

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETEN SUŞ İZOLASYONU VE
ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ORTAM KOŞULLARININ
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra KOÇAK

Yüksek Lisans Tezi
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Danışman: Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN

OCAK-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETEEN SUŞ İZOLASYONU VE ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ORTAM KOŞULLARININ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kübra KOÇAK

141132109

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 19 Aralık 2017

Tezin Savunulduğu Tarih: 02 Ocak 2018

Tez Danışmanı : Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN(F.Ü)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Hasan TOĞRUL(E.O.Ü)

Yrd. Doç. Dr. Venhar ÇELİK ÖZGEN(F.Ü)

ÖNSÖZ

Deneysel çalışmalar FÜBAP M.F.16.07 nolu proje ile yürütülmüştür.

Tez süresi boyunca her türlü akademik bilgi ve birikimlerini paylaşan ve her an desteğini hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımın yürütülmesinde hiçbir yardımını ve manevi desteğini esirgemeyen, yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren hocam Sayın Doç. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI' na teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamda akademik tecrübelerine başvurduğum hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Veyis SELEN'e teşekkür ederim.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerini her zaman hissettiğim ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Ayşegül ÇELİK ve Yunus Emre ÖZ'e çok teşekkür ederim.

Doğduğum günden bu zamana kadar maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

KÜBRA KOÇAK

ELAZIĞ-2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler	3
2.2. Selüloz	5
2.3. Selülazlar	8
2.3.1. Selülaz Enzim Kaynakları	11
2.3.2. Selülozik Mikroorganizmaların Kaynakları	13
2.3.3. Selülozik Suş İzolasyonu.....	14
2.3.4. Selülazın Kullanım Alanları	16
2.4. Selülaz Enzimi Üreten Suş İzolasyonu Konusunda Önceki Çalışmalar	25
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Materyal.....	30
3.1.1. Bakteri İzolasyonunda ve Teşhisinde Kullanılan Besiyerleri	30
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	31
3.1.3. Kullanılan Boyalar	32
3.1.4. Mikroorganizma için Morfolojik ve Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Besiyerleri	33
3.2. Metot	33
3.2.1. Selülaz Enzimi Üreten Suşların İzolasyonu	33
3.2.2. Katı Besiyerinde Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi	33
3.2.3. Sıvı Besiyerinde Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi	34
3.2.4. Bakteri Teşhisi.....	34

3.2.5.	Selülaz Enzimi Üretiminin Maksimum Olduğu pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi.....	36
3.2.6.	Besiyeri Bileşiminin Selülaz Enzimi Üretimine Etkisinin Belirlenmesi.....	36
3.2.7.	Selülaz Enziminin Üretimi ve Kısmi Saflaştırılması	37
3.2.8.	Enzim Aktivitesinin Maksimum Olduğu Sıcaklık, pH ve NaCl Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	37
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1.	Toprak ve Sudan Bakteriyel Suş İzolasyonu Sonuçları	38
4.2.	İzolatların Katı Ortamdaki Selülaz Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçlar	39
4.3.	İzolatların Sıvı Ortamdaki Selülaz Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçlar	40
4.4.	7 Nolu İzolatın Biyokimyasal ve Morfolojik Test Sonuçları	41
4.5.	7 Nolu Suşun 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları	44
4.6.	Selülaz Enzim Üretiminin Maksimum Olduğu pH ve Sıcaklık Değerleri	46
4.7.	Besiyeri Bileşenlerinin Selülaz Enzim Üretimine Etkisi	47
4.8.	Enzim Karakterizasyonu Sonuçları	50
4.8.1.	Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Belirlenmesi	50
4.8.2.	Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH'nın Belirlenmesi	51
4.8.3.	Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği NaCl Konsantrasyonunun Belirlenmesi ..	52
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
6.	KAYNAKLAR.....	56
	ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

Bu çalışmada, toprak ve su kaynakları kullanılarak selüloz enzimi üreten suşların izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu yapılan suşların, katı ve sıvı enzim üretim ortamlarında yapılan analizler ile selüloz aktivitesi belirlenmiş ve en yüksek aktiviteyi gösteren suş seçilmiştir. Seçilen suş, biyokimyasal ve morfolojik testlerin yanı sıra 16S rRNA analizi ile tanımlanmıştır. Seçilen suşun maksimum selüloz enzimi üretimini 45 °C sıcaklık ve 6,0 pH’da gösterdiği tespit edilmiştir. Enzim üretimi için kullanılan farklı kültür koşullarında, en iyi karbon kaynağının nişasta, en iyi azot kaynağının ise maya ekstraktı olduğu, mikro nütrient kaynağı olarak K₂HPO₄’ın enzim üretiminde indükleyici bileşen olduğu belirlenmiştir. Elde edilen selüloz enziminin, pH 7,5; sıcaklık 50 °C ve % 2 NaCl konsantrasyonu şartlarında optimum aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Suş izolasyonu, Selüloz, Enzim aktivitesi, 16S rRNA.

ABSTRACT

Cellulase Enzyme Producing Strain Isolation and Determination of the Effect of Medium Conditions on Enzyme Activity

In this study, isolation of cellulase enzyme producing strains from soil and water resources was investigated. The cellulase enzyme activity of the isolated strains was determined by analyses performed on solid and liquid enzyme production media and the strain with the highest activity was selected. Selected strain having maximum cellulase activity was identified by 16S rRNA analysis as well as biochemical and morphological tests. It was determined that the selected strain showed maximum cellulase enzyme production at a temperature of 45 °C and pH 6.0. In the different culture conditions used for enzyme production, it was determined that the best carbon source is starch, the best nitrogen source is yeast extract, and the K₂HPO₄ is the inducer component in enzyme production as a micronutrient. It was determined that the cellulase enzyme obtained has an optimum activity under the conditions of 7.5 of pH, 50 °C of temperature and 2% of NaCl concentration.

Keywords: Strain isolation, Cellulase, Enzyme activity. 16S rRNA.

TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Selüloz üreten mikroorganizmalar.....	12
Tablo 3.1. Deneyde kullanılan bakterilerin ön ekim, izolasyon, saklama ve enzim üretiminde kullanılan besiyerleri.	30
Tablo 3.2. Gram ve endospor boyama için kullanılan boya çözeltileri.	32
Tablo 4.1. Biyokimyasal test sonuçları.....	41



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Selüloz polimerinin yapısı. Kristalin selüloz (kırmızı renk) amorf selülozdan (siyah renk) renklerle ayrılır	6
Şekil 2.2. Selüloz yapısı. Kırmızı renkteki glukoz molekülleri kristalin bölgeyi temsil eder ve siyah renkteki glukoz molekülleri ise amorf bölgeyi göstermektedir	7
Şekil 2.3. Selülozun enzimatik parçalanmasının şematik görünüşü	9
Şekil 2.4. Doğal selülozun enzimatik hidrolizinin selülazın 3 bileşeni ile gerçekleştirilmesi	10
Şekil 2.5. Tekstil endüstrisinde selülaz uygulamalarına bazı örnekler	18
Şekil 2.6. Bira endüstrisinde selülazların rolü	21
Şekil 2.7. Şarap endüstrisinde selülazların rolü	22
Şekil 4.1. Numune alınan toprak örnekleri	38
Şekil 4.2. Kongo kırmızısı boyama görüntüleri (sırasıyla 23, 17, 13 ve 2 nolu izolatlar) ..	39
Şekil 4.3. 7 Nolu suşun koloni ve zon çapı görüntüsü	39
Şekil 4.4. Katı besiyerine ekilen suşların koloni ve zon çapları	40
Şekil 4.5. Sıvı besiyeri aktivite ölçüm sonuçları	40
Şekil 4.6. Katalaz testi sonucu	42
Şekil 4.7. İndol testi sonucu	42
Şekil 4.8. Sitrat testi sonucu	43
Şekil 4.9. Gram boyama sonucu ışık mikroskobu görüntüsü	43
Şekil 4.10. Endospor boyama sonucu ışık mikroskobu görüntüsü	44
Şekil 4.11. 7 Nolu Suşun koloni şekli görüntüsü	44
Şekil 4.12. 16S rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi	45
Şekil 4.13. Filogenetik Ağaç	45
Şekil 4.14. 7 nolu suşun farklı inkübasyon koşullarında aktivite ölçüm sonuçları	46
Şekil 4.15. Farklı karbon kaynaklarında selülaz enziminin bağıl aktivite sonuçları	48
Şekil 4.16. Farklı azot kaynaklarında selülaz enziminin bağıl aktivite sonuçları	48
Şekil 4.17. Farklı iz element kaynaklarında selülaz enziminin bağıl aktivite sonuçları	49
Şekil 4.18. Farklı sıcaklıklarda selülaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları	51
Şekil 4.19. Farklı pH değerlerinde selülaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları	52
Şekil 4.20. Farklı NaCl konsantrasyonlarında selülaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları ...	53

KISALTMALAR DİZİNİ

CMC	: Karboksimetilselüloz
CMCaz	: Karboksimetilselülaz
DNS	: Dinitrosalisilik asit
Rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki dönüş sayısı)
sp.	: Tür



1. GİRİŞ

Enzimler, canlı hücrelerde bulunan ve kimyasal dönüşümlerin gerçekleşmesinde katalizör rolü oynayan karmaşık yapıları organik moleküllerdir. Eski çağlardan beri şarap, peynir ve ekmek üretimi gibi çeşitli alanlarda rol oynamışlardır. 20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren mikroorganizmalar ve ürettikleri metabolitlere ilişkin yoğun çalışmalar yapılmış ve enzimlerin endüstriyel uygulamaları büyük bir önem kazanmıştır. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle endüstriyel enzimlerle ilgili yapılan araştırmalar hızla sürdürülmektedir. Mikrobiyal kaynaklı enzim üretiminde fermantasyon metodlarının geliştirilmesi, çevresel koşulların kontrol altında tutulması ve doğru suşların seçilmesi ile enzim üretim potansiyeli arasında doğru bir orantı vardır (Kulkarni vd., 1999).

Enzim üretimi konusunda gerçekleştirilen araştırmalarda temel amaç, üretim şartlarının optimize edilerek mümkün olan en düşük maliyetle ve en yüksek faydayı sağlayacak enzimi üretmektir. Bunun için enzim üretim proseslerinde yenilenebilir doğal kaynakların kullanımı önem kazanmıştır. Bu kaynaklar içerisinde selüloz en yaygın kullanan polimerdir (Kulkarni vd., 1999). Selüloz, monomerik şeker birimlerine ayrılmak için polimerik yapısı üzerinde etki yapan selülaz enzimlerinin etkisi ile parçalanmaktadır. Selülazlar, selüloz ve ilgili polisakkaritleri monosakaritler ve oligosakaritlere hidrolize ederler.

Selülaz enzimi, farklı etki tiplerine sahip ve daha ziyade kendi substratlarına özgü olan karmaşık bir sistemdir. Etki tipinde ve enzimin hidroliz modelinde geniş bir çeşitlilik vardır. Selülaz enzimi yaygın olarak incelenmiş ve endüstrilerde geniş bir uygulama yelpazesine sahip olduğu belirlenmiştir. Kağıt hamuru ve kağıt, tekstil, tarım, bira ve şarap, gıda, hayvan yemi, atık arıtma ve biyorafineri gibi endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılırlar.

Selülazların üretimi, çeşitli parametrelere bağlıdır. Bunlardan bazıları selülozik substrat konsantrasyonu, ilave edilen indükleyiciler, kültür sıcaklığı, ortamın pH'sı ve çalkalama hızı olarak sıralanabilir (Gupta 2016).

Canlı sistemlerde selülaz enzimi, türlerin çoğunda yaygın olarak sentezlenmektedir. Bunların arasında bakteri, mantar ve aktinomisetler enzimlerin en iyi üreticileri olarak kabul

edilmektedir. Dahası, selülozik aktivite sergileyen birçok organizma daha vardır. Araştırmalar, nematodlar, yumuşakçalar ve eklembacaklılar da dahil olmak üzere bazı organizmaların da endojen selülozlar üretebildiğini göstermiştir. Bu enzimlerin etki biçimleri farklıdır ve fizibiliteye göre farklı uygulamalar için kullanılırlar. Fungal selülozların, diğer mikrobiyal selülozlara kıyasla daha yüksek verimli ve daha uygun maliyetli yöntemlerle üretildiği kabul edilmektedir. Ancak bakteriyel selülozlar ise daha termostabildirler ve daha kısa sürede yüksek miktarlarda salgılanabilirler. Bakterilerde, selülozlar, hücreye bağlı selülozomlar olarak bilinen kümelenmiş yapılar halinde bulunurlar. Fungal sistemlerde ise bu yapılar mevcut değildir (Gupta 2016).

Selüloz enzimi üreten sayısız selülozik mikroorganizma olsa da, devamlı üretim için daha güvenli olan en iyi suşun belirlenmesi çok zor bir süreçtir. Selülozik aktiviteye sahip birçok patojenik suş vardır. Bununla birlikte, çoğunlukla gıda ve tekstil ya da insanların günlük faaliyetleriyle doğrudan bağlantılı oldukları diğer endüstrileri içeren uygulamalarda enzimlerin devamlı olarak üretilmesi için bu suşları seçmek oldukça önem taşımaktadır (Gupta 2016).

Bu çalışmanın amacı, farklı bölgelerden alınan toprak ve su örneklerinden selüloz enzimi üreten suşları izole ederek en yüksek selüloz aktivitesi gösteren suşun farklı besiyeri içeriği, farklı sıcaklık ve pH değerlerinde enzim aktivitesini incelemektir. Elde edilen enzimin ise farklı sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonlarında en yüksek aktivite gösterdiği değerleri belirlemektir. Ayrıca seçilen suşu morfolojik, biyokimyasal testler ve 16S rRNA analizi ile tanımlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Enzimler; yapısında karbon, oksijen, hidrojen ve azot bulunduran, kimyasal tepkimelerde katalizör görevi yapan ve mikroorganizmalar (bakteriler, virüsler, mantarlar) tarafından salgılanan moleküllerdir. Günlük, ekonomik ve endüstriyel alanlarda çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere hayatımıza girmişlerdir.

Endüstriyel proseslerde kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu hidrolitik karaktere sahiptirler. Ticari olarak kullanılan selülozlar, endüstriyel olarak önemli biyoteknolojik enzimlerdir. Selüloz enziminin maliyeti ve stabilitesi, bu enzimin kullanımı açısından büyük önem taşımaktadır. Geniş uygulama alanları ve giderek artan talepleri nedeniyle, prosese uyumluluğu, spesifik aktivitesi ve stabilitesi daha yüksek yeni selülozların üretimi için selüloz üreten suşların keşfi geniş bir çalışma alanı oluşturmaktadır (Sadhu vd., 2014).

2.1. Enzimler

Enzimler, doğal olarak canlılar tarafından sentezlenen, tamamı ya da bir kısmı protein yapısında olan biyomoleküllerdir. Yeni dokuların oluşturulması (Lutolf vd., 2003), eski dokuların yenilenmesi (Mizushima ve Komatsu, 2011), gıdaların enerjiye dönüşümü (Van Beek vd., 2011), zehirli maddelerin uzaklaştırılması (Çakır vd., 2015) ve "yaşam" olarak nitelendirilebilecek hemen hemen tüm faaliyetleri üstlenerek, hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olan enzimler, günlük ve ekonomik olarak çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere hayatımıza girmişlerdir. Enzimler sahip oldukları etkinlik, seçicilik, özgüllük gibi özellikleri sayesinde, uygun koşullar altında çeşitli endüstriyel ürünlerin üretiminde yer alan önemli bir buluştur (Miletic vd., 2012). Gıda, yem, tarım, kâğıt, deri, deterjan ve tekstil gibi endüstriyel alanlarda uygulanan üretim proseslerinde çeşitli amaçlarla kullanımı yaygındır (Beilen ve Li, 2002).

Endüstriyel enzimlerin toplam pazarı 2016 yılında 4,742.68 milyar ABD doları seviyesine ulaşmıştır ve 2018-2023 periyodunda bu değerin yıllık %6,03 büyüme oranıyla artacağı tahmin edilmektedir. 2017 yılında bu pazarın büyük bir kısmını karbonhidrazlar oluşturmuştur (URL-1, 2017).

Enzimler, mevcut şartlarda yürüyen reaksiyonu hızlandırma kabiliyetine sahip biyokatalizörlerdir, termodinamik olarak gerçekleşmesi mümkün olmayan reaksiyonları başlatmazlar. Substratın, enzimin aktif bölgesine fiziksel olarak bağlanmasıyla, yeni ürün moleküllerine dönüşüm enzim tarafından katalizlenmektedir. Enzimler, katalize ettikleri tepkimelerde tüketilmezler ve reaksiyonların dengesini değiştirmezler. Enzimlerin yaklaşık 4.000 biyokimyasal reaksiyonu katalize ettiği bilinmektedir (Schnell vd., 2006).

Endüstriyel alanda kullanılan enzimler bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal enzimler olmakla birlikte ağırlıklı olarak mikroorganizma kökenli enzimler üretilmektedir. Mikroorganizmaların, enzim kaynağı olarak tercih edilmesinin nedenleri şöyle sıralanabilir (Hasan vd., 2006):

- Üretim maliyetleri genellikle daha düşüktür,
- Enzim içeriği daha öngörülebilirdir,
- Enzim üretimi mevsimsel değişimlerden etkilenmez,
- Düşük maliyetli ortamlarda mikroorganizmalar hızlı gelişirler,
- Bitki ve hayvan dokuları, mikroorganizmalara göre potansiyel olarak daha toksik maddeler içerirler (fenolik bileşikler, endojen enzim inhibitörleri vb.),
- Mikrobiyal enzimler, bitki ve hayvan kaynaklı enzimlerden daha kararlıdır.

Endüstriyel enzim pazarı, uygulama alanları açısından “teknik enzimler, gıda enzimleri ve hayvan yemi enzimleri” olmak üzere üç bölüme ayrılmıştır.

Karbonhidrazlar ve proteazlar, teknik enzimler arasında gıda ve hayvan yemlerinde kullanılan en temel enzimlerdir. Proteazlar, selülozlar, amilazlar ve lipazlar, çamaşır deterjanları, bulaşık deterjanları ve diğer temizlik maddelerinde kullanılmaktadırlar. Ağırlıklı olarak selüloz ve amilaz kullanan pamuklu ve selülozik tekstil işletmeleri de, bu uygulama alanlarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Hasan vd., 2006).

Selülotik enzimlerin gıda, bira, şarap, kâğıt hamuru ve kâğıt, tekstil, deterjan, yem ve tarım gibi farklı endüstriyel alanlardaki uygulamalar için biyoteknolojik potansiyeli çok yüksektir (Bhat 2000). Selülozik materyallerin enzimatik hidrolizi üzerine gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemler günümüzde oldukça artmıştır. Yenilenemeyen kaynakların gittikçe azalması; selülozu gıda, enerji, yakıt ve diğer ürünler için temel ham materyal haline getirmiştir (Krishna vd., 2000).

2.2. Selüloz

Lignoselülozik biyokütle, tarım ve orman kalıntıları şeklinde toprakta bol miktarda bulunmaktadır. Bu biyokütle çeşitli bakteri, mantar ve böcek türleri için enerji kaynağıdır ve onlara yaşam alanı oluşturmaktadır. Ayrıca otoburlar, selülozik enzim ve diğer yardımcı proteinlerin yardımı ile biyokütlenin basit şekerlere parçalanması sayesinde besin ihtiyaçlarını karşılamaktadır (Van Dyk ve Pletschke, 2012). Bu enzimler ve proteinler, doğadaki biyokütlenin yapısal farklılıklarına göre oldukça çeşitlilik göstermektedir. Biyokütlenin yapısı ise bitki türleri ve coğrafi yerlere göre şekillenmektedir. Lignoselülozik biyokütle selüloz (%20-50), hemiselüloz (%15-35) ve lignin (%5-30) olmak üzere üç önemli bileşeni içerir (Lynd vd., 2002).

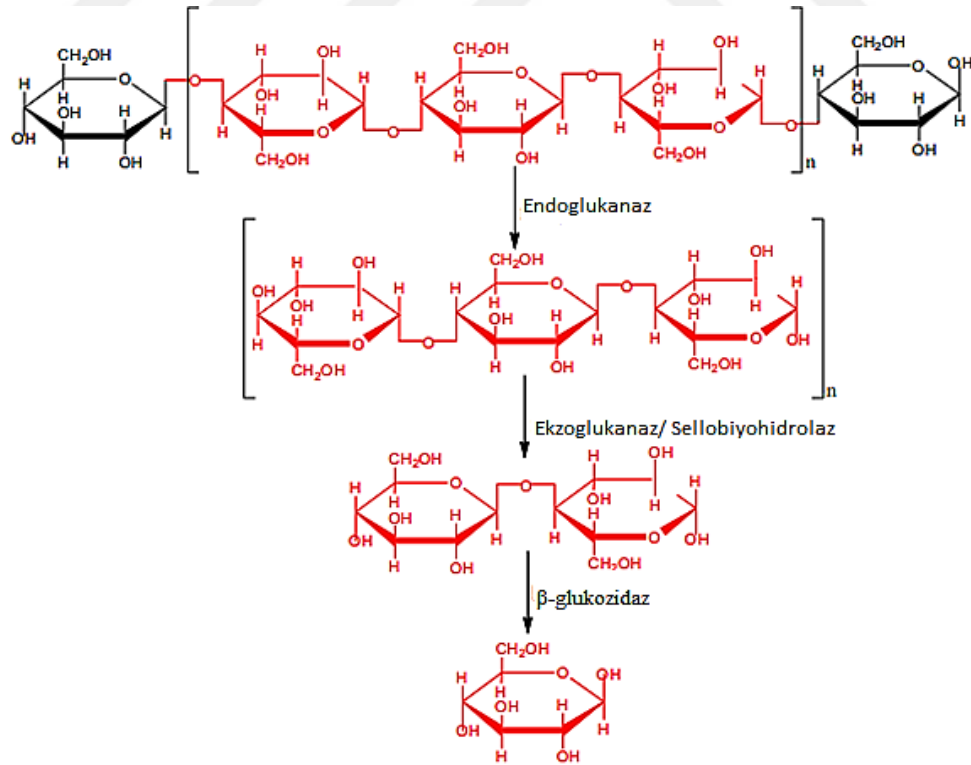
Hemiselülozlar, lignoselulozik biyokütlerde selülozdan sonra gelen en önemli bileşendir. Bu bileşen, farklı şekerler (ksilan, mannan ve galaktan) ve şeker asitleri içeren, heterojen ve kısa zincirli polimerik bir yapıya sahiptir. Kendilerini oluşturan şekerlere göre adlandırılırlar. Doğal yapıları itibarıyla şekilsizdirler (Fan vd., 1987).

Lignin, bitkinin kök ve gövdesinde odunsu yapıyı meydana getiren bileşendir. Bitkiyi sert çevre koşullarına karşı korur. Karbon-karbon ve ester bağları ile birleştirilen fenil-propan birimlerinden oluşan dallanmış polimerlerdir. Lignin bileşimi (farklı fenil-propan monomerlerinin oranı), farklı biyokütle ve ağaç türleri arasında değişmektedir (Brebü ve Vasile, 2009).

Selüloz, bitki biyokütlesinin ana bileşenidir ve dünyada en yüksek oranda bulunan organik polimerdir. Selüloz, bitki, ot ve ağaçların temel yapı taşıdır. Odunun ağırlıkça %40'ını, ketenin %60-85'ini, pamuk liflerinin %85-90'ını selüloz oluşturmaktadır (Johansson vd., 2000). Sellobiyoz ünitelerinden oluşan selüloz, bitki ikincil hücre duvarının ana bileşenidir (Fox vd., 2013). Doğada selüloz lifleri, başta hemiselüloz ve lignin olmak üzere diğer yapısal biyopolimerlerin matrisine gömülü şekilde bulunmaktadır. Selülozun bitkilerdeki en önemli görevleri bitkiye sağlamlık, diklik kazandırmak ve destek sağlamaktır. Yenilenebilir bir polisakkarittir ve biyokütlenin ağırlıkça %20-50'sini kapsamaktadır. Doğada sadece pamuk yumaklarında saf halde bulunmaktadır (Watanabe ve Tokuda, 2010). Selülozun yapısı oldukça kristalindir ve β -1,4-D-glikopiranoz birimlerinin doğrusal zincirlerinden oluşmaktadır. Bu birimler katmanlar halinde istiflenerek, Vander

Waals kuvvetleri ile iç ve zincirler arası hidrojen bağları ile birlikte tutunmaktadırlar. Hidroksil grupları ile bitişik halkalı moleküllerin oksijenleri arasındaki zincir içi hidrojen bağı, β -1,4-glukozid bağıni sabitleştirir ve selüloz zincirinin lineer konfigürasyonda olmasını sağlar (Şekil 2.1) (Moon vd., 2011).

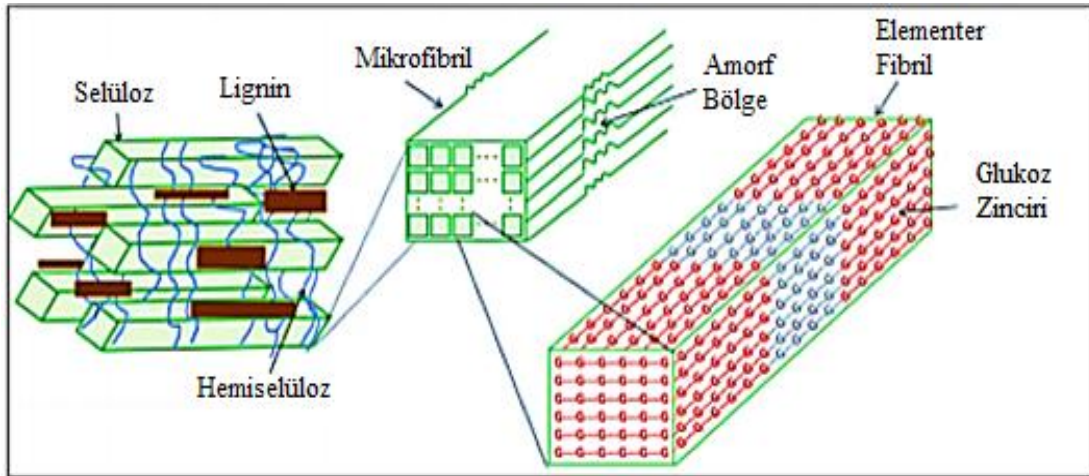
Birincil bitki hücre duvarlarındaki selüloz zincirleri 5000 ile 7500 glukoz monomer birimi aralığında polimerizasyon derecesine sahiptir (OSullivan 1997). Her bir glukoz, tekrarlayan birer sellobiyoz birimi ile zincirin ana eksenini boyunca komşularına göre 180° döndürülür. Düz şerit konformasyonu, selüloz yapısının karakteristiğidir ve istenilen zincir düzeninin en yüksek derecesini temsil eder. Hidrojen bağları, mikrofibril yüzeyi ile bitki hücre duvarının matrisinde bulunan nonglukanlar arasındaki bağın oluşmasında önemlidir. Selülozların doğrusal zincirleri, mikrolifler olarak adlandırılan ince, düzleştirilmiş, çubuk benzeri yapılar oluşturmak üzere uzun eksenleri boyunca hidrojen bağıyla birleşir. Daha sonra, selüloz zincirleri birbirine paralel bir şekilde düzenlenir ve bir molekülün 3. karbonu ile bir başka molekülün oksijen halkası, hidrojen bağlarıyla çapraz bağlanır.



Şekil 2.1. Selüloz polimerinin yapısı. Kristalin selüloz (kırmızı renk) amorf selülozdan (siyah renk) renklerle ayrılır (Juturu ve Wu, 2014).

Selüloz polimerinde, her bir glukan zinciri 25.000 kadar glukoz içerebilir. Mikroskopik seviyede 15-45 glukan zinciri, kristalin düzen içinde bir mikrofibril oluşturmak üzere birleşir. Bunların bir grubu makrofibril veya lif oluştururlar. Doğal haliyle selüloz, alternatif kristal ve amorf bölgelerle parakristal formda bulunmaktadır (Şekil 2.2). Buna ek olarak bazı durumlarda, selüloz liflerinde toplam yüzey alanını arttıran katlanmış yapılar veya boşluktan oluşan düzensizlikler bulunur (Heredia vd., 1995).

Selüloz farklı formlarda bulunabilir. Selüloz I, bitkiler ve mikroorganizmalar da dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda bulunan doğal formdur. Birçok doğal selüloz, I_α ve I_β olarak adlandırılan iki allomorf veya kristalin formdan oluşur (Moon vd., 2011; OSullivan, 1997; Wyman vd., 2004). I_α formu, bakteri ve mantar kaynaklı selülozlarda daha ağırlıklı iken I_β formu yüksek bitkilerin selülozunda baskındır. Her iki form da, molekül içi bağlanma modelleri ve kararlılığı bakımından birbirinden farklıdır. I_β formu I_α formundan daha kararlı ve kimyasal hidrolize daha dirençlidir. Selülozun farklı polimorfları (II , III_I , III_{II} , IV_I ve IV_{II}) da bulunmaktadır ve sulu sodyum hidroksit ile yeniden kristalleştirme (Lavoine vd., 2012; Wyman vd., 2004) vb. çeşitli ön işlemler ile birbirine dönüştürülebilir. Selüloz I'den farklı olarak selüloz II'deki zincirler anti paralel bir yönde ilerlerler ve daha termostabildirler.



Şekil 2.2. Selüloz yapısı. Kırmızı renkteki glukoz molekülleri kristalin bölgeyi temsil eder ve siyah renkteki glukoz molekülleri ise amorf bölgeyi göstermektedir (Kumar ve Murthy, 2013).

Selüloz karmaşık bir polimerdir ve en küçük monomerik birimi olan glukoz kadar parçalanabilir. Ancak yapısı itibari ile doğrudan bir dönüşüm mümkün değildir. Selülozlar,

önce oligomerik formlara ve daha sonra monomerik formlara ayrılır. Selüloz, polimerik yapısı üzerinde etki eden selülaz enzimlerinin etkisi ile monomerik şeker birimlerine ayrılmak üzere parçalanır. Selülaz enzimi, farklı etki tiplerine ve kendi substratlarına özgü olan karmaşık bir sisteme sahiptir. Etki tiplerinde ve enzimin hidroliz modellerinde geniş bir çeşitlilik vardır (Watanabe ve Tokuda, 2010).

2.3. Selülazlar

Selülazlar ve polisakkaridazlar üzerine yapılan yoğun çalışmalar, toprakta en bol bulunan ve yenilenebilir enerji kaynağı olan lignoselülozun glukoz ve çözünür şekerlere dönüştürülmesinde yüksek aktiviteye sahip olmaları nedeniyle 1950'lerin başında başlamıştır. 1970 ve 1980 yılları arasındaki daha kapsamlı ve uygulamalı araştırmalar, lignoselülozun biyolojik olarak çözünebilir şekerlere dönüştürülmesinin, oldukça zor bir süreç olduğunu ve ekonomik olmadığını ortaya koymuştur. Buna rağmen selülazlar, hemiselülazlar ve pektinazlar üzerine devam eden araştırmaların olması, gıda, bira ve şarap, hayvan yemi, tekstil ve çamaşırhane, kâğıt hamuru ve kâğıt, tarım, araştırma ve geliştirme gibi çeşitli endüstriyel alanlardaki biyoteknolojik önemini ortaya koymuştur (Bhat 2000).

Selülazlar, enzimatik hidrolizde rol oynayan en önemli enzimlerden biridir ve selülozun son ürün olan glukozu dönüştürülmesinden sorumludurlar. Selülazlar öncelikle selüloz moleküllerini daha kısa polisakaritlere, daha sonra sellobiyoz gibi oligosakaritlere ve nihayetinde β -D-glukoz gibi monosakkaritlere parçalar.

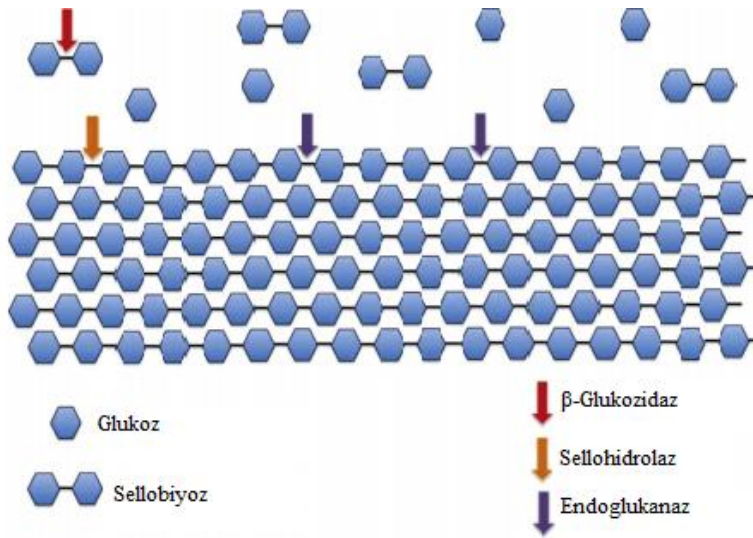
Selülaz enzim sistemleri (enzim karışımı), senkronize olarak hareket eden üç bileşenden oluşur ve enzimatik faaliyetlerine göre endoglukanazlar, ekzoglukanazlar ve β -glukozidazlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Hepsinin ortak noktası, D-glukoz molekülleri arasındaki 1,4- β -glukozidik bağı hidrolize etme kabiliyetine sahip olmalarıdır (Şekil 2.3).

Endoglukanazlar, 1,4- β -D-glukan-4-glukanohidrolazlar olarak da bilinirler ve rastgele bir şekilde iç amorf bölgelerdeki selüloza bağlanıp, 1,4- β bağına bir su molekülü ekleyerek polisakkarit zincirini parçalarlar. Sonuçta, indirgeyici ve indirgeyici olmayan uçlardan oluşan, çeşitli uzunluklarda oligosakaritler meydana gelir. Endoglukanazlar, genellikle karboksimetil selüloz (CMC) çözeltisinin viskozitesindeki düşüş ile test edilirler.

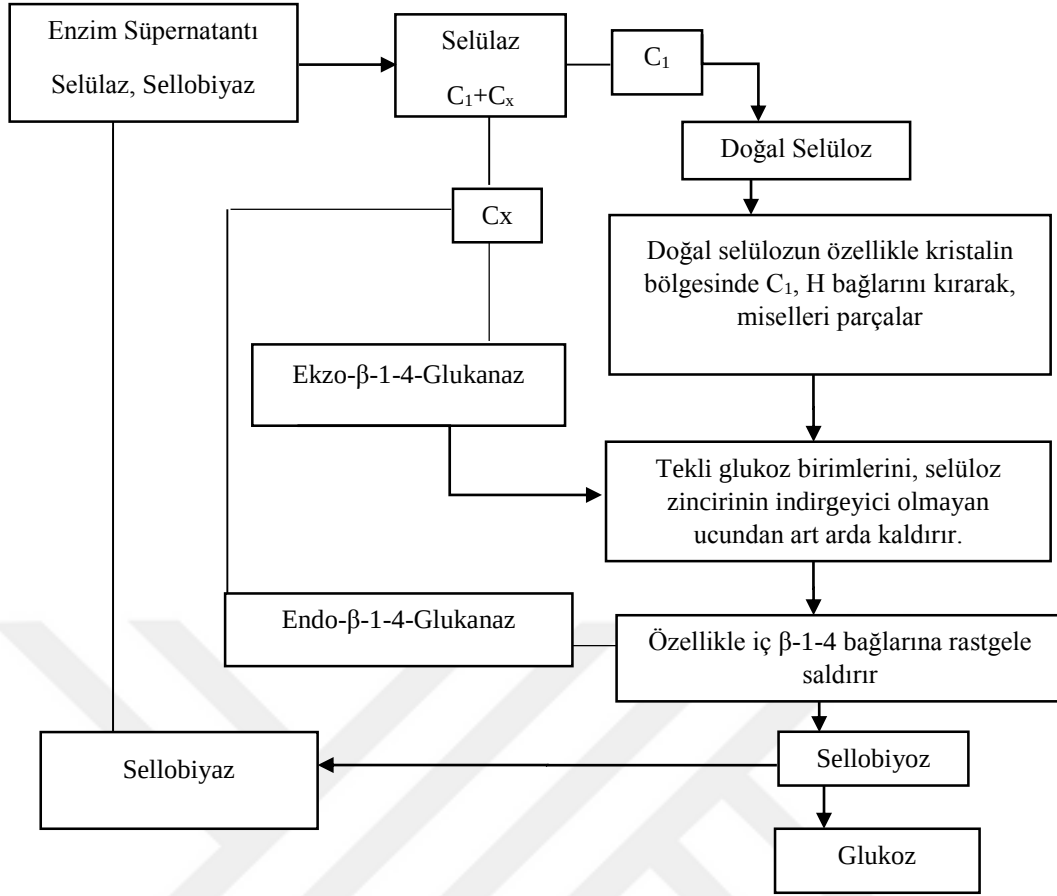
İntramoleküler bölünmelerden dolayı yüksek hidroliz ile CMC'nin spesifik viskozitesini önemli ölçüde düşürmektedirler (T. Teeri 1997; Zhang ve Lynd, 2004).

Ekzoglukanazlar, oligosakkarit zincirlerinin indirgeyici ya da indirgeyici olmayan ucundan başlayarak, doğrudan glukoz ya da sellobiyoz dimerleri salarlar. Glukoz açığa çıkaran enzimler glukanazlar, sellobiyoz açığa çıkaran enzimler ise sellobiyohidrolazlardır. Ekzoglukanazlar bağımsız olarak da çalışabilir ve selüloz zincirlerini mikrokristalin selülozdan ayırabilirler. Ekzoglukanaz aktivitesini belirlemek için çözünmeyen selülozik substratlardan avicel kullanılabilir. Endoglukanazlar ve β -glukozidazların aksine ekzoglukanazlara spesifik herhangi bir substrat bulunmamaktadır (Sharrock 1988).

β -glukozidazlar (veya β -glukozit glukohidrolazlar) sellobiyoz dimerleri ve çeşitli uzunluklarda bulunan sellodekstrinleri glukoz hidrolize ederler (Şekil 2.4) (Himmel vd., 2007; Lynd vd., 2002). Çözünür sellobiyozu ve diğer poliekodekstrinleri, sulu fazda glukoz açığa çıkarmak üzere polimerizasyon derecesi en fazla 6 olana kadar hidrolize ederler. Hidroliz oranı, polimerizasyon alt tabaka derecesi arttıkça belirgin şekilde düşmektedir (Zhang ve Lynd, 2004).



Şekil 2.3. Selülozun enzimatik parçalanmasının şematik görünüşü (de Souza 2013).



Şekil 2.4. Doğal selülozun enzimatik hidrolizinin selülazın 3 bileşeni ile gerçekleştirilmesi (Sharada vd., 2013).

Şekil 2.4’de ekzo-β-1-4-glukanaz (C_1), selüloz zincirinin indirgenmeyen ucuna etki ederek glukoz birimlerini serbest bırakır. Endo-β-1-4-glukanaz (C_x), rastgele β-1-4 bağlarına etki eder ve β-glukozidazlar ya da sellobiyazlar ise C_1 ve C_x ’e ek olarak, selüloz yapı birimini glukozla dönüştüren selobiyozu da parçalar. Selülazların yüksek ısıya dayanıklılığı, endüstriyel açıdan arzu edilen bir özelliktir. Tekstil endüstrisinde pamuğun biyo parlatma işleminde kullanılan selülazların 100 °C’ye yakın yüksek bir sıcaklıkta kararlı olmaları gerekmektedir (Ando vd., 2002). Ayrıca suda çözünmeyen ve yoğun olarak sıkıştırılmış lifli yapılar gösteren doğal kristalin selüloza etki etmek için yüksek sıcaklık ve yüksek pH’da aktif olan termostabil selülazlar gereklidir. Isıya dayanıklı selülazlar, termal koşullar altında yüksek seviyede bir aktiviteye sahiptirler. Bu nedenle, bu enzimler endüstriyel uygulamalar için iyi birer adaydır (Herbert 1992). Termostabil selülazların uygulamalardaki öneminden dolayı, yüksek termostabiliteye sahip yeni selülazları keşfetmek için çeşitli çalışmalar sürdürülmektedir (Annamalai vd., 2012, 2013; Zhao vd., 2012).

Selüloz enzim sisteminin, uygulama sırasında endüstriyel şartların üstesinden gelebilmesi için yapısal, biyokimyasal, fizikokimyasal özelliklerine ve işlevsel yönlerine odaklanan birçok çalışma mevcuttur. Ayrıca, moleküler çalışmalar ve gen ekspresyonu çalışmaları da enzim sistemi hakkındaki bilgilere katkıda bulunmaktadır. Bu enzim sisteminin çeşitliliği çok yüksek olup, aynı cinsteki enzim sistemleri bile birbirleriyle farklılık gösterebilmektedir. Dolayısıyla, selüloz sistemlerinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi için geniş bir alan vardır. Yakıtlara olan talebin sürekli olarak artması ve lignoselülozik biyokütle kaynaklı biyoyakıt kavramı, selüloz enzimleri ve diğer lignoselülozik enzimlere olan talebi hızlandırmıştır. Sürekli artmakta olan talebi karşılamak amacıyla yeni selülozik mikroorganizmaların araştırılmasına gereksinim duyulmaktadır. Selüloz araştırmalarındaki ilerlemelere karşın, enziminin etkisini engelleyebilecek solvent ve iyonik çözeltilere karşı toleransı arttırabilmek için tasarlanmış suşlara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.3.1. Selüloz Enzim Kaynakları

Mikrobik selülozlar, yaygın endüstriyel uygulamaları nedeniyle odak biyokatalizörleri haline gelmişlerdir. Selülozik materyaller üzerinde büyüyen, mikrobiyal selülozların kaynağı olarak kullanılan çok çeşitli mikroorganizmalar (çeşitli mantar, bakteri ve aktinomiset türleri) vardır. Bu mikroorganizmalar aerobik, anaerobik, mezofilik veya termofilik olabilirler (Kuhad vd., 2011). Tablo 2.1’de selüloz üreten bazı bakteri ve mantar türleri belirtilmiştir.

Anaerobik bakteriler toprakta, çürüyen bitki materyalinde, kanalizasyon bitkilerinde, geviş getiren hayvanlarda ve termitlerin bağırsaklarında bulunurlar. Bununla birlikte, konakçılarıyla simbiyotik yaşarlar ve onlar için bitki materyali hazırlarlar. Çeşitli *Clostridium* türleri, genel anaerobik selülozik bakterilerdir.

Öte yandan, aerobik bakteriler su, toprak, çürüyen bitki materyali veya hayvansal dışkıları gibi çeşitli habitatlarda bulunurlar. *Selulomonas* ve *Streptomyces*, selülozik aerobik bakterilerin sık görülen iki cinsidir. Aerobik mantarlar, bitki materyalinin bozunmasında önemli rol oynamakta ve neredeyse doğada her yerde bulunmaktadır. *Aspergillus niger* bilinen aerobik selülozik bir mantar türüdür. Anaerobik selülozik funguslar daha az

yaygındırlar ve bunlardan sadece altı tanesi bilinmektedir: *Anaeromyces*, *Caecomycetes*, *Cyllumycetes*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* ve *Piromyces*.

Tablo 2.1. Selüloz üreten mikroorganizmalar (Kuhad vd., 2011).

Bakteri	Tür Adı
Aerobik Bakteri	<i>Acinetobacter junii</i> ; <i>Acinetobacter amitatus</i> ; <i>Acidothermus cellulolyticus</i> ; <i>Anoxybacillus</i> sp.; <i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Bacillus pumilus</i> ; <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; <i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>Bacillus circulans</i> ; <i>Bacillus flexus</i> ; <i>Bacteriodes</i> sp.; <i>Cellulomonas bioazotea</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 Bakteri	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ; <i>B. fibrisolvens</i> ; <i>Clostridium thermocellum</i> ; <i>Clostridium cellulolyticum</i> ; <i>Clostridium acetobutylicum</i> ; <i>Clostridium papyrosolvens</i> ; <i>Fibrobacter succinogenes</i> ; <i>Ruminococcus albus</i>
Mantar	
Yumuşak çürükçül mantar	<i>Aspergillus niger</i> ; <i>Aspergillus nidulans</i> ; <i>Aspergillus oryzae</i> ; <i>Aspergillus terreus</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Humicola insolens</i> ; <i>Humicola grisea</i> ; <i>Melanocarpus albomyces</i> ; <i>Penicillium brasilianum</i> ; <i>Penicillium occitanis</i> ; <i>Penicillium decumbans</i> ; <i>T. reesei</i> ; <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ; <i>Trichoderma harzianum</i> ; <i>Chaetomium cellulyticum</i> ; <i>Chaetomium thermophilum</i> ; <i>Neurospora crassa</i> ; <i>Penicillium fumigosum</i> ; <i>Thermoascus aurantiacus</i> ; <i>Mucor circinelloides</i> ; <i>Penicillium janthinellum</i> ; <i>Paecilomyces inflatus</i> ; <i>Paecilomyces echinulatum</i> ; <i>Trichoderma atroviride</i>
Kahverengi çürükçül mantar	<i>Coniophora puteana</i> ; <i>Lanzites trabeum</i> ; <i>Poria placenta</i> ; <i>Tyromyces palustris</i> ; <i>Fomitopsis</i> sp.
Beyaz çürükçül mantar	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Sporotrichum thermophile</i> ; <i>Trametes versicolor</i> ; <i>Agaricus arvensis</i> ; <i>Pleurotus ostreatus</i> ; <i>Phlebia gigantea</i>
Aktinomisetler	<i>Cellulomonas fimi</i> ; <i>Cellulomonas bioazotea</i> ; <i>Cellulomonas uda</i> ; <i>Streptomyces drozdowiczii</i> ; <i>Streptomyces lividans</i> ; <i>Thermomonospora fusca</i> ; <i>Thermomonospora curvata</i>

Genel olarak, bakteriyel selülozlar, mantar kaynaklı selülozlardan daha fazla termostabillerdir. Ayrıca, bakteriler kısa sürede ve daha ekonomik karbon ve azot kaynakları kullanarak kolayca çok yüksek hücre yoğunluklarına gelebilirler ve yüksek miktarda enzim salgılama yeteneğine sahiptirler. Ek olarak bakterilerin, ekspresyon sistemi ve manipülasyonu daha uygundur ve mantar kaynaklı selülozlara kıyasla bakterilerde yüksek seviyede endojen selüloz ifadesi daha kolay gerçekleştirilir (Li vd., 2008).

Selüloz üreten *Bacillus* cinsi bakteriler, her alanda en yaygın olarak görülen bakteri cinslerinden biridir ve gösterdiği geniş fenotipik çeşitlilik ve heterojenite nedeniyle sınıflandırmada önemli bir yere sahiptirler. *Bacillus* cinsine ait olarak bilinen 268 tür ve 7 alttür mevcuttur. Çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Çoğunluğu kötü koşullara dirençlidir. Genelde gram pozitiflerdir. Aerobik veya fakültatif anaeroburlar. Çoğunda oksijen, terminal elektron alıcısıdır. Endospor oluştururlar. Koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli koloniler oluşturur. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah gibi çeşitli renklerde pigmentli kolonilere de rastlanır (Kalaylı ve Beyatlı 2003).

Patojen olarak kabul edilen *B. anthracis*, fırsatçı patojen olabilen *B. subtilis* ve gıda zehirlenmelerine neden olan *B. cereus* dışındaki türlerin insan ve hayvanlarda hastalık oluşturmadığı bilinmekte olup bu türlerin bazıları insanların doğal florasında yer alabilmektedir. Bu organizmalar genellikle kanlı agarda büyük, yayılabilen sınırları belirlenemeyen gri koloniler oluştururlar. Isıya, ışına, dezenfektan maddelere dirençli sporların ameliyathane, cerrahi malzeme, kozmetik ürün ve yiyeceklere bulaşması sorunlara neden olmaktadır (Sevim vd., 2006).

2.3.2. Selülozik Mikroorganizmaların Kaynakları

Selülozik mikroorganizmalar biyosferde yaygın olarak bulunup, çeşitli çevresel kaynaklardan kolaylıkla izole edilebilmektedirler. Bunun üzerine potansiyel selüloz üreticileri olan endofitik mikroorganizmalar üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır.

Herbivorlar, özellikle geviş getiren hayvanlar, selülozik mikroorganizmaları bağırsak mikrofloralarının bir parçası olarak içerirler. Bu nedenle, otobur hayvan gübreleri genellikle selülotik organizmaların izole edilmesi için zengin bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Bu

hayvan gübrelerinden izole edilen mikroorganizmalar arasında bakteri, mantar, maya ve aktinomisetler bulunmaktadır. Humus açısından zengin topraklar da mikroorganizma izolasyonu için iyi bir kaynaktır. Kıyı bölgelerindeki toprakların, selülozik mikroorganizma açısından yüksek bir potansiyele sahip olduğuna dair birçok rapor vardır. Yapılan bir çalışmada, mangrov topraklarından ve bitki artıklarından potansiyel lignoselülozik mikroorganizmalar izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Gupta 2016). Metagenomikdeki son gelişmeler, tatlısu (Debroas vd., 2009), okyanus (Yooseph vd., 2007), böcek bağırsakları (Warnecke vd., 2007), geviş getiren hayvanlar (Brulc vd., 2009) ve hatta insan bağırsaklarını da (Qin vd., 2010) içeren çeşitli ortamlardan genetik veri kümeleri oluşturulmasını sağlamıştır. *Ampullaria crossean* (Wang vd., 2003) ve *Patinopecten yessoensis* (Tachibana vd., 2005) gibi yumuşakalardan selülaz için sorumlu genlerin veya endojen selülaz enziminin izolasyonu üzerine bazı raporlar bulunmaktadır. Bunun dışında, kurtlar da selülaz enzimi için yüksek bir potansiyel oluşturmaktadır (Calderon-Cortes vd., 2010).

2.3.3. Selülozik Suş İzolasyonu

Fermantasyon ekonomisi, pazarlanan bir üründen elde edilen k rdan sağlanmaktadır. Bu değerin ana bileşeni, ürün başına üretim maliyetine dayanmaktadır. Düşük maliyette yapılan fermantasyon, imalat ve sermaye giderleri, fermantasyon tasarım mühendisliğindeki çalışmalarla sağlanabilir. Bununla birlikte, mikrobik suş üretimlerindeki gelişmeler, yüksek sermaye harcamaları olmaksızın maliyeti minimize etmek için en büyük imk nı sunmaktadır. İstenilen sonuç, ek talepleri karşılamak amacıyla daha büyük ölçekli üretim ferment r  veya biyoreaktör eklemeyen üretimi sağlamaktır. Bu durum, yüksek oranda üretim sağlayan bir suş seçildiğinde, yani kültürde ve proseye üretkenliğin artmasıyla elde edilebilir (Parekh vd., 2000). Bu uygulamalara yönelik çalışmalar arasında selülaz üretimi için suş geliştirmeye yönelik birçok çalışma mevcuttur. Homstake altın madeninin (Lead, South Dakota, ABD) derin alt tabakalarındaki selülaz üreten bakterileri tanımlamak için yapılan bir çalışmada, ortamın moleküler yapısını belirlemek ve selülaz üreten türlerin bulunduğu ailelerin var olup olmadığını analiz etmek için, tek bir karbon kaynağı olarak mikrokristalin selülozda zenginleştirme yapılmıştır. Ardından 16S rDNA / RNA'nın ekstraksiyonu ile analiz edilmiştir. Selülaz potansiyeline sahip suşlar, tek karbon kaynağı

olarak selüloz içeren ortamda, zenginleştirme kültüründen alt kültür hazırlanması yoluyla izole edilmiştir (Rastogi vd., 2009).

Ayrıca, selülaz aktivitesine yönelik araştırmalarında petri tarama yöntemleri bir ön şarttır. Mikrobiyal izolatlarda bakteriyel selülaz aktivitesi için tarama, yaygın olarak karboksimetilselüloz (CMC) içeren petriler üzerinde gerçekleştirilmektedir (Anagnostakis 1977). Bu yöntem hızlıdır, ancak hidroliz zonu kolayca ayırt edilemez. Kasana ve arkadaşları, hegzadesil trimetil amonyum bromür veya Kongo kırmızısı yerine yıkama için gram iodininin daha hızlı ve çok daha belirgin bir sonuç verdiğini tespit etmişlerdir (Kasana vd., 2008). Bununla birlikte, boyalar kullanılarak yapılan petri tarama yöntemleri, niceliksel olarak yeterince hassas değildir. Bu nedenle, daha yüksek hassasiyet ve nicelik kazanım sağlayan kısa selooligosakkaritler geliştirilmiştir. Floresein, resorufin ve 4-metilumbelliferon gibi pek çok örnek mevcuttur (Fia vd., 2005; Wittrup ve Bailey, 1988). Ancak floresan substratların agar plakalarına eklenmesinde önemli bir sınırlama bulunmaktadır. Hidroliz ürünleri yayılıma eğilimlidir ve bu nedenle bu tür bileşikler kolaylıkla kullanılamamaktadır. Günümüzde, petri analizlerinde mikrobiyal selülozik aktivitenin taranması için 2-4 (BTPG2-4) polimerizasyon derecesine sahip 2-(2'-benzothiazolyl)-fenil (BTP) selooligosakkaritler sentezlenmiştir (Ivanen vd., 2009). Bununla birlikte, bu yöntemler temel olarak kültürlenebilir selülaz üreten bakterilerle sınırlıdır. Araştırmacılar, ekstrem çevre koşullarında bulunan kültürlenemeyen mikroorganizmalardaki selülaz genlerinin tanımlanması ve kullanılması üzerine yoğunlaşmışlardır. İzole edilen enzimlerin çevresel koşullara karşı daha dirençli olmaları nedeniyle yenilikçi ve spesifik uygulamalarda kullanılabileceği umut edilmektedir.

Mevcut tüm türlerden yeni selülazları tanımlamak amacıyla, kültürlenebilir ve kültürlenemeyen türler için hızlı bir şekilde bir metagenomik klon kütüphanesi oluşturulmalı ve ardından işlevsel olarak taranmalıdır. Bu tekniğin en önemli özelliği işlevsel taramadır. Tarama, karboksimetil selüloz (CMC) gibi çözünebilir selüloz üzerinde aktiviteye sahip endoglukanazlar veya mikrokristalin selüloz üzerinde aktivite gösteren ekzoglukanazlar gibi spesifik bir enzimin izolasyonu için yapılabilir. Bu, geniş bir alanı taramak için hızlı ve etkili bir yöntemdir. Kristal ve çözünebilir selülaz aktivitesi için tarama yapılarak, kâğıt fabrikası atıklarından yeni selülaz üreten bakterilerin tanımlanması yakın zamanda uygulanmıştır (Duan vd., 2009; Xu vd., 2006).

2.3.4. Selülaazın Kullanım Alanları

Selülaazlar, çeşitli endüstrilerde geniş bir uygulama yelpazesine sahiptirler. Geleneksel olarak, gıda ve bira üretimi, hayvan yemi işleme, deterjan üretimi, tekstil işleme ve kâğıt hamuru imalatında uygulanmaktadırlar.

Kâğıt ve Kâğıt Hamuru Uygulamaları:

Kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, dünya çapındaki en büyük endüstrilerden biridir ve bir ülkenin ekonomik büyümesinde ayrılmaz bir rol oynamaktadır. Günümüzde, yenilenebilir kaynakların sürdürülebilir kullanımı üzerine kurulan yeni teknolojiler, kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinin yenilenmesi ve hızlı büyümesi için potansiyel fırsatlar sunmaktadır. Enzim biyoteknolojisi, kâğıt hamuru ve kâğıt hammaddelerinin kalitesini ve üretimini artırma, üretim maliyetlerini düşürme, faydalı ve / veya yeni yüksek değerli ürünler oluşturma ve çevre dostu olma potansiyeline ve geleneksel yöntemlerin/ kimyasalların kullanımına kıyasla daha yüksek verime sahiptir (Torres vd., 2011).

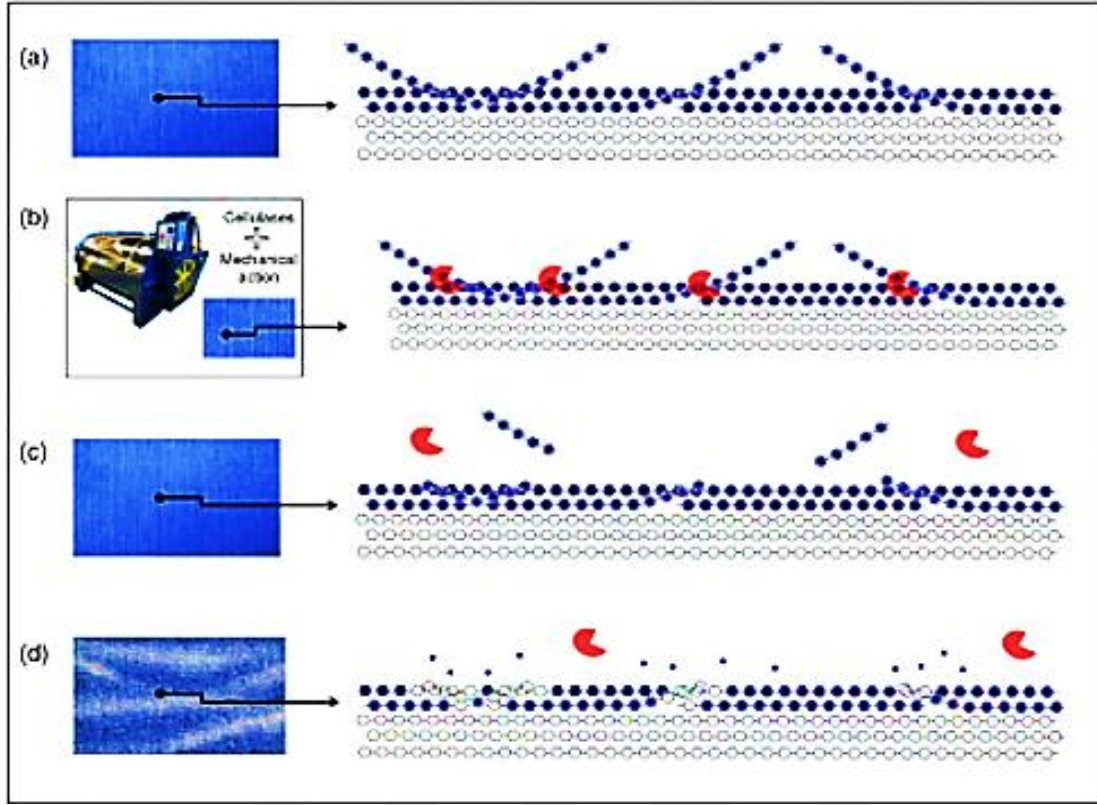
Tarihte enzimlerle yapılan ilk endüstriyel çalışmaların 1986'da yapıldığı söylene de kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisi üretim süreçlerinde enzimlerin kullanımı daha sonraki dönemlere aittir (Viikari vd., 1986). Moleküler biyoteknolojinin ortaya çıkışı, endüstriyel enzimler için güçlü sentezleme sistemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Selülaaz biyoteknolojisi, 1980'li yılların başında, önce hayvansal besinlerde, ardından da gıda uygulamalarında (Voragen vd., 1992), daha sonra tekstilde ve ayrıca kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde başlamıştır (Godfrey vd., 1996). Kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde selülaazların uygulanmasına yönelik ilgi son on yılda önemli ölçüde artmıştır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen selülaazlar geniş uygulama alanlarına sahip olmakla birlikte, prokaryotik selülaazlar tarafından üretilen selülotik enzimlerin karakterizasyonu için araştırmalar devam etmektedir. Bu hızlı gelişme sayesinde selülaazlar bugün kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisinde birçok uygulama için kullanılmaktadır. Kâğıt yapımı ve tekstil endüstrileri, selüloz hidrolizini sağlamak ve kâğıt ve kumaş özelliklerini iyileştirmek için selülaaz enziminin avantajlarından yararlanmaktadır.

Tekstil Endüstrisi Uygulamaları:

Tekstil işlemede kullanılan enzim teknolojisi, pamuklu kumaşın haşıl sökme işlemlerinde amilaz kullanılarak başlamış (Shah 2013) ve o zamandan beri birçok süreçte birtakım enzimler kullanılmıştır. Enzimatik işleme, kumaşların kalitesini arttırmak için uygulanan bir dizi mekanik ve kimyasal işlemleri değiştirebilmektedir (Gupta 2016). Tekstil ürünlerinin işlenmesi sırasında kimyasalların havaya, dolum alanlarına, suya bırakılması ve bu nedenle çevreyle ilgili endişelerin artması, enerji ve hammaddelerin tüketimi enzim uygulamalarının başlıca tetikleyicilerindendir (Araujo vd., 2008; O'Neill vd., 1999). Birkaç yıl içinde kumaş ıslatma üretim prosesinin, hukuki ve çevresel kısıtlamalarının ve tatlı su kaynaklarının azalan durumu nedeniyle daha ılımlı yöntemlere kaydırılması beklenmektedir. Tekstil endüstrilerindeki enzimatik uygulamalar sadece enerji, su ve kimyasallardan tasarruf ederek veya kaliteyi iyileştirerek iyi ekonomik durumu sağlamakla sınırlı kalmamakta, aynı zamanda bazı çevresel faydalar da sağlamaktadır. Devam eden gelişim ve iklim değişikliği bakımından çevresel önemin arttığı dönemde bu faydalar giderek daha da önem kazanmaktadır (Nielsen vd., 2009; Nierstrasz ve Warmoeskerken, 2003). Bu avantajlar, geleneksel yöntemlere kıyasla (Belghith vd., 2001) birim başına daha düşük veya benzer maliyetle elde edilmektedir. Tekstil endüstrisindeki biyolojik olarak geri dönüştürülebilir, çevre dostu ve cilt dostu kumaşlar ve giysiler için artan talep, selüloz iplikler için küresel pazara yönlendirmektedir. Son kullanılan endüstrilerde selüloz ipliklerin petrokimyasal ipliklerin yerini almaya yönelik değişimi, pazar büyümesini yönlendiren en önemli etkenlerden biri olmuştur (Gupta 2016). Yapılan bir piyasa araştırmasında küresel selüloz iplik pazarının 2018'e kadar 24,17 milyar ABD doları olması beklenmektedir (URL-2, 2017). Pazarın belirgin bir şekilde büyümesi nedeniyle, bu pazarda enzim uygulamaları da artmaktadır. ABD, Batı Avrupa, Japonya ve Kanada gibi gelişmiş ekonomilerdeki endüstriyel enzimlere olan talep, son zamanlarda nispeten istikrarlı bir seyir izlerken Asya-Pasifik, Doğu Avrupa, Afrika ve Orta Doğu bölgelerinin gelişmekte olan ekonomileri, endüstriyel enzimlerin en hızlı büyüyen pazarları haline gelmiştir. Birleşik Devletler ve Avrupa, toplu olarak dünya endüstriyel enzim pazarının önemli bir bölümünü yönetmektedir (Sarrouh vd., 2012).

Şekil 2.5'de (a) ham kot üzerindeki tüylerin (b) selülozlar kullanılarak kumaş yüzeyinden giderilmesi gösterilmiştir. Bu işlemten sonra kumaş daha pürüzsüz ve daha parlak bir görünüm kazanmaktadır. (c) Biosting ise mekanik çalkalamayla birlikte enzimatik



Şekil 2.5. Tekstil endüstrisinde selüloz uygulamalarına bazı örnekler (Gupta 2016)

etki ile boyaların uzaklaştırılmasını içeren bir süreçtir. (d) Boya uzaklaştırma işleminde de selülozlardan yararlanıldığı görülmektedir.

Tekstil endüstrisinde enzimlerin daha az tüy bırakan, daha yumuşak bir kumaş yüzeyi elde etmek için uygulamaları mevcuttur. Bu alandaki yapılan çalışmalar, pamuk, keten ve bunların sentetik liflerle harmanlanmış selüloz materyalleri üzerine enzimlerin uygulanmasına odaklanmıştır (Juciene vd., 2006). Bu bağlamda en fazla selüloz enzimleri incelenmiş ve bu enzimlerin uygulamaları tekstil endüstrisinde iyi bir şekilde uygulanmıştır. Selülozun kumaş ıslama işleminde kullanılabilir ve güvenilir bir yöntem olduğu ve gelecekteki beklenen gereksinimleri karşılamak için umut verici bir teknoloji olduğu kanıtlanmıştır. Selülozların en iyi bilinen uygulamaları, taşlamaya alternatif olarak kot giysi yıkama işleminde ve yüzey özelliklerini iyileştirmek için pamuklu kumaşların modifikasyonunda kullanılmasıdır (Heikinheimo vd., 2003).

Selülaazlar, kumaşların kalitesini arttırmak için selüloz iplikleri kontrollü ve istenen bir şekilde iyileştirebilme yetenekleri nedeniyle tekstil alanında dünya çapındaki başarısını kanıtlamıştır (Bhat 2000). Selülaazlar ayrıca yıkama ürünlerinde deterjan etkisine yardımcı olmak ve lif yüzeylerini temizlemek, parlaklık ve renk bakımından görünümünü iyileştirmek için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Cavaco-Paulo, 1998).

Bu enzim grubunun çeşitli sıcaklık ve pH aralığındaki enzimatik aktivitelerin stabilitesi ve ağır reaksiyon koşulları gibi bazı özellikleri, ticari ve endüstriyel uygulamalarda kilit önem taşımaktadır. Endüstriyel selülaaz uygulamaları için sadece katabolik sürecin ayrıntılarını değil aynı zamanda substrat üzerinde etkili enzim konsantrasyonunu arttırarak kristalin selüloz yapısının parçalanması için gerekli olan karbonhidrat bağlayıcı etki alanı (CBD) (Reyes-Ortiz vd., 2013), gibi yardımcı kısımların fonksiyonunu anlamak da kritik önem taşımaktadır (Arumugam vd., 2007).

Çeşitli selülozik mikroorganizmalardan elde edilen selülaazlar genellikle endoglukanazlar, sellobiyohidrolazlar ve β -glukozidazların bir karışımıdır. Bütün bu enzimler, reaksiyon esnasında kristal halindeki selülozun verimli bir şekilde parçalanması için birlikte etki etmelidir. Bu nedenle, biyolojik olarak kotların taşlanması ve biyolojik parlatma da dahil olmak üzere tekstil endüstrisinin farklı süreçlerinin optimizasyonu, endoglukanazların, sellobiyohidrolazların ve β -glukozidazların sinerjik etkisini gerektirmektedir.

Biyoyakıt Endüstrisinde Selülaaz Uygulamaları:

Henri Braconnot, 1819 yılında selülaazın, selülozdan şekeri oluşturduğunu keşfetmiştir. Bunu, etanol üretmek için biyokütleyi fermente edilebilen sülfürik asitle muamele ederek yapmıştır. Yirminci yüzyılın son yıllarında enzim teknolojisinin hızlı bir şekilde gelişmesiyle, başlangıçta kullanılan asit hidroliz işlemi yerini yavaş yavaş enzimatik hidrolize bırakmıştır. Hammaddedeki hemiselülozu ön hidrolize etmek (ayırarak) için kimyasal yerine selülaaz kullanımı, şekerlere dönüşümde daha etkili bir yöntemdir (Gupta 2016).

Şarapta ve Bira Sanayi Uygulamaları:

Enzim teknolojisi ve özellikle selülaazlar, şarap ve bira üretiminde önemli avantajlar sağlamaktadır.

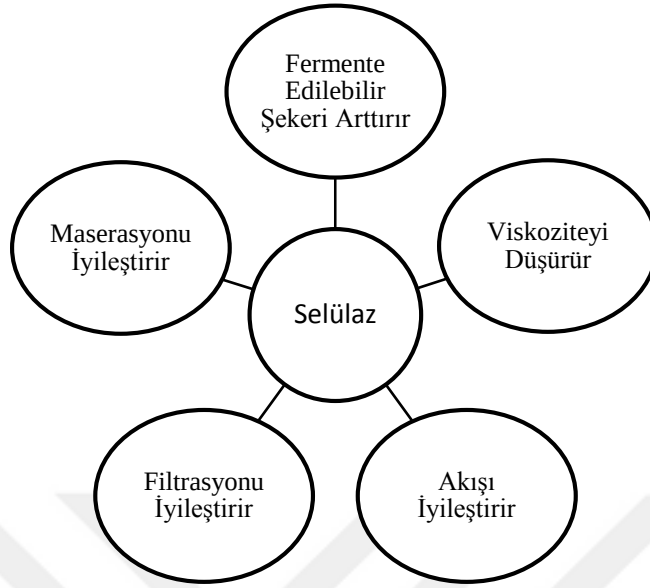
Bira Endüstrisinde Selülozların Rolü:

Tahıl ekstraktlarının fermantasyonu ile alkollü içeceklerin üretimi çok eskilere dayanmaktadır. Bira üretim faaliyetlerinin izleri Babil zamanlarına kadar uzanmaktadır. Bununla birlikte, ezilmiş üzümlerden veya diğer meyvelerden yapılan şarapların aksine, mayalara gerekli fermente edilebilir substratları ve besinleri sağlayacak tahıllarla fermantasyon süreci birbirinden farklıdır (Galante vd., 1998).

Bira geleneksel olarak malt, şerbetçiotu, maya ve sudan yapılmaktadır. Ancak demleme teknolojisi, büyük ölçüde malt ve fermantasyon sırasında aktive edilen enzimlerin etkisine dayanmaktadır (Harman vd., 1998). Uygulama için α ve β -amilazlar, peptidazlar ve β -glukanazlar olmak üzere dört ana kategoride enzime ihtiyaç vardır. Kullanılan enzimlerin hepsi sinerji içinde ve en uygun seviyede etki etmelidir (Bamforth 1994).

Selülozların bira sanayinde, filtrelenebilirliği ve jel oluşumunun önlenmesi ve malt ekstraksiyonunun iyileştirilmesi gibi birçok görevi vardır (Şekil 2.6). Scheffler ve Bamforth (2005), β -glukanaz ilavesinin viskoziteyi düşürdüğünü ve malt ekstraksiyonunu arttırdığını bildirmiştir. Kullanılan enzim, β -glukanların glukozidik bağlarını bölerek düşük viskoziteli daha kısa polimerler üretmektedir. Bira üretiminde kullanılan β -glukanazlar yaygın olarak *Penicillium emersonii*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* veya *T. reesei*'den üretilmektedir.

Yapılan bir çalışmada, ticari bir selüloz ilavesinin β -glukan içeriğinde %90 azalma ve filtrasyon süresinde %30'a kadar bir düşme olduğu gösterilmiştir. Arpa bitkileri arasındaki mevsimsel farklılıklara bakılmaksızın, maltlanmada selülozların kullanılması, maltın kalitesini arttırmaktadır. Ayrıca bira üretiminin verimi ve fermantasyon oranı da artmaktadır. Enzim, hücre çeperi yapısını büyük oranda etkileyerek eklenen gibberellik asidin tahıla nüfuzunu arttırmakta ve böylece endojen hidrolitik enzimlerin sentezini hızlandırmaktadır (Hattingh vd., 2014). Dolayısıyla, selülozlar bira fabrikalarında verimli işleme için iyi bir yardımcıdır.

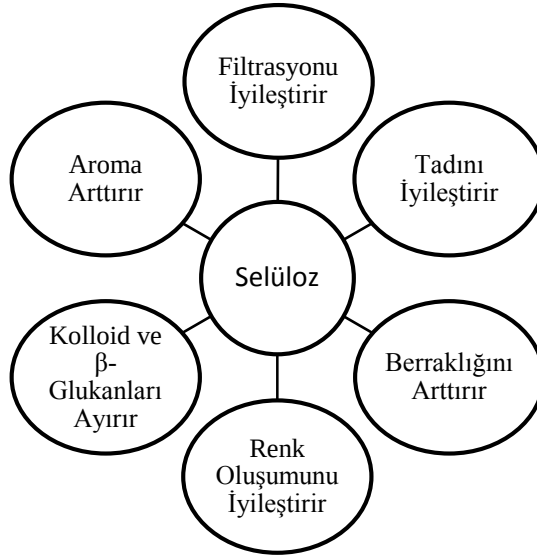


Şekil 2.6. Bira endüstrisinde selülazların rolü (Gupta 2016).

Şarap Endüstrisinde Selülazların Rolü:

Şarap imalatında yüksek kaliteli bir ürün elde etmek için, maya fermentasyonu ve enzim kullanımı önemli biyoteknolojik işlemlerdir. Şarap yapımında selülazlar, hemiselülazlar ve pektinazların kullanımı, iyi bir kabuk ıslamada ve özellikle kırmızı şarap üretiminde üstün kırmızı renk oluşumunda önemlidir. Buna ek olarak, bu enzimlerin kullanımı berraklaştırmayı, filtrasyonu ve şarabın genel kalitesini ve kalıcılığını arttırır (Galante vd., 1998). Selülazların şarap üretiminde rolü çok büyüktür (Şekil 2.7). Şarap yapımında, daha kısa süre içinde meyve sıvılaşması gerçekleştiği ve hücrelerde daha iyi bir parçalanma gerçekleştirdiği için pektinazların yerine selülaz ve hemiselülazlar tercih edilmektedir (Romero-Cascales vd., 2012).

Maserasyon enzim karışımının üzüm işlemede tek başına pektinazlardan daha iyi olduğu gösterilmiştir (Haight ve Gump, 1994). Galante ve diğerleri (1998), Kuzey İtalya'daki beyaz üzümün üç çeşidini (Soave, Chardonnay ve Sauvignon) kullanarak şarap yapımında Cytolase 219'un (*Trichoderma* ve *Aspergillus*'tan türetilen ve pektinaz, selülaz ve hemiselülaz içeren ticari bir enzim preparatı) aktivitesini incelemiştir. Şarabın ekstraksiyonunda %10-35, filtreleme hızında %70-180 artış, şarap stabilitesinde önemli



Şekil 2.7. Şarap endüstrisinde selülaazların rolü (Gupta 2016).

iyileşme, presleme süresinde 50-120 dk düşme, viskozitede %30-70 azalma ve fermentörlerin soğutulması sırasında %20-40 enerji tasarrufu sağlanmıştır. Üzüm preslenebilirliği, çökelme hızı ve toplam meyve suyu verimi bakımından belirgin ve tekrarlanabilir gelişmeler, maserasyon enzimlerinin bir kombinasyonu kullanılarak elde edilmiştir (Harbord vd., 1990).

Gıda Alanında Uygulamaları:

Gıda endüstrisinde kullanılan ve toplu olarak maserasyon enzimler olarak bilinen diğer enzimler (ksilanazlar ve pektinazlar) ile kombinasyon halindeki selülaazlar meyve ve sebze sularının verimlerini arttırmak için ekstraksiyon ve berraklaştırmada kullanılmaktadır (Juturu ve Wu, 2014). Macerasyon enzimleri genelde presten sonra, meyve hamurunu kısmen veya tamamen sıvılaştırdığı için meyve suyu verimini arttırıp, işleme süresini azaltmakta ve önemli meyve bileşenlerinin ekstraksiyonunu geliştirmektedir. Bu nedenle, ağırlıklı olarak selülaaz ve pektinazdan oluşan maserasyon enzimler, gıda biyoteknolojisinde önemli role sahiptir. Birçok sağlık uygulaması nedeniyle dünya pazarında dikkat çeken, zeytinyağı ekstraksiyonu da dâhil olmak üzere çok çeşitli meyve ve sebzelerden meyve suyu çıkarılması için bu enzimlere olan talep artmıştır. Buna ek olarak, pektinazların ve β -glukozidazların eklenmesi, belirli meyve ve sebzelerin aromasını da arttırmaktadır (Karmakar ve Ray, 2011). Selülaazın diğer kullanım amaçları, üzüm maltlanmasını ve ezilmesini, preslenmesini ve renk özütlenmesini arttırmak, antioksidanların meyve ve sebze

posasından salınmasını sağlamak, nişasta ve protein ekstraksiyonundaki verimi iyileştirmek, fırın ürünlerinin dokusunu ve kalitesini iyileştirmek, meyve pürelerinin viskozitesini iyileştirmek ve narenciyelerin acılık kontrolünü sağlamak olarak sıralanabilir (Kuhad vd., 2011). Bu enzimlerin kullanımı, ek sermaye yatırımı olmaksızın verim ve proses performansını arttırmaktadır (Karmakar ve Ray, 2011; Kuhad vd., 2011).

Zeytin Yağının İşletmelerindeki Uygulamaları:

Zeytin meyvesinde doğal olarak mevcut olan yağın ekstraksiyonunu arttırmak için enzimler kullanılmaktadır (De Faveri vd., 2008). Maserasyon enzimlerin kullanımı, sızma zeytinyağında artan antioksidan ve E vitamini, azalan asitleşme gibi bir dizi avantajlar sağlamaktadır (Galante vd., 1998; Kuhad vd., 2011). Ayrıca zeytinyağlarında enzimlerin kullanılması karotenoidlerin, vitamin E'nin ve fenolik bileşiklerin gelişimini arttırmakta ve sonuç olarak, lipid oksidasyon sürecinin inhibisyonu iyileştirerek çürümeyi geciktirmektedir. Buda ürünlerde daha iyi kalite ve uzun raf ömrü sağlamaktadır.

Sharma vd. (2007) zeytinyağının kalitesini ve verimini artırmak için selüloz ve pektinaz kombinasyonunu kullandıklarında maksimum yağ geri kazanımını elde etmişlerdir. Ayrıca elde edilen bu yağ, yüksek miktarda doğal antioksidan ve daha az peroksit ve serbest yağ asidi içermiştir.

De Faveri vd. (2008) enzimler (selüloz, pektinaz ve hemiselüloz) ile muamele edildikten sonra zeytinyağının fenolik içeriğini incelemiş ve içeriğin arttığını saptamışlardır.

Aliakbarian vd. (2008) zeytinyağı ekstraksiyonunu, selüloz, pektinaz ve hemiselülozu içeren preparatlar kullanılarak optimize etmişlerdir. Bu araştırmacılar, antioksidan ve toplam polifenollerin ve o-difenollerin en yüksek enzim konsantrasyonlarında elde edildiğini gözlemlemişlerdir.

Hadj-Taieb vd. (2012) yeşil ve siyah zeytinlerden yağ üretim verimi ve kalitesine selüloz, ksilanaz ve pektinaz içeren farklı enzimatik formülasyonların etkisini araştırmışlardır. Her iki zeytin çeşidinde verimin %1,5 arttığını belirlemişlerdir.

Sharma vd. (2015) zeytinyağının kalitesini arttırmak için selüloz ve pektinazın kombinasyon halinde veya tek başına etkinliğini değerlendirmiş ve işlenmiş yağın, berraklığının ve veriminin arttırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, daha yüksek yağ geri

kazanımı ve toplam fenollerin enzimle muamele edilmemiş yağlarla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.

Deterjan Endüstrisi Uygulamaları:

Son yıllarda deterjan endüstrisinde, deterjan bileşimlerine selüloz, lipaz ve proteaz içeren enzim ilavesi izlenen yeni bir eğilimdir (Kuhad vd., 2011). Deterjan bileşiminde bulunan alkalın selülozlar, interfibril alanlardan kolayca geçebilir ve lekelerin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına yardımcı olabilirler. Ek olarak, selülozlar selülozik ipliklere, tekrarlanan yıkamalardan sonra bile renk parlaklığı ve pürüzsüzlüğü kazandırır (Karmakar ve Ray, 2011; Kuhad vd., 2011).

Hayvan Yemi Endüstrisi Uygulamaları:

Hemiselülozların yanı sıra selülozlar, hayvan yemlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Besleme işlemi sırasında yemlere enzimlerin eklenmesi, silajda bulunan selüloz ve hemiselüloz bileşenlerinin kısmen hidrolize edilmesini, tahıl tanelerinin çıkarılmasını ve beslemelerin daha iyi emülsiyon haline getirilmesini sağlamaktadır. Hayvanların sindirim sistemine girdikten sonra kısmen sindirilmiş yem, daha fazla besin oluşturarak hayvanların daha iyi bir şekilde büyümesini sağlamaya yardımcı olmaktadır (Jacobs ve Mcallan, 1991; Krause vd., 1998).

Biyo-Rafineri Uygulamaları:

Günümüzde yenilenebilir biyokütle hammaddelerinden katma değerli kimyasallar ve biyoyakıt üretimi dünya çapında üzerinde çalışılan bir konudur. Fermente edilebilir şekerler üretmek için bitki biyokütlesinin parçalanması ön şartlardan biridir. Biyokütlenin biyolojik olarak ön arıtılması daha çevreci özelliklere ve birçok avantaja sahiptir (Agbor vd., 2011). Selülozların bu bağlamda etkileri büyük önem taşımaktadır.

Bakteri Biyofilminin Çıkarılması Uygulamaları:

Bakteri hücreleri, inert bir yüzeye uzun süre bağlanırken, yapışkan hücre dışı polisakkaritleri (EPS) salgırlar. EPS, büyüyen bir biyofilm oluşturan mevcut bakteri hücrelerinin büyümesi ve bölünmesi için bir matris geliştirmektedir. Bu bakteri biyofilminden kurtulmak için karbonhidrat parçalayıcı enzimlerin kullanımı mevcuttur (Orgaz vd., 2006).

2.4. Selülag Enzimi Üreten Suş İzolasyonu Konusunda Önceki Çalışmalar

Ram vd. (2014) topraktan elde ettikleri 21 mantar izolatının 4 tanesinin selülag aktivitesi gösterdiğini ve PISS-3 olarak adlandırılan izolatın ise karboksimetil selülag içeren petrilere maksimum hidroliz zonu gösterdiğini belirlemişlerdir.

Trinh vd. (2013) NDVN01 suşunu tanımlayıp ve ayrıca sıvı hal fermentasyonunda bu suş tarafından CMCaz üretimi için kültür koşullarının ve ortam bileşenlerin optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu optimum koşullar altında, *Peniophora* sp. NDVN01 kültür süpernatantının her ml'si için $24,65 \pm 0,37$ birim CMCaz ürettiğini, ve bunun optimizasyon öncesindeki miktardan ($2,87 \pm 0,28$ U.ml⁻¹) 8,6 kat daha yüksek olduğunu açıklamışlardır. *Peniophora* sp. NDVN01 tarafından maksimum CMCaz üretimini 28 °C'de, ilk ortam pH'sı 7,0 ve 120 saat içinde, ek karbon kaynağı olarak %80 (v/v) patates ve %0,6 (w/v) pirinç samanı ve ilave bir azot kaynağı olarak %0,2 (w/v) amonyum hidrojen fosfat ve indüktör olarak %0,5 (w/v) küspe içeren optimum ortamda elde edildiği belirtilmektedir.

Prasad vd. (2011) belediye atıklarından izole ettikleri tüm izolatlar arasında Kongo kırmızısı testi temeline dayanarak daha büyük bir hidroliz zonu sergilediğinden, selülotik aktiviteler için *Streptomyces albospinus* (MTCC No. 8768) ve *Streptomyces somaliensis* (MTCC No. 8769) suşlarını seçmişlerdir. Seçilen suşlardan *S. albospinus*'da (MTCC No. 8768), ekzoglukanaz miktarı 6. günden itibaren 3,20'den 0,51'e (selülag ünitelerinde), endoglukanaz miktarı 4. günden 1,87'den 0,99'a (selülag ünitelerinde) azalırken, *S. Somaliensis*'da (MTCC No: 8769), ekzoglukanaz üretimi, 6. günden itibaren 2,33'ten 0,54'e (selülag ünitelerinde), hidroliz ilerledikçe endoglukanazlarda 4. günden 1,67'den 0,31'e kadar düştüğünü gözlemlemişlerdir. Ayrıca, *S. albospinus* suşu (MTCC No. 8768) tarafından salgılanan selülagların toplamının, *S. Somaliensis*'in (MTCC No. 8769) salgıladığı miktarın üzerinde olduğunu ortaya koymuşlardır.

Ijaz vd. (2011) mısır koçanı gibi bol miktarda bulunan tarımsal atıkları kullanarak selülag üretmeyi amaçlamış, bu amaçla mısır koçanı ile *Alternaria alternata*'yı katı hal fermentasyonu ile kültür ederek enzim üretim koşullarını optimize etmişlerdir. Selülag üretimi için farklı inkübasyon süresi (1-7 gün), farklı sıcaklık (25, 30, 35 ve 40 °C) ve pH

(3,0-9,0) deneyip, optimum kültür şartlarını 35 °C ve pH 6,0'da 96 saat inkübasyon olarak belirlemişlerdir.

Deka vd. (2011) *Bacillus subtilis* AS3 suşunun selülaaz aktivitesini, ortam bileşenlerini istatistiksel yöntemlerle optimize ederek belirlemişlerdir. Ortam bileşenlerini optimal konsantrasyon seviyelerini CMC (%1,8), pepton (%0,8) ve maya özütü (%0,479) olarak saptamışlardır.

Irfan vd. (2012) topraktan izole ettikleri *Cellulomonas* sp. ASN2 suşunun enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklığı 7,5 ve 60 °C olarak tespit etmişlerdir. Enzim sentezinde Co^{2+} ve Mn^{2+} 'nin güçlü uyarıcılar olduğunu, buna karşın Hg^{2+} ve Fe^{2+} 'nin selülozik bakteri kökenli *Cellulomonas* sp. ASN2'nin selülaaz aktivitesini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır.

Hussain vd. (2017) topraktan izole ettikleri *B. amyloliquefaciens* SA5, *B. subtilis* BTN7A, *B. Megaterium* BMS4 ve *A. Flavithermus* BTN7B suşları için selülaaz üretim koşullarını optimize etmişlerdir. *B. Amyloliquefaciens* SA5, *B. Subtilis* BTN7A ve *B. Megaterium* BMS4 için optimum koşullar, çalkalamalı ortamda, pH 7,0'da 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra süzkroz tek karbon kaynağı olarak kullanıldığında elde edilmiştir. *A. Flavithermus* BTN7B ise statik koşullar altında, 24 veya 48 saat inkübasyon süresinden sonra pH 7,0'da ve süzkroz tek karbon kaynağı olarak kullanıldığında tespit edilmiştir.

Shajahan vd. (2016) Maharashtra, Hindistan batı kıyısı sıcak su kaynağından izole ettikleri *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 suşunun optimum üretim koşullarını 19,21 g/l CMC, 25,06 mg/l CaCl_2 , 2,96 ml/l Tween-20 ve 43,35 °C sıcaklık değeri olarak tespit etmişlerdir. Yüksek miktarda selülaaz üretimini (42,99 IU/ml), optimum koşullar altında 7 litre ölçekli biyolojik fermentörde gerçekleştirmişlerdir.

Padilha vd. (2015) termofilik *Bacillus* sp. C1AC5507 suşundan selülaaz üretimi ve karakterizasyonunu incelemişlerdir. Enzim üretimi için şeker kamışı küspesini karbon kaynağı olarak kullanmışlar, CMCaz üretimi için optimum sıcaklık ve pH'yı sırasıyla 70 °C ve 7,0 olarak tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesinin çoğunlukla Cu^{+2} tarafından inhibe ve Co^{+2} , Mn^{2+} , Ca^{+2} ve Fe^{+3} tarafından aktive olduğunu gözlemlemişlerdir.

Hakamada vd. (1997) Japonya'da topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. KSM-S237 suşundan üretilen enzimin en yüksek aktivitesinin pH değeri 8,6-9,0 ve 45 °C sıcaklıkta

olduğunu gözlemlemişlerdir. Alkalın enzimin 50 °C'ye kadar stabil olduğunu ve 100 °C'de ve pH 9,0'da 10 dakika ısıtıldıktan sonra başlangıçtaki aktivitenin %30'undan fazlasını koruduğunu saptamışlardır.

Li vd. (2008b) kaplıcadan yüksek selüloz aktivitesi gösteren bir bakteri türünü (0,26 U/ml kültür ortamı) izole etmişler, morfolojik ve 16S rDNA gen dizisi analizi ile bu bakteri türünü *B. Subtilis DR* olarak isimlendirmişlerdir. Termotabil bir endoselüloz olan CelDR'i izole ettikleri suştan saflaştırmışlar ve enzim reaksiyonunun optimum sıcaklığını 50 °C olarak belirlemişlerdir. CelDR'nin 75 °C'de 30 dakika inkübasyondan sonra maksimum aktivitesinin %70'ini koruduğunu saptamışlardır.

Topuz vd. (2007) toprak örneklerinden selüloz enzim üreticisi olan 42 *Bacillus* suşu izole etmiş, izolasyonu yapılan suşların, ürettiği sıcaklık ve pH aralıkları, enzim üretme yeteneği ve enzim sentezinin gerçekleştiği sıcaklık ve pH aralıkları bakımından en iyi sonucu veren *Bacillus* B23 suşunu seçmişlerdir. En yüksek selüloz üretiminin 42 °C'de ve pH 8,5'de gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir.

Sadhu vd. (2014) inek gübresinden izole ettikleri bakteriyel C1 suşunun, selüloz üretimi için en iyi karbon kaynağının CMC olduğunu saptamışlardır. Maksimum enzim üretimini *Bacillus* sp. tarafından 50 °C sıcaklıkta, büyümenin 8. gününde ve pH 7,0 ile gerçekleştirmişlerdir.

Trivedi vd. (2011) *Ulva lactuca*'dan izole ettikleri *Bacillus flexus* NT suşunu enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 10 ve 45 °C olarak tespit etmişlerdir. Enzimin 9,0-12,0 aralığındaki yüksek pH aralığında bile stabil olduğu belirlemişler ve %15 NaCl konsantrasyonunda da aktivitesinin yaklaşık %70'ini koruduğunu saptamışlardır.

Saratale vd. (2014) izole ettikleri dört selülozik mikroorganizma arasından *Streptomyces* sp. MDS selülozünün, 90 °C'de ve pH 5,0'da %60-70 ve pH 10 ve 40 °C ve 60 °C'de (endoglukanaz için) 1 saatlik inkübasyondan sonra %55-60'dan daha fazla aktivitelerini korumalarıyla alkalotoleransını ve yüksek termal stabilitesini ortaya koymuşlardır. Enzimin aynı zamanda 1 saat süreyle ticari deterjan varlığındaki inkübasyonu ile başlangıçtaki aktivitesinin %50-70'i kadarını koruduğunu gözlemlemişlerdir.

Dar vd. (2015) Afrika salyangozunun mide bağırsak sistemi olan *Achatina fulica*'dan selüloz parçalayan bakterileri izole etmiş ve 16S rDNA uygulamaları ve dizilimi ile tanımlamışlardır. Bu izolatların 18'inde selüloz aktivitesini gözlemleyip; *Bacillus*,

Achromobacter chrobactrum ve *Klebsiella*'nın türleri olarak tespit etmişlerdir. *Ochrobactrum* sp. K38 olarak tanımlanan izolatin, 14 günlük inkübasyondan sonra en yüksek CMCaz aktivitesi (501,75 IU/ml ekstrakt) sergilediğini saptamışlardır.

Tachaapaikoon vd. (2012) termofilik selülozik suşları, ağırlıklı olarak Taylve'daki tarım kalıntılarından elde edilen 800'den fazla örnekten, karbon kaynağı olarak da mikrokristalin selüloz kullanarak taramışlardır. Yüksek selüloz parçalama kabiliyetine sahip olan yeni suş *C. thermocellum* 14'ü, kağıt posası çamurundan izole etmişlerdir.

Paudel ve Qin (2015), çürüyen odun örneklerinden izole ettikleri suşun 16S rDNA sekans analizine dayanarak *Bacillus* sp. olduğunu saptamışlardır. Bu suş, azot kaynağı olarak pepton (%1) varlığında pH 6,0 ve 50 °C'de maksimum CMCaz sentezi göstermiştir. *Bacillus* sp. K1'in CMCaz aktivitesinin, fermantasyon sırasında karbon kaynağı olarak laktoz kullanıldığında yüksek oranda indüklendiğini tespit etmişlerdir.

Korpole vd. (2011) 10 yıl boyunca işletilen bir çöp sahasının depolama alanının 3 ve 5 fit derinliklerinden elde ettikleri pek çok izolat arasından 22 bakteri türünü, karboksimetil selülozu (CMC) parçalama kabiliyetlerine dayanarak seçmişlerdir. Tüm izolatlar, optimum büyümesi pH 9-10 olan alkalofilik bakterileri oluşturan gram pozitif endosporlar olarak belirlenmiştir. 16S rRNA geninin analizi, bu suşların *Bacillus* cinsinin farklı türlerine ait olduğunu göstermiştir. 50 °C'de elde edilen LFC15 suşunun maksimum CMCaz aktivitesinin, 4,8 U/ml olduğunu ve çalışmadaki sonuçlar ile çöp sahası gibi arazi ekosistemlerinin endüstriyel olarak önemli mikroorganizmaların izolasyonu için potansiyel olduğunu göstermişlerdir.

Gaur ve Tiwari (2015), toprak örneklerinden izole ettikleri suşun 16S rDNA sekans analizi ile *Bacillus vallismortis* RG-07 olarak tanımlamışlardır. *Bacillus vallismortis* RG-07'nin, karbon kaynağı olarak tarımsal atık olan şeker kamışı küspesini kullanarak (4105 Uml⁻¹) maksimum selülaz üretimi sergilediğini gözlemlemişlerdir. *Bacillus* sp. tarafından üretilen selülaz enziminin, toplam %28,8'lik geri kazanım ile (NH₄)₂SO₄ çöktürme, iyon değiştirme ve jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılmasını yapmışlardır. Saflaştırılmış selülazın moleküler ağırlığı SDS-PAGE ve aktivite jel analizi ile 80 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesi için optimum sıcaklığı 65 °C ve pH'ı 7,0 olarak belirlemişlerdir. Enzim aktivitesinin ayrıca Ca²⁺ merkaptotanol, Tween-60 ve Sodyum

hipoklorür tarafından artarken, Hg tarafından son derece inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir.

Ferbiyanto vd. (2015) dört selülotik bakteri izolatını aerobik ve anaerobik koşullar altında *M. gilvus* bağırsağından izole etmişlerdir. En yüksek selülozik aktivite değerinin RA2 tarafından meydana geldiğini belirlemişlerdir. RU4 ve RA2 izolatlarının 16S rRNA gen dizilerinin BLAST-N sonucuna göre sırasıyla *Bacillus megaterium* ve *Paracoccus yeei* ile benzerliği olduğunu göstermişlerdir.

Aygan vd. (2013) Van Gölü topraklarından izole ettikleri halofilik alkalın *Bacillus licheniformis*'ten endoglukanazı saflaştırmışlardır. *B. licheniformis* C108 tarafından üretilen endoglukanazın optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 10,0 ve 30 °C olarak belirlemişlerdir. Enzimin, pH 10,0'da 100 °C'ye kadar oldukça kararlılık gösterdiğini ve %7-10 NaCl konsantrasyonunda 6 saat süreyle tam aktivitesini koruduğunu saptamışlardır. Enzim aktivitesinin sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100, çinko klorür ($ZnCl_2$), fenilmetansülfonil florür (PMSF) ve üre tarafından önemli derecede inhibe edildiğini gözlemlemişlerdir. Kısmen saflaştırılmış enzimin, karboksimetil selülozun hidroliz ürünleri; glukoz, sellobiyoz ve diğer uzun selooligosakkaritleri açığa çıkardığını tespit etmişlerdir.

Yaptığımız bu çalışmada, toprak ve su kaynaklarından elde edilen selülaz üreticisi suşları tanımlayarak, elde edilen enzimin optimal kültür koşullarını belirlemek amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada araştırılacak suşlar, Fırat Üniversitesi Mühendislik Kampüsü'ü ve Pertek (Tunceli) mevkiinden alınan toprak ve su örnekleri kullanılarak izole edilmiştir. Örnekler, 250 ml'lik steril vida kapaklı cam şişelerde toplanmış ve bir buz kutusu içerisinde muhafaza edilerek zaman kaybetmeden laboratuvara getirilmiştir.

3.1.1. Bakteri İzolasyonunda ve Teşhisinde Kullanılan Besiyerleri

Selülaz enzim üreten suş izolasyonu, elde edilen suşların enzim üretim kapasitesinin araştırılması ve kültürün saklanması için kullanılan besiyerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deneyde kullanılan bakterilerin ön ekim, izolasyon, saklama ve enzim üretiminde kullanılan besiyerleri.

Besiyeri Bileşimleri	Ön Ekim Besiyeri (g/l) (Saraçoğlu 2010)	Bakteri İzolasyon ve Kültür Saklama Besiyeri (g/l) (Saraçoğlu 2010)	Enzim Üretim Besiyeri(Katı) (g/l) (Sambrook ve Russell 2001)	Enzim Üretim Besiyeri(Sıvı) (g/l) (Sambrook ve Russell 2001)
Trypton			10	10
Bakto Pepton	10	10		
Glukoz	1	1		
Et Ekstrakt	10	10		
CMC			10	10
Maya Ekstrakt	5	5	5	5
NaCl			5	5
Agar		15	15	

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

NaOH çözeltileri, besiyerlerinin pH'sını ayarlamak için 1 N, DNS çözeltisi hazırlamak için ise 2 N konsantrasyonlarda olmak üzere iki farklı derişimde hazırlanmıştır. Bunun için sırasıyla 40 ve 80 g NaOH tartılarak 1 L'lik balon jojelerde distile suda çözülmüştür.

Kongo kırmızısı (%0,1), katı besiyerindeki selülaç aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 0,1 g Kongo kırmızısı 100 ml'lik balon jojede distile suda çözülecek hazırlanmıştır (Voget vd., 2006).

NaCl çözeltisi (1 M), selülaç aktivitesini belirlemek amacıyla Kongo kırmızısı ile boyanan petrilere boyanın uzaklaştırılması için kullanılmıştır (Voget vd., 2006). 1 M konsantrasyonundaki NaCl çözeltisi, 58,5 g NaCl tartılarak 1 L'lik balon jojede distile su ile çözülmüştür.

Dinitrosalisilik asit çözeltisi (DNS), enzim aktivitesi sonucu açığa çıkan indirgen şeker miktarını belirlemek amacı ile kullanılmıştır. 1g DNS 50 ml distile su içerisinde çözülecek, üzerine 30 g K-Na-Tartarat ve 20 ml 2N NaOH ilave edilmiş ve son hacim bir balon jojede 100 ml'ye tamamlanmıştır (Miller 1959).

CMC (%2) çözeltisi, kullanımından 1 gece önce 2 g CMC tartılarak 100 ml'lik balon jojede pH'ı 4,8 olan sitrat tamponunda 150 rpm çalkalama hızında karıştırılarak hazırlanmıştır.

0,5 M Na₂CO₃ çözeltisi, 5,3 g Na₂CO₃ tartılarak 100 ml'lik balon jojede distile suda çözülecek hazırlanmıştır.

Kazein çözeltisi (%0,6), proteaz enzim aktivitesinin ölçümü için substrat olarak kullanılmıştır. Bunun için 0,3 g kazein, 50 ml 50 mM pH 7,5 Tris-HCl ile ısı yardımıyla çözdürülerek hazırlanmıştır.

50 mM Tris-HCl için, 6,057 g Tris tartılarak, 1 L'lik balon jojede distile su ile çözülmüştür. HCl ile istenilen pH'ya ayarlanmıştır.

TCA çözeltisi, proteaz enzim aktivitesinin belirlenmesi esnasında, reaksiyonu sonlandırmak ve tirozinin serbestleşmesini sağlamak amacıyla belirlenmiştir. 1,798 g TCA,

2,99 g Na-asetat ve 1,88 ml asetik asit 250 ml'lik balon jojede distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

%3'lük H₂O₂ çözeltisi, katalaz testinde kullanılmak üzere %30'luk H₂O₂'den 1 ml alınıp, üzerine 9 ml distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.

Folin ciocalteu çözeltisi (%50), ticari olarak alınan folin ciocalteu ayıracından 50 ml alınarak 100 ml'lik bolon jojede distile su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.1.3. Kullanılan Boyalar

Hücre morfolojisinin belirlenmesi amacıyla kullanılan boyalar Tablo 3.2'de verilmiştir. Kristal viyole çözeltisi, Gram boyama metodunda kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bu çözeltisi için, çözelti A ve B karıştırılarak distile su ile 1:10 oranında seyreltilip filtre kâğıdından süzölmüştür. Safranin ise etil alkolde çözüldükten sonra su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. Gram ve endospor boyama için kullanılan boya çözeltileri (Özşahin 2006).

	Kristal viyole çözeltisi		Safranin	Lügel çözeltisi	Malahit yeşili
	Çözelti A	Çözelti B	çözeltisi		çözeltisi
Kristal Viyole (g)	2				
Etil alkol (%95)(ml)	10		10		
Amonyum Oksalat (g)		0.8			
Distile Su (ml)		80	100	100	100
Safranin (g)			0.25		
İyot (g)				5	
Potasyum iyodür (g)				10	
Malahit yeşili (g)					5

3.1.4. Mikroorganizma için Morfolojik ve Biyokimyasal Testlerde Kullanılan Besiyerleri

İzolasyonu yapılan bakterinin morfolojik ve biyokimyasal testleri için kullanılan ortamlardan, Gram boyama, spor oluşumu ve katalaz testi için büyüme ortamı, pepton (10g/l), maya ekstraktı (5g/l) ve NaCl (10g/l); indol testi için büyüme ortamı, tripton (20g/l) ve NaCl (5g/l) ve sitrat testi için büyüme ortamı (Kuzu 2008) ise $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1 g/l), K_2HPO_4 (1 g/l), sodyum sitrat (2 g/l), MgSO_4 (0,2 g/l), NaCl (5 g/l), Agar (15 g/l), bromtimol mavisi(0,08 g/l) içermektedir.

3.2. Metot

3.2.1. Selülaz Enzimi Üreten Suşların İzolasyonu

Fırat Üniversitesi Mühendislik Kampüsü ve Pertek (Tunceli) mevkiinden alınan toprak ve su örnekleri steril kaplar ile laboratuvara taşınmıştır. Her bir numuneden 1'er g toprak örneği tartılarak, 4.5 ml steril saf su ile karıştırıldıktan sonra elde edilen üst sıvı 80 °C'de 10 dk sıcak su banyosunda bekletilmiştir (Aygan vd., 2013). Su numunelerine ise bu işlem direkt uygulanmıştır. Örneklerden 1'er ml alınarak 50 ml ön ekim ortamına ekilip, 50 °C'de 150 rpm'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda gelişen bakteri örneklerinden tek koloni elde etmek için sulandırarak 10^{-4} ve 10^{-5} seyreltme yapıp, izolasyon ortamına yayma yöntemi ile ekilmiştir. Ekim yapılan petriler 50 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonucunda farklı morfolojik görüntüye sahip ve tek düşmüş koloniler izolasyon ortamına çizgi ekim yapılarak tekrar 50 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem saf koloni elde etmek amacıyla en az üç defa tekrarlanmıştır.

3.2.2. Katı Besiyerinde Selülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolasyonu yapılan bakteri örnekleri enzim üretim besiyerine (katı) çizgi ekim yapılarak 50 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucunda petri kutuları

%0,1'lik Kongo kırmızısı ile 15 dk süre ile boyanmıştır. Süre sonunda boya dökülüp, petrilere 1 M NaCl çözeltisi eklenerek boya uzaklaştırılmıştır. Selülaaz aktivitesi sarı zon oluşumuna göre saptanmıştır. Zon çapı yüksek olan örneklerin selülaaz aktiviteleri sıvı besiyeri ortamında tekrar değerlendirilmiştir (Voget vd., 2006).

3.2.3. Sıvı Besiyerinde Selülaaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla seçilen örnekler ön ekim ortamında geliştirildikten sonra 50 ml enzim üretim besiyerine (sıvı) ekilerek 50 °C'de ve 150 rpm'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kültür +4 °C'de 15 dakika süreyle 7000 rpm'de çöktürülerek bakteriler sıvı ortamdan ayrılıp, süpernatant elde edilmiştir. Aktivite tayini için 0,5 ml süpernatant ve 0,5 ml %2'lik CMC çözeltisi 50 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir tüpe 1 ml DNS eklenerek, 5 dk kaynatılmıştır. Kaynama işleminden sonra tüpler soğutularak 540 nm dalga boyunda köre karşı (0,5 ml CMC çözeltisi + 0,5 ml sitrat tampon, 1 ml DNS) okunmuştur.

3.2.4. Bakteri Teşhisi

Seçilen bakteri örneğine Gram boyama, spor oluşumu gibi morfolojik testlerin yanı sıra, katalaz, indol, sitrat gibi biyokimyasal testler yapılmış ve proteaz aktivite ölçümü ile suşun kazein hidrolizini gerçekleştirebilme özelliği araştırılmıştır. Ayrıca moleküler tanı amacıyla, 16S rRNA gen bölgesi DNA dizi analizi yapılmıştır.

Gram boyama:

Gram boyama testi için hazırlanan ortama bakteri ekimi yapılmış ve 24 saatlik kültürden steril öze ile 2-3 öze dolusu alınarak lam üzerine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiş ve kristal viyole çözeltisi ile 1 dk muamele edilmiştir. Bu süre sonunda boya uzaklaştırılmış ve lam üzerine lügol çözeltisi damlatılarak 1 dk beklenmiş süre sonunda lügol çözeltisi dökülerek kurutma kağıdı ile kurulanmıştır. Lam %96'lık etil alkole daldırılıp çıkarılarak 10-15 saniye süreyle alkol ile yıkanmış daha sonra ise saf su ile yıkanarak kurulanmıştır. Son olarak lam üzerine safranin çözeltisi damlatılarak 0,5 saniye süreyle boyanmış ve örnek saf su ile yıkanarak kurulandıktan sonra mikroskopta incelenmiştir (Özşahin 2006).

Endospor Boyama:

Endospor boyama testi için ekim yapılan 24 saatlik bakteri kültüründen steril öze ile 2-3 öze dolusu alınarak lam üzerine yayılmıştır. Lam havada kurutulduktan sonra alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Lam üzerine malahit yeşili çözeltisi damlatılarak 3-5 dk süre ile boyanmıştır. Daha sonra lam saf su ile yıkanmış ve safranin çözeltisi damlatılarak 5 dk süre ile boyanmıştır. Son olarak lam tekrar su ile yıkandıktan sonra kurulanmış ve mikroskopta incelenmiştir (Özşahin 2006). Örneklerde, sporların yeşil hücrenin diğer kısımlarının ise kırmızı renkte boyandığı gözlenmiştir.

Katalaz Testi:

Katalaz testi için hazırlanan büyüme ortamına bakteri ekimi yapılmış ve 18 saatlik kültür oluşturulmuştur. Kültür üzerine %3'lük 1 ml H₂O₂ damlatılarak gaz çıkışı gözlemlenmiştir. Gaz çıkışının meydana gelmesi testin pozitif olduğunu göstermektedir (Saginur vd., 1982).

İndol Testi:

İndol testi için pH'sı 7,2 olarak ayarlanmış ortama bakteri ekimi yapılmıştır. Ekim yapılan ortam 1 gece inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda kültür üzerine 10-15 damla Kovac's ayracı (M109293 MERCK) damlatılmıştır. Test sonucunda oluşan kırmızı renk testin pozitif olduğunu göstermektedir (Collins vd., 2004).

Sitrat Testi:

Sitrat testi, bakterinin tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığını, aynı zamanda bakterinin cins ve türlerini belirlemek için yapılan bir testtir. Sitrat testi için besiyeri yatık agar şeklinde hazırlanmıştır. Hazırlanan ortama bakteri ekimi yapıp 1-3 gün süre ile 37 °C'de inkübe edilmiştir. Besiyerindeki indikatörün renginin maviye dönmesi testin pozitif olduğunu göstermektedir (Kuzu 2008).

Proteaz Testi:

Proteaz testi için %0,6'lık 2,5 ml kazein çözeltisi üzerine 0,5 ml seçilen suşun geliştiği kültür süpernatantı eklenerek 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerine 2,5 ml TCA eklenerek 20 dk daha inkübe edilip, karışım süzgeç kağıdıyla süzölmüştür. Elde edilen süzöntüden 0,5 ml alınarak üzerine 2,5 ml 0,5 M'lık Na₂CO₃ ve 0,5 ml %50'lik Folin

Ciocalteau ilave edilip, 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnek absorbans değeri spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Takami vd., 1989).

16S rRNA Analizi:

16S rRNA analizi, hizmet alımı yoluyla yapılmıştır. Elde edilen 16S rDNA dizileri Gen Bankasında (URL-3, 2017) var olan diğer bakteriyel dizilerle karşılaştırılmıştır (BLAST analizi). Karşılaştırma sonucu aralarındaki benzerlik oranları tespit edilmiştir.

3.2.5. Selüloz Enzimi Üretiminin Maksimum Olduğu pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Katı ve sıvı enzim üretim ortamında en yüksek aktivite gösteren suş farklı pH değerlerinde (6, 7 ve 8) hazırlanan enzim üretim ortamına ekilerek 35, 45 ve 65 °C sıcaklıklarda ve 150 rpm çalkalama hızında 48 saate kadar inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi boyunca 6'şar saat aralıklarla numune alınarak, sıvı besiyerinde kullanılan aktivite tayin yöntemi uygulanıp, maksimum enzim sentezinin gerçekleştiği sıcaklık ve pH değeri belirlenmiştir.

En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH ve sıcaklık değerleri 100 kabul edilerek diğer pH ve sıcaklık değerlerinde elde edilen sonuçlar buna göre oranlanıp, bağlı enzim aktivitesi belirlenmiştir (Shanmughapriya vd., 2010).

3.2.6. Besiyeri Bileşiminin Selüloz Enzimi Üretimine Etkisinin Belirlenmesi

Selüloz enzimi üretiminde farklı besiyeri bileşenlerinin etkisini belirlemek için temelde, Deka vd. (2011)'nin kullandığı enzim üretim ortamı (10 g/l CMC; 5 g/l pepton; 5 g/l maya ekstrakt; 2 g/l K₂HPO₄; 0,25 g/l MgSO₄; 0,25 g/l FeSO₄ ve 0,5 g/l MnCl₂) esas alınarak literatürde tanımlanan farklı karbon, azot ve iz elementlerin etkileri incelenmiştir. Karbon kaynağı olarak (10 g/l); CMC, sükröz, maltoz, glukoz ve nişasta, azot kaynağı olarak (5 g/l); NH₄Cl, pepton, tripton, üre ve maya ekstrakt, iz element olarak ise 2 g/l K₂HPO₄; 0,25 g/l MgSO₄; 0,25 g/l FeSO₄; 0,5 g/l MnCl₂ sırasıyla değiştirilerek elde edilen enzim kullandığımız standart enzim aktivite tayin yöntemiyle incelenmiştir.

3.2.7. Selülag Enziminin Üretimi ve Kısmi Saflaştırılması

Seçilen suş, maksimum selülag enzim aktivitesinin gerçekleştiği besiyeri bileşenleri ve şartları kullanılarak hazırlanan kültür +4 °C’de 15 dakika süreyle 7000 rpm’de çöktürülerek süpernatant alınmıştır. Süpernatanta toplam hacmin %70’i oranında soğuk etanol (%96’lık) eklenerek enzim -33 °C’de 1 gece presipite edilmiştir. Çökmüş olan örnek, +4 °C’de 20 dakika süreyle 10000 rpm’de santrifüj edilerek enzim sıvı fazdan geri kazanılmıştır. Çökelti şeklinde elde edilen enzim pH’sı 7,0 olan 0.1M’lık sodyum fosfat tamponunda çözülerek aktivite analizlerinde kullanılmak amacıyla +4 °C’de saklanmıştır (Aygan ve Arıkan, 2008).

3.2.8. Enzim Aktivitesinin Maksimum Olduğu Sıcaklık, pH ve NaCl Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Enzim aktivitesinin maksimum olduğu sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonunun belirlenmesi için kısmi saflaştırılmış enzim kullanılmıştır. 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda enzim aktivitesi ölçülerek maksimum enzim aktivitesinin gerçekleştiği sıcaklık belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değerinde, farklı tampon çözeltilerinde hazırlanan ve pH’sı 4,0; 4,5; 4,8; 5,5; 6,0; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 olan substrat çözeltisi kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Ayrıca 0; 2; 4; 6; 8; 10; 15 g/l NaCl içeren çözeltiler ile optimum sıcaklık ve pH değerinde tuz konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toprak ve Sudan Bakteriyel Suş İzolasyonu Sonuçları

Selülozlar; farklı endüstrilerdeki uygulamalarda kullanılan, yüksek biyoteknolojik potansiyele sahip enzimlerdir. Fakat enzimin maliyeti ve stabilitesi kullanım açısından büyük önem taşımaktadır. Daha iyi proses uygunluğu, yüksek spesifik aktivite ve stabiliteye sahip selülozlar elde edebilmek için yeni selülozik suşlara ihtiyaç vardır. Bu amaçlara yönelik olarak, Fırat Üniversitesi Mühendislik Kampüsünün farklı bölgelerinden alınan toprak örneklerinden 14, Pertek mevkinden alınan toprak ve su örneklerinden ise 18 suş olmak üzere toplam 32 suş izole edilmiştir (Şekil 4.1). Bu izolatlardan 2 suşun, katı enzim üretim ortamında yapılan analiz sonucu selüloz üretiminde negatif sonuç verdiği, 30 suşun ise selüloz ürettiği saptanmıştır.

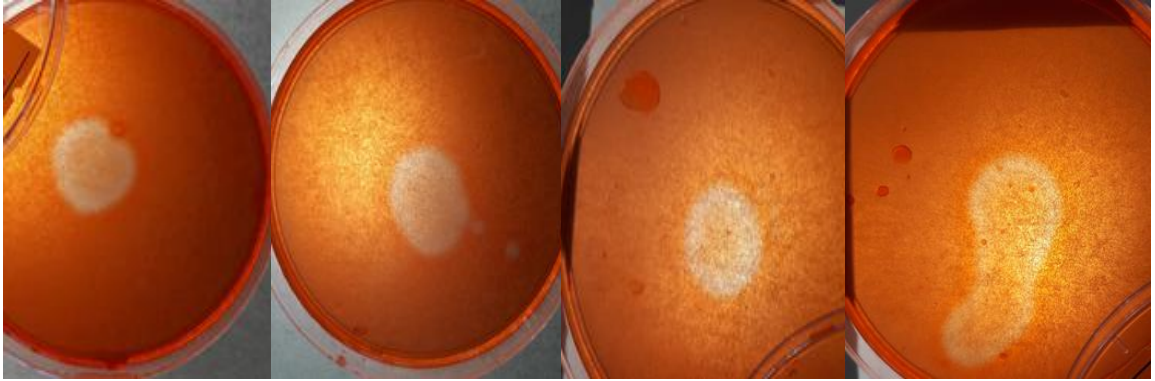


Şekil 4.1. Numune alınan toprak örnekleri

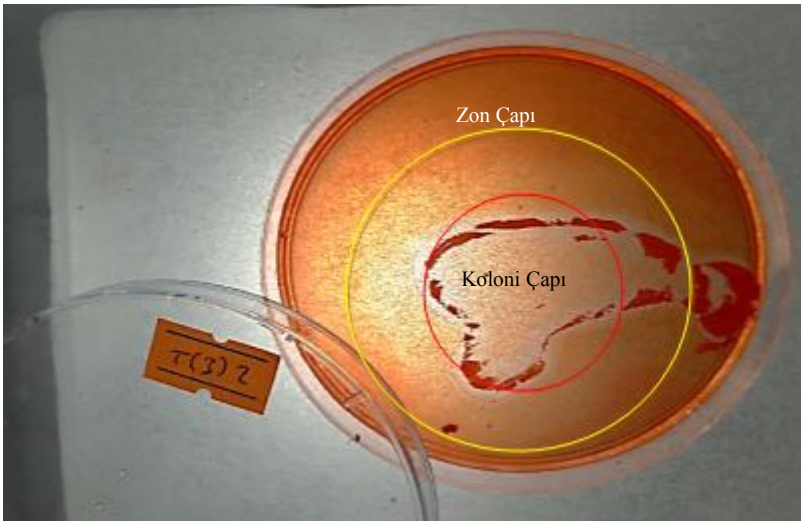
4.2. İzolatların Katı Ortamdaki Selülag Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçlar

İzole edilen suşların enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, CMC'li katı enzim üretim besiyerlerine ekim yapılarak 50 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılan suşların %0,1'lik Kongo kırmızısıyla boyandıktan sonraki görüntüleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te verilmiştir.

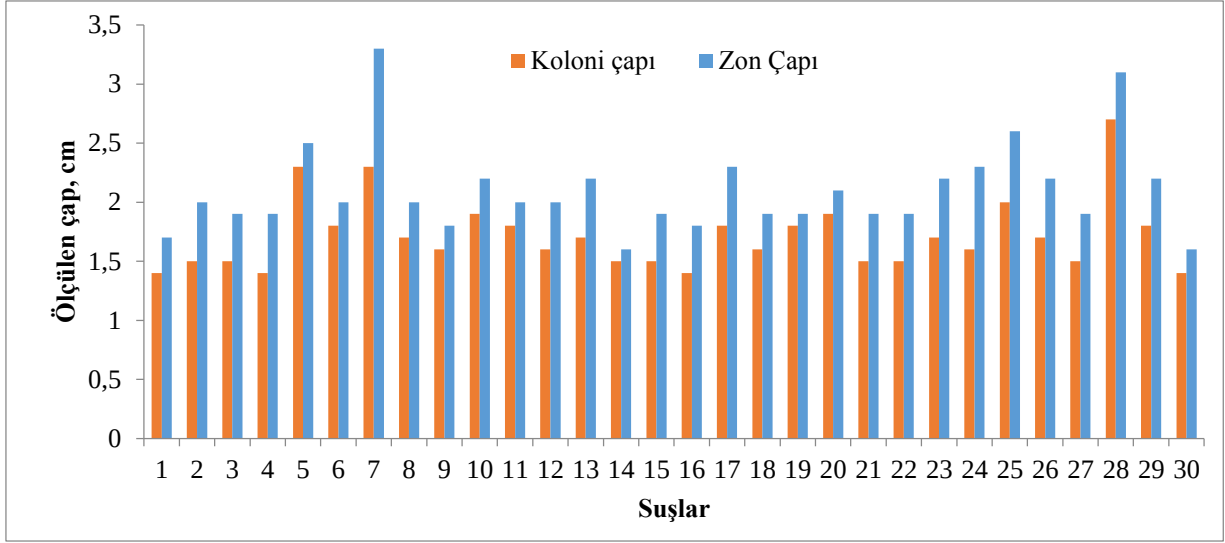
Boyama sonrasında suşların net aktivite zon çapları ölçülerek enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi net aktivite zon çapı, toplam zon çapı ile koloni çapı arasındaki farkı ifade etmektedir. Şekil 4.4'te verilen grafikte ise, selülag enzimi üreten 30 suş için petri kutularındaki Kongo kırmızısı boyamasından sonra elde edilen koloni ve zon çapları verilmiştir. Bu değerlere göre net aktivite zon çap genişliklerinin belirlenmesiyle en iyi enzim üretiminin gerçekleştiği 10 suş (2, 4, 7, 13, 17, 23, 24, 25, 26, 29 nolu suşlar), sıvı enzim üretim ortamında aktivitelerinin ölçülmesi için seçilmiştir.



Şekil 4.2. Kongo kırmızısı boyama görüntüleri (sırasıyla 23, 17, 13 ve 2 nolu izolatlar)



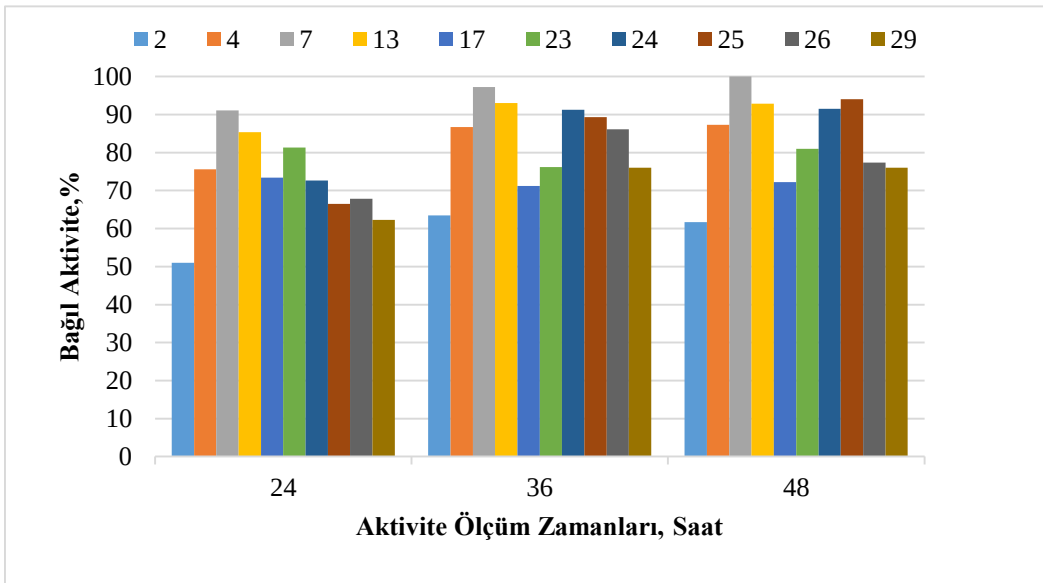
Şekil 4.3. 7 Nolu suşun koloni ve zon çapı görüntüsü



Şekil 4.4. Katı besiyerine ekilen suşların koloni ve zon çapları

4.3. İzolatların Sıvı Ortamdaki Selüloz Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçlar

Katı besiyerinde yapılan Kongo kırmızısı boyama yönteminin enzim aktivite tayininde yeterince hassas olmamasından dolayı net aktivite zonu en yüksek seçilen 10 suşun sıvı enzim üretim ortamında 24, 36 ve 48. saatlerde enzim aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 4.5). Ölçülen bağıl aktivite sonuçlarına göre incelenen tüm saatlerde en yüksek aktivite değerinin 7 nolu suшта olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Sıvı besiyeri aktivite ölçüm sonuçları

7 nolu suşun selüloz üreten diğer suşlara göre katı besiyerinde en yüksek net aktivite zonu göstermesi (1,0 cm) ile sıvı besiyerindeki analizler birbirini desteklemektedir. Katı ve sıvı enzim üretim ortamlarının her ikisinde de yapılan analizler sonucunda en yüksek aktiviteyi gösteren 7 nolu suş, yapılacak optimizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

4.4. 7 Nolu İzolatın Biyokimyasal ve Morfolojik Test Sonuçları

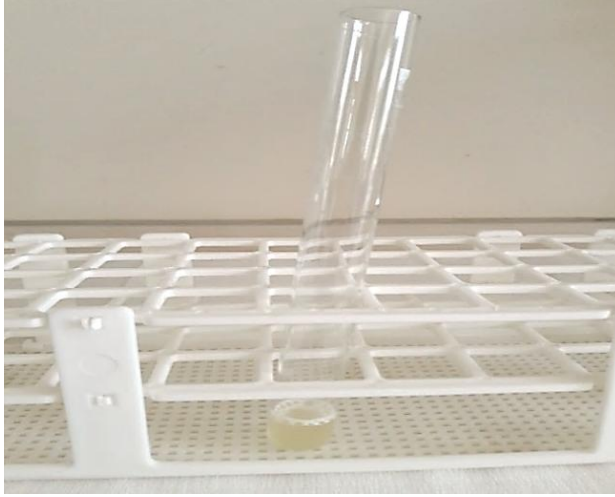
Seçilen suş için katalaz, indol, sitrat gibi biyokimyasal testlerinin yanı sıra gram ve endospor boyama ve koloni şekli belirleme gibi morfolojik testler de yapılmıştır. Ayrıca proteaz aktivitesi ölçülerek suşun kazein hidrolizi için etkinliği incelenmiştir.

Tablo 4.1’de verilen biyokimyasal testlerden katalaz, indol ve sitrat testi pozitif sonuç verirken, proteaz aktivitesi negatif sonuç göstermiştir.

Katalaz, çoğunlukla aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ve ortamdaki hidrojen peroksiti su ve oksijene ayıran bir enzimdir. Şekil 4.6’da görüldüğü gibi test tüpüne %3’lük H₂O₂ ilave edildiğinde, serbest oksijen gaz kabarcıkları halinde gözlenmiş ve katalazın varlığı saptanmıştır.

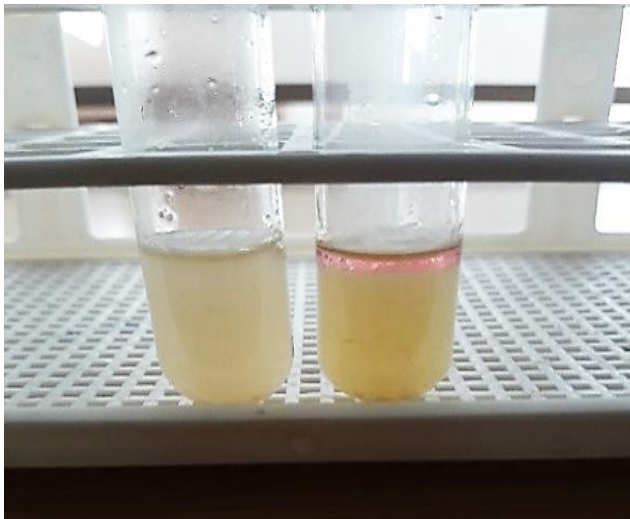
Tablo 4.1. Biyokimyasal test sonuçları

Biyokimyasal Testler	7 Nolu Suş
Katalaz Testi	+
İndol Testi	+
Sitrat Testi	+
Proteaz Aktivitesi	-

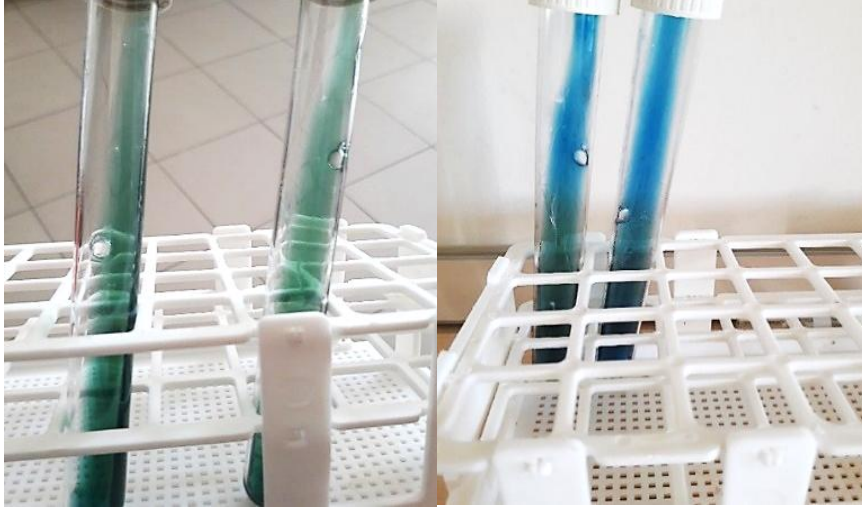


Şekil 4.6. Katalaz testi sonucu

İndol, bakterilerde bulunan triptofanaz enzimiyle bir aminoasit olan triptofanı parçalaması ve hidrolize etmesi sonucu oluşan nitrojenli bir bileşiktir ve aldehitlerle reaksiyona girdiğinde, kırmızı renkli bir ürün oluşturmaktadır. Kovac's ayracının damlatılması sonucu tüpün üst kısmında kırmızı halka meydana gelmiş ve testin pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7). Yapılan sitrat testinde, inkübasyon süresi sonunda ekim hattı boyunca üreme ile birlikte ortamın orijinal yeşil renginin koyu mavi renge dönüşmesi pozitif reaksiyon sonucunu göstermiştir (Şekil 4.8.)



Şekil 4.7. İndol testi sonucu



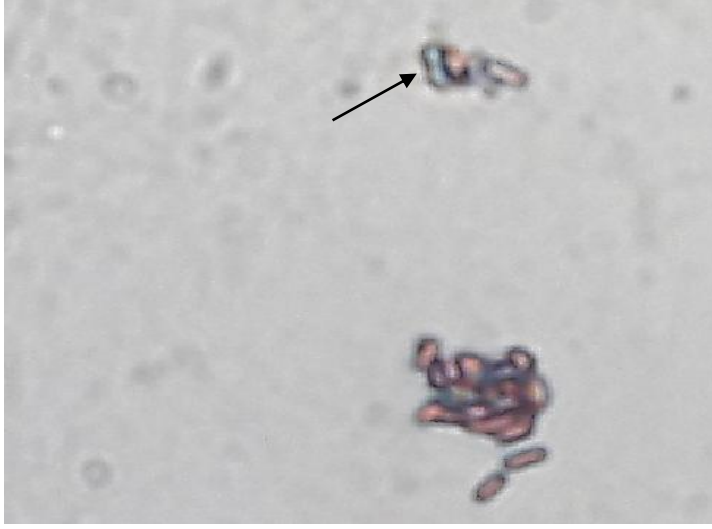
Şekil 4.8. Sitrat testi sonucu

Yapılan proteaz aktivitesi ölçüm neticesinde ise spektrofotometrede okunan örneğin absorbands değeri vermemesi sonucu, seçilen suşun kazeini hidrolize etmediği belirlenmiştir.

Morfolojik testlerden Gram boyama metodu ile boyanan suşun, ışık mikroskobu ile incelenmesi sonucu çubuk (basil) şeklinde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca boyama sonucu yapılan mikroskobik incelemede gözlenen rengin pembe renkte olması suşun gram negatif olduğunu göstermektedir (Şekil 4.9). Endospor boyamada mikroskobik görüntüde yeşil yapıların görülmesi suşun spor oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.10). Ayrıca seçilen 7 nolu suşun katı ortamdaki 24 saatlik inkübasyon sonucu koloni şeklinin etrafı dalgalı ve beyaz renkte olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.9. Gram boyama sonucu ışık mikroskobu görüntüsü



Şekil 4.10. Endospor boyama sonucu ışık mikroskobu görüntüsü



Şekil 4.11. 7 Nolu Suşun koloni şekli görüntüsü

4.5. 7 Nolu Suşun 16S rRNA Dizi Analizi Sonuçları

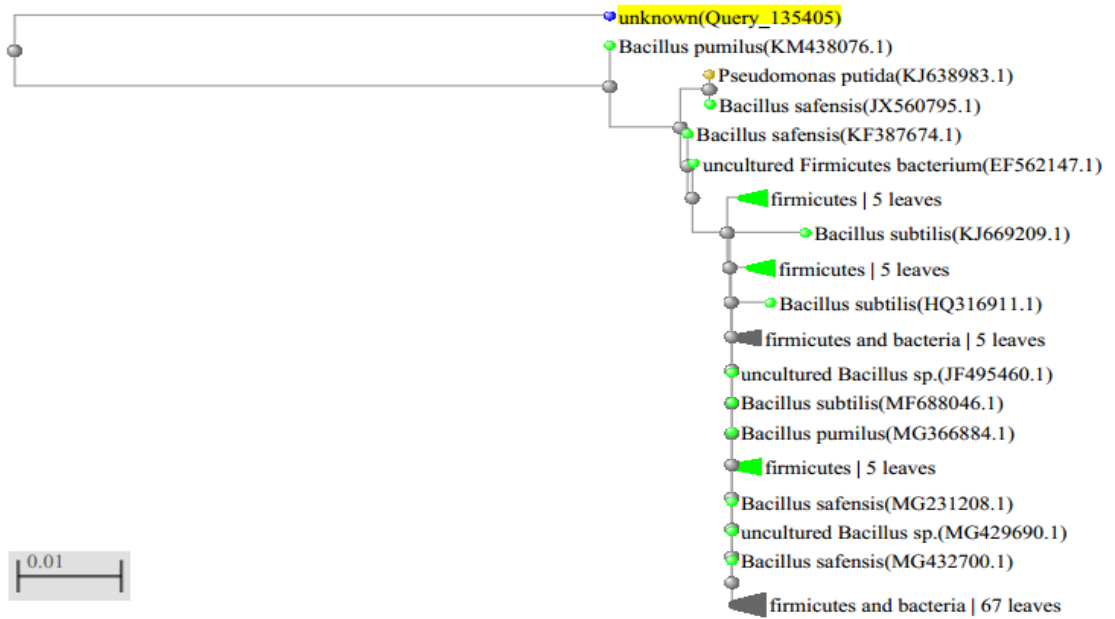
16S rRNA dizi analizi sonucu “Chromas” programı kullanılarak elde edilen nükleotid dizisi Şekil 4.12’de verilmiştir.

CGCMAYGTCATWTATAAACTCTATGGCTCCKASGGTWSYYCACCRA YTWAGAGGKGT
WAAAAAWSTGGGGTGGGYTTYGGGGRGWAWAGGCCCGGGAACKATTTATMGGA
AGGCKAAYCCGCGATTACWAGSGATTCCGGCTTCACGCAGTCAAGTTGCAAAC TGR
ATCCRAATTTTCTTWCGATTTGGGGGATGGGYTTAMCCTCSSGGTTTCTTGGCCTTTTT
TTTGTCTTTGTAGAAGTGGGGTGGCCCGGGCCWTAGGGGGCGGAGGATTGGCCKTCTT
CCCCCCTTCTCCTCCGGTTTGTCCCGGGCGYCCCTTAAAGGCCAAYTGAAGGCGGGACAG
TAGGGCCCTGGGTAACAATCAGGAAGGAGCATTTTTTACGCCTTCCCAAGTACTCTTC
CAGTTGCGAGGAGYAGCCGGAAGGTTTTCCGTTGTTRAATTAACCAAATGCTCCACC
CCTTGGGCGGGCCCCCTCAATTCCTTTGAGTTTCATCTTGCRACCAYACTCCCCAGGCG
GAGTGCTTAAGGCGTTRGCTGCGGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTASCAC
TCATCKTTTACGGCGTGRACWACMAGGGATATCWAATCTKGTGCGCTCCACACSCTTY
CGCKCTTCAGSGYCRGTAAMCAGACACAGAGGAGTCGCCTTCCCCAYTGTTGGTTTTT
AAAAATTTWTAGAATTTTACGGCTACASKKGGGATTTCAAAC TCTCTTCTCCTGGG
MACTCCAGGTCCCCCAGTTTTTMAAAGKACCCCYCCCCCGTTTGGGRRGCGGGGG
GGGCTTTCCCCACAAC T CAGGAAC TTTTAARAAAAAACC C C C C C S C T G C C S C G G R
GAASCCCCCCCCCMC

Y: C/T R: G/A M: A/C
K: G/T W: A/T S: G/C

Şekil 4.12. 16S rRNA dizi analizi sonucu elde edilen nükleotid dizisi

Elde edilen dizi, blast analizi yapıldıktan sonra sonra izolatin en yakın türler ile akrabalık ilişkisini belirleyen soyağacı çizilmiş ve %86 benzerlik oranıyla yeni bir bakteri sınıfına ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).



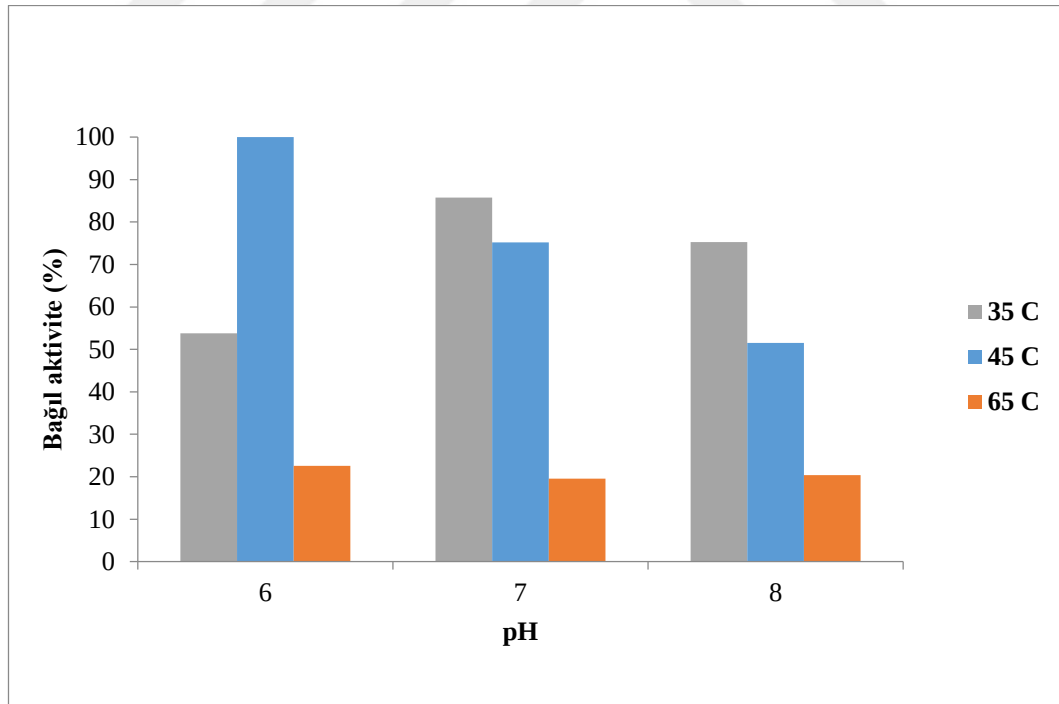
Şekil 4.13. Filogenetik Ağaç

4.6. Selüloz Enzim Üretiminin Maksimum Olduğu pH ve Sıcaklık Değerleri

Seçilen 7 nolu suş, pH'sı 6, 7 ve 8 olan CMC'li sıvı enzim üretim besiyerinde 35, 45 ve 65 °C sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yapılan aktivite tayinine göre suşun maksimum enzim sentezini gerçekleştirdiği pH'nın 6,0 sıcaklığın ise 45 °C olduğu belirlenmiştir. 7 nolu suş pH 7,0'da; 35 °C'de %85,79; 45 °C'de %75,16 bağıl aktivite gösterirken, 65 °C'de %19,56 bağıl aktivite göstermiştir. pH 8,0'da; 35 °C'de %75,25; 45 °C'de %51,55 ve 65 °C'de ise %20,41 bağıl aktivite sergilemiştir (Şekil 4.14).

Topuz vd. (2007), topraktan izole ettikleri *Bacillus* B23 suşu tarafından en yüksek selüloz üretiminin 42 °C sıcaklık ve 8,5 pH'da gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir.

Aygan ve Arıkan (2008), Van gölü kıyı şeridinin 20 farklı bölgesinden aldıkları toprak örneklerinde toplam 242 bakteri izolasyonu yapmış ve bunlardan 76'sının amilaz (%31,66), 35'inin selüloz (%14,6), 32'sinin ksilanaz üreten (%13,2) suş olduğunu belirlemişlerdir. *Bacillus* sp. C-14 suşunun, pH 8,5-9,5 aralığında 37 °C'de ve %3 tuz konsantrasyonunda maksimum selüloz enzim ürettiğini saptamışlardır.



Şekil 4.14. 7 nolu suşun farklı inkübasyon koşullarında aktivite ölçüm sonuçları

Caf ve Arıkan (2012), Adana ili ve çevresinden aldıkları toprak ve doğal gübre örneklerinden *Bacillus* suşlarını izole etmişlerdir. *Bacillus* sp. CY-3 suşunun pH 9,0 ve 55 °C’de optimum enzim sentezlediğini belirlemişlerdir. Ayrıca enzimin kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra pH 9,0 ve 100 °C’de maksimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Goyal vd. (2014), *Bacillus* sp 313SI olarak tanımladıkları bakteri türünün en yüksek CMCaz aktivitesini; çalkalamalı koşullarda, pH 8,0 ve 30 °C’de elde ederken, statik koşullarda pH 8,0 ve 35 °C’de belirlemişlerdir.

Aygan (2015), bahçe toprağından izole ettiği *Bacillus* sp. P-5 suşunun pH 6,0 ile 10,5 arasında enzim sentezi gerçekleştirdiğini, maksimum selülotik aktivitenin 35 °C ve pH 8,0’da olduğunu gözlemlemiştir.

4.7. Besiyeri Bileşenlerinin Selülaz Enzim Üretimine Etkisi

Seçilen 7 nolu suş için Deka vd. (2011)’nın tanımladığı besiyerinde farklı karbon, azot ve iz elementlerin etkisi, enzim sentezinin maksimum gerçekleştiği şartlarda (45 °C ve pH 6,0’da) incelenmiştir. İnkübasyon sonucunda yapılan aktivite analizlerine göre farklı karbon, azot ve iz elementlerin enzim sentezi üzerine etkisi belirlenmiştir

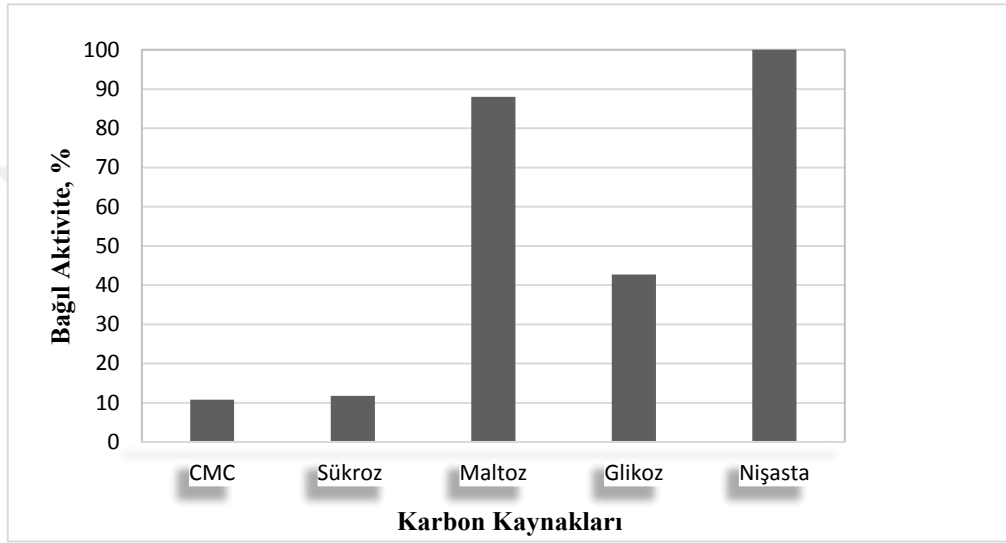
Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı ortamlarda üretilen selülaz enziminin aktivite ölçüm sonuçlarına göre, analiz yapılan süre içerisinde en yüksek enzim sentezinin karbon kaynağı olarak nişastanın kullanıldığı ortamda gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.15). Ayrıca bir diğer karbon kaynağı olarak kullanılan maltoz, %88 bağıl aktivite ile nişastadan sonraki en iyi karbon kaynağı olarak saptanmıştır.

Enzim üretiminde kullanılan azot kaynakları önemli bir faktördür. Azot kaynağı olarak kullanılan NH₄Cl, pepton, tripton, üre ve maya ekstraktı bileşenleri arasından en yüksek enzim aktivitesi maya ekstraktının kullanıldığı ortamda elde edilmiştir (Şekil 4.16.). Üre ise %20 bağıl aktivite ile enzim üretimi üzerinde en az etkili bileşen olmuştur.

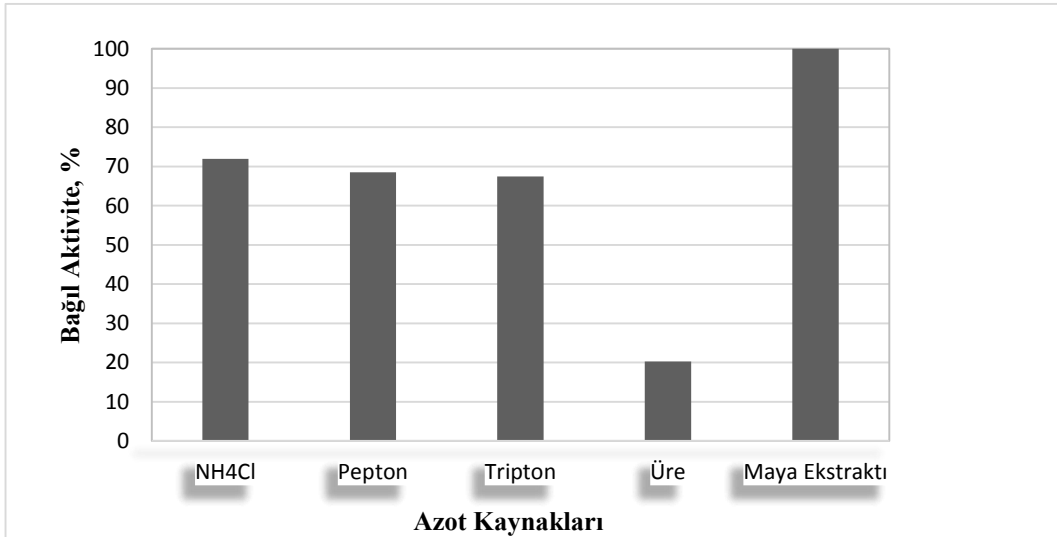
Sheng vd. (2012), *H. paralela* larvalarının bağırsaklarından izole ettikleri HP207 suşunun sekiz farklı karbon kaynağı kullanarak (CMC-Na, buğday kepeğı, maltoz, MCC, çözünür nişasta, selobiyoz, glukoz ve sakkaroz) endoglukanaz üretimindeki etkisini araştırmışlar ve CMC-Na’nın enzim üretiminde en etkili kaynak olduğunu saptamışlardır. Azot kaynakları arasında ise maksimum enzim aktivitesini maya ekstraktı ile elde

etmişlerdir. Bakteri kültürlerinde maksimum enzim aktivitesinin ise pH 7,0 ve 30 °C sıcaklıkta olduğunu belirlemişlerdir.

Sethi vd. (2013), topraktan selüloz üreten bakteriler izole etmiş ve maksimum selüloz üretimi için pH, sıcaklık, karbon ve azot kaynakları gibi kültür koşullarını optimize etmişlerdir. Selüloz üretimi için optimum koşulların, karbon kaynağı olarak glukoz, azot kaynağı olarak amonyum sülfat kullanıldığında ve pH 10, sıcaklık ise 40 °C olduğunda sağlandığını belirlemişlerdir.



Şekil 4.15. Farklı karbon kaynaklarında selüloz enziminin bağıl aktivite sonuçları



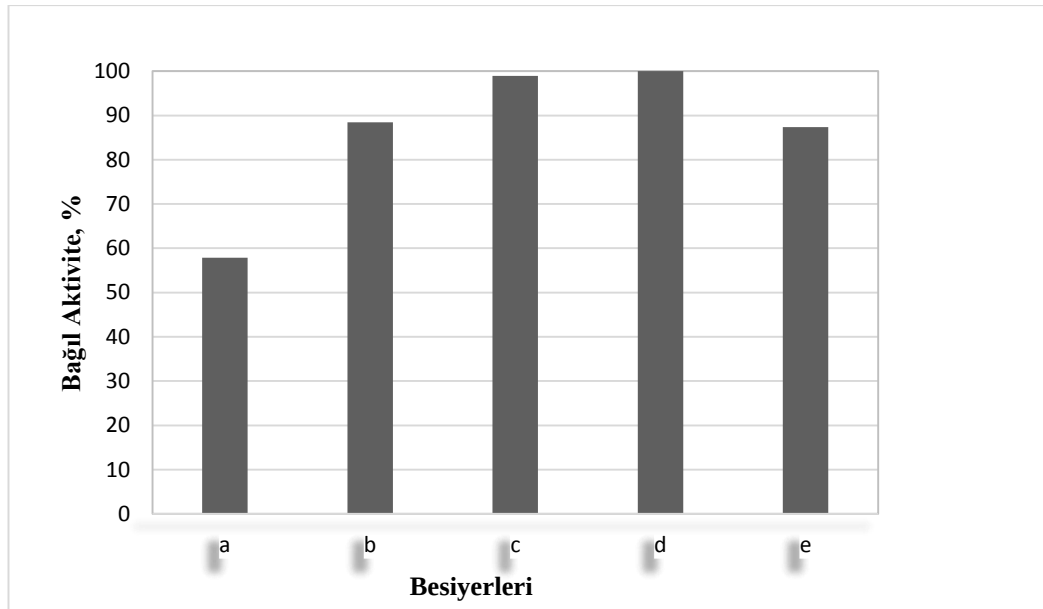
Şekil 4.16. Farklı azot kaynaklarında selüloz enziminin bağıl aktivite sonuçları

Goyal vd. (2014), farklı ekolojik alanlardan aldıkları toplamda 80 mikrobiyal izolattan *Bacillus* sp. 313SI olarak tanımladıkları bakteri türünü CMCaz üretimi için seçmişlerdir. Yaptıkları iki farklı kültür koşulunda maksimum CMCaz üretimi için, en iyi karbon kaynağının karboksimetil selüloz, en iyi azot kaynağının ise amonyum sülfat ve amonyum nitrat olduğunu elde etmişlerdir.

Yang vd. (2014), Tibet domuzunun bağırsağından selülozik bir bakteri izole etmiş ve enzim üretimi için en iyi karbon kaynağının %1 konsantrasyonda mısır unu, en iyi azot kaynağının ise %2 konsantrasyonda pepton ve maya ekstraktı birleşiminin olduğunu belirlemişlerdir.

Paudel ve Qin (2015), izole ettikleri K1 bakteri türünün 16S rDNA sekansı analizine dayanarak, *Bacillus* sp. olduğunu ve azot kaynağı olarak pepton (%1) varlığında, pH 6 ve sıcaklık 50 °C'de maksimum CMCaz ürettiğini saptamışlardır.

Yaptığımız çalışmada Deka vd. (2011)'nin tanımladığı besiyeri (e), 7 nolu suşun selülaz enzim üretiminde iyonların etkisini belirlemek amacıyla temel alınmıştır. Bu amaçla K_2HPO_4 'nin bulunmadığı (a), $MgSO_4$ 'nin bulunmadığı (b), $FeSO_4$ 'nin bulunmadığı (c), $MnCl_2$ 'nin bulunmadığı (d) ortamlarda enzimin bağıl aktivitesi belirlenmiştir. Ayrıca tüm bileşenlerin bulunduğu besi yeri (e) sonuçlarıyla da karşılaştırılmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Farklı iz element kaynaklarında selülaz enziminin bağıl aktivite sonuçları

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi b, c, d ortamlarında enzim bağıl aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir ve $MgSO_4$, $FeSO_4$, $MnCl_2$ bileşenlerinin enzim üretimine olumsuz etki gösterdiği belirlenmiştir. a ortamında ise bağıl aktivite düştüğü için bu bileşenin enzim üretimine olumlu yönde etkisi olduğu saptanmıştır.

4.8. Enzim Karakterizasyonu Sonuçları

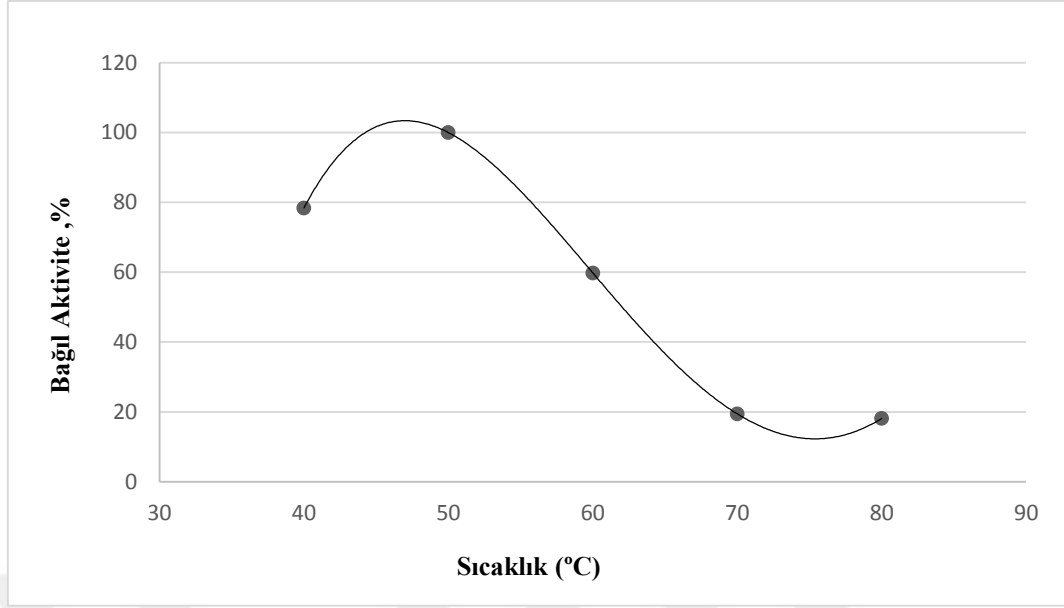
7 nolu suş, en yüksek enzim sentezinin gerçekleştiği ortama ekilerek 45 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda enzim, kısmi olarak saflaştırılıp, farklı sıcaklık, pH değerlerinde ve farklı NaCl konsantrasyonlarında incelenmiştir.

4.8.1. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklığın Belirlenmesi

Kısmi olarak saflaştırılan selüloz enziminin aktivite tayini yapılırken, enzim ve substrat (%2’lik CMC çözeltisi) 40, 50, 60, 70 ve 80 °C sıcaklıklarda 30 dk. inkübe edilmiştir. Süre sonunda enzimin en yüksek aktivite değerini 50 °C’de gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.18.).

Ariffin vd. (2006), yaptıkları çalışmada substrat olarak karboksimetil selüloz (CMC) kullanarak, izole ettikleri *Bacillus pumilus* EB3 tarafından ürettikleri selüloz enziminin pH 6,0 ve sıcaklık 60 °C’de maksimum aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Coşkun (2012), Adana’da yerelması yetiştiriciliği yapılan topraklardan CMCase üreten termofilik *Bacillus* sp. YET-1 suşunun izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiş ve termofilik *Bacillus* sp. YET-1 suşunun ürettiği CMCase enziminin optimum sıcaklık ve pH’sını sırasıyla 50 °C ve 7,0 olarak belirlemiştir.



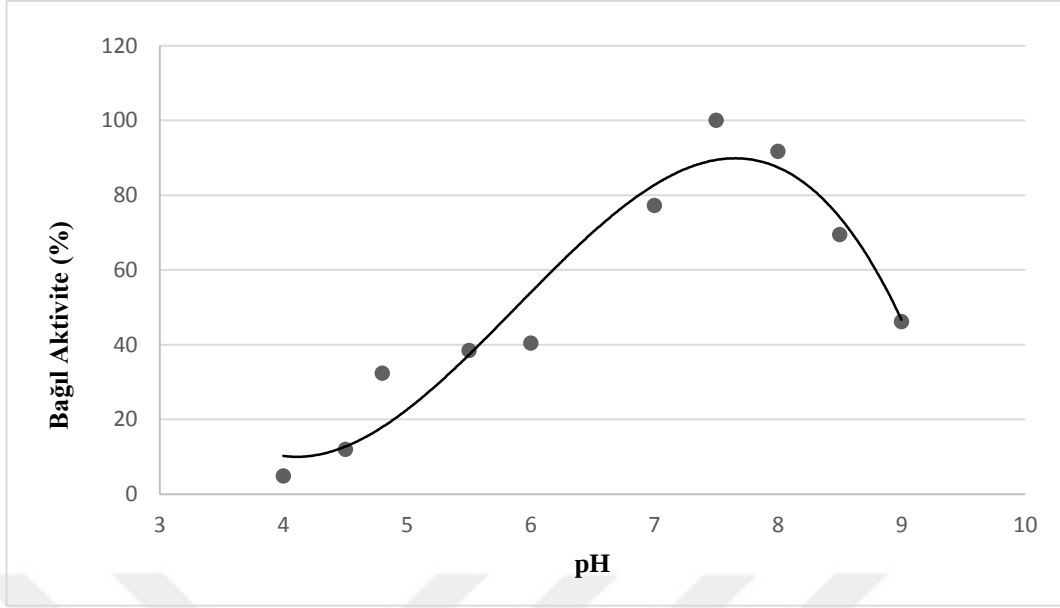
Şekil 4.18. Farklı sıcaklıklarda selülaz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

4.8.2. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği pH'nın Belirlenmesi

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek amacıyla enzim ve substrat (pH 4,0-9,0 aralığındaki tamponlarla hazırlanan %2'lik CMC çözeltisi) 50 °C'de 30 dk. inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonucunda enzimim pH 7,5'te en yüksek aktivite gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.19).

Liang vd. (2014), izole ettikleri ME27-1 suşu tarafından üretilen CMCase aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla 5,5 ve 50 °C olarak belirlemiş ve enzimin geniş bir pH aralığında (5.0-9.5) aktivitesini koruduğunu saptamışlardır.

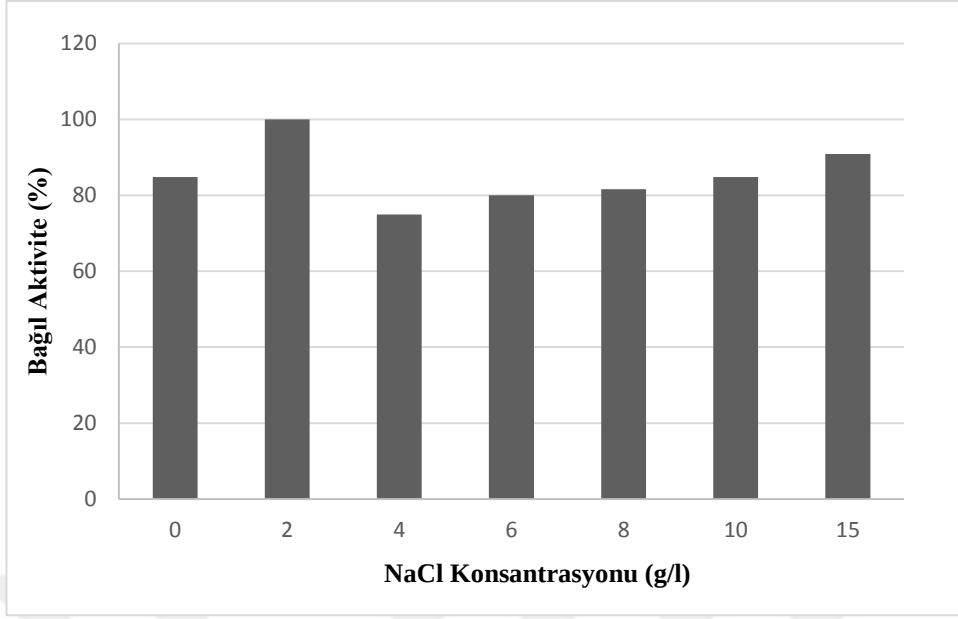
Sriariyanun vd. (2016), bir çeltik tarlası toprağından selülaz aktivitesi analizine dayalı olarak *Bacillus* sp. MSL2 türünü, izole etmişlerdir. İzole ettikleri bakteriden elde ettikleri enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerini sırasıyla 50 °C ve pH 6,0 olarak belirlemişlerdir.



Şekil 4.19. Farklı pH değerlerinde selülag enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

4.8.3. Enzimin Optimum Aktivite Gösterdiği NaCl Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kısmi saflaştırma yapılan selülag enziminin aktivitesi ölçülürken, NaCl'nin 2,0-15,0 g/l aralığındaki farklı konsantrasyon değerlerindeki çözeltilerle enzim seyreltmesi yapılarak aktivite ölçülmüştür. Yapılan ölçümlere göre enzimim en yüksek aktivite gösterdiği değer 2 g/l NaCl konsantrasyonunda belirlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Farklı NaCl konsantrasyonlarında selüloz enzim aktivitesi ölçüm sonuçları

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Farklı lokasyonlardan alınan toprak ve su örnekleri kullanılarak elde edilen bakteriyel bir suştan selüloz enzim üretiminin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Fırat Üniversitesi Mühendislik Kampüsü'ü ve Pertek mevkiinden alınan toprak ve su örnekleri kullanılarak toplamda 32 suş izole edilmiştir. İzole edilen suşlardan 30 tanesinin selüloz enzimini ürettiği, 2 tanesinin ise selüloz enzimini üretmediği belirlenmiştir.
2. Selüloz üreten 30 suş için CMC'li katı enzim üretim ortamında yapılan analizler sonucu 2, 4, 7, 13, 17, 23, 24, 25, 26, 29 nolu 10 suşun selüloz enzim sentezinde en yüksek aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir.
3. Sıvı enzim üretim ortamında yapılan analizler sonucu seçilen 10 suş arasından en yüksek aktiviteyi gösteren suşun 7 nolu suş olduğu saptanmıştır.
4. Seçilen 7 nolu suşun tanımlanması amacıyla yapılan morfolojik, biyokimyasal ve 16s rRNA analizler sonucu suşun, basil şeklinde, gram negatif, spor oluşturan bir tür olduğu belirlenmiştir. Ayrıca katalaz, indol ve sitrat testlerinde pozitif sonuç verirken, proteaz aktivitesinin olmadığı elde edilmiştir. 16s rRNA sonucuna göre ise suşun yeni bir bakteri sınıfına ait olduğu belirlenmiştir.
5. Enzim üretiminin maksimum olduğu sıcaklık ve pH değerlerinin belirlenmesi için yapılan analizde, 7 nolu suşun 45 °C ve 6,0 pH'da maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir.
6. Enzim üretimi için kullanılan besiyerinde karbon, azot ve iz elementlerin enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için, karbon kaynağı olarak CMC, sükröz, maltoz, glikoz ve nişasta kullanılmıştır. Karbon kaynaklarından en yüksek selüloz aktivitesi nişastada kullanıldığında elde edilmiştir. Azot kaynağı olarak ise NH₄Cl, pepton, tripton, üre ve maya ekstraktı kullanılmış ve enzim en iyi aktiviteyi maya ekstraktı varlığında sergilemiştir. İz elementlerin etkisini belirlemek için kullanılan K₂HPO₄, MgSO₄, FeSO₄ ve MnCl₂ bileşenlerinden MgSO₄, FeSO₄ ve MnCl₂ enzimi inhibe edici etki gösterirken, K₂HPO₄'ın indükleyici etki yaptığı belirlenmiştir.

7. En yüksek enzim sentezinin gerçekleştiği nişasta içeren besiyeri kullanılarak, maksimum enzim sentezinin gerçekleştiği 45 °C ve 6,0 pH’da üretilen enzim, farklı sıcaklık, pH ve NaCl konsantrasyonu değerlerinde incelenmiştir. Yapılan analizler sonucu enzimin 50 °C sıcaklık, 7,5 pH ve 2 g/l NaCl konsantrasyonunda en yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Nihai bir sonuç olarak, toprak ve su kaynaklarından selülaz enzimi üreten suşların elde edilebileceği belirlenmiştir. Birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler, endüstriyel enzimlerin hızla gelişen pazarları haline gelirken, enzim üretiminin ve ithalatının ülke ekonomisine önemli bir katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A., Levin, D. B. 2011. "Biomass Pretreatment: Fundamentals toward Application." *Biotechnology Advances* 29(6):675–85.
- Aliakbarian, B., De Faveri, D., Converti, A., Perego, P. 2008. "Optimisation of Olive Oil Extraction by Means of Enzyme Processing Aids Using Response Surface Methodology." *Biochemical Engineering Journal* 42(1):34–40.
- Anagnostakis, S. L., Hankin, L. 1977. "Solid Media Containing Carboxymethylcellulose to Detect." *Journal of General Microbiology* 98(1977):108–15.
- Ando, S., Ishida, H., Kosugi, Y., Ishikawa, K. 2002. "Hyperthermostable Endoglucanase from *Pyrococcus Horikoshii*." *Applied and Environmental Microbiology* 68(1):430–33.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. 2012. "Purification and Characterization of Thermostable Alkaline Cellulase from Marine Bacterium *Bacillus Licheniformis* AU01 by Utilizing Cellulosic Wastes." *Waste and Biomass Valorization* 3(3):305–10.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T. 2013. "Thermostable, Haloalkaline Cellulase from *Bacillus Halodurans* CAS 1 by Conversion of Lignocellulosic Wastes." *Carbohydrate Polymers* 94(1):409–15.
- Araújo, R., Margarida C., Artur C. P. 2008. "Application of Enzymes for Textile Fibres Processing." *Biocatalysis and Biotransformation* 26(5):332–49.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y., Hassan, M. 2006. "Production and Characterization of Cellulase by *Bacillus Pumilus* EB3." *International Journal of Engineering and Technology* 3(1):47–53.
- Arumugam, K., Verenich, S., Shim, E., Pourdeyhimi, B. 2007. "Pretreatment of Bleached Cotton Fibers with Whole and Monocomponent Cellulase for Nonwoven Applications" 77(919):734–42.
- Aygan, A., Battaloğlu, G. 2015. "Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Sp . P-5 Tarafından Endoglukanaz Üretimi , Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu"

- Aygan, A., Arıkan, B. 2008a. “A New Halo-Alkaliphilic, Thermostable Endoglucanase from Moderately Halophilic *Bacillus* Sp. C14 Isolated from Van Soda Lake.” *International Journal of Agriculture and Biology* 10(4):369–74.
- Aygan, A., Arıkan, B. 2008b. “Amilaz Selüloz ve Ksilanaz Üretebilen Orta Düzeyde Halofil *Bacillus* Sp. İzolasyonu ve Optimum Üreme ve Enzim Sentezlerinin Belirlenmesi.” *Ç.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü* 18(2):1–11.
- Aygan, A., Karcıoğlu, L., Arıkan, B. 2013. “Alkaline Thermostable and Halophilic Endoglucanase from *Bacillus Licheniformis* C108.” *African Journal of Biotechnology* 10(5):789–96.
- Bamforth, C. W. 1994. “ β -Glucan and β -Glucanases in Malting and Brewing: Practical Aspects.” *Brewers Digest* 69:12–16.
- Bayer, E. A., Lamed, R., Himmel, M. E. 2007. “The Potential of Cellulases and Cellulosomes for Cellulosic Waste Management.” *Current Opinion in Biotechnology* 18(3):237–45.
- van Beek, J. H. G. M., Supandi, P., Gavai, A. K., de Graaf, A. A., Binsl, T. W., Hettling, H. 2011. “Simulating the Physiology of Athletes during Endurance Sports Events: Modelling Human Energy Conversion and Metabolism.” *Phil. Trans. R. Soc. A* 369:4295–4315.
- van Beilen, J. B., Li, Z. 2002. “Enzyme Technology: An Overview.” *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):338–44.
- Belghith, H., Ellouz-Chaabouni, S., Gargouri, A. 2001. “Biostoning of Denims by *Penicillium Occitanis* (Pol6) Cellulases.” *Journal of Biotechnology* 89(2–3):257–62.
- Bhat, M. K. 2000. “Cellulases and Related Enzymes in Biotechnology.” *Biotechnology Advances* 18(5):355–83.
- Brebu, M., Vasile, C. 2009. “Thermal Degradation of Lignin.” *Cellulose Chemistry and Technology* 44(9):353–363.
- Brulc, J. M., Antonopoulos, D. A., Miller, M. E., Wison, M. K., Yannarell, A. C., Dinsdale, E. A., Edwards, R.E., Frank, E.D., Emerson, J. B., Wacklin, P., Coutinho, P. M.,

- Henrissat, B., Nelson, K.E., White, B. A. 2009. "Gene-Centric Metagenomics of the Fiber-Adherent Bovine Rumen Microbiome Reveals Forage Specific Glycoside Hydrolases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(6):1948–53.
- Caf, Y., Arıkan, B. 2012. "Thermofil Bacillus Sp.' den Alkalın, Termofilik, Oksidant Dirençli, Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu." *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 27(1):50–59.
- Calderon-Cortes, N., Watanabe, H., Cano-Camacho, H., Zavala-Paramo, G., Quesada, M. 2010. "CDNA Cloning, Homology Modelling and Evolutionary Insights into Novel Endogenous Cellulases of the Borer Beetle *Oncideres Albomarginata* Chamela (Cerambycidae)." *Insect Molecular Biology* 19(3):323–36.
- Carere, C. R., Sparling, R., Çicek, N., Levin, D. B. 2008. "Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation." *International Journal of Molecular Sciences* 9(7):1342–60.
- Cavaco-Paulo, A. 1998. "Mechanism of Cellulase Action in Textile Processes." *Carbohydrate Polymers* 37(3):273–77.
- Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M., Falkinham, J. O. 2004. "Collins and Lyne's Microbiological Methods." 7:97.
- Coşkun, A. 2012. "Yerelması Yetiştirilen Topraklardan İzole Edilen Bacillus Sp. Yet-1 Suşuna Ait CMCaz Enziminin Karakterizasyonu." *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 27(5):112–20.
- Dar, M. A., Pawar, K. D., Jadhav, J. P., Pandit, R. S. 2015. "Isolation of Cellulolytic Bacteria from the Gastro-Intestinal Tract of *Achatina Fulica* (Gastropoda: Pulmonata) and Their Evaluation for Cellulose Biodegradation." *International Biodeterioration and Biodegradation* 98:73–80.
- Debroas, D., Humbert, J. F., Enault, F., Bronner, G., Faubladier, M., Cornillot, E. 2009. "Metagenomic Approach Studying the Taxonomic and Functional Diversity of the Bacterial Community in a Mesotrophic Lake (Lac Du Bourget - France)." *Environmental Microbiology* 11(9):2412–24.
- Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., Goyal, A. 2011. "Enhancement

- of Cellulase Activity from a New Strain of *Bacillus Subtilis* by Medium Optimization and Analysis with Various Cellulosic Substrates.” *Enzyme Research* 2011:1–8.
- Duan, C. J., Xian L., Zhao, G. C., Feng, Y., Pang, H., Bai, X. L., Tang, J. L., Ma, Q. S., Feng, J. X. 2009. “Isolation and Partial Characterization of Novel Genes Encoding Acidic Cellulases from Metagenomes of Buffalo Rumens.” *Journal of Applied Microbiology* 107(1):245–56.
- Van Dyk, J. S., Pletschke, B. I. 2012. “A Review of Lignocellulose Bioconversion Using Enzymatic Hydrolysis and Synergistic Cooperation between enzymes—Factors Affecting Enzymes, Conversion and Synergy.” *Biotechnology Advances* 30(6):1458–80.
- Fan, L.T., Gharpuray, M. M., Lee, Y. H. 1987. *Cellulose Hydrolysis. Biotechnology Monographs. Volume 3*. United States: Springer-Verlag, New York.
- De Faveri D., Aliakbarian B., Avogadro, M., Perego, P., Converti, A. 2008. “Improvement of Olive Oil Phenolics Content by Means of Enzyme Formulations: Effect of Different Enzyme Activities and Levels.” *Biochemical Engineering Journal* 41(2):149–56.
- Ferbiyanto, A., Rusmana, I., Raffiudin, R. 2015. “Characterization and Identification of Cellulolytic Bacteria from Gut of Worker Macrotermes Gilvus.” *HAYATI Journal of Biosciences* 22(4):197–200.
- Fia, G., Giovani, G., Rosi, I. 2005. “Study of β -Glucosidase Production by Wine-Related Yeasts during Alcoholic Fermentation. A New Rapid Fluorimetric Method to Determine Enzymatic Activity.” *Journal of Applied Microbiology* 99(3):509–17.
- Fox, J. M., Jess, P., Jambusaria, R. B., Moo, G. M. 2013. “A Single-Molecule Analysis Reveals Morphological Targets for Cellulase Synergy.” *Nat Chem Biol* 9(6):356–61.
- Galante, Y. M., De Conti, A., Monteverdi, R. 1998. “Application of Trichoderma Enzymes in the Food and Feed Industries.” *Trichoderma and Gliocladium* 2:327–42.
- 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(1):19.
- Godfrey, T., West, S. 1996. “The Application of Enzymes in Industry.” *Industrial*

Enzymology, 2nd Edn. The Nature Press, New York 512.

- Goyal, V., Mittal, A., Bhuwal, A. K., Singh, G., Yadav, A., Aggarwal, N. K. 2014. "Parametric Optimization of Cultural Conditions for Carboxymethyl Cellulase Production Using Pretreated Rice Straw by *Bacillus* Sp. 313SI under Stationary and Shaking Conditions." *Biotechnology Research International* 2014:1–7.
- Gupta, V. K. 2016. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: *Aspergillus System Properties and Applications*. Elsevier.
- Hadj-Taieb, N., Grati, N., Ayadi, M., Attia, I., Bensalem, H., Gargouri, A. 2012. "Optimisation of Olive Oil Extraction and Minor Compounds Content of Tunisian Olive Oil Using Enzymatic Formulations during Malaxation." *Biochemical Engineering Journal* 62:79–85.
- Haight, K. G., Gump, B. H. 1994. "The Use of Macerating Enzymes in Grape Juice Processing." *American Journal of Enology and Viticulture* 45(1):113 LP-116.
- Hakamada, Y., Koike, K., Yoshimatsu, T., Mori, H., Kobayashi, T., Ito, S. 1997. "Thermostable Alkaline Cellulase from an Alkaliphilic Isolate, *Bacillus* Sp. KSM-S237." *Extremophiles* 1(3):151–56.
- Harbord, R., Simpson, C., Wegstein, J. 1990. "Winery Scale Evaluation of Macerating Enzymes in Grape Processing." *Wine Industry J* 5:134–37.
- Harman, G. E., Kubicek, C. P. 1998. *Trichoderma and Gliocladium. Volume 2: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. Florida, United States: Taylor and Francis Ltd.
- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. 2006. "Industrial Applications of Microbial Lipases." *Enzyme and Microbial Technology* 39(2):235–51.
- Hattingh, M., Alexander, A., Meijering, I., van Reenen, C. A., Dicks, L. 2014. "Malting of Barley with Combinations of *Lactobacillus Plantarum*, *Aspergillus Niger*, *Trichoderma Reesei*, *Rhizopus Oligosporus* and *Geotrichum Candidum* to Enhance Malt Quality." *International Journal of Food Microbiology* 173C:36–40.
- Heikinheimo, L., Miettinen-Oinonen, A., Cavaco-Paulo, A., Buchert, J. 2003. "Effect of purified *Trichoderma Reesei* Cellulases on Formation of Cotton Powder from Cotton

- Fabric.” *Journal of Applied Polymer Science* 90(7):1917–22.
- Herbert, R. A. 1992. “A Perspective on the Biotechnological Potential of Extremophiles.” *Trends in Biotechnology* 10:395–402.
- Heredia, A., Jimenez, A., Guillen, R. 1995. “Composition of Plant Cell Walls.” *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung* 200(1):24–31.
- Himmel, M. E., Ding, S. Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., Brady, J. W., Foust, T. D. 2007. “Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production.” *Science* 315(5813):804–7.
- Hussain, A. A., Abdel-Salam, M. S., Abo-Ghalia, H. H., Hegazy, W. K., Hafez, S. S. 2017. “Optimization and Molecular Identification of Novel Cellulose Degrading Bacteria Isolated from Egyptian Environment.” *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*.
- Ijaz, A., Anwar, Z., Zafar, Y., Hussain, I., Muhammad, A., Irshad, M., Mehmood, S. 2011. “Optimization of Cellulase Enzyme Production from Corn Cobs Using *Alternaria Alternata* by Solid State Fermentation.” *Journal of Cell and Molecular Biology* 9(2):51–56.
- Irfan, M., Safdar, A., Syed, Q., Nadeem, M. 2012. “Selülaz Aktivitesine Sahip Bakterilerin Topraktan İzolasyonu, Değerlendirilmesi ve Selülaz Üretim ve Aktivitesinin Optimizasyonu.” *Turkish Journal of Biochemistry* 37(3):287–93.
- Ivanen, D.R., Rongjina, N. L., Shishlyannikov, S. M., Litviakova, G. I., Isaeva-Ivanova, L. S., Shabalin, K. A., Kulminskaya, A. A. 2009. “Novel Precipitated Fluorescent Substrates for the Screening of Cellulolytic Microorganisms.” *Journal of Microbiological Methods* 76(3):295–300.
- Jacobs, J. L., Mcallan, A. B. 1991. “Enzymes as Silage Additives. 1. Silage Quality, Digestion, Digestibility and Performance in Growing Cattle.” *Grass and Forage Science* 46(1):63–73.
- Johansson, E., Krantz-Rülcker, C., Zhang, B. X., Öberg, G. 2000. “Chlorination and Biodegradation of Lignin.” *Soil Biology and Biochemistry* 32(7):1029–32.
- Juciene, M., Dobilaite, D., Kazlauskaite, K. 2006. “Influence of Industrial Washing on

- Denim Properties.” 355–59.
- Juturu, V., Wu, J. C. 2014a. “Microbial Cellulases: Engineering, Production and Applications.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33(Complete):188–203.
- Juturu, V., Wu, J. C. 2014b. “Microbial Cellulases: Engineering, Production and Applications.” *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33:188–203.
- Kalaylı, E., Beyatlı, Y. 2003. “Bacillus Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA’ları.” *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi* 1(12):24–35.
- Karmakar, M., Ray, R. R. 2011. “Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases.” *The Effects of Brief Mindfulness Intervention on Acute Pain Experience: An Examination of Individual Difference* 1:1689–99.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. 2008. “A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram’s Iodine.” *Current Microbiology* 57(5):503–7.
- Korpole, S., Sharma, R., Verma, D. 2011. “Characterization and Phylogenetic Diversity of Carboxymethyl Cellulase Producing Bacillus Species from a Landfill Ecosystem.” *Indian Journal of Microbiology* 51(4):531–35.
- Krause, M., Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Farr, B. I., Nqrgaard, P. 1998. “Fibrolitic Enzyme Treatment of Barley Grain and Source of Forage in High-Grain Diets Fed to Growing Cattle.” *Journal of Animal Science* 76(11):2912–20.
- Krishna, S. H., Rao, K.C. S., Babu, J. S., Reddy, D. S. 2000. “Studies on the Production and Application of Cellulase from Trichoderma Reesei QM-9414.” *Bioprocess Engineering* 22:467–70.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., Singh, A. 2011. “Microbial Cellulases and Their Industrial Applications.” *Enzyme Research* 2011:1–10.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. 1999. “Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases.” *FEMS Microbiology Reviews* 23(4):411–56.
- Kumar, D., Murthy, G. 2013. “Stochastic Molecular Model of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose for Ethanol Production.” *Biotechnology for Biofuels* 6(1):1–20.

- Kuzu, S. B. 2008. "Kitinaz Üreten Bacillus İzolasyonu, Enzimin Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu." Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., Bras, J. 2012. "Microfibrillated Cellulose - Its Barrier Properties and Applications in Cellulosic Materials: A Review." *Carbohydrate Polymers* 90(2):735–64.
- Li, W., Zhang, W., Yang, M., Chen, Y. L. 2008. "Cloning of the Thermostable Cellulase Gene from Newly Isolated Bacillus Subtilis and Its Expression in Escherichia Coli." *Molecular Biotechnology* 40(2):195–201.
- Liang, Y. L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., Feng, J. X. 2014. "Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by Paenibacillus Terrae ME27-1." *BioMed Research International*.
- Lutolf, M. P., Lauer-Fields, J. L., Schmoekel, H. G., Metters, A. T., Weber, F. E., Fields, G.B., Hubbell, J. A. 2003. "Synthetic Matrix Metalloproteinase-Sensitive Hydrogels for the Conduction of Tissue Regeneration: Engineering Cell-Invasion Characteristics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9):5413–18.
- 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 : MMBR* 66(3):506–77.
- Miletic, N., Nastasovic, A., Loos, K. 2012. "Immobilization of Biocatalysts for Enzymatic Polymerizations: Possibilities, Advantages, Applications." *Bioresource Technology* 115:126–35.
- Miller, G. L. 1959. "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar." *Analytical Chemistry* 31(3):426–28.
- Mizushima, N., Komatsu, M. 2011. "Autophagy: Renovation of Cells and Tissues." *Cell* 147(4):728–41.
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood. 2011. *Cellulose Nanomaterials Review: Structure, Properties and Nanocomposites*.

- Nielsen, P. H., H. Kuilderd, W. Zhou, and X. Lu. 2009. "Enzyme Biotechnology for Sustainable Textiles." *Sustainable Textiles*, 5:133-138
- Nierstrasz, V. A. and M. M. C. G. Warmoeskerken. 2003. "4 – Process Engineering and Industrial Enzyme Applications." Pp. 120–57 in *Textile Processing with Enzymes*.
- O'Neill, C., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., Lourenço, N. D., Pinheiro, H. M., Delee, W. 1999. "Colour in Textile Effluents - Sources, Measurement, Discharge Consents and Simulation: A Review." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74(11):1009–18.
- Orgaz, B., Kives, J., Pedregosa, A., Monistrol, I., Laborda, F., SanJosé, C. 2006. "Bacterial Biofilm Removal Using Fungal Enzymes." *Enzyme and Microbial Technology* 40(1):51–56.
- OSullivan, A. C. 1997. "Cellulose: The Structure Slowly Unravels." *Cellulose* 4(3):173–207.
- Özşahin, A. D. 2006. "Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan Bacillus Sp. Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması." K.S.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş.
- Padilha, I. Q. M., Carvalho, L. C. T., Dias, P. V. S., Grisi, T. C. S. L., Honorato da Silva, F. L., Santos, S. F. M., Araujo, D. A. M. 2015. "Production and Characterization of Thermophilic Carboxymethyl Cellulase Synthesized by Bacillus Sp. Growing on Sugarcane Bagasse in Submerged Fermentation." *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 32(1):35–42.
- Parekh, S., Vinci, V. A., Strobel, R. J. 2000. "Improvement of Microbial Strains and Fermentation Processes." *Applied Microbiology and Biotechnology* 54(3):287–301.
- Paudel, Y. P., Qin, W. 2015. "Characterization of Novel Cellulase-Producing Bacteria Isolated From Rotting Wood Samples." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 177(5):1186–98.
- Prasad, P., Bedi, S., Bedi, Tanuja. 2011. "Comparative Assessment of Cellulolytic Potential of Two Streptomyces Strains Isolated from Municipal Wastes." *Asian Journal of*

Science and Technology 1(4):675–78.

- Qin, Y., He, H., Li, N., Ling, M., Liang, Z. 2010. “Isolation and Characterization of a Thermostable Cellulase-Producing *Fusarium Chlamydosporum*.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(11):1991–97.
- Ram, L., Kaur, K., Sharma, S. 2014. “Screening Isolation and Characterization of Cellulase Producing Micro-Organisms from Soil.” *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* 3(3):12–18.
- Rastogi, Gurdeep., Muppidi, G. L., Gurram, R. N., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Apel, W. A., Bang, S. S., Dixon, D. J., Sani, R. K. 2009. “Isolation and Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria from the Deep Subsurface of the Homestake Gold Mine, Lead, South Dakota, USA.” *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36(4):585–98.
- Reyes-Ortiz, V., Heins, R. A., Cheng, G., Kim, E. Y., Vernon, B. C., Elandt, R. B., Adams, P. D., Sale, K. L., Hadi, M. Z., Simmons, B. A., Kent, M. S., Tullman-Ercek, D. 2013. “Addition of a Carbohydrate-Binding Module Enhances Cellulase Penetration into Cellulose Substrates.” *Biotechnology for Biofuels* 6(1):93.
- Romero-Cascales, I., Ros-Garcia, J. M., Lopez-Roca, J. M., Gomez-Plaza, E. 2012. “The Effect of a Commercial Pectolytic Enzyme on Grape Skin Cell Wall Degradation and Colour Evolution during the Maceration Process.” *Food Chemistry* 130(3):626–31.
- Sadhu, S., Ghosh, P. K., Aditya, G., Maiti, T. K. 2014. “Optimization and Strain Improvement by Mutation for Enhanced Cellulase Production by *Bacillus* Sp. (MTCC10046) Isolated from Cow Dung.” *Journal of King Saud University - Science* 26(4):323–32.
- Saginur, R., Clecner, B., Portnoy, J., Mendelson, J. 1982. “Superoxol (Catalase) Test for Identification of *Neisseria Gonorrhoeae*.” *Journal of Clinical Microbiology* 15:475–77.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. third. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Saraçoğlu, Z. N. 2010. “Cellulase-Free Alkaline Xylanase Enzim Üreticisi *Bacillus* Sp. Suşlarının İzolasyonu, Enzim Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Kullanım

Olanaklarının Araştırılması.” Ç.Ü. Yüksek Lisans Tezi, Adana.

- Saratale, G. D., Saratale, R. G., Oh, S. E. 2014. “Production and Characterization of Multiple Cellulolytic Enzymes by Isolated Streptomyces Sp. MDS.” *Biomass and Bioenergy* 47:302–15.
- Sarrouh, B., Santos, T. M., Miyoshi, A., Dias, R., Azevedo, V. 2012. “Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market.” *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* S4(2):1–10.
- Scheffler, A., Bamforth, C. W. 2005. “Exogenous β -Glucanases and Pentosanases and Their Impact on Mashing.” *Enzyme and Microbial Technology* 36(5–6):813–17.
- Schnell, S., Chappell, M. J., Evans, N. D., Roussel, M. R. 2006. “The Mechanism Distinguishability Problem in Biochemical Kinetics: The Single-Enzyme, Single-Substrate Reaction as a Case Study.” *Comptes Rendus Biologies* 329(1):51–61.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., Gupta, S. 2013. “Optimization of Cellulase Production from Bacteria Isolated from Soil.” *ISRN Biotechnology* 2013:1–7.
- Sevim, E. Ç., Sevim, A., Özgümüş, O. B. 2006. “İçme Sularından İzole Edilen Bacillus Suşlarının İdentifikasyonu ve Antibiyotiklere Direnç Profilleri.” *Society* 36:219–23.
- Shah, S. R. 2013. “Chemistry and Applications of Cellulase in Textile Wet Processing.” *Research Journal of Engineering Sciences* 2(7):1–5.
- Shajahan, S., Moorthy, I. G., Sivakumar, N., Selvakumar, G. 2016. “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
- Shanmughapriya, S., Kiran, G. S., Selvin, J., Thomas, T. A., Rani, C. 2010. “Optimization, Purification, and Characterization of Extracellular Mesophilic Alkaline Cellulase from Sponge-Associated Marinobacter Sp. MSI032.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162:625–40.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateshwar, S., Rao, M. A. 2013. “Production of Cellulase” *Ijpcbs* 3(4):1070–90.
- Sharma, R., Kaushal, B. B., Sharma, P. C. 2007. “Development of Cost Effective

- Commercial Method for Enhancing Yield and Quality of Olive Oil.” *Journal of Food Science and Technology* 44(2):133–37.
- Sharma, R., Sharma, P. C., Rana, J. C., Joshi, V. K. 2015. “Improving the Olive Oil Yield and Quality Through Enzyme-Assisted Mechanical Extraction, Antioxidants and Packaging.” *Journal of Food Processing and Preservation* 39(2):157–66.
- Sharrock, K. R. 1988. “Cellulase Assay Methods: A Review.” *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 17(2):81–105.
- Sheng, P., Huang, S., Wang, Q., Wang, A., Zhang, H. 2012. “Isolation, Screening, and Optimization of the Fermentation Conditions of Highly Cellulolytic Bacteria from the Hindgut of *Holotrichia Parallela* Larvae (Coleoptera: Scarabaeidae).” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167(2):270–84.
- de Souza, W. R. 2013. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization. *InTech* 2013.
- Sriariyanun, M., Tantayotai, P., Yasurin, P., Pornwongthong, P., Cheenkachorn, K. 2016. “Production, Purification and Characterization of an Ionic Liquid Tolerant Cellulase from *Bacillus* Sp. Isolated from Rice Paddy Field Soil.” *Electronic Journal of Biotechnology* 19(1):23–28.
- Teeri, T. T. 1997. “Crystalline Cellulose Degradation: New Insight into the Function of Cellobiohydrolases.” *Trends in Biotechnology* 15:160–67.
- Tachaapaikoon, C., Kosugi, A., Pason, P., Waeonukul, R., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K. L., Arai, T., Murata, Y., Mori, Y. 2012. “Isolation and Characterization of a New Cellulosome-Producing *Clostridium Thermocellum* Strain.” *Biodegradation* 23(1):57–68.
- Tachibana, N., Saitoh, A., Shibata, H., Saitoh, M., Fujita, S., Ohmachi, T., Kato, Y., Takagaki, K., Yoshida, T. 2005. “Carboxymethyl Cellulase from Mid-Gut Gland of Marine Mollusc, *Patinopecten Yessoensis*.” *Journal of Applied Glycoscience* 52(2):107–13.
- Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K. 1989. “Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus* Sp. No. AH-101.” *Applied Microbiology and*

Biotechnology 30(2):120–24.

Topuz, U., Eren Kiran, Ö., Çömlekçioğlu, U. 2007. “Selülaz Üreticisi *Bacillus* Suşlarının Enzimatik Özelliklerinin Araştırılması.” 10(2):13–16.

Torres-Salas, P., del Monte-Martinez, A., Cutino-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A. O., Plou, F. 2011. “Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports.” *Advanced Materials* 23(44):5275–82.

Trinh, D. K., Quyen, D. T., Do, T. T., Nguyen, T. T. H., Nghiem, N. M. 2013. “Optimization of Culture Conditions and Medium Components for Carboxymethyl Cellulase (CMCase) Production by a Novel Basidiomycete Strain *Peniophora* Sp. NDVN01.” *Iranian Journal of Biotechnology* 11(4):251–59.

Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., Jha, B. 2011. “An Alkali-Halotolerant Cellulase from *Bacillus Flexus* Isolated from Green Seaweed *Ulva Lactuca*.” *Carbohydrate Polymers* 83(2):891–97.

URL-1, <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-industrial-enzymes-market-industry>, Industrial Enzymes Market - Growth, Share, Trends and Forecasts (2018 - 2023), 2 Aralık 2017.

URL-2, <https://www.transparencymarketresearch.com/cellulose-fibers-market.html>, Cellulose Fibers Market for Spun Yarn, Fabrics and Clothing Applications - Global Industry Analysis, Size Share, Growth, Trends and Forecast, 2012 – 2018, 2 Kasım 2017.

URL-3, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Basic Local Alignment Search Tool, 28 Kasım 2017.

Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M., Sundquist, J. 1986. “Application of enzymes in bleaching.” *Proceedings of 4th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry*, Paris,1:151-154.

Voget, S., Steele, H. L., Streit, W. R. 2006. “Characterization of a Metagenome-Derived Halotolerant Cellulase.” *Journal of Biotechnology* 126(1):26–36.

Voragen, A. G. J., Schols, H. A. Beldman, G. 1992. “Tailor-Made Enzymes in Fruit Juice Processing.” *Fruit Processing* 2:98–102.

- Wang, J., Ding, M., Li, Y. H., Chen, Q. X., Xu, G. J., Zhao, F. K. 2003. "Isolation of a Multi-Functional Endogenous Cellulase Gene from Mollusc, *Ampullaria Crosseana*." *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 35:941–46.
- Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson T. H. 2007. "Metagenomic and Functional Analysis of Hindgut Microbiota of a Wood-Feeding Higher Termite." *Nature* 450(7169):560–65.
- Watanabe, H., Tokuda, G. 2010. "Cellulolytic Systems in Insects." *Annual Review of Entomology* 55(1):609–32.
- Wittrup, K. D., Bailey, J. E. 1988. "A Single-Cell Assay of Beta-Galactosidase Activity in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Cytometry* 9(4):394–404.
- Wyman, C., Decker, S., Stephen, R. 2004. "Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose." *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* 1:1023-1062
- Xu, Y. Q., Duan, C. J., Zhou, Q. N., Tang, J. L., Feng, J. X. 2006. "Cloning and Identification of Cellulase Genes from Uncultured Microorganisms in Pulp Sediments from Paper Mill Effluent." *Appl Microbiol Biotechnol.* 46(5):783—788.
- Yalcin Cakir, F., Engin, E., Gurgan, S., Sabuncuoğlu, S., Şahin Arpa, Ç., Tokgöz, İ., Özgüneş, H., Kiremitçi, A. 2015. "Effect of Bleaching on Mercury Release from Amalgam Fillings and Antioxidant Enzyme Activities" *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 27(1):29–36.
- Yang, W., Meng, F., Peng, J., Han, P., Fang, F., Ma, L., Cao, B. 2014. "Isolation and Identification of a Cellulolytic Bacterium from the Tibetan Pig's Intestine and Investigation of Its Cellulase Production." *Electronic Journal of Biotechnology* 17(6):262–67.
- Yooseph, S., Sutton, G., Rushch, D. B., Halpern, A. L., Williamson, S. J., Remington, K., Eisen, J. A., Heidelberg, K. B., Manning, G., Li, W. 2007. "The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Expanding the Universe of Protein Families." *PLOS Biology* 5(3):1–35.
- Zhang, Y. H. P., Lynd, L. R. 2004. "Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems." *Biotechnology and*

Bioengineering 88(7):797–824.

Zhao, K., Guo, L. Z., Lu, W. D. 2012. “Extracellular Production of Novel Halotolerant, Thermostable, and Alkali-Stable Carboxymethyl Cellulase by Marine Bacterium *Marinimicrobium* Sp. LS-A18.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168(3):550–67.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kübra KOÇAK

Doğum Yeri : Elazığ/Merkez

Doğum Tarihi : 10.04.1991

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Elazığ Balakgazi Lisesi (2005-2009)

Lisans : Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü
(2010-2014)

Yüksek Lisans : Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik
Anabilim Dalı (Eylül 2014 - Ocak 2018)