeklinde tercih ettiği görülmüştür (Şekil 4.8 ve Çizelge 4.7). Yapılan çalışmada, en yüksek enzim üretiminin elde edildiği  $LiSO_4$  varlığında enzim üretimi,  $MgSO_4$  bulunan kontrol ortamına göre 1,85 kat artmıştır (Çizelge 4.7). Denemeye alınan metal iyonları varlığında hemen hemen tüm metal iyonlarının ( $MnSO_4$  hariç) enzim üretimi üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Maksimum bakteri üremesinin ise sırayla;  $CaCl_2 > LiSO_4 = Kontrol = KCl = NaCl = MnSO_4 = FeSO_4$  ortamlarında gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 4.8 ve Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Metal kaynaklarının selüloz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

Metal İyonları	Üreme ( $OD_{600}$ )	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Kat Artışı
Kontrol ( $MgSO_4$ )	1,8	68	1
$MnSO_4$	1,8	60	0.88
$CaCl_2$	<b>1,9</b>	84	1.23
<b><math>LiSO_4</math></b>	1,8	<b>126</b>	<b>1.85</b>
$FeSO_4$	1,8	78	1.14
$KCl$	1,8	86	1.26
$NaCl$	1,8	68	1



**Şekil 4.8.** Metal iyonlarının selüaz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri

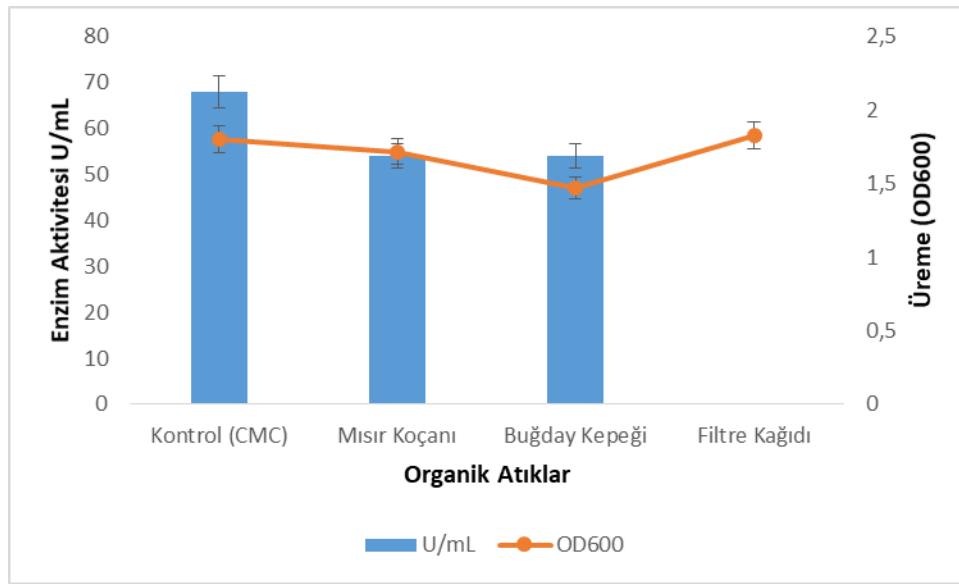
#### 4.4.4. Organik atıklarının etkisi

Bakterilerinin üreme kapasiteleri ve enzim üretimi üzerine organik atıklarının etkilerini araştırmak amacıyla Çizelge 3.1’de içeriği verilen enzim üretim besiyerinde karbon kaynağı CMC yerine aynı oranda (%1) 3 farklı organik atık kaynağı kullanılmıştır. Bakterinin aşılması ve üretimi Çizelge 3.2.4’te belirtildiği gibi yapılmış olup, maksimum enzim üretimin elde edildiği 40 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu saat sonunda alınan örneklerde üreme ve selüaz aktivitesi tayinleri yapılmıştır (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.9).

171ES’nin enzim üretimi açısından denemeye alınan organik kaynakları içeren ortamlar kontrol ortamına (68 U/mL) göre verimli bir sonuç elde edilmemiştir. Mısır koçanı ve buğday kepeği 54 U/mL enzim üretimi sağlarken, filtre kağıdı içeren ortamda enzim üretimi saptanmamıştır. Bakteri üremesi açısından ise Kontrol = Filtre kağıdı > Mısır koçanı > Buğday kepeği şeklinde belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4.8.** Organik atıklarının selüloz aktivitesi ve üreme miktarı üzerine etkileri

Organik Atıklar	Üreme (OD <sub>600</sub> )	Enzim Aktivitesi (U/mL)	Bağıl Aktivite (%)
Kontrol (CMC)	1,8	68	100
Mısır Koçanı	1,7	54	79
Buğday Kepeği	1,5	54	79
Filtre Kağıdı	1,8	-	-



**Şekil 4.9.** Organik atıklarının selüloz aktivitesi ve üreme üzerine etkileri

#### 4.5. Maksimum Selüloz Üretimi İçin Modifiye Ortamın Belirlenmesi

Maksimum selüloz üretiminin saptandığı besinsel faktörler bir araya getirilerek enzim veriminin artırılmasının sağlanması için yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Modifiye ortamda maksimum verimi sağlayan karbon kaynağı olarak elde edilen %1 oranında kullanılan Maltoz, azot kaynağı olarak %1,6 oranında Skim Milk Powder (yağsız süt tozu) ve metal iyonları olarak %0,03 oranında LiSO<sub>4</sub> olarak saptanmıştır. Üretim koşulları olarak sıcaklık için 37°C, pH için 7,0, havalandırma için 150 rpm ve inokülasyon miktarı için %1 olarak alınmış ve bu yeni oluşturulan modifiye ortamda enzim üretimi

yoluna gidilmiştir. Modifiye ortamda (453 U/mL) kontrol ortamına göre (68 U/mL) 6.6 kat enzim verimin arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4.9.** Kontrol ortamı ile modifiye ortamda üreme ve selülaz enzim üretim kapasitesinin karşılaştırılması

<b>Kontrol Ortam</b> (Maryam ve ark. 2017)	<b>Enzim Aktivitesi</b> (U/mL)	<b>Üreme</b> (OD <sub>600</sub> )	<b>Modifiye Ortam</b>	<b>Enzim Aktivitesi</b> (U/mL)	<b>Üreme</b> (OD <sub>600</sub> )
%0,03 MgSO <sub>4</sub>	68	1,8	%0,03 LiSO <sub>4</sub>	453	1,1
%1 Pepton + %0,6 Yeast Ekstrakt			%1,6 Yağsız Süt Tozu		
%1 CMC			%1 Maltoz		
%0,2 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			%0,2 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		
%0,25 (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>			-		
37°C			37°C		
pH 7.0			pH 7.0		
150 rpm			150 rpm		
%1 Aşılama			%1 Aşılama		
Ön İnkübasyon 18 Saat			Ön İnkübasyon 18 Saat		

#### 4.6. Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Enzimin kısmi olarak saflaştırılma geçilmeden önce 171ES suşu (3.2.4)'te belirttiği gibi üretilmiştir. Üretim sonrası kültür ortamı +4'de santrifüjde 5000 rpm'de santrifüjlenmiş, supernatant ayrılmış ve ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Ham enzim çözeltisi sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemlerinden geçirilerek kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımlarında elde edilen fraksiyonların aktivite ve protein tayinleri standart koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Kısmi saflaştırmanın ilk basamağı olan amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmıştır. Bunun için ham enzim çözeltisi ayrı ayrı olarak %60, %70, %80 ve %90 konsantrasyonlarındaki amonyum sülfat varlığında çöktürmeleri yapılmıştır. Enzimin en iyi çöktüğü amonyum

sülfat konsantrasyonu %80 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Buna göre %80'lik çöktürmeden elde edilen enzimin aktivitesi 230 U/ml olup, diğer konsantrasyonlardaki çöktürmelerden yüksek olduğu için, bundan sonraki aşamalarda %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi kullanılmış ve elde edilen pellet 50 mM Sodyum-Fosfat (pH 6.5) tamponunda bir gece boyunca diyaliz edilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Farklı konsantrasyonlarda amonyum sülfat çöktürmesi

Fraksiyonlar (%)	Enzim Aktivitesi (U/mL)
60	83
70	95
<b>80</b>	<b>230</b>
90	81

Kısmi saflaştırmada ikinci adım olarak %80'lik amonyum sülfat çöktürmesi +4'de soğutmalı santrifüjde 10,000 rpm'de santrifüjlenmiş ve elde edilen pellet 50 mM Sodyum-Fosfat (pH 6.5) tamponunda çözülmüş ve diyaliz tüpüne konarak bir gece boyunca, tamponu 3 kez değiştirilerek, +4°C de diyaliz edilmiştir. Diyalizat ultra filtrasyon (MW cut-off 30,000) tüp ile konsantre edilmiş ve enzim 4,8 kez saflaştırılmıştır. Kısmi olarak saflaştırılan enzim daha sonra karakterize edilmiştir.

Saflaştırma basamakları ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11'de verilmiştir.

**Çizelge 4.11.** Selülaz enziminin kısmi saflaştırma basamakları

Saflaştırma Basamağı	Hacim (mL)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg)	Verim <sup>1</sup> (%)	Saflık <sup>2</sup> (Kez)
Ham enzim	100	437	45,300	104	100	1
Amonyum sülfat çöktürmesi (%80)	12	8,6	2,760	320	6	3



**Çizelge 4.11.** Selülaz enziminin kısmi saflaştırma basamakları (devam)

Diyaliz	10	3,1	1000	322	2,2	3,1
Ultrafiltrasyon	5	0,5	250	500	0,6	4,8

<sup>1</sup>Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

<sup>2</sup>Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

#### **4.7. Kısmi Olarak Saflaştırılan Selülaz Enziminin Karakterizasyonu**

Kısmi olarak saflaştırılan enzim çözeltisi üzerine sıcaklık, sıcaklık stabilitesi, pH ve pH stabilitesi ile farklı metal iyonlarının etkilerine bakılmıştır. Ayrıca ham enzimin molekül ağırlığı jel elektroforez yöntemi (Laemmli 1974) ile tayin edilmiştir. Enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri de saptanmıştır.

##### **4.7.1. Sıcaklık ve sıcaklık stabilitesinin etkisi**

Enzim üzerine sıcaklık derecelerinin etkilerini belirlemek üzere 35, 37 (Kontrol), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ve 80°C'lerde aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol olarak kullanılan 37°C sıcaklık derecesinden elde edilen sonuç %100 kabul edilerek, aktivite değerleri % bağıl aktivite olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre enzimin 50°C'de maksimum aktivite gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.10).

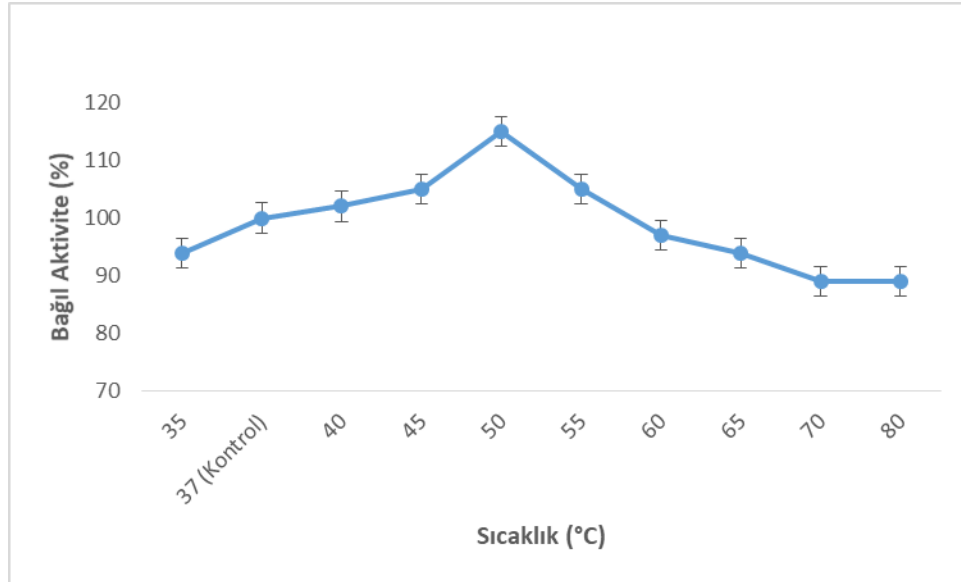
Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi ham enzime göre %15 artmıştır. Sıcaklığın her 5 derece artırılması ile 50 derece ulaşıncaya kadar aktivite değerleri artmıştır. 55 °C'de enzim aktivitesi %5 oranında da elde edilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda enzim aktivitesinde fazla kayıplar olmamıştır.

**Çizelge 4.12.** Selülaz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Sıcaklık (°C)	Bağıl Aktivite (%)
35	94
37 (Kontrol)	100

**Çizelge 4.12.** Selüloz enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (devam)

40	102
45	105
<b>50</b>	<b>115</b>
55	105
60	97
65	94
70	89
80	89

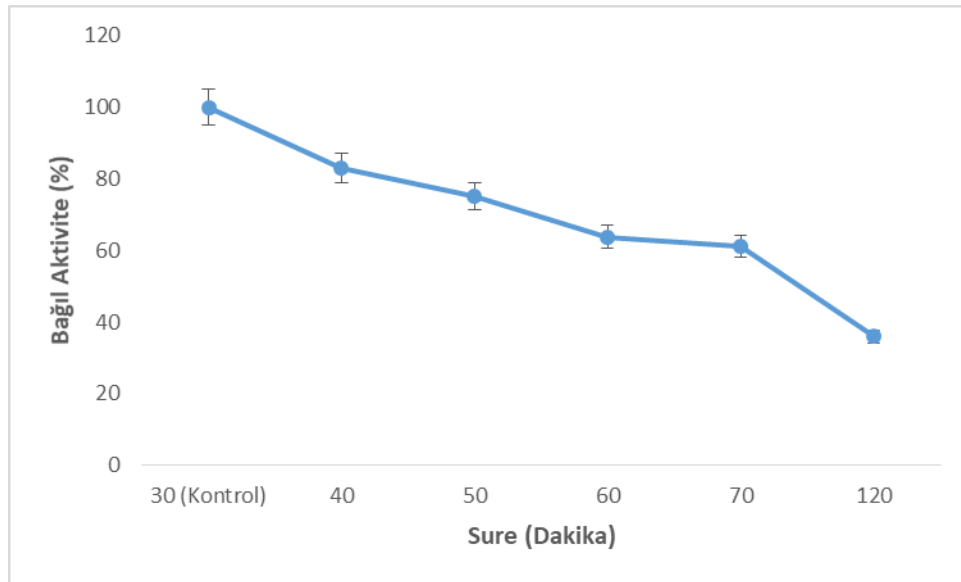


**Şekil 4.10.** Sıcaklığın kısmi saf enzim üzerine etkisi

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği 50°C’de enzimin stabilitesine bakılmış ve enzim çözeltisi su banyosunda 40, 50, 60, 70 ve 120 dakika süre ile tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre kısmi saf enzimin 50. dakikada aktivitesini koruduğu saptanmıştır (Çizelge 4.13). Sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.11). Enzimin ısıya dayanıklı (termostabil) karakterde olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 4.13.** Sıcaklık stabilitesinin selülaz enzimi üzerine etkisi

<b>50 °C (Dakika)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>
30 (Kontrol)	100
40	83
50	75
60	64
70	61
120	36



**Şekil 4.11.** Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın stabilitesi

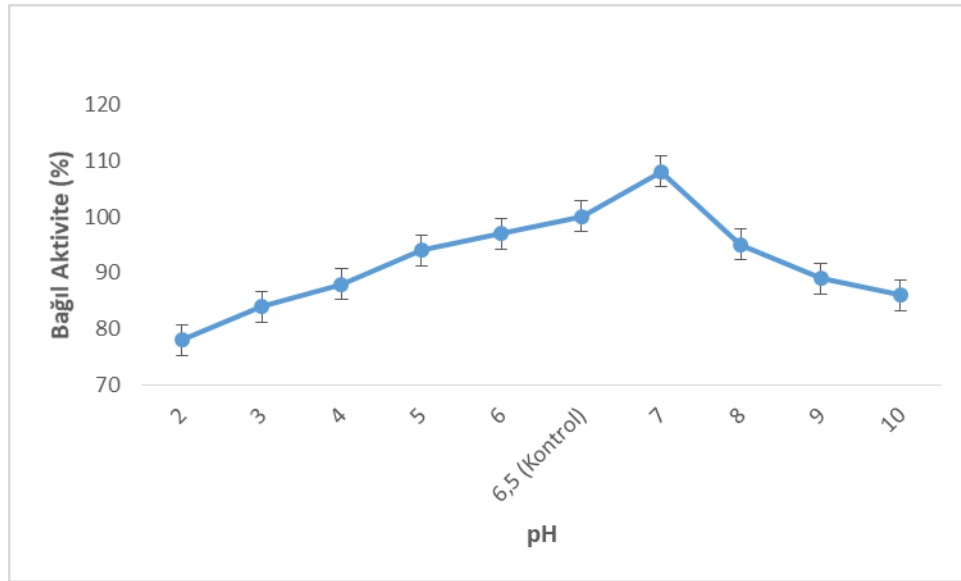
#### **4.7.2. pH ve pH stabilitesinin etkisi**

Selülaz enziminin optimum pH değerlerini belirlemek amacıyla enzim 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 (kontrol), 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 pH’larda hazırlanan substrat çözeltilerinde aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sırasında pH 6.5’de elde edilen sonuçlar kontrol olarak kabul edilmiş ve diğer sonuçlar buna göre % bağlı aktivite olarak hesaplanmıştır. Çizelge 4.14 ve Şekil 4.12’da de görüldüğü gibi enzimin optimum pH değerinin 7.0 olduğu

saptanmıştır. Enzim bu pH değerinde %8'luk bir aktivite artışı göstermiştir. Enzim nötral bir enzimdir.

**Çizelge 4.14.** Enzim üzerine pH'nın etkisi

pH	Bağlı Aktivite (%)
2	78
3	84
4	85
5	94
6	97
6,5 (Kontrol)	100
<b>7</b>	<b>108</b>
8	102
9	89
10	86

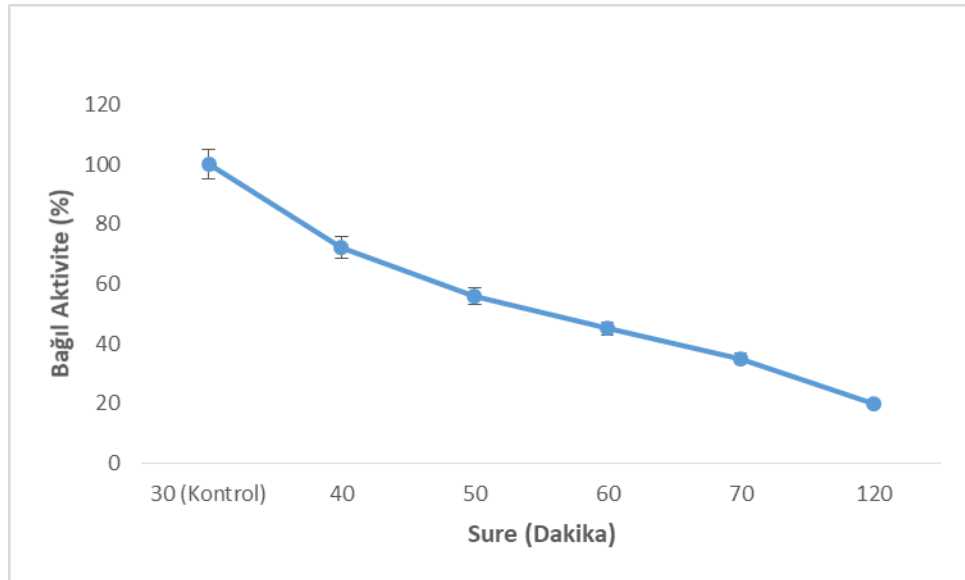


**Şekil 4.12.** Saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın etkisi bağlı aktivite

Selülaz enziminin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim pH 7.0'da 120 dakika boyunca su banyosunda inkübe edilmiştir. Enzim 30 dakika boyunca aktivitesini korurken, sürenin artması ile 120 dakika sonunda %80 oranında kayıp olduğunu saptanmıştır. (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.13)

**Çizelge 4.15.** pH stabilitesinin selülaz enzimi üzerine etkisi

<b>pH 7.0 (Dakika)</b>	<b>Bağlı Aktivite (%)</b>
30 (Kontrol)	100
40	72
50	56
60	45
70	35
120	20



**Şekil 4.13.** Saf enzim aktivitesi üzerine pH'nın stabilitesi bağlı aktivite

#### 4.7.3. Enzim aktivitesi üzerine potansiyel bileşiklerin etkisi

Enzim aktivitesi üzerine metal iyonlarının, tuzların ve redükleyici bileşiklerin etkisini tespit etmek üzere enzim 1 ve 5 mM MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, LiSO<sub>4</sub>, BaCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl, SDS, EDTA ve 2-Mercaptoethanol gibi farklı bileşenlerle inkübe edilmiştir. İçerisinde hiçbir potansiyel bileşik bulunmayan substrat çözeltisi ile elde edilen aktivite değeri kontrol olarak kullanılmış (%100) ve elde edilen değerler buna göre % olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.16 ve Şekil 4.14).

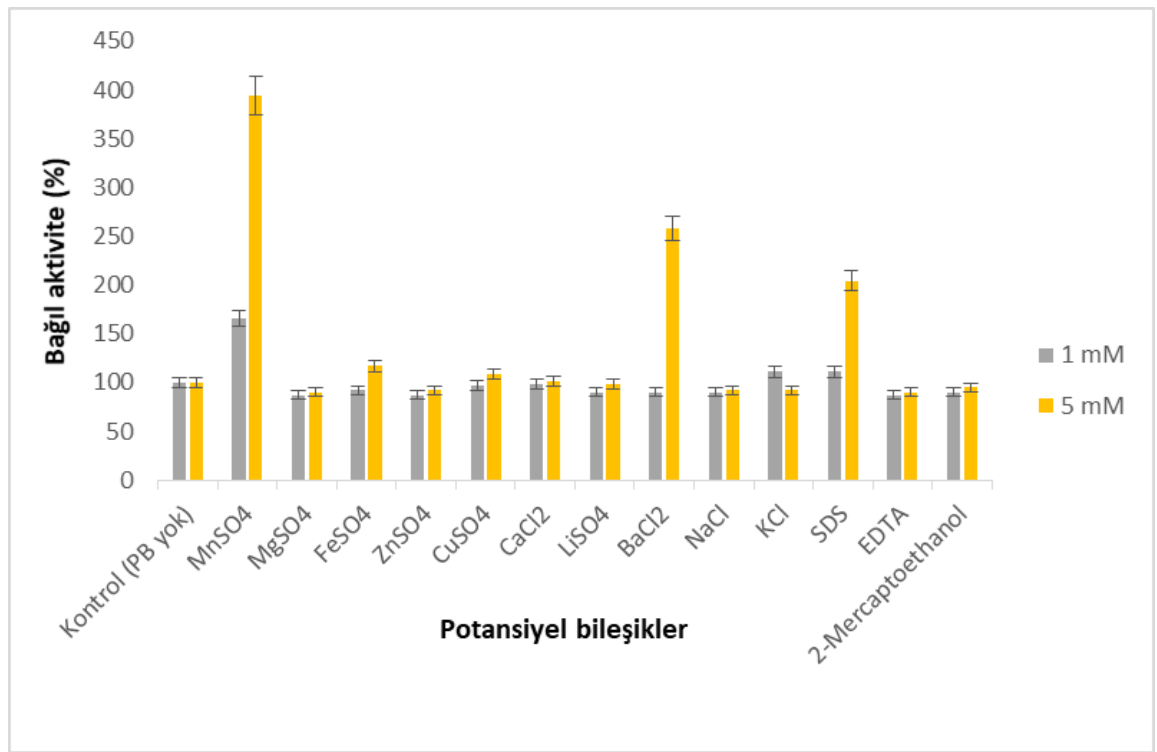
5 mM konsantrasyonundaki çoğu potansiyel bileşiklerin enzim aktivitesini 1 mM'a göre daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Bununla beraber MnSO<sub>4</sub> ve BaCl<sub>2</sub> metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkili bir şekilde aktivatör etki yaptığı, bu metalleri FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, ve KCl izlerken, diğer metal iyonlarının inhibitör etki yarattığı saptanmıştır. Anyonik bir deterjan olan SDS enzimi etkili bir şekilde aktive ederken, şelatlayıcı ajan olan EDTA ise enzim aktivitesini inhibe etmiştir (Çizelge 4.16).

**Çizelge 4.16.** Potansiyel bileşiklerin enzim üzerine etkileri

Potansiyel Bileşikler	Bağlı aktivite (%)	
	1mM	5mM
Kontrol (potansiyel bileşik içermiyor)	100	100
MnSO <sub>4</sub>	166	<b>394</b>
MgSO <sub>4</sub>	87	90
FeSO <sub>4</sub>	92	117
ZnSO <sub>4</sub>	87	92
CuSO <sub>4</sub>	97	109
CaCl <sub>2</sub>	98	102
LiSO <sub>4</sub>	90	98

**Çizelge 4.16.** Potansiyel bileşiklerin enzim üzerine etkileri (devam)

BaCl <sub>2</sub>	90	<b>258</b>
NaCl	90	92
KCl	111	92
SDS	111	<b>204</b>
EDTA	87	90
2-Mercaptoethanol	90	95



**Şekil 4.14.** Farklı potansiyel bileşiklerin saf enzim üzerine etkileri

#### 4.7.4. Enzim aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

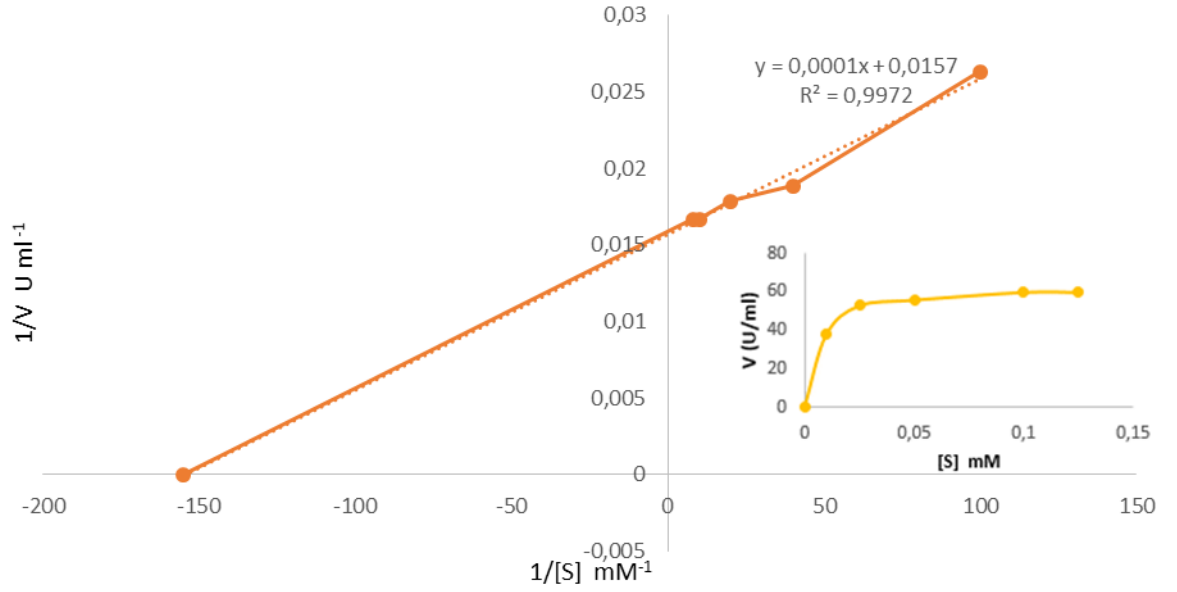
Selülaz aktivitesi üzerine substratın konsantrasyonunun etkisi saptamak amacıyla 0,001-0,2 mM arasındaki konsantrasyonlarda CMC optimum sıcaklık ve pH'da (37°C ve pH 6.5) belirlenen inkübasyon süresinde ortama ilave edilerek enzim aktivitesi standart deney koşullarında ölçülmüştür (Çizelge 4.17).

**Çizelge 4.17.** Selüloz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

<b>Substrat Konsantrasyonu (mM)</b>	<b>Enzim Aktivitesi (U/mL)</b>
0,001	38
0,025	53
0,05	56
0,1	60
0,125	60
0,2	60

Substrat konsantrasyonunun 0,001 mM'dan 0,2 mM'a kadar belli bir oranda artırılması ile enzim aktivitesinin kademeli olarak arttığı görüldü. Selülozın maksimum hızını ( $V_{max}$ ) ve Michaelis-Menten sabitesini ( $K_m$ ) saptamak için,  $1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$  olarak Lineweaver-Burk  $y = ax + b$  doğru grafiğinden yararlanıldı. Lineweaver-Burk grafiği,  $1/V$ 'ye karşı  $1/[S]$  olarak çizildi (Şekil 4.15). Bu grafikten elde edilen doğrunun denklemi ise,  $y = 0,0001x + 0,0157$  olarak, tamamlayıcılık katsayısı ( $R^2$ ) ise  $R^2 = 0.9972$  bulundu. Denklemin dikey eksenini kestiği nokta  $1/V_{max} = 0,016$  değerini verdiği için,  $V_{max}$  değeri 63,7 U/mL olarak,  $K_m$  değeri ise 0,0064 mM olarak saptanmıştır.





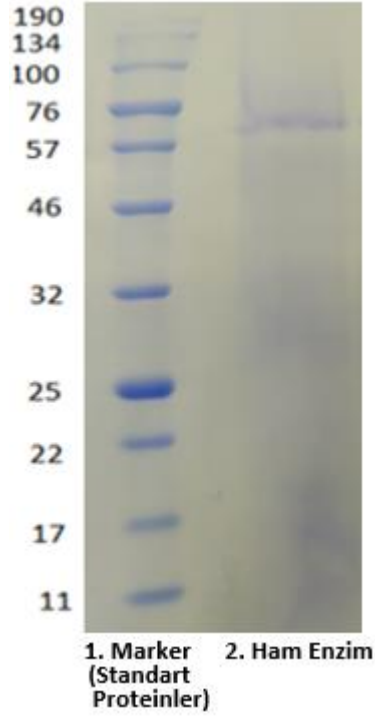
**Şekil 4.15.** Selülaaz aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Lineweaver-Burk grafiği ve Michaelis-Menten Grafiği)

#### 4.7.5. Enzimin moleküler ağırlığının tespiti

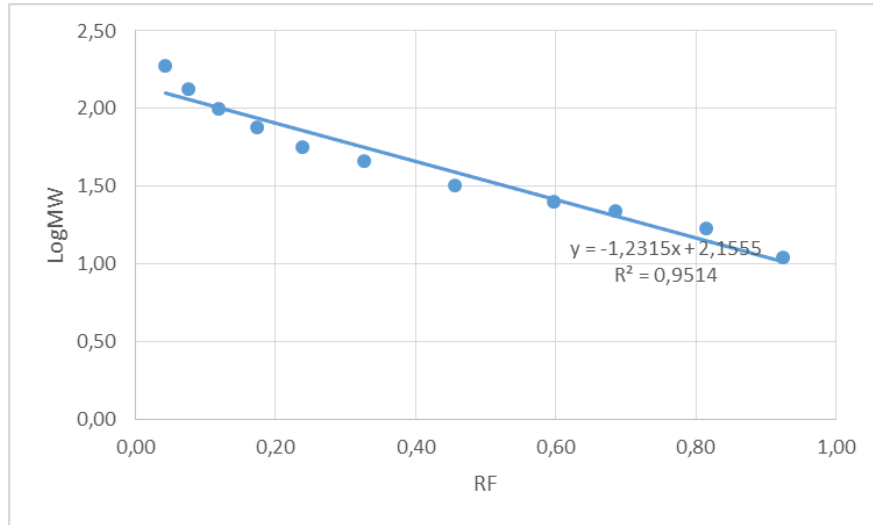
Ham enzim örneğinin moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla, elektroforez jeline enzim örneği yanında moleküler ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisi de uygulanmış ve elektroforez işlemi sonucunda oluşan bantların (Şekil 4.16) Rf değerlerinden yararlanılarak aşağıda verilen formüle göre enzim ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır.

$$Rf = \frac{\text{Proteinin Aldığı Yol (cm)}}{\text{İzleme Boyanının Aldığı Yol (cm)}}$$

Moleküler ağırlıkları bilinen standart proteinlerin göreceli hareketlilik değerleri ve molekül ağırlıkları ile bir standart eğri elde edilmiştir (Şekil 4.17). Elde edilen grafiğin analizi yapılarak, örneğin moleküler ağırlığı saptanmıştır. Enzim örneğinin molekül ağırlığının Şekil 4.16'da görüldüğü gibi tek bir bant halinde saptanmıştır. Koyu bant halinde görülen enzimin moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 73 kDa olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bant görünümü



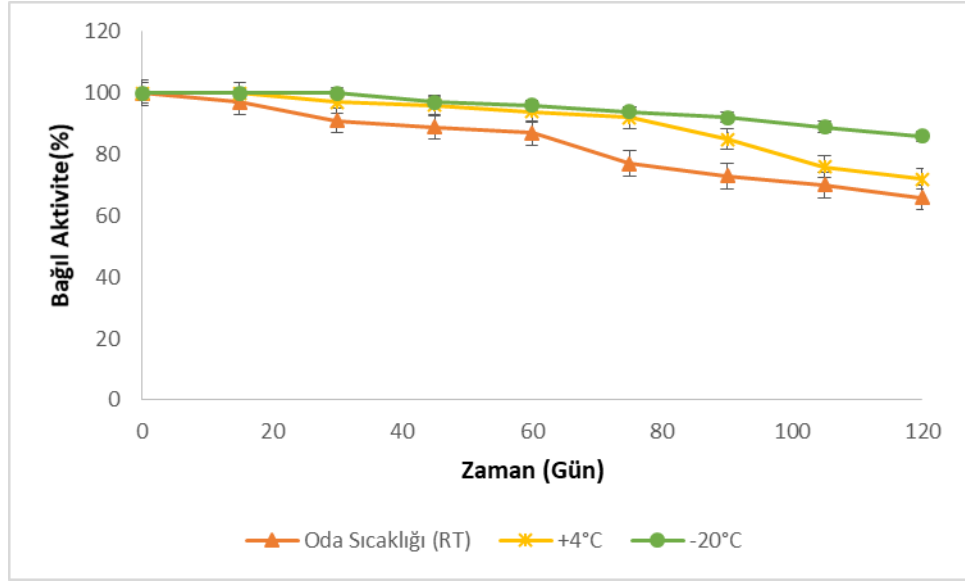
Şekil 4.17. Standart proteinlerin Rf değerleri ve molekül ağırlıklarına göre oluşturulan standart eğri

#### 4.8. Ham Enzimin Depolanma Stabilitesinin Belirlenmesi

Ham enzimin depolanma sıcaklığını saptamak üzere bakteriden üretilen ham enzimin aktivitesi tayin edildikten sonra enzim örnekleri ellişer mL olacak şekilde oda sıcaklığında (RT), +4 °C' de ve -20 °C' de olmak üzere 3 ayrı gruba ayrılmış ve her 15 günde bir aktivitelerine bakılarak depolama stabilitesi belirlenmiştir. Yapılan çalışmada oda sıcaklığında (RT) 30 gün sonra, +4°C'de ise 75 gün sonra enzimin aktivitesi hemen hemen korunurken, bu süre -20 °C'de 90 güne kadar bulunmuştur. Sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüşler gözlenmiştir. En iyi korunmanın -20 °C'de olduğu saptanmış ve 120 günde sadece %14 oranında bir aktivite kaybı olmuştur. En fazla kayıp ise oda sıcaklığındaki depolamada olmuştur. (Çizelge 4.18 ve Şekil 4.18).

**Çizelge 4.18.** Ham enzimin depolanma stabilitesi

Zaman (Gün)	Oda Sıcaklığı (RT)	+4°C	-20°C
	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Aktivite (%)	Bağlı Aktivite (%)
0	100	100	100
15	97	100	100
30	91	97	100
45	89	96	97
60	87	94	96
75	77	92	94
90	73	85	92
105	72	74	89
120	66	72	86

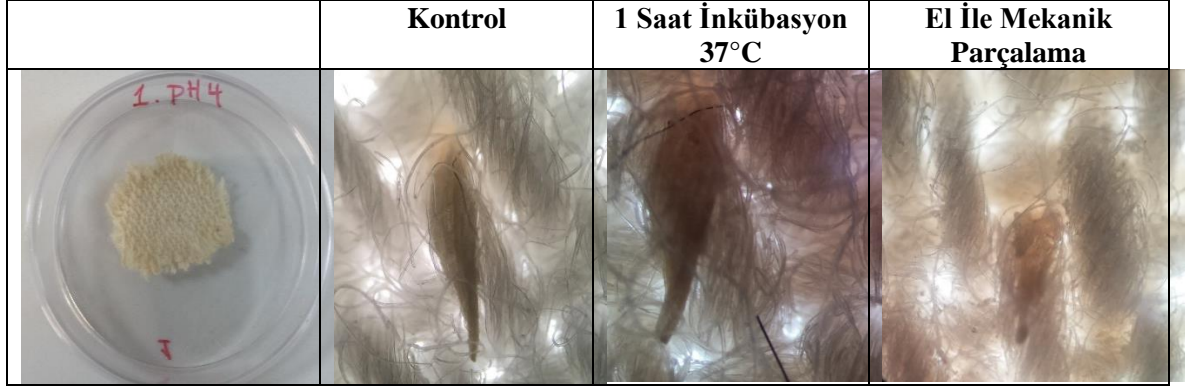


**Şekil 4.18.** Farklı sıcaklıkta ham enzimin depolanma stabilitesi

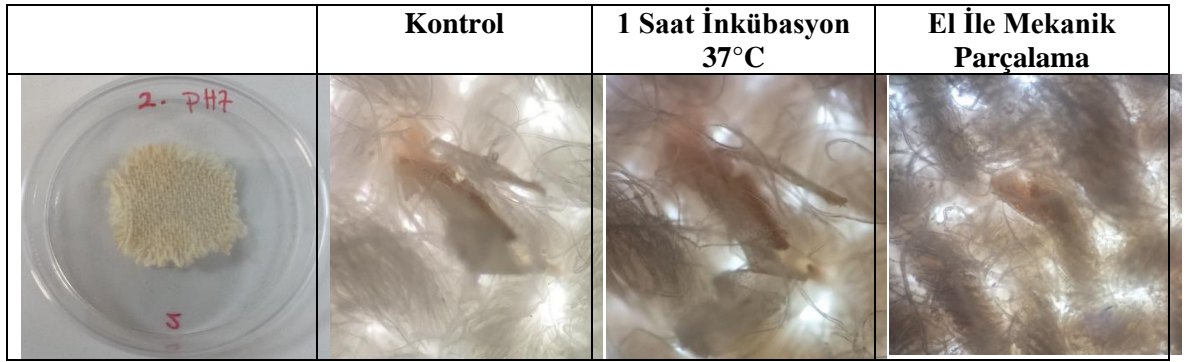
#### **4.9. Selüloz Enziminin Yünlü Kumaşlarda Bitkisel Artıkların Gideriminde Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi**

Liyofilize edilmiş selülazın %100 yünlü kumaşlarda bulunan pıtrak, diken, ot, yaprak, yem artıklarından oluşan bu bitkisel kaynaklı atıkların giderilmesi incelenmek üzere çeşme suyu ile yıkanmış yün kumaşlara 15 mL sodyum fostat tamponu (pH 4.0 ve 7.0) içerisinde çözölen 2 gr liyofilize edilmiş selülaz enzimi tatbik edilmiştir. Kumaşlar 1 saat boyunca 37°C’de inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Bitkisel atıkların uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı ışık mikroskop (Nikon Eclipse E1000) görüntölemesi ile belirlenmiştir. Ayrıca, kumaşlar el ile mekanik parçalanması uygulanmış ve bitkisel atıkların daha fazla giderip giderilmediğini ışık mikroskop görüntölemesi ile de belirlenmiştir. Sonuçlar kontrol olarak hiçbir işlem görmemiş ve önceden ışık mikroskopunda fotoğraflanan kumaşlardaki bitkisel atıklar ile karşılaştırılmıştır. Yapılan çalışmada kumaşların enzim ile 37°C’de 1 saat inkübasyon sürecinden sonra bitkisel atıkların tam olarak giderilmediği görölmüştür. Fakat kumaşlara el ile mekanik parçalanma uygulanmasıyla bitkisel atıkların önemli ölçüde uzaklaştığı görölmüştür. Genellikle pH 4.0’de enzimatik olarak bitkisel atıkların giderimi

yapılmasına rağmen bu çalışmada pH 7.0 ile daha iyi sonuç alınmıştır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.19).



Şekil 4.19. pH 4.0'de yün kumaştaki pıtrak görüntüleri



Şekil 4.20. pH 7.0'de yün kumaştaki pıtrak görüntüleri

## 5. TARTISMA ve SONUÇ

Günümüzde enzimler rutin olarak gıda, yem, deterjan, tabaklama, tekstil, deterjan, ilaç ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır ve belirli uygulamalara göre sınıflandırılmaktadır. Bu endüstriyel uygulamalar, küresel enzim pazarının %80'inden fazlasını oluşturmaktadır (Van Oort, 2010). Endüstriyel enzimlere olan talep, sürdürülebilir çözümlere olan artan ihtiyaç nedeniyle sürekli artmaktadır. Mikroorganizmalar birçok enzimin en büyük ve yararlı kaynaklarından biridir ve olmaya devam etmektedir (Demain and Adrio, 2008; Adrio and Demain, 2005). Mikrobiyal enzimler bitki ve hayvan enzimlerinden daha aktif ve stabildir. Ek olarak, mikroorganizmalar alternatif bir enzim kaynağını temsil ederler çünkü biyokimyasal çeşitlilikleri ve gen manipülasyonuna yatkınlıkları nedeniyle fermantasyon yoluyla kısa sürede büyük miktarlarda kültürlenebilirler (Anbu ve ark., 2013). Mikrobiyal enzimler, ekonomik uygulanabilirlik, yüksek verimleri, sabitliği, ürün modifikasyonu ve optimizasyonu kolaylığı, mevsimsel dalgalanmaların olmaması nedeniyle düzenli tedarik, mikropların ucuz ortamlarda hızlı büyümesi, stabilite ve daha fazla katalitik aktivite nedeniyle bitki veya hayvan enzimlerine tercih edilir (Gurung ve ark., 2013).

Endüstride kullanılan enzimler arasında selüloz enzimi önemli bir yere sahiptir. Selüloz, selülozun ve bazı ilgili polisakkaritlerin ayrışması olan selüloz katalize eden mantarlar, bakteriler ve protozoanlar tarafından üretilmektedir. Çoğu memeli, selüloz gibi diyet liflerini kendi başlarına sindirme sınırlı kabiliyetine sahiptir. Sığır ve koyun gibi ruminantlar gibi birçok otçul hayvanda selüloz simbiyotik bakteriler tarafından üretilir. (Barkalow ve ark., 2008). Endüstride selülozlar daha çok hayvan yemi, tekstil endüstrisi, yiyecek ve içecek sektörlerinde kullanılmaktadır. Artan talebi karşılamak için daha verimli enzim üreten yeni mikroorganizmalar doğadan izole edilmekte ya da mevcut mikroorganizmalar kullanılarak genetik manipülasyonlarla verim arttırıma gidilmektedir.

Bu çalışmada doğal kaynaklarımız olan toprak örneklerinden daha önceden izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarının selüloz enzim potansiyelerini belirlemek üzere kalitatif olarak taranmış ve 100 *Bacillus* sp. suşlarından 54 *Bacillus* sp. suşunun selüloz potent olduğu

belirlenmiştir. Bunlar arasında en yüksek selüloz üretimine sahip (EI 3 ve 18 mm zon çapı) Denizli ili toprağından izole edilmiş *Bacillus* sp. suşu 16S rRNA dizi analizi ile tür düzeyinde tespit edilmiş ve *Bacillus subtilis* ile %100 benzerlik göstermiştir. Bu bakteri *Bacillus subtilis* 171ES olarak adlandırılmıştır. Bu bakterinin en iyi geliştiğı üretim ortamı Maryam ve ark. (2018) tarafından önerilen besiyeri olarak saptanmış ve bu besiyerinin besinsel optimizasyonu sonucu yeni bir modifiye ortam geliştirilmiştir. Enzim kısmi saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca enzimin yünlü kumaşlarda bitkisel artıkların gideriminde kullanım potansiyeli araştırılmıştır.

Çalışmada, *Bacillus subtilis* 171ES'in maksimum enzim üretiminin durağan fazda olduğu saptanmıştır. Bakterinin maksimum enzim aktivitesi 68 U/mL ile 40. saatte elde edilmiştir. Enzim üretiminin ve bakteri üremesinin paralel olduğunu belirlenmiştir.

Selüloz üreten mikroorganizmalar toprak, su, kompost gibi doğadan farklı kaynaklardan izole edilebilir. Selüloz enzimin izolasyonu birçok araştırmacı tarafından çeşitli doğal kaynakları kullanılarak araştırılmıştır.

Arif ve ark.(2006) yaptığı çalışmada, 5 günlük inkübasyondan sonra, 9 bakteri suşunun (EB1-EB9) ve 2 aktinomiset suşunun (Act 1 ve 2) CMC agarında büyüme belirtileri gösterdi ve kongo kırmızısı testinde pozitif sonuçlar göstermiştir. EB3 suşu, hidrolitik bölge çapının koloni çapına en yüksek oranını vermiştir. EB3 suşu, *B. pumilus* ile yüksek düzeyde 16S rDNA benzerliği (%99) sergilemiştir. EB3'ten maksimum selüloz aktivitesi, 0.079 U/mL ile 24 saatlik fermantasyondan sonra elde edilmiştir. Selülozun *B. pumilus* EB3'ün büyüme fazında üretildiğı gözlenmiştir. Bu, selülozun büyümeyle ilişkili bir ürün olduğunu gösteren bir sonuçtur.

Lugani ve ark. (2015) çeşitli yerlerden toplanan toprak ve inek gübresi örneklerinden toplam 20 izolat elde etmişlerdir. Bu izolatlar, pH 7'ye sahip CMC ile zenginleştirilmiş besin agar ortamı kullanılarak ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. 16 izolat selüloz pozitif olarak bulunmuştur. İnek gübresi numunesinden elde edilen Y3 izolatı ile hidrolitik zon çapının koloni çapına (2,34: 0,24) maksimum oranı, 9,75 mm elde edildi. Y3 izolatı ile maksimum 2.48 IU/mL enzim aktivitesi bulunmuşlardır.

Afzal ve ark. (2019) karboksimetil selüloz (CMC) ile takviye edilmiş besin agarında *H. indicola* termitinin arka bağırsağından 15 bakteri suşu izole etmişlerdir. Bu izolatların 7'si, Kongo kırmızısı ve NaOH çözeltileri ile boyanmış CMC agar plakaları üzerinde iyi selüloz aktivitesi sergilemişlerdir. İyi selüloolitik aktiviteye sahip izolatlar, 40°C'de 6 saat inkübasyondan sonra >1.0 cm'lik bir hidrolitik bölge üreterek selülozların ekstrasellüler bir özelliğini göstermiştir. Yedi suş arasında HI-08, maksimum hidrolitik bölgesi çapını gösterdi ve daha sonraki işlemler için seçilmiştir.

Al-Kharousi ve ark, (2015) 3 cinse ait dört mantar türü, kitaplardan ve arşivlerden izole etmişlerdir ve tanımlanmıştır. *Chaetomium sp.* ve *Penicillium sp.* Afrika kitap arşivlerinden, *Aspergillus niger* ve *A. nidulans* ise Ummanlı kitaplarından izole edilmiştir. İzole edilen tüm mantarlar selüloz üretebilmiştir. En yüksek selüloz üreticisi *Chaetomium sp.*, ileri selüloz fermentasyon çalışmaları için alınmıştır. 144. saatte yüksek selüloz aktivitesi gözlenmiştir. *Chaetomium sp.*'nin biyokütlesi 72. saat sonra önemli ölçüde arttı ve maksimum miselyum ağırlığı 168. saatte elde edilmiştir.

Nargotra ve ark. (2016) *Bacillus subtilis* SV1 ile maksimum selüloz üretimini (CMCase) (2.201 IU/mL± 0.06) 72 saat inkübasyon sonrası saptamışlardır.

Reddy ve ark. (2017) 4 adet bakteri kağıt ve kağıt hamuru endüstrisi atık su kontamine topraklarından izole etmişler. 37°C'de 2-3 gün inkübasyon süre sonrası, yaptıkları selüloolitik aktivite testi sonucunda, bakterilerin dördü de selüloz pozitif olarak bulmuşlar. İzolat I (JCEN I) ve izolat IV'ün (RW) sırasıyla en büyük selüloolitik indekse (2.5 ve 2.0), izolat II (JCEN2) ve izolat III'e (JCEN3) en küçük selüloolitik indekse (0.85 ve 0.75) sahip olduğunu bulmuşlardır.

Maryam ve ark. (2018) *Bacillus cellulosilyticus* ile selüloz üretimini 48 saatlik 35°C'de inkübasyon sonrası saptamışlardır. En geniş zon 7.75 EI olan PC-BC6 tarafından gözlenmiştir. Diğer yandan PC-BC1, PC-BC3, PC-BC4, ve PC-BC8 sırayla EI değerleri 4.83, 3.13, 3.47, ve 5.40 olarak saptanmıştır.

Mikroorganizmanın üreme ortam içeriği enzim üretimi üzerinde arttırıcı bir etkiye sahiptir (Gulati ve ark. 2007). Bakterilerin büyümesini ve ürettikleri son ürünlerini etkileyen ana



faktörler karbon kaynağı, azot kaynağı ve diğer inorganik tuzlardır. Bu nedenle, kritik ortam bileşenlerinin optimizasyonu, istenen ürünlerin üretiminde çok önemli bir rol oynamaktadır. (Tabssum ve ark. 2018). Buna ek olarak, sıcaklık ve pH gibi birçok faktör mikrobiyal büyüme ve enzim üretimi için çok önemlidir. Bu nedenle, yüksek enzim üretimi elde etmek için optimal çalışma koşullarının tasarlanması bir ön koşuldur (Pandey, 1992).

Bu çalışmada selüloz üretim kapasitesini arttırmak için üretim ortamında farklı besinsel faktörler araştırıldı ve elde edilen sonuçlara göre yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. En iyi karbon kaynağı olarak maltoz bulunmuştur. Maltoz bulunan besiyerinde, kontrol ortama göre selüloz aktivitesinde 6.29 kat verim artışı gözlenmiştir. Karbon kaynaklarının yerine çeşitli organik atıklar denenmiştir, fakat organik atıklar kontrol ortama göre daha düşük enzim verimleri elde edilmiştir.

Azot kaynaklarının etkisini saptamak üzere, kontrol ortamda birlikte bulunan organik azot kaynakları olan pepton, yeast ekstrakt ve inorganik azot kaynağı olan  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  yerine çeşitli inorganik ve organik azot kaynakları ayrı ayrı denemeye alınmış, fakat enzim üretiminde inorganik azot kaynakları tek başlarına kullanıldığında verimli bir etkiye sahip olmadıklarını saptanmış ve kontrol ortama göre daha düşük enzim verimleri elde edilmiştir. Organik azot kaynağı olarak skim milk powder (yağsız süt tozu) varlığında ise kontrol ortama verim göre 7.8 kat enzim artışı sağlanmıştır. Metal iyonu olarak  $\text{LiSO}_4$  varlığında 1,85 kat enzim verim artışı sapanmıştır. Denemeye alınan azot kaynaklarından organik azot kaynakları, inorganik azot kaynaklarına göre daha etkili olduğu ifade edilebilir.

Çalışmada maksimum selüloz enzim üretiminin gözleendiği besinsel faktörler bir araya getirilerek oluşturulan modifiye ortamda 171ES suşu enzim üretimi açısından değerlendirilmiş ve selüloz enziminin aktivitesi 453 U/mL olarak bulunmuştur. Bu ortamdan elde edilen değer kontrol (68 U/mL) ile kıyaslandığında 6,6 kat bir enzim üretim artışı elde edilmiştir. Bu artış oldukça önemli bir artış olarak bulunmuştur.

Çeşitli araştırmacılar selülaz üretimi üzerine farklı karbon, azot kaynakları metal iyonları ve organik atıkları kullanmışlar. Bu araştırmalar neticesinde birbirinden farklı sonuçlar elde etmişlerdir.

Shankar ve Isaiarasu (2011) 37°C'de 72 saatlik inkübasyondan sonra *Bacillus pumilus* EWBCM1 tarafından, karbon kaynak olarak galaktoz varlığında maksimum selülaz (0.5851 IU/ml) üretimiyle sonuçlanmıştır. Minimum selülaz üretimi, selüloz varlığında kaydedildi (0.0419 IU/ml). Organik azot kaynaklarına gelince, malt ekstresi varlığında maksimum enzim üretimi (0.5666 IU/ml) ve üre ve glisinde minimum selülaz üretimi (0.0851 IU/ml) gösterilmiştir. İnorganik azot kaynakları ise amonyum molibdata maksimum enzim üretimi (0.3036 IU/ml) ve potasyum nitratta minimum üretim miktarı (0.1555 IU/ml) göstermiştir. Test edilen metal iyonları arasında maksimum miktarda enzim üretimi, kalsiyum klorür (0.1851 IU/ml) ilave edilen ortamına kaydedilmiştir. Alüminyum sülfat (0.1555 IU/ml) selülaz üretiminde en iyi ikinci metal iyonu iken, nikel sülfat (0.0148 IU/ml) takviyeli ortamda minimum miktarda selülaz üretimi rapor etmişlerdir.

Bai ve ark. (2012) İnek gübresinden izole edilen *Bacillus subtilis* tarafından selülaz üretimi için farklı karbon kaynaklar olarak fruktoz, laktoz, maltoz, mannitol, sükroz ve nişasta incelenmiştir. Laktoz sunulduğunda maksimum selülaz üretimi 23.96 U/ml gözlenmiştir. Azot kaynaklar olarak maya ekstraktı, kazein, jelatin, pepton, sığır eti ekstraktı, potasyum nitrat, amonyum nitrat, amonyum klorür, amonyum sülfat gibi farklı azot kaynakları kullanılmışlardır. Pepton, selülaz üretimini 29.63 U/ml'ye kadar arttırdığı için en iyi azot kaynağı olarak bulmuşlardır. Hangi doğal substratların daha iyi selülaz üretimi sağladığını belirlemek amacıyla, farklı doğal substratlar olarak şeker kamışı baggase, filtre kağıdı, pirinç kepeği, buğday kepeği ve hindistancevizi lifi kullanılmıştır. 72 saatlik inkübasyondan sonra, *Bacillus subtilis* CEL PTK1 buğday kepeğinden maksimum miktarda selülaz (20.96 U/ml) ürettiğini bildirmişlerdir.

Annamalai ve ark. (2013) ve Jo ve ark. (2008), pirinç kabuğu ve pirinç kepeğinin sırasıyla *Bacillus halodurans* CAS 1 ve *Bacillus amy-loliuefaciens* DL-3 tarafından selülaz üretimi için en iyi karbon kaynakları olduğunu bildirmişlerdir.

Sadhu ve ark. (2013), şeker kamışı baggazının *Bacillus sp.* tarafından selüloz üretimi için en iyi karbon kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

Sethi ve ark. (2013) Topraktan izole edilen *Bacillus substilis* üretilen kontrol ortamında karbon kaynağı olan glukozun yerine nişasta, früktoz, maltoz ve süktroz gibi çeşitli karbon kaynakları kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar, glukozun 24 saatlik inkübasyondan sonra diğer karbon kaynaklarına kıyasla en yüksek selüloz üretimini sağladığını rapor etmişlerdir. Azot kaynakları için pepton yerine amonyum sülfat, üre ve maya özütü kullanmış olup, amonyum sülfatın selüloz üretimi için en iyi azot kaynağı olduğu bulmuşlardır. Azot, başlıca hücre proteinlerinden biridir ve selüloz aktivitesinin amonyum sülfat tarafından uyarılması, protein sentezine doğrudan girişlerinden kaynaklanıyor olabilir rapor etmişlerdir.

Asha ve Sakthivel (2014) karbon kaynağı olarak %2 CMC ile takviye edilmiş üretim ortamı, *Bacillus substilis*'ten maksimum selüloz enzimi (34 U/ml) üretimine neden olmuştur. Farklı organik ve inorganik azot kaynaklarının (üre, tripton, maya özütü, pepton, amonyum klorür, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve potasyum nitrat) varlığı enzimin üretimini önemli ölçüde etkiledi. Maya ekstraktı (%0.5) maksimum büyüme ve enzim üretimi göstermiştir.

Wasem ve ark. (2014) tarafından rapor edilen sonuçlara göre, *Bacillus substilis* CB-2 suşu ile en yüksek selüloolitik aktiviteyi rapor etmişlerdir. Maksimum selüloz enzim üretimi %2 karbon kaynağı olarak işlenmemiş pamuk sapı, organik azot kaynağı olarak maya ve inorganik azot kaynağı olarak amonyum sülfat elde etmişlerdir.

Karbon kaynağı olarak tarımsal atık maddelerin *Bacillus vallismortis* tarafından bakteri ve selüloz üretimi üzerindeki etkisi Gaur ve Tiwari (2015) tarafından şeker kamışı baggase, pirinç kepeği, buğday kepeği, pirinç kabuğu ve mısır kepeği kullanılarak araştırılmıştır. 48 saat inkübasyondan sonra selüloz üretimi için en uygun substrat olarak %2 şeker kamışı baggaz ( $4105 \text{ U ml}^{-1}$ ), ardından pirinç kabuğu ( $3509 \text{ U ml}^{-1}$ ) ve pirinç kepeği ( $3110 \text{ U ml}^{-1}$ ) bulundu. Buğday kepeği ( $2890 \text{ U ml}^{-1}$ ) ve mısır kepeği ( $2545 \text{ U ml}^{-1}$ ) minimum selüloz üretimi rapor edilmiştir.

Lugani ve ark. (2015) en iyi selüloolitik izolat *Bacillus sp.* Y3 buğday kepeği, pirinç kepeği, glukoz, laktoz ve CMC gibi farklı karbon kaynaklar ile 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Karbon kaynak olarak CMC bulunduğunda maksimum selülaz aktivitesi (4.49 IU/mL) bulmuşlardır. Bu nedenle, selülazın üretimi indükleyicisi olarak işlev görecektir substratın mevcudiyetine bağlı olarak indüklenebilir bir enzim olduğu sonucuna varılabilir. Azot kaynakları olarak %1 pepton, maya özütü, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl ve NaNO<sub>3</sub> da araştırmışlardır. Pepton ile maksimum 4.72 IU/mL selülaz aktivitesi bulmuşlardır. Maksimum selülaz üretimi için inorganik kaynaklara kıyasla organik azot kaynaklarının kullanımının, maksimum selülaz üretimi için daha uygun olduğu bulmuşlardır.

Harinathan ve ark. (2017)'nin yaptığı bir çalışmada, *Aspergillus niger* tarafından 120 saat inkübasyondan sonra selülaz üretimi üzerindeki karbon, organik ve inorganik azot kaynakları ve metal iyonların etkisi araştırılmıştır. Kontrol ortamı (13.34 IU/ml) ile karşılaştırıldığında selülaz üretimi, laktoz içeren ortamda (13.8 IU/ml) az da olsa artış gösterirken, glukoz içeren ortamda daha düşük selülaz üretimi (3.33 IU/ml) gösterilmiştir. Yedi tür organik azot kaynağı arasında pepton takviyeli ortam, kontrol ortamına göre (12.02 IU/ml) daha yüksek selülaz üretimi göstermiştir (12.23 IU/ml). Üre, en düşük selülaz üretimini gösterdi (5.08 IU/ml). Beş tip inorganik azot kaynağının arasında sodyum nitrat takviyeli ortam ile selülaz üretimi miktarında kademeli bir artış (13.56 IU/ml) elde edilmiştir. Test edilen metal iyonlarından (% 0.02), maksimum selülaz verimi miktarı, kalsiyum klorür takviyeli ortamda kaydetmişlerdir. Diğer yandan, minimum miktarda enzim üretimi Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) kullanılarak kaydetmişlerdir.

Shajahan ve ark. (2017) CMC (14.27 IU/mL) ve maya ekstraktı (12.59 IU/mL) takviyeli ortam, kaplıca'dan izole edilen *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 tarafından maksimum selülaz aktivitesi ile sonuçlanmış ve selülaz üretimi için optimum karbon ve azot kaynakları olarak seçmişlerdir. Çeşitli metal iyonlarının selülaz aktivitesi üzerindeki etkileri olarak da CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O kullanılan ortam en yüksek selülaz aktivitesi (13.10 IU/mL) elde etmişlerdir. MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O ise, selülaz enzim üretimi üzerinde herhangi bir etki göstermediğini rapor etmişlerdir.

Roopa ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada palmiye lifleri ( $600 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), saman ( $260 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) ve muz çiçeklerine ( $420 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) kıyasla bir substrat olarak kullanıldığında, enzim aktivitesinin maksimum olduğu bulunmuştur.

Yaptığımız çalışma ile diğer bilim insanlarının yaptığı çalışma sonuçları kıyaslandığından selüloz üretiminin birçok faktöre bağlı olduğu sonucuna varılabilir. Bakteriyel tür ve suşun yanı sıra kültür ortamın içerdiği karbon, azot kaynakları ve metal iyonları gibi besin faktörleri, ayrıca inkübasyon süresi ve sıcaklığı gibi faktörlere de bağlıdır. Farklı sonuçların incelenmesi mikroorganizmaların kullandığı metabolik yolların farklı olduğunu da göstermektedir.

Her enzimin optimum aktivite gösterdiği özellikleri vardır. Bu özelliklerin bilinmesi enzimin endüstriyel alanlarda kullanışlı olup olmayacağını hakkında fikir vermektedir. Enzimin aktiviteleri üzerinde oldukça önemli olan parametrelerden sıcaklık ve pH bulunmaktadır. Her enzimin optimum aktivite gösterdiği bir sıcaklık ve pH değeri vardır. Diğer yandan bazı enzimler aktivite gösterebilmeleri için ortamda metal iyonlarına gereksinim duymaktadırlar. Metal iyonları, amino asitlerin amin veya karboksilik asit grubu ile etkileşime girerek enzimatik aktiviteyi artırabilir veya inhibe edebilir. (İshida ve ark., 1980). Metal varlığında aktivite gösteren enzimlere metallo enzimler adı verilmektedir ve endüstriyel enzimlerin çoğu metallo enzimlerdir. Enzimlerin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri en önemli kinetik özellikleri göstermektedir. Bu değerler enzimin belirli bir substrat ile ne kadar çabuk doyuma ulaştığı ( $K_m$ ) ve ulaşabildiği en hızlı ( $V_{max}$ ) reaksiyonunu ifade etmektedir.  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerlerin bilinmesi bir enzimin hücre içinde ne yaptığını ve o şartlardaki değişikliklere nasıl tepki verdiği hakkında fikir verebilmektedir.  $K_m$  değeri düştükçe enzimin substratına olan ilgisi artmaktadır. Diğer yandan  $K_m$  değeri arttıkça enzimin substrata olan ilgisi ise düşmektedir. Düşük  $K_m$ 'e sahip enzimler substratlarına karşı yüksek affiniteye sahip olduğundan endüstride önem taşırlar.

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* 171ES'den selüloz enziminin özelliklerini saptamak üzere enzim 3 basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bunun için sırasıyla; amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon işlemleri yapılmıştır. Enzim %0,6 verimle, 4,8 kez saflaştırılmıştır.

Kısmi saf enzim üzerine sıcaklık ve stabilitesi, pH ve stabilitesi araştırılmıştır. Aynı zamanda çeşitli potansiyel bileşiklerin etkileri araştırılmış, enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri saptanarak ve ham enzimin molekül ağırlığı belirlenerek enzim karakterize edilmiştir.

Çalışmada 171ES bakterisinin ürettiği selüloz enzimi için optimum sıcaklık değeri 50°C olarak saptanmıştır. Enzim termofil bir enzimdir. Kısmi olarak saflaştırılan enzimin aktivitesi ham enzime göre %15 artmıştır. 37°C-50°C sıcaklığın her 5 derece arttırılması ile aktivite değerleri de artmıştır. 55°C'de ise enzim aktivitesi %5 oranında artış elde edilmiştir. 50°C'de 30 dakika kadar aktivitesini koruduğu saptanmıştır. Enzimin optimum pH değeri ise 7.0 olarak saptanmış ve enzim aktivitesi %8 oranında artış elde edilmiştir. Enzim nötral bir enzimdir. Enzim pH 5.0 ve pH 8.0 arasında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. pH stabilite denemelerinde pH 7.0'da 30 dakika boyunca aktivitesini korurken sürenin artması ile 120 dakika sonunda %80 oranında kayıp olduğunu saptanmıştır. Metal iyonları enzim aktivitesi üzerinde kofaktör olarak görev yaptığından enzim üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu çalışmada  $MnSO_4$  ve  $BaCl_2$  iyonlarının enzim aktivitesi aktivatör görev yaptığı saptanmıştır. Aniyonik bir deterjan olan SDS varlığında da enzim aktivitesinde artış olmuştur. Enzimin kinetik özellikleri araştırıldığında  $V_{max}$  değeri 63,7 U/mL olarak hesaplanmıştır.  $K_m$  değeri ise 0,0064 mM olarak bulunmuştur. *Bacillus substilis* 171ES'den üretilen selüloz enziminin molekül kütlesi SDS-PAGE ile yaklaşık 73 kDa olarak tespit edilmiştir. Ham enzimin depolanma stabilitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada oda sıcaklığında (RT) 30 gün sonra enzimin aktivitesi hemen hemen korunurken, bu süre +4°C'de 75 gün, -20 °C'de ise 90 güne kadar bulunmuştur.

Farklı araştırmacılar çeşitli mikroorganizmalarla yaptıkları çalışmalarda da selülozların özelliklerini ortaya çıkarmışlardır.

Yin ve ark. (2010), *Bacillus subtilis* YJ1 tarafından üretilen ham enzimi %60-80 amonyum sülfat ile çöktürdükten sonra %42.7 verim ile 50.4 kez saflaştırdığını görmüşlerdir. Amonyum sülfat çöktürmesi ardından Micro-Prep iyon değişimi ve Bio-Gel P-100 ile enzimi daha da saflaştırılmıştır. %9.7 verim ve 289 saflık kez rapor etmişlerdir. 32.5

kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip saflaştırılmış selülaz, pH 6.0 ve 50-60°C'de optimal bir pH'a ve sıcaklığa sahiptir. Saflaştırılan selülaz, pH 6.0-7.5 ve <50°C'de stabil olduğunu rapor etmişlerdir. Enzim aktivitesi  $Mn^{2+}$  ve  $Co^{2+}$  ile arttırılmış, fakat SDS, p-CMB, DTT,  $Hg^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  tarafından inhibe edilmiştir.

Asha ve Sakthivel (2014) *Bacillus substilis* SU40 tarafından üretilen enzim, %90 amonyum sülfat çöktürme ve ardından bir Biosep kolonu kullanılarak boyut dışlama kromatografisi ile saflaştırılmışlardır. %20,28 bir son verim ve 85.02 kez saflaştırıldığını rapor etmişlerdir. Saflaştırılan selülaz enzimi, SDS-PAGE ile teyit edilen 51.4 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahiptir. Saflaştırılan enzim, geniş bir pH aralığı (5-10) üzerinde aktifti ve pH 8.0'da maksimum aktivite sergilemiştir. Enzim, 30 dakika boyunca 7-9 pH aralığında aktivitesinin %50'sinden fazlasını korumuştur. Enzim 35°C-75°C sıcaklık aralığında aktifti ve 45°C'de optimumdu. Bu sonuca göre enzimin kayda değer bir termostabiliteye sahip olduğu görülmektedir.  $Mn^{2+}$  ve  $Zn^{2+}$  gibi metal iyonları enzimin aktivitesini arttırmamıştır.  $Ca^{2+}$  ve  $Na^+$  metal iyonları enzim üretimi üzerinde maksimum uyarıcı aktivite göstermiştir. SDS, Tween 20 ve Triton X-100 gibi yüzey aktif maddeler enzimatik aktiviteyi arttırmıştır. EDTA varlığında enzimatik aktivite azaldı, bu da enzimatik aktivite için iki değerlikli kationun gerekliliğini gösteriyordur. Selülaz enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 1.97 mg/ml ve 75.41 mg/ml/s olarak rapor atmışlardır.

Gaur ve Tiwari'nin (2015) kullandığı *Bacillus vallismortis* RG-07 tarafından üretilen selülaz enzimi  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürme, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştı ve toplam %28.8'lik son verim ile 39.1 kez saflaştırılmıştır. Saflaştırılmış selülazın molekül ağırlığı, SDS-PAGE ve aktivite jeli analizi ile 80 kDa olarak saptanmıştır. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklık ve pH 65°C ve 7.0 olarak belirlenmiştir. 95°C ve pH 9.0'da bile aktivitesinin %95 ve %75'ini koruduğunu gözlenmiştir. Enzim aktivitesi  $Ca^{2+}$ , merkaptoetanol, Tween-60 ve sodyum hipoklorid tarafından da uyarılırken Hg tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir. Saflaştırılmış enzimin kinetik analizi,  $K_m$  ve  $V_{max}$ 'in sırasıyla 1.923 mg ml<sup>-1</sup> ve 769.230 µg ml<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> olduğunu rapor etmişlerdir.

Abdullah ve ark. (2016) *Bacillus* PC-BC6'dan üretilen selüloz, %80 amonyum sülfat kullanılarak kısmen saflaştırmışlardır. Üretilen selüloz 2.5 kez saflaştırılmış ve % 4.4 verim elde edildiğini rapor etmişlerdir. Enzimin, optimum sıcaklık 50°C olarak saptanmış ve pH 5.0-9.0 aralığında geniş aktivite ve stabilite gösterdiğini belirtmişlerdir. Metal iyonları arasında MnSO<sub>4</sub> ve CaCl<sub>2</sub> enzim aktivitesini arttırdığını aynı zamanda SDS ve EDTA da enzimin aktivitesini arttırdığını da rapor etmişlerdir.

Azadian ve ark. (2016)'nın yaptığı çalışmada, *B. licheniformis* tarafından üretilen karboksimetilselüloz (CMCase) enzimi %85 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürme, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Enzim, 412.32 U/mg'lık spesifik bir aktivite ile yaklaşık 8.85 kez saflaştırılmıştır. SDS-PAGE kullanılarak 37 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip tek bir bant göstermiştir. CMCase enzimi, 70°C ve pH 9.0'da maksimum aktivite ile geniş sıcaklık (40-80°C) ve pH (6.0-10.0) aralıklarında oldukça aktif ve stabil olduğunu rapor etmişlerdir. Reaksiyon karışımında Ca<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup> metal iyonlarının varlığı enzim aktivitesini büyük ölçüde uyarırken Mn<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> ve Tx100 metal iyonları enzim aktivitesinin orta derecede artmasına neden olmuştur. Aktivite Co<sup>+2</sup>, Hg<sup>+2</sup>, K<sup>+</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından kuvvetle inhibe edildiği bulunmuştur. Enzim aktivitesi EDTA tarafından da büyük ölçüde inhibe edildi, bu da çalışmada saflaştırılan selülozün bir metaloenzim olduğunu sonuca varmışlardır.

Afzal ve ark. (2018)'nin yaptığı çalışmada ham selülozün %80 amonyum sülfat çöktürme, afinite ve boyut dışlama kromatografisi ile %32.33 toplam verim ile ve 12.02 kez saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ile *B. licheniformis*'in saflaştırılmış selülozünün molekül ağırlığı yaklaşık 55 kDa olarak rapor etmişlerdir. Saflaştırılmış selülozün kinetik analizi, K<sub>m</sub> ve V<sub>max</sub> sırasıyla 2.28 mg mL<sup>-1</sup> ve 454.05 µg mL<sup>-1</sup> dk<sup>-1</sup> olarak bulmuşlardır. Enzim 45°C'de optimal aktivite göstermiştir. Maksimum selüloz aktivitesi ve stabilitesi, 1 saatlik inkübasyonda pH 7.0'da belirlenmiştir. Saflaştırılmış selülozların aktivitesi ve stabilitesi, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup> ve Na<sup>+</sup> gibi alkali metal iyonlarının varlığında arttırıldı. Civa iyonu Hg<sup>+2</sup> varlığında selüloz aktivitesinin maksimum inhibisyonu gözlenmiştir. Benzer şekilde, Zn<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup>, kontrol ile karşılaştırıldığında selüloz aktivitesini ve stabilitesini hafifçe inhibe edilmiştir.



Yaptığımız çalışmada ham enzimin depolanma sıcaklığını saptamak üzere ham enzimin aktivitesi oda sıcaklığında (RT), +4 °C' de ve -20 °C' de olmak üzere 15 günde bir aktivitelerine bakılarak depolama stabilitesi belirlenmiştir. En iyi korunmanın -20 °C'de olduğu saptanmış ve 120 günde sadece %14 oranında bir aktivite kaybı olmuştur.

Zdarta ve ark. (2017) selülazın 4°C ve 25°C'de depolanma stabilitesi, enzimin aktivitesini 30 gün boyunca her 5 günde bir ölçerek değerlendirmişlerdir. 30 günlük depolamadan sonra, 4°C'de aktivitesinin yaklaşık %75 korurken, 25°C'de ise aktivitesinin yaklaşık %40 koruduğunu saptamışlardır.

Islam ve ark. (2019) selülaz enzimi, oda sıcaklığında 28 gün depolandıktan sonra kontrol aktivitenin (1.60 U/ml, %100) sadece %68'ini (1.10 U/ml) koruduğunu rapor etmişlerdir.

Li ve ark. (2019)'nın selülaz enzimini bir ay boyunca 4°C'lik bir buzdolabında sakladığı bir çalışmada, enzim aktivitesinin 7 günlük depolamadan sonra ilk selülaz aktivitesinin %72.7'sine düştüğünü keşfettiler. 30 günlük depolamadan sonra ise selülaz aktivitesi %56.8'i koruduğunu rapor etmişlerdir.

Literatürlerde görüldüğü gibi *Bacillus* türlerinden elde edilen selülazlar ile ilgili çok çeşitli sonuçlar rapor edilmektedir ve bu da *Bacillus* türlerinin çeşitli özelliklerde selülazları üretebildiğini göstermektedir.

Yün kumaşlar pıtrak denilen bitki atıklar içermektedir. Bu bitkisel atıkların yünlü kumaşlardan “yün karbonizasyon” denilen bir işlem ile uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemin prensibi, selülozu kolayca çıkarılabilen bir hidroselüloza dönüştürmek ve bunun için güçlü bir asit olan sülfürik asit kullanılmaktadır. Kimyasal karbonizasyon yerine, selülazlar gibi enzimlerin kullanımı yün lifi hasarını, atık yükünü ve enerji tüketimini azaltmak amacıyla araştırılmaktadır (Gouviea ve ark. 2008).

Bu çalışmada liyofilize edilmiş selülozün %100 yünlü kumaşlarda bulunan bitkisel atıkların giderilmesi incelemek üzere, yün kumaşlara selüloz muamele ve el ile mekanik parçalama uygulanmasından sonra bitkisel atıkların uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı ışık mikroskop görüntülemesi ile belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmanın sonucunda kumaşlarda bulunan bitkisel atıkların el ile mekanik uygulaması sonucunda önemli ölçüde uzaklaşmasını sağlanmıştır. Diğer yandan, genellikle endüstride bitkisel atıkların uzaklaştırılması çalışmaları pH 4.0'de yapılmaktadır, ancak bu çalışmada pH 7.0'de daha verimli sonuç elde edilmiştir. Bu da etki enzimin yapısından kaynaklanıyor olabilir. Bu konudaki çalışmalar detaylandırılarak enzimatik olarak bitkisel atıkların tamamen giderimi yoluna gidilebilir.

El-Sayed ve ark. (2010) tarafından yapılan bir benzer çalışmada bitkisel safsızlıkların (selüloz) işlenmemiş yünden giderimi, selüloz enzimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Enzim uygulama yöntemi, geleneksel seyreltik sülfürik asit kullanarak karbonizasyon işlemi ile karşılaştırmışlardır. İşlenmemiş yün kumaşı sülfürik asit ile işlenmesi, bitkisel maddelerin yünden neredeyse tamamen çıkarılmasıyla sonuçlanırken, karbonize kumaşın gerilme mukavemeti, işlenmemiş yün kumaşlara göre azalmaktadır. Yünün 20 mL/L selüloz (Biotouch L) ile işlenmesi, bitkisel safsızlıkların yaklaşık %75'ini çıkarmıştır (selüloz işleminden sonra %1.05'e kıyasla işlenmemiş yün üzerinde %4.0 safsızlık içeriği). Selüloz işleminden sonra gerilme mukavemeti, hiçbir muamele edilmemiş yün (%13.88 cN/tex) ve karbonize yün (%10.45 cN/tex) ile karşılaştırıldığında gerilme mukavemeti (%14.08 cN/tex) artmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda yeni adlandırılan *Bacillus substilis* 171ES'dan yüksek verimde selüloz enzimi için yeni ve verimli bir modifiye üretim ortamı elde edilmiştir. Enzim kısmi olarak saflaştırılıp karakterize edildiğinde enzimin termofil ve düşük  $K_m$ 'e sahip olması gibi önemli özellikleri nedeni ile endüstrinin farklı alanlarında kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Ayrıca ilk kez bu çalışma ile Türkiyede doğal kaynaklarından izole ettiğimiz bakterinin yünlü kumaşlardaki bitkisel atık giderim potansiyeli ortaya çıkarılmıştır. Dolayısıyla, tekstil endüstrisinde önemli bir yere sahip olan Türkiye'de selüloz enziminin geniş çapta üretilmesi ve ülke ekonomisine katkıda bulunması mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

- Abdullah, R., Zafar, W., Nadeem, M., Iqtedar, M., Kaleem A., Naz, S. 2016.** Partial purification and characterization of cellulases produced by *Bacillus* strain. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1): 11103-11109.
- Acharya, S., Chaudhary, A. 2012.** Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus sp.* MVS3 isolated from indian hot spring. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4): 497-503.
- Adrio, J.L., Demain, A.L. 2005.** Microbial cells and enzymes- a century of progress: microbial enzymes and biotransformations. Barredo, J.L., Humana Press, New Jersey, USA, 1–27.
- Afzal, M., M.Z. Qureshi, S. Ahmed, M.I. Khan, H. Ikram, A. Ashraf and N.A. Qureshi, 2019.** Production, purification and optimization of cellulase by *Bacillus licheniformis* HI-08 isolated from the hindgut of wood-feeding termite. *Int. J. Agric. Biol.*, 21(1): 125-134.
- Alexopoulos, C., Mims, C., Blackwell, M. 1996.** Introductory mycology. John Wiley, New York, USA, 869 pp.
- Al-Kharousi, M.M., Sivakumar, N., Elshafie, A. 2015.** Characterization of cellulase enzyme produced by *Chaetomium* sp. isolated from books and archives. *Eurasia. J. Biosci.*, 9: 52-60.
- Allen, F., Andreotti, R., Eveleigh, D.E., Nystrom, J. 2009.** Mary elizabeth hickox mandels, 90, bioenergy leader. *Biotechnol Biofuels.*, 2: 22.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Anbu, P., Gopinath, S.C.B., Cihan, A.C., Chaulagain, B.P. 2013.** Microbial enzymes and their applications in industries and medicine. *BioMed Research International*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/204014>.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Elayaraja, S., Balasubramanian, T. 2013.** Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohy. Poly.*, 94(1): 409–415.
- Anonim, 2016.** DNS Assay. <https://cynthialearnsthings.wordpress.com/2016/07/13/dns-assay/>- (Erişim Tarihi : 27.03.2020).
- Anonim, 2018.** [https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus#cite\\_note-Baron-2-](https://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus#cite_note-Baron-2-) (Erişim Tarihi: 27.03.2020).
- Anonim, 2019a.** Biyoteknolojide enzimler. Food Elphi <https://www.foodelphi.com/biyoteknolojide-enzimler/>-(Erişim Tarihi: 23.03.2020).
- Anonim, 2019b.** Cellulase (CAS 9012-54-8) market share, size 2019 global industry, global industry analysis, key growth drivers trends, segments, emerging technologies, opportunity and forecast 2019 to 2024. <https://www.marketwatch.com/press-release/cellulase-cas-9012-54-8-market-share-size-2019-global-industry-global-industry-analysis-key-growth-drivers-trends-segments-emerging-technologies-opportunity-and-forecast-2019-to-2024-market-reports-world-2019-09-26->(Erişim Tarihi : 26.03.2020).
- Anonim, 2020a.** <https://en.wikipedia.org/wiki/Cellulase-> (Erişim Tarihi: 2020).

- Anonim, 2020b.** Structure of cellulose. <https://science.jrank.org/pages/1333/Cellulose-Structure-cellulose.html> -(Erişim tarihi: 11.04.2020).
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M.S., Shirai, Y., Hassan, M.A. 2006.** Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* eb3. *International Journal of Engineering and Technology*, 3(1): 47-53.
- Asha, B.M., Sakthivel, N. 2014.** Production, purification and characterization of a new cellulase from *Bacillus subtilis* that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent-tolerant properties. *Ann. Microbiol.*, 64(4): 1839-1848.
- Attwood, G. T., Herrera, F., Weissenstein, L. A., White, B. A. 1996.** An endo-beta-1,4-glucanase gene (celA) from the rumen anaerobe *Ruminococcus albus* 8: cloning, sequencing, and transcriptional analysis. *Can. J. Microbiol.*, 42(3): 267–278.
- Aygan, A. 2008.** Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. *Doktora Tezi*, ÇÜ, Fen bilimleri enstitüsü, Biyoloji anabilim dalı, Çukurova.
- Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Hassanshahian, M. 2016.** Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Molecular Biology Research Communications*, 5(3): 143-155.
- Bai, S., Ravi kumar, M., Mukesh kumar, D.J., Balashanmugam, P., Bala kumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T. 2012.** Cellulase production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung. *Scholars Research Library*, 4(1): 269-279.
- Bailey, B.A., Lumsden, R.D. 1998.** Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens: biological control and commercial applications, Editörler: Harman, G. F., Kubicek, C. P., London, UK, 327–342 pp.
- Bayer, E.A., Shimon, L.J.W., Shoham, Y., Lameds, R. 1998.** Cellulosomes-structure and ultrastructure., *Struc Biol.*, 124(2-3): 221–234.
- Behera, B.C., Sethi, B.K., Mishra, R.R., Dutta, S.K., Thatoi, H.N. 2017.** Microbial cellulases – diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: a review., *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15: 197–210.
- Berghem, L., Pettersson, L. 1973.** The mechanism of enzymatic cellulose degradation. purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose, *Eur J Biochem.*, 37: 21.
- Berghem, L., Pettersson, L., Axiš-Fredriksson, U. 1975.** The mechanism of enzymatic cellulose degradation characterization and enzymatic properties of a beta-1,4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur J Biochem.*, 53: 55.
- Berikten, D., Kıvanç, M. 2018.** Fitazlar: Çevreye etkisi, beslenme ve biyoteknolojideki önemi. *Akademik Gıda*, 16(1): 109-119.
- Bhat, M. K. 2000.** Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355–383.
- Bischof, R.H., Ramoni, J., Seiboth, B. 2016.** Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb Cell Fact.* 15(1): 106.
- Bishop, J.D., Byoung, C.M., Harrow, F., Ratner, D., Gomer, R.H., Dottin, R.P., Brazill, D.T. 2002.** A second UDP-glucose pyrophosphorylase is required for

differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. *Biol Chem.*, 277: 32430–32437.

**Breen, A., 1999.** Fungi in lignocellulose breakdown and bio pulping. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(3):252-258.

**Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J. 2004.** Carbohydrate-binding modules: Fine-tuning polysaccharide recognition., *Biochem. J.*, 382: 769-781.

**Camila Florencio, C., Couri, S., Farinas, C.S. 2012.** Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Research*, <https://doi.org/10.1155/2012/793708>.

**Ciolacu, D., Ciolacu, F., Popa, V.I. 2011.** Amorphous cellulose- structure and characterization., *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(1-2): 13-21.

**Choi, J.M., Han, S.S., Kim, H.S. 2015.** Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspect. *Biotechnol Adv.*, 33: 1443–1454.

**Cleveland, L. R. 1924.** The physiological and symbiotic relationships between the intestinal protozoa of termites and their host, with special reference to *Reticulitermes flavipes*. *Kollar. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.*, 46: 117–227.

**Clifford, C.B. 2018.** Composition of enzymes. penn state college of earth and mineral sciences. <https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/670-> (Erişim tarihi: 12.04.2020).

**Davies, G., Henrissat, B. 1955.** Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9): 853-859.

**Demain, A.L., Adrio, J.L. 2008.** Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, 38(1): 41–45.

**Doğan, M. 2015.** Yunlu kumaşın fiziksel özellikleri üzerine yeni izolat *Bacillus* sp. suşundan elde edilen Proteaz enziminin etkisinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Muhendisliği Anabilim Dalı, Bursa.

**Durur D.Y., 2016.** Enzim nedir. Rasyonalist. <https://rasyonalist.org/yazi/enzimler/> (Erişim Tarihi: 26.03.2020).

**El-Sayed, H., El-Gharby, L., Kantouch, F. 2010.** Effect of bio-carbonization of coarse wool on its dyeability. *Journal of Fibre and Textile Research*, 35(4): 330-336.

**Elyakova, L. A., Sova, V.V., Vaskovsky, V. E. 1968.** Cellulase of marine mollusc *Littorina* sp. *Biochim. Biophys. Acta.*, 167: 462–464.

**Favaro, G., Bogialli, S., Di Gangi, I.M., Nigris, S., Baldan, E., Squartini, A., Pastore, P., Baldan, B. 2016.** Characterization of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* using liquid chromatography with accurate tandem mass spectrometre. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30(20): 2237–2252.

**Garda, M., Devaiah, S.P., Requesens, D.V., Chang, Y.K., Dabul, A., Hanson, C., Hood, K.R. Hood, E.E. 2015.** Assessment of field-grown cellulase-expressing corn. *Transgenic Res*, 24: 185–198.

**Garriga, M., Almaraz, M., Marchiaro, A. 2017.** Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method). *Actas de Ingeniería*, (3): 173-179.

**Garside, M. 2019.** Paper industry - statistics & facts. [https://www.statista.com/topics/1701/paper-industry/-](https://www.statista.com/topics/1701/paper-industry/)(Erişim tarihi: 27.03.2020).

- Gaur, R., Tiwari, S. 2015.** Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnology*, 15(19): <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0129-9>.
- Gouveia, I.C., Fiadeiro, J.M. and Queiroz, J.A. 2008.** Combined bio-carbonization and dyeing of wool: a possibility using cell wall-degrading enzymes and 1:1 metal-complex dyes. *Eng. Life Sci.*, 8: 250-259.
- Graumann, P. 2012.** *Bacillus: cellular and molecular biology*. Caister Academic Press, Freiburg, Germany.
- Guerriero, G., Sergeant, K. Legay, S., Hausman, J.F., Cauchie, H.M., Ahmad, I., Siddiqui, K.S. 2018.** Novel insights from comparative in silico analysis of green microalgal cellulases. *Int. J. Mol. Sci.*, doi:10.3390/ijms19061782.
- Gulati, H.K., Chadha, B.S., Saini, H.S. 2007.** Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: purification and characterization of phytase. *Folia Microbiol.*, 52859: 491-497.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., Rai, V. 2013.** A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, doi:10.1155/2013/329121.
- Haan, R.D., Rose, S.H., Lynd, L.R., Zyl, W.H. 2007.** Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Metabol. Eng.*, 9: 87–94.
- Harinathan, B., Palpperumal, S., Karthikeyan, S., Sankaralingam, S., Kathiresan, D., Sivakumar, N., Thiyagarajan, P., Shankar, T. 2017.** Enhancing the efficacy of cellulase producing *Aspergillus niger* isolated from alagar hills, madurai district, tamilnadu. *Bioprocess Technology*, ISBN: 978-93-86568-22-9
- Hefferon, K. 2017.** Cellulase production in transgenic plants: molecular pharming with a twist. *Adv Biotech & Micro.*, 6(2): 555685.
- Heikinheimo, L., Buchert, J., Miettinen-Oinonen, A., Suominen, P. 2000.** Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Research Journal*, 70: 969-973.
- Herve, C., Rogowski, A., Blake, A.W., Marcus, S.E., Gilbert, H.J., Knox, J.P. 2010.** Carbohydrate-binding modules promote the enzymatic deconstruction of intact plant cell walls by targeting and proximity effects. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 107(34): 15293-15298.
- Howell, J., Stuck, J. 1975.** Kinetics of solka floc, cellulose hydrolysis by *Trichoderma viride* cellulase. *Biotechnol Bioeng.*, 17: 873.
- Immanuel, G., Dhanusha, R., Prema, P., Palavesam, A. 2006.** Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 3(1): 25-34.
- Ishida, N., Okubo, A., Kawai, H., Yamazaki, S., Toda, S., 1980.** Interaction of amino acids with transition metal ions in solution (I) solution structure of L-lysine with Co(II) and Cu(II) ions as studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Agric. Biol. Chem.*, 44(2): 263–270.
- Islam, M., Sarkar, P.K., Dr. Mohiuddin A.K.M., Md. Suzauddul. 2019.** Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. *Malaysian Journal of Halal Research Journal*. 2(2): 19-24.

- Jayasekara, S., Ratnayake, R. 2019.** Microbial Cellulases: An overview and application. *Intechopen.*, DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84531>.
- Jo, K.I., Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jung, C.H., Nam, S.W. 2008.** Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* L-3. *Biotechnol. Biopro. Engineer*, 13(2): 182–188.
- Kaur, A., Chakraborty, J. N., Dubey, K.K., 2016.** Enzymatic functionalization of wool for felting shrink-resistance. *Journal of Natural Fibers*, 13(4): 437-450.
- Khalil, I., Ronn, A.M., Alifrangis, M., Gabar, H.A. Satti, G.M.H., Bygbjerg, I.C. 2003.** Dihydrofolat reductase and dihydropteroate synthase genotypes associated with in vitro resistance of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine, trimethoprim, sulfadoxine and sulfamethoxazole. *AM. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 586-589.
- Kılıçer, H.R. 2014.** Yem katkısı selülaaz enzimlerini üreten termofilik *Bacillus* suşlarının izolasyonu ve enzimlerin kısmi karakterizasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*, OKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Osmaniye.
- Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Wagenknecht, W. 1998.** Comprehensive cellulose chemistry: fundamentals and analytical methods, Weinheim, Germany.
- Körlü, A., Altay, P. 2009.** Enzimlerle yün terbiyesi. *Electronic Journal of Textile Technologies*, 3(2): 81-91.
- Kubicek, C. 2013.** systems biological approaches towards understanding cellulase production by *Trichoderma reesei.*, *J Biotechnol.*, 163: 133.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A.D. 2011.** Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011: 10.4061/2011/280696.
- Kumar, D., Kumar, V., Verma, A.K., Dubey, A. 2014.** Kinetic characterization and immobilization of partially purified extracellular alkaline protease from rhizospheric soil bacterium *Bacillus subtilis* strain EN4. *Journal of pure and applied microbiology*, 7(1): 727-732.
- Lakhundi, S., Siddiqui, R., Khan, N.A. 2015.** Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections. *Parasites and Vectors*, 8(23): 10.1186/s13071-015-0642-7.
- Lamed, R., Setter, E., Bayer, E.A. 1983.** Characterization of a cellulose-binding, cellulase containing complex in *Clostridium thermocellum*. *Bacterial.*, 156(2): 828–836.
- Laemmli, U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.
- Laemmli, U.K., Paulson, J.R., Hitchins, V. 1974.** Maturation of the head of bacteriophage T4. V. a possible DNA packaging mechanism: in vitro cleavage of the head proteins and the structure of the core of the polyhead. *Journal of Supramolecular Structure*, 2(2-4): 276-301.
- Lavanya, D., Kulkarni, P.K., Dixit, M., Raavi P.K., Krishna, L.N.V. 20011.** Sources of cellulose and their applications – A review. *International Journal of Drug Formulation and Research.*, 2(6): 19-21.
- Lee, J.H., Brown, R.M. 1997.** A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*: a high resolution electron microscopy study. *Biotechnol.* 57: 127–36.

- Li1, L.J., Xia, W.J., Ma, G.P., Chen, Y.L., Ma, Y.Y. 2019.** A study on the enzymatic properties and reuse of cellulase immobilized with carbon nanotubes and sodium alginate. *AMB Express*, 9(1): <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0835-0>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193(1): 265-275.
- Lu, W.J., H.T., Wang, Y.F., Nieetal., 2004.** Effect of inoculating flower stalks and vegetable waste with ligno-cellulolyticmicroorganisms on the composting process. *Journal of Envi-ronmental Science and Health*, 39(5-6): 871–887.
- Lugani, Y., Singla, R., Sooch, B.S. 2015.** Optimization of cellulase production from newly isolated *Bacillus sp.* Y3. *J. Bioprocess. Biotech.*, 5(11): 264.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., Pretorius, I. S. 2002.** Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 506–577.
- Mabrouk., S.S., Hashem., A.M., EL-Shayeb, A., Ismail, M.S., Abdel-Fattah, A.F. 1998.** Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, *Bioresource Technology*, (69) :155- 159.
- Magrey, A., Sahay, S., Gothalwal, R. 2018.** Cellulases for biofuel: a review. *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*, 12(1): 17-25.
- Mandels, M., Reese, E. 1957.** Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, *J. Bacteriol.*, 73: 269.
- Martin, M. M. 1991.** The evolution of cellulose digestion in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 333: 281–288.
- Maryam, B., Qadir, A., Zameer, M., Ahmad, S.R., Nelofer, R., Jamil, N., Arzoo, S., Afzaal, R. 2018.** Production of cellulases by *Bacillus cellulosilyticus* using lignocellulosic material. *Pol. J. Environ. Stud.*, 27(6): 2659-2667.
- Mathew, G.M., Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Pandey, A. 2008.** Progress in research on fungal cellulases for lignocellulose degradation. *Journal of scientific and industrial research*, 67: 898-907.
- Milala, M., Shugaba, A., Gidado, A., Ene, A., Wafar, J. 2005.** Studies on the use of agricultural wastes for cellulase enzyme production by *Aspergillus niger*. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1: 325-328.
- Miller, G. 1959.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Miranda, M., Kam, T.L., Wensheng, Q. 2009.** The prospects of cellulase- producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*, 5:500-516.
- Mojsov, K. 2011.** Application of enzymes in the textile industry: a review. proceedings of the 11 international congress on engineering, ecology and materials in the processing industry, Bosnia and Herzegovina.
- Nargotra, P., Vaid, S., Bajaj, B.K. 2016.** Cellulase production from *Bacillus subtilis* SV1 and its application potential for saccharification of ionic liquid pretreated pine needle biomass under one pot consolidated bioprocess. *Fermentation*, 2(4): 19.
- Nema, N., Alamir, L., Mohammad, M. 2016.** Partial purification and molecular weight determination of cellulase from *Bacillus cereus*. *International Food Research Journal*, 23(2): 894-898.



- Nogawa M, Goto M, Okada H, Morikawa Y. 2001.** L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.*, 38(6): 329–334.
- Pandey, A., 1992.** Recent process developments in solid state fermentation. *Process. Biochem.*, 27:2 109-117.
- Payen, A. 1838.** Memoir on the composition of the tissue of plants and of woody material, *Comptes rendus.*, 7: 1052–1056.
- Pere, J., Puolakka, A., Nousiainen, P., Buchert, J. 2001.** Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. *Journal of Biotechnology.*, 89(2-3): 247–255.
- Ray, A.K., Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K. 2007.** Optimization of fermentation conditions for cellulase production by *Bacillus subtilis* CY5 and *Bacillus circulans* TP3 isolated from fish gut. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 1(37): 47-53.
- Reddy, K.V., Vijayalashmi, T., Ranjit, P., Raju, M.N. 2017.** Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from pulp and paper mill effluent contaminated soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 60: <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2017160226>.
- Reese, E.T. 1956.** A microbiological process report: enzymatic hydrolysis of cellulose., *Appl. Microbiol.*, 4(1): 39–45.
- Roopa, R., Charulatha, M., Meignanalakshmi, S. 2017.** Production of cellulase from *Bacillus subtilis* under solid- state fermentation using fiber wastes of palmyra palm. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6(6): 2225-2231.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S.K., Mayilraj, S., Maiti, T.K. 2013.** Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *Springer Plus.*, 2(10): <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-10>.
- Sadhu, S., Maiti, T.K. 2013.** Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3): 235–258.
- Saranraj, P., Stella, D., Reetha, D. 2012.** Microbial cellulases and its applications: a review., *International Journal of Biochemistry & Biotech Science*, 1: 1-12.
- Sarıkaya, E. 1995.**  $\alpha$ -Amilaz üreten bazı *Bacillus* suşlarının gelişme parametreleri, enzim özellik ve üretim koşullarının optimizasyonu. *Doktora Tezi*, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sang-Mok, L., Koo, Y. M. 2001.** Pilot-scale production of cellulase using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(2): 229–233.
- Schubert, C. 2006.** Can biofuels finally take center stage? *Nature Biotechnology*, 24: 777-784.
- Schwarz, W.H. 2001.** The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56:634–49.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B.L.,Gupta, S. 2013.** Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN Biotechnology*, 2013: <https://doi.org/10.5402/2013/985685>.
- Shah, S.R. 2013.** Chemistry and applications of cellulase in textile wet processing. *Research Journal of Engineering Sciences*, 2: 1-5.
- Shajahan, S., Ganesh Moorthy, I., Sivakumar, N., Selvakumar, G. 2017.** Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556

isolated from the hot spring, Maharashtra, India. *Journal of King Saud University – Science*, 29(3): 302–310.

**Shankar, T., Isaiarasu L. 2011.** Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8(1): 40-45.

**Sharma, A., Tewari, R., Rana, S.S., Soni, R., Soni, S.K. 2016.** Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8): 1346-1380.

**Shoemaker, S., Schweickart, V., Ladner, M., Gelfand, D., Kwok, S., Myambo, K., Innis, M. 1983.** Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Nat Biotech.*, 1:691–696.

**Shoseyov, O., Shani, Z., Levy, I. 2006.** Carbohydrate binding modules: biochemical properties and novel applications., *Microbial Mol. Boil. Rev.*, 70: 283–95.

**Singh, A., Hayashi, K. 1995.** Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis. *Advan. Appl. Microbiol.*, 40: 1–44.

**Singh, A., 1999.** Engineering enzyme properties. *Indian Journal of Microbiology.*, 39(2): 65–77.

**Singh, G., Patel, A. K., Gupta, A., Gupta, D., Mishra V. K. 2019.** Current advancements in recombinant technology for industrial production of cellulases: part-II. *Fungal Biology*, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_11).

**Singh R., Kumar M., Mittal A., Mehta P.K. 2016.** Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech.*, 6(2): 174.

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

**Sumner, J.B. 1921.** Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *Journal of Biological Chemistry*, 47: 5.

**Suto, M., Tomita, F. 2001.** Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi., *J. Biosci. Bioeng.*, 92(4): 305-311.

**Tabssum, F., Irfan, M., Shakir, H.,A., Qazi, J. I. 2018.** RSM based optimization of nutritional conditions for cellulase mediated saccharification by *Bacillus cereus*. *J. Biol. Eng.*, 12(7): doi:10.1186/s13036-018-0097-4

**Tahir, S.R., Bakhsh, A., Rao, A.Q., Naz, M., Saleem, M. 2009.** Isolation, purification and characterization of extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Bacillus* sp. *Adva. Environ. Biol. Report.*, 3: 269.

**Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007.** MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.*, 24:1596-1599.

**Tanimura, A., Liu, W., Yamada, K., Toyohara, H. 2013.** Animal cellulases with a focus on aquatic invertebrates., *Fish Sci.*, 79:1–13.

**Tarakçioğlu, I. 1983.** Protein (yumurta akı) liflerinin terbiyesi. *Tekstil Terbiyesi ve Makineleri*, 2: 115-116.

**Teeri, T.T., Penttilä, M., Keränen, S., Nevalainen, H., Knowles, J.K. 1992.** Structure, function, and genetics of cellulases. *Biotechnology*, 21:417–445.

**Teeri TT. 1997.** Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.*, 15(5): 160–167.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994.** Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22: 4673-4680.
- Turnbull, P.C.B. 1996.** *Bacillus*: Barron's medical microbiology, Editor: Baron, S. Galveston, Texas.
- Vinod, K., Punesh, S., Dharmendra, S., Prabhjot, K.G. 2014.** Global scenario of industrial enzyme market from industrial enzymes: trends, scope and relevance. Editors: Vikas, B., Anil, K.S., NY, USA, 173–196 pp.
- Valjamae, P., Sild, V., Pettersson, G., Johansson, G. 1998.** The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface-erosion model. *Eur. Biochem.*, 253(2): 469–75.
- Van Oort, M. 2010.** Enzymes in food technology, Wiley-Blackwell Publishing, USA, pp: 1-17.
- Wang, N.S. 2009.** Experiment no.4a glucose assay by dinitrosalicylic colorimetric method. <http://terpconnect.umd.edu/~NSW/ench485/lab4a.htm>- (Erişim Tarihi: 27.03.2020).
- Wang, J., Hua, B., Wang, X., Cui, Z. 2017.** Characteristics of cellulase in cellulose-degrading bacterium strain *Clostridium straminisolvens* (CSK1). *Afr. J. Microbiol. Res.*, 11(10): 414-421.
- Watanabe, H., Tokuda, G. 2010.** Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol. Annu. Rev.*, 55: 609–632.
- Waseem, I., Gulsher, M., Choudhry, S. 2014.** Cellulase production from newly isolated bacterial strains from local habitat. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(8): 1454-1459.
- Wilson, D.B. 2008.** Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1125:289–97.
- Wiseman, A., 1987.** The application of enzymes in industry. handbook of enzymes biotechnology, Editörler: Horwood, E., Chichester, UK, 274-373 pp.
- Wood, T.M. 1985.** Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.*, 13: 407-410.
- Xie, G., Bruce, D.C., Challacombe, J.F., Chertkov, O., Detter, J.C., Gilna, P., Han, C.S., Lucas, S., Misra, M., Myers, G.L., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Thompson, L.S., Brettin, T.S., Henrissat, B., Wilson, D.B., McBride, M.J. 2007.** Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(11): 3536-3546.
- Xu, B., Hellman, U., Ersson, B., Janson, J.C. 2000.** Purification, characterization and amino-acid sequence analysis of a thermostable, low molecular mass endo-b-1,4-glucanase from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Eur. J. Biochem.*, 267: 4970–4977.
- Yin, L.J., Lin H.H., Xia, Z.R. 2010.** Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(3): 466-471.
- Yuan, X., Cheng, G. 2015.** From cellulose fibrils to single chains: understanding cellulose dissolution in ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, (47)17: 31592-31607.
- Zdarta J., Jędrzak, A., Kłapiszewski, Ł., Jesionowski, T. 2017.** Immobilization of cellulase on a functional inorganic–organic hybrid support: stability and kinetic study. *Catalysts*, 7(12): doi:10.3390/catal7120374.

**Zhang, Z.J., Chen, Y.Z., Hu, H.R., Sang, Y.Z. 2013.** The beatability-aiding effect of *Aspergillus niger* crude cellulase on bleached simao pine kraft pulp and its mechanism of action. *BioResources*, 8: 5861-5870.

**Zhang, Y.H., Lynd, L.R. 2004.** Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems., *Biotechnol. Bioeng.*, 88(7): 797–824.

**Zhang, X.Z., Zhang, Y.H.P. 2013.** Cellulases: characteristics, sources, production, and applications: bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers, Editors: Yang, S.T., El-Enshasy, H.A., Thongchul, N., pp: 131-146.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sarra MSAKNİ  
Doğum Yeri : Kairouan, Tunus  
Doğum Tarihi : 02.11.1994

### Eğitim Durumu

Lise : American School of Correspondence  
Lisans : İstanbul Üniversitesi  
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi  
Çalıştığı Kurumlar : --  
İletişim (e-posta) : smsakni94@gmail.com