



**SELÜLAZ ENZİMİNİN AĞRI DİYADİN TERMAL KAPLICALARINDAN İZOLE
EDİLEN BAKTERİDEN ELDE EDİLMESİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Osman EREN
Doktora Tezi
Kimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU
AĞRI-2024
(Her Hakkı Saklıdır)

T.C. AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Osman EREN

SELÜLAZ ENZİMİNİN AĞRI DİYADIN TERMAL KAPLICALARINDAN
İZOLE EDİLEN BAKTERİDEN ELDE EDİLMESİ, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI
VE KARAKTERİZASYONU
DOKTORA TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ
Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU

AĞRI-2024

LİSANASÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Selülaz Enziminin Ağrı Diyadin Termal Kaplıcalarından İzole Edilen Bakteriden Elde Edilmesi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı doktora tezinin bilimsel ve etik kurallara riayet edilerek tarafımdan hazırlandığını taahhüt eder, tezimin basılı ve elektronik nüshalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivlerinde saklanmasına ve tamamının erişime açılmasına izin verdiğimi beyan ederim.

■ Tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

Osman EREN

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU danışmanlığında, Osman EREN tarafından hazırlanan bu çalışma 27/08/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ
Jüri Üyesi: Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU
Jüri Üyesi: Doç.Dr. Aykut ÖZTEKİN
Jüri Üyesi: Doç. Dr. Fikret TÜRKAN
Jüri Üyesi: Dr.Öğr. Ü. Neslihan BALCI

İmza:
İmza:
İmza:
İmza:
İmza:

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine ait olup;

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../202.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

/...../.....

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SELÜLAZ ENZİMİNİN AĞRI DİYADIN TERMAL KAPLICALARINDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİDEN ELDE EDİLMESİ, KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU

2024, 118 sayfa

Jüri: Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ

Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU

Doç.Dr. Aykut ÖZTEKİN

Doç. Dr. Fikret TÜRKAN

Dr.Öğr. Ü. Neslihan BALCI

Bu çalışmada Ağrı ili Diyadin İlçesinde bulunan termal sıcak su kaynağından elde edilen *Bacillus licheniformis* OE-1 suşuna ait selülaaz enziminin karakterizasyonu ve çeşitli bileşiklerin enzime etkisi ile bu bakterinin ürettiği ekzopolisakkarit miktarı ve ekzopolisakkaritin antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Selülaaz enziminin optimum çalışma sıcaklığı ve pH'ı sırasıyla 60°C ve 9,0'dır. Selülaaz enziminin karboksimetil selüloz (CMC) substratı ile V_{max} değeri 2,33 EU/mL olup K_m değerinin ise 0,0348 mM olduğu görülmüştür. EDTA, KCl, $MgSO_4$, $NaIO_3$ ve SDS bileşiklerinin selülaaz enzimine olan etkileri incelendiğinde bu bileşiklerin enzimi inhibe ettiği görülmektedir. Lineweaver-Burk grafiği çizilerek bu bileşiklerin IC_{50} ve K_i değerleri hesaplanarak inhibisyon tipleri belirlenmiştir. Bu çalışmada izole edilen *Bacillus licheniformis* OE-1 suşunun en fazla pH 6,0'da ürettiği, en fazla ekzopolisakkariti de bu pH'da ve 40°C'de ürettiği belirlenirken üretilen ekzopolisakkaritin antimikrobiyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

2024, 118 sayfa

Anahtar Sözcükler: Antimikrobiyal, *Bacillus licheniformis*, Diyadin Termal kaplıcaları, Ekzopolisakkarit, Selülaaz,

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

OBTAINING, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CELLULAZE ENZYME FROM BACTERIA ISOLATED FROM AĞRI DIYADIN THERMAL SPRINGS

Advisor: Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU

2024, 118 page

Jury: Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ
Doç.Dr. Halis ŞAKİROĞLU
Doç.Dr. Aykut ÖZTEKİN
Doç. Dr. Fikret TÜRKAN
Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BALCI

In this study, the characterization of cellulase enzyme of *Bacillus licheniformis* OE-1 strain obtained from a thermal hot water source in Diyadin District of Ağrı Province, the effects of various compounds on the enzyme, the amount of exopolysaccharide produced by this bacteria and the antimicrobial effect of exopolysaccharide were investigated. The optimum operating temperature and pH of cellulase enzyme were determined as 60°C and 9.0, respectively. According to these results, V_{max} value was 2.33 EU/mL and K_m value was 0.0348 mM for cellulase enzyme with carboxymethyl cellulose (CMC) substrate. When the effects of EDTA, KCl, $MgSO_4$, $NaIO_3$ and SDS compounds on cellulase enzyme were analyzed, these compounds inhibited the enzyme. IC_{50} and K_i values of these compounds were calculated by drawing the Lineweaver-Burk graphs and inhibition types were determined. As a result of the studies, it was determined that *Bacillus licheniformis* OE-1 strain grows at pH 6.0 and produces the most exopolysaccharide at this pH and 40°C, and the exopolysaccharide produced has antimicrobial effect.

Keywords: Antimicrobial, *Bacillus licheniformis*, Cellulase, Diyadin Hot Spring Exopolysaccharides,

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak hazırlanan bu araştırma, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu araştırma FEF 20.004 nolu Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi olarak desteklenmiştir.

Doktora eğitimim boyunca, benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için her türlü şartı sağlayan ve bana her zaman her türlü desteği sunan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Halis ŞAKİROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren tez izleme komitesi jüri üyeleri çok değerli hocalarım Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ ve Doç.Dr. Aykut ÖZTEKİN ile katkılarından dolayı Doç. Dr. Fikret TÜRKAN ve Dr. Öğr. Üyesi Neslihan BALCI'ya teşekkürlerimi sunarım

Çalışmalarım esnasında değerli yardımları ile bana yardımcı olan arkadaşlarım Sayın Dr. Abdullah DEMİRCİ'ye Sayın Dr. Tahir YÜCEL'e ve Sayın Dr. Şehriban OĞUZ'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca kendisini ihmal etmeme rağmen maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Haticetül Kübra ALTAY EREN'e, ve oğlum Ömer Bera EREN'e, bugünlere gelmem de büyük katkıları olan Annem Elif EREN'e ve Babam Nebi EREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında Laboratuvarın imkânlarından faydalanmamı sağlayan Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvar'ı yönetimine teşekkür ederim.

...../...../2024
Osman EREN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Selüloz.....	1
1.2. Enzimler	2
1.2.1. Enzimlerin tarihçesi, yapısı ve inhibisyonu	3
1.2.2. Enzimlerin numaralandırılması ve sınıflandırılması.....	5
1.2.2.1. Oksidoredüktazlar:	6
1.2.2.2. Transferazlar:	6
1.2.2.3. Hidrolazlar:	6
1.2.2.4. Liyazlar:	6
1.2.2.5. İzomerazlar:.....	7
1.2.2.6. Ligazlar:	7
1.2.3. Selülaz:	7
1.2.3.1. Selülaz enziminin bileşimlerine göre sınıflandırılması.....	11
1.2.4 Endüstride Selülaz enziminin kullanımı	13
1.2.4.1. Gıda endüstrisinde Selülaz enzimi kullanımı.....	14
1.2.4.2. Biyoetanol üretiminde Selülaz enzimi kullanımı.....	21
1.2.4.3. Diğer endüstriyel alanlarda Selülaz enzimi kullanımı	22
1.3. Bakteriler ve Sınıflandırılması	22
1.3.1. Termofilik Bakteriler ve Habitatları.....	23
1.3.2. Biyoteknolojik Açıdan Termofilik Bakteriyel Enzimler ve Önemi	24
1.3.3. Bacillus cinsi bakteriler, özellikleri ve endüstriyel uygulamaları	25
1.4. Selülaz Enzim Kaynakları:.....	27
1.4.1. Mikrobiyal selülaz enzimleri	27
1.5. Ekzopolisakkaritler	28
1.5.1. Bakteriyel ekzopolisakkaritler	28

1.5.2. Bakteriyel ekzopolisakkaritlerin antibakteriyel özellikleri	29
2. KAYNAK ÖZETLERİ	31
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	39
3.1. Materyaller	39
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar.....	39
3.1.2. Tez için kullanılan besiyerleri	39
3.1.2.1. LB (Luria Bertani)-Agar besiyeri.....	39
3.1.2.2. CMC (Carboxymethyl Cellulose)- LB Agar besiyeri	40
3.1.2.3. Nutrient Agar besiyeri.....	40
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler:	40
3.1.3.1. Fizyolojik Tuzlu Su:.....	40
3.1.3.2. Kongo Kırmızı Çözeltisi	41
3.1.3.3. 1 M NaCl Çözeltisi.....	41
3.1.3.4. Çeşitli Konsantrasyonlarda NaOH Çözeltileri	41
3.1.3.5. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)	41
3.1.4.1. Sodyum-Fosfat Tamponu.....	42
3.1.4.2. Glisin-NaOH tamponu	42
3.1.5. Elektroforez için kullanılan çözeltiler	43
3.1.6. Diğer çözeltiler.....	44
3.1.6.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi.....	44
3.1.6.2. Protein Standart Çözeltisi.....	44
3.2. Yöntemler.....	45
3.2.1. Bakteri izolasyonu ve tanısı	45
3.2.2. İzolatların selüloz üretme yeteneklerinin tespiti	45
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	46
3.2.4. Selüloz Enziminin kısmi saflaştırılması	48
3.2.5. Selüloz Enzimi aktivitesinin belirlenmesi ve karakterizasyonu.....	48
3.2.5.1. Glukoz Standart Eğrisi	49
3.2.5.2. Selüloz Enziminin Çalıştığı Optimum pH'nın Belirlenmesi.....	49
3.2.5.3. Selüloz Enziminin Çalıştığı Optimum İyonik Şiddetin belirlenmesi.....	50
3.2.5.4. Selüloz Enziminin Çalıştığı Stabil pH'nın belirlenmesi	50
3.2.5.5. Selüloz Enziminin CMC substratı ile Çalıştığı Optimum Sıcaklığının belirlenmesi	50

3.2.5.6. Selülaz Enziminin CMC substratı ile 4°C’de Depolama stabilitesinin belirlenmesi	50
3.2.5.7. Selülaz Enziminin CMC substratı ile Km-Vmax, Kcat ve Vo Değerlerinin belirlenmesi	51
3.2.5.8. Selülaz Enziminin Aktivasyon Enerjisinin (Ea), Aktivasyon Entalpisinin (ΔH) ve Q10 Değerlerinin Belirlenmesi	52
3.2.6. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	52
3.2.6.1. Selülaz Enzimi için Sephadex G-100 jelinin hazırlanması	53
3.2.6.2. Süpernatanttaki Selülaz Enziminin Sephadex G-100 ile Saflaştırılması	53
3.2.7. Kalitatif Protein Tayini	54
3.2.8. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	54
3.2.9. SDS-PAGE Poliakrilamid Jel Elektroforezi	54
3.2.10. Selülaz Enzimi Üzerine Bazı Bileşiklerin İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi	56
3.2.11. Selülaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Bileşiklerin Ki Sabitlerinin Bulunması	57
3.2.12. <i>Bacillus licheniformis</i> OE-1’in Gelişimi için Optimal pH’nın Belirlenmesi.	57
3.2.13. <i>Bacillus licheniformis</i> OE-1’in Optimum EPS Ürettiği pH Değerinin Belirlenmesi	58
3.2.14. <i>Bacillus Licheniformis</i> OE-1’in Optimum EPS Ürettiği Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.	58
3.2.15. <i>Bacillus Licheniformis</i> OE-1’den Elde Edilen EPS’nin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi	58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	60
4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik.....	60
4.2. Glukoz Standart Grafiği	61
4.3. İzolasyon Sonuçları.....	62
4.4. İzolatların Enzim Üretme Yeteneği Sonuçları	63
4.5. 16s rDNA PCR Sonucu.....	66
4.6. Kısmi Saflaştırma Sonucu.....	66
4.7. Selülaz Enziminin Optimum pH Sonuçları.....	67
4.8. Selülaz Enziminin Optimum İyonik Şiddeti Sonuçları	68
4.9. Selülaz Enziminin Stabil pH Sonuçları.....	70
4.10. Selülaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları.....	71
4.11. Selülaz Enziminin 4°C’de Depolama Stabilitesi Sonuçları	72

4.12. Selülaz Enziminin CMC substratı ile Km-Vmax, Kcat ve Vo Değerleri sonuçları	73
4.13. Selülaz Enziminin Km-Vmax, Kcat ve Vo Değerleri sonucu.....	74
4.14. Selülaz Enziminin Sephadex G-100 ile Saflaştırma Sonucu	75
4.15. Selülaz Enziminin SDS-PAGE Elektroforez Sonucu	76
4.16. Selülaz Enzimi Üzerine Bazı Bileşiklerin IC ₅₀ Değerleri Sonuçları.....	77
4.17. Selülaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Bazı Bileşiklerin Ki Sabitleri Sonuçları	80
4.18. <i>Bacillus licheniformis</i> OE-1'in Geliştiği Optimum pH değeri Sonuçları	84
4.19. <i>Bacillus licheniformis</i> OE-1 Optimum Ekzopolisakkarit ürettiği pH değeri Sonuçları	85
4.20. <i>Bacillus licheniformis</i> OE-1'in En Yüksek Ekzopolisakkarit Ürettiği Optimum Sıcaklık Değeri Sonucu.....	86
4.21. <i>Bacillus licheniformis</i> OE-1'den Elde Edilen EPS'nin Antibakteriyel Etkisi Sonuçları	87
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OH ⁻	Hidroksil
CD	Katalitik Domain
CBD	Selüloz Bağlayıcı Bölge
CbpA-CipA	Skaffoldin protein
°C	Santigrat derece
SDS-PAGE	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
EPS	Ekzopolisakkarit
CPS	Kapsüler ekzopolisakkarit
K	Kelvin
T	Mutlak Sıcaklık
mM	Milimolar
M	Molar
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ea	Aktivasyon Enerjisi
kJ/mol	Kilo Joule/mol
ΔH	Aktivasyon Entalpisi
LB-Agar	Luria Bertani-Agar Besiyeri
LB	Luria Bertani Besiyeri
CMC	Karboksimetil selüloz
NA	Nutrient Agar
DNS	Dinitrosalisilik asit
Et	Toplam enzim miktarı
R	Gaz sabiti
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Selüloz'un Yapısı.....	1
Şekil 1.2. Enzimlerin Aktivasyon Enerjisini düşürmesi	3
Şekil 1.3. Peptit Bağı.....	4
Şekil 1.4. Proteinlerin Üç Boyutlu Yapıları.....	5
Şekil 1.5. Holoenzim	5
Şekil 1.6. Selülaz enziminin üç boyutlu yapısı	9
Şekil 1.7. Selülaz enzimlerinin hidroliz etme şekli	10
Şekil:1.8. Selülaz Enziminin Katalitik etki mekanizmaları.....	11
Şekil:1.9. Selülozun basit selülaz enzimi ile hidrolizi	12
Şekil:1.10. Selülozun selülozom ile hidrolizi	13
Şekil 1.11. Bakterilerin Optimum Sıcaklık Eğrileri.....	23
Şekil 1.12. <i>Bacillus licheniformis</i> OE-1	27
Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik	61
Şekil 4.2. Aktivite ölçümlerinde kullanılan standart glukoz grafiği	61
Şekil 4.3. Toprak ve su örneklerinin alındığı yerler-A	62
Şekil 4.4. Toprak ve su örneklerinin alındığı yerler -B	62
Şekil 4.5. Bakteri İzolasyonu ve saflaştırma sonuçları	63
Şekil 4.6. İzolatların Kongo Kırmızı Testi Sonuçları	64
Şekil 4.7. Yüksek enzim üretme yeteneğine sahip izolatların Kongo Kırmızısı Testi sonuçları	64
Şekil 4.8. OE-1'in Kongo Kırmızısı Testi Sonucu	65
Şekil 4.9. Genomik DNA izolasyonu jel sonuç görüntüsü	66
Şekil 4.10. Selülaz Enziminin Optimum pH sonuçları	67
Şekil 4.11. Selülaz Enziminin Optimum pH grafiği	68
Şekil 4.12. Selülaz Enziminin Optimum İyonik Şiddet sonuçları	69
Şekil 4.13. Selülaz Enziminin Optimum İyonik Şiddet grafiği	69
Şekil 4.14. Selülaz Enziminin Stabil pH Sonuçları	70
Şekil 4.15. Selülaz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları	71
Şekil 4.16. Selülaz enziminin 4 °C'de depolama stabilitesi sonuçları.....	72

Şekil 4.17. Selülaz Enziminin CMC substratı ile Km-Vmax değerlerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan 1/V-1/S grafiği.....	74
Şekil 4.18. Selülaz enzimi için optimum sıcaklık, Ea, ΔH ve Q10 değerlerine ait grafik.....	75
Şekil 4.19. Selülaz enzimi için sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle elde edilen saflaştırma grafiği.....	76
Şekil 4.20. Selülaz Enziminin SDS-PAGE görüntü sonuçları.....	77
Şekil 4.21. Selülaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[EDTA] grafiği	79
Şekil 4.22. Selülaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[KCl] grafiği.....	79
Şekil 4.23. Selülaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[MgSO ₄] grafiği	79
Şekil 4.24. Selülaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[PIO ₃] grafiği.....	79
Şekil 4.25. Selülaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[SDS] grafiği	80
Şekil 4.26. Selülaz enzimi için EDTA'nın inhibisyon Etkisi	81
Şekil 4.27. Selülaz enzimi için KCl'nin inhibisyon Etkisi	81
Şekil 4.28. Selülaz enzimi için MgSO ₄ 'ün inhibisyon etkisi	82
Şekil 4.29. Selülaz enzimi için PIO ₃ 'ün inhibisyon Etkisi	82
Şekil 4.30. Selülaz enzimi için SDS'nin inhibisyon Etkisi.....	83
Şekil 4.31. Bakteri ekimi öncesi farklı pH'larda hazırlanan besiyerleri.....	84
Şekil 4.32. Farklı pH'larda OE-1 gelişimi	85
Şekil 4.33. <i>B.licheniformis</i> OE-1'in pH 6.0'da ürettiği EPS	86
Şekil 4.34. EPS'nin <i>B.subtilis</i> üzerine etkisi	89
Şekil 4.35. EPS'nin <i>P. aeruginosa</i> üzerine etkisi	89
Şekil 4.36. EPS'nin <i>K. pneumoniae</i> üzerine etkisi	90
Şekil 4.37. EPS'nin <i>S. aureus</i> üzerine etkisi.....	91

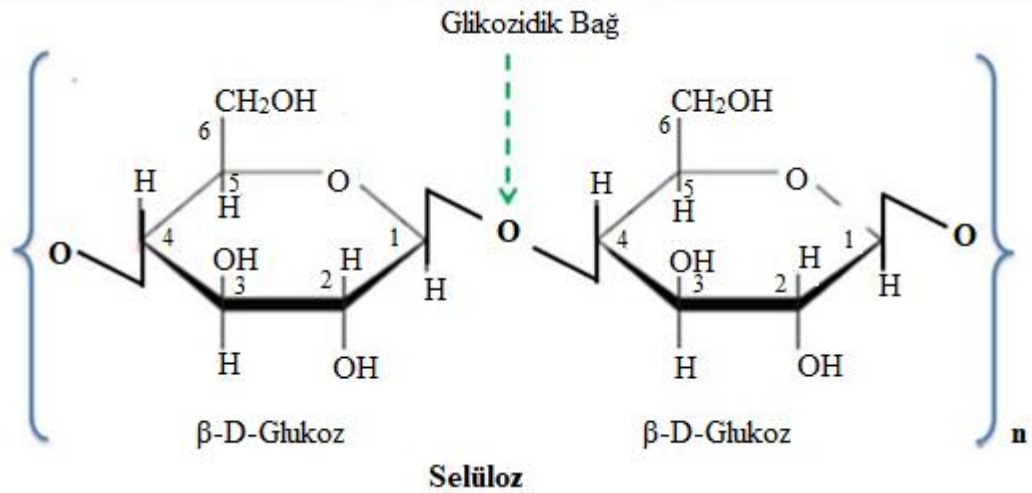
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Fosfat Tamponu hazırlama çizelgesi	42
Çizelge 3.2. Glisin-NaOH Tamponu hazırlama çizelgesi.....	43
Çizelge 4.1. En yüksek zon aktivitesine sahip bakterilerin net zon aktivitesi sonuçları	65
Çizelge 4.2. Selüloz Enziminin pH sonuçları çizelgesi	68
Çizelge 4.3. Selüloz Enziminin iyonik şiddet sonuçları çizelgesi	70
Çizelge 4.4. Selüloz Enziminin Stabil pH sonuçları Çizelgesi	71
Çizelge 4.5. Selüloz Enziminin Optimum Sıcaklık çizelgesi	72
Çizelge 4.6. Selüloz Enziminin 4 °C’de Depolama Stabilitesi çizelgesi	73
Çizelge 4.7. Selüloz Enziminin CMC substratı ile K_M , V_{max} , k_{cat} ve V_0 değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları	74
Çizelge 4.8. Selüloz enzimi için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerine ait tablo	75
Çizelge 4.9. Selüloz Enziminin Homojenat ve Jel Filtrasyon Sonucu Saflaştırma Tablosu.....	76
Çizelge 4.10. Selüloz Enzimi üzerine etki gösteren bazı bileşiklerin IC_{50} değerleri .	81
Çizelge 4.11. Selüloz Enzimi üzerine etki gösteren bazı bileşiklerin K_i değerleri ve İnhibisyon Tipleri.....	83
Çizelge 4.12. <i>B.licheniformis</i> OE-1’in farklı pH’larda in üreme yoğunluğu.....	85
Çizelge 4.13. <i>B.licheniformis</i> OE-1’in farklı pH’larda EPS üretim miktarı.....	86
Çizelge 4.14. <i>B.licheniformis</i> OE-1’in farklı sıcaklıklarda ürettiği EPS miktarı.....	87
Çizelge 4.15. <i>B. Licheniformis</i> OE-1’in ürettiği EPS’nin antibakteriyel etkisi	87

1. GİRİŞ

1.1. Selüloz

Selüloz yeryüzünün en yaygın biyopolimeri olup hücre duvarının ana bileşenlerinden biridir. Bitkilerin yanı sıra algler, tulumlular ve bakteriler gibi farklı canlılar tarafından da sentezlenir (Moon *et al* 2011). Selüloz $(C_6H_{10}O_5)_n$ genel formülüne sahiptir ve n sayıda β -D-Glukoz'un 1. ve 4. karbon atomlarının oksijen köprüsü üzerinden bağlanmasıyla oluşan bir homopolisakarittir (Hockenberger 2004). (Şekil 1.1). Selüloz molekülü doğrusal ve doğal bir polimer olup her bir glukoz ünitesi üzerinde, oksijenle reaksiyona girme eğiliminde olan üç adet hidroksil grubu bulunur. Bu OH⁻ gruplarının bir başka selüloz zincirinin OH⁻ grubuyla bağ yapabilme özelliği vardır. Hidrojen bağları denilen bu bağlar, selüloz moleküllerinin hidrofil özellik kazanmalarını sağlarlar (Çankaya and Sökmen 2016). Selüloz, yapı endüstrisi, kâğıt endüstrisi ve tekstil endüstrisinin temel ham maddelerinden biridir. Selülozun bitkilerde hemiselüloz ve lignin ile bulunması nedeniyle selülozu bunlardan izole etmek ve yapıtaşlarına ayırmak için oldukça fazla miktarda enerji ve kimyasal maddeye ihtiyaç bulunmaktadır. Bu nedenle selülozun kimyasal ajanlarla elde edilmesi çevre kirliliğine de neden olmaktadır (Brown 2004).



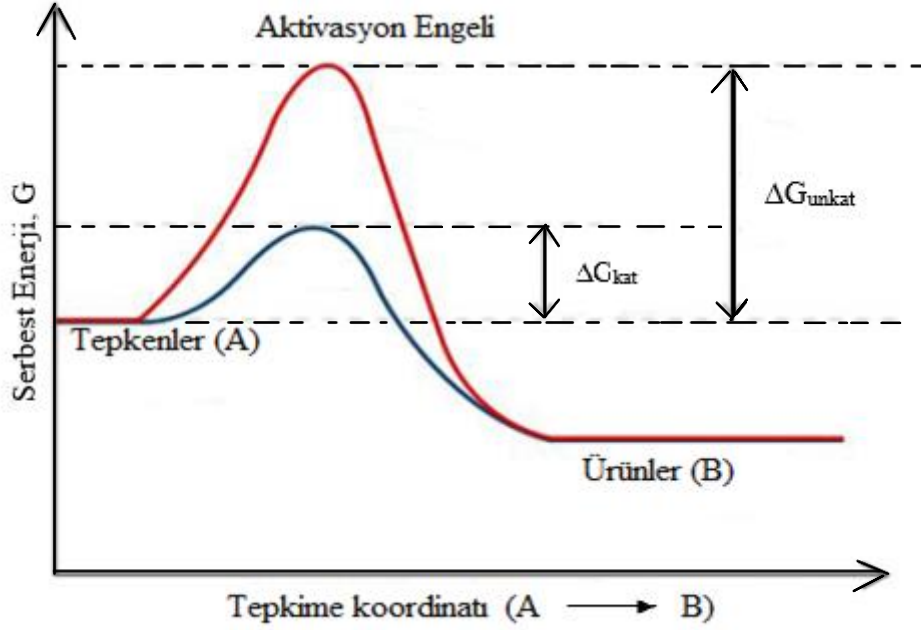
Şekil 1.1. Selüloz'un Yapısı.

Selüloz, bitki biyokütlesinin %40'ını oluşturmaktadır ve hidrofilik özelliğine rağmen suda çözünmemektedir. Selüloz, minimum üç farklı enzimin sinerjistik çalışması ile glukoza hidrolize olabilir (Kıran vd 2006).

1.2. Enzimler

Biyokataliz olmasaydı yaşamın devam etmesi için elzem olan kimyasal reaksiyonların zamanında meydana gelmesi düşük ihtimaldi, biyolojik sistemlerin tepkime katalizörleri enzimlerdir. Bir diğer ifadeyle enzimler biyokimyasal reaksiyonların olmasını ve bu sayede canlılığın devam etmesini sağlayan oldukça önemli protein yapıdaki moleküllerdir. Enzimleri sentetik ve inorganik katalizörlerinden ayıran en önemli özellik çok yüksek düzeydeki katalitik aktiviteleridir. Enzimler substratları için yüksek bir özgüllük seviyesine sahip olup optimum pH ve optimum sıcaklık değerlerinde olmasalar bile oldukça aktif şekilde işlevsel olabilirler. Enzimler, organizmada hiçbir yan ürün oluşturmayıp %100 verimle çalışan katalizörler olup kimyasal katalizörlerde bu kadar yüksek düzeyde ve yan ürün oluşmadan reaksiyonun gerçekleşmesi oldukça zordur. Hücrede meydana gelen yapım, yıkım, sindirim gibi biyokimyasal faaliyetlerin enzimler olmadan gerçekleşmesi pek mümkün değildir. Enzimler, reaktanların reaksiyon oluşturabilmeleri için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyona giren maddenin ara ürün veya ürüne geçiş durumunu kolaylaştırır ve böylece daha hızlı ve kolay şekilde reaksiyonun gerçekleşmesini sağlar (Nelson and Cox 2005). Biyokimyasal katalizörler, reaksiyon hızını 10^{20} kata kadar arttırabilme yeteneğine sahiptirler. Biyolojik olmayan katalizörlere baktığımızda ise bu oranın 10^2 - 10^4 arası olduğu belirtilmiştir. Özetle, enzimler inorganik katalizörlerden yaklaşık 10^8 - 10^{20} arası daha hızlı şekilde reaksiyon hızını arttırabilirler (Türkan 2015). Bir enzim genellikle sadece bir reaksiyonu veya birbirine yakın olan bir reaksiyon dizisini katalizler ve bu aşamada yan ürün neredeyse hiç meydana gelmez. Enzimler aynı maddenin stereoizomerlerinde bile bazen katalitik etkiye sahip değildir. Enzimleri diğer inorganik katalizörlerden ayıran en önemli faktörlerin başında işte enzimlerin bu özgüllüğü gelmektedir. Kataliz olayı enzimin aktif bölge adı verilen bir bölgesinde meydana gelir ve bilinen tüm enzimler protein yapıdadır. Fakat kataliz konusunda enzimler tekel değildir ve bazı katalitik RNA molekülleri de bulunmaktadır (Jaeger

and Eggert 2004; Berg *et al.* 2010). Enzimlerin reaksiyonu nasıl gerçekleştirdikleri konusundaki en muhtemel açıklama, bu katalitik yapıların kimyasal bağları ve substratları en olası şekilde bir araya gelmesini sağlayarak reaksiyonun oluşmasını katalize ettiği şeklindedir (Balcı 2015).



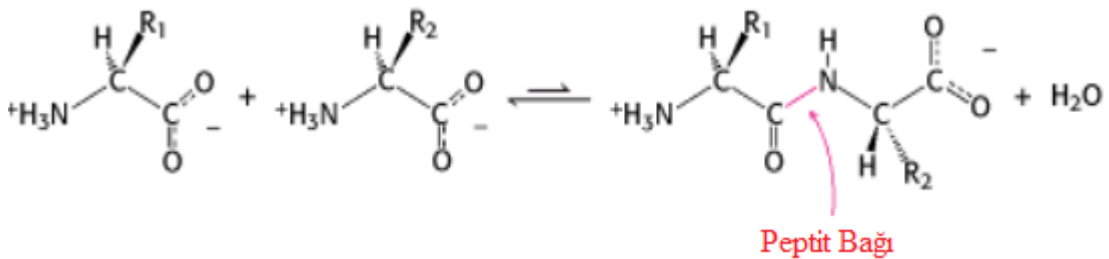
Şekil 1.2. Enzimlerin Aktivasyon Enerjisini düşürmesi (Nelson and Cox 2005)

1.2.1. Enzimlerin tarihçesi, yapısı ve inhibisyonu

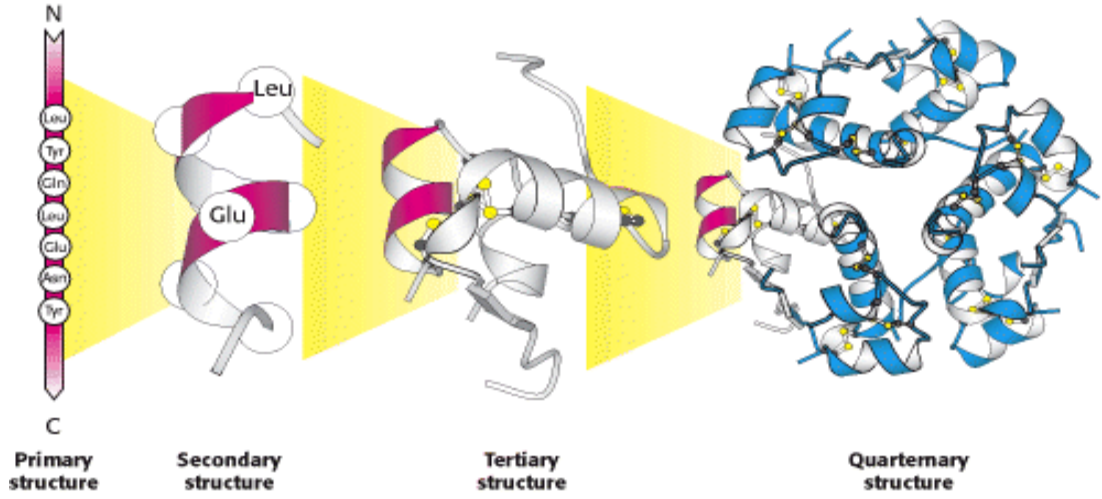
Biyokatalizörler ile ilgili ilk çalışmalar 1700’lü yıllarda mide salgılarının eti sindirdiğinin fark edilmesiyle olmuştur. Daha sonra 1800’lerde bazı bitki özlerinin ve tükürüğün nişastayı parçaladığının gösterilmesiyle devam etmiştir. 1897’de Eduard Buchner mayaların şekeri alkole dönüştürdüğünü ve bu yapının mayadan uzaklaşsa bile işlemine devam edebildiğini buldu. F. Kühne, bu yapıya enzim adı verdi ve böylece enzimlerin izole edilmesi ve özelliklerinin belirlenmesi biyokimya biliminin gelişmesini sağladı. 1926’da üreaz’ın kristalize edilmesi enzimler adına yeni bir çağın başlangıcı oldu. Daha sonra 1930’lardan itibaren farklı enzimler izole edilip özellikleri belirlenmiştir. 1930’da J.B.S Haldane enzimlerin sadece proteinlerden ibaret olduğunu belirtmiş olup substrat ve enzim arasındaki zayıf etkileşimlerin substratı değiştirdiğini ileri sürmüştür. Bugün enzimlerin sadece proteinlerden müteşekkil olmadığını

biliyoruz; ama Haldane'nin teorisi, katalitik mekanizmanın anlaşılmasında temel etken olmuştur (Nelson and Cox 2005).

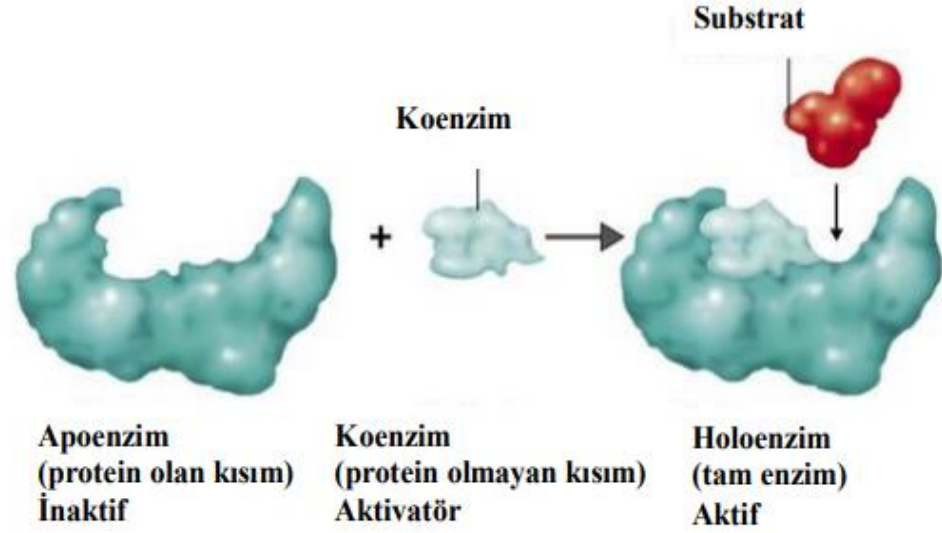
Enzimler, protein yapıda olan bileşiklerdir ve proteinler aminoasitlerin bir araya gelmesiyle oluşurlar. Aminoasitler peptit bağı ile bağlanırken işlevsel olabilmeleri için üçüncül veya dördüncül yapıyı oluşturmaları gerekir. Peptit bağı, bir aminoasidin merkez C atomu ile komşu aminoasidin N atomu arasında meydana gelir. Yapılan çalışmalarda aminoasitlerdeki C—N bağının diğer bileşiklerdeki C—N bağından farklı olduğu ispatlanmıştır. Aminoasitlerin düz bir zincir şeklinde peptit bağlarıyla bir araya gelmesiyle birincil (primer) yapı meydana gelirken hidrojen bağları ve diğer interaksiyonlarla birlikte sırayla sekonder, tersiyer ve kuarterner (dördüncül) yapı oluşur. Enzimin fonksiyonel olması için yapının denatüre olmaması gerekir. Enzimler, ısı, ışık, metal iyon varlığı, radyasyon gibi çeşitli faktörlerin etkisiyle tersiyer yapıları bozulup inhibe olabilirler. Enzimler ana bileşen olarak proteinlerden oluşmalarına rağmen, çoğu enzim işlev görebilmek için proteinlerin dışında da çeşitli yapılara ihtiyaç duyar. Bazı enzimler aktivite gösterebilmek için kofaktör olarak isimlendirilen Fe^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} gibi inorganik iyonlara ihtiyaç duyarken bazı enzimler de koenzim olarak adlandırılan kompleks organik veya metalloorganik yapılara ihtiyaç duyar. Bu yapılar proteine çok sıkı bağlıysa prostetik grup olarak da isimlendirilir. Protein kısım ile aktif olmak için metal iyonuna veya koenzime ihtiyaç duyan yapıya holoenzim denir. Bu gibi enzimlerin protein kısmına apoenzim (apoprotein) denilir. Koenzimler işlevsel yapıların taşıyıcısı olarak genelde rol oynar ve koenzimler çoğunlukla vitaminlerdir (Nelson and Cox 2005; Şentürk 2009; Berg *et al.* 2010; Türkan 2015).



Şekil 1.3. Peptit Bağı (Berg *et al.* 2010)



Şekil 1.4. Proteinlerin Üç Boyutlu Yapıları (Berg *et al.* 2010)



Şekil 1.5. Holoenzim (Şentürk 2009)

1.2.2. Enzimlerin numaralandırılması ve sınıflandırılması

Enzimler ilk olarak etki ettikleri substratlara göre sonlarına –az eki getirilerek sınıflandırılmıştır. Ancak bu sınıflandırma bütün enzim sistemlerini düzenli bir şekilde açıklayamamıştır, bu sebeple Uluslararası Enzim Komisyonu sistematik bir sınıflandırma yapmıştır. Bu sınıflandırma metoduna göre enzimler katalizledikleri reaksiyon tipine bağlı olarak 6 ana gruba ayrılmıştır. Her gruptaki enzimlere E.C. ile başlayan bir kod verilmiş ve her bir enzimin dört rakamdan oluşan kodu meydana getirilmiştir.

1-İlk rakam enzimin ait olduğu 6 sınıfın hangisini içerisine girdiğini göstermektedir.

2-İkinci rakam alt sınıfı

3-Üçüncü rakam enzimin alt-alt sınıfını ve

4-Dördüncü rakam ise enzimin içinde bulunduğu alt-alt sınıftaki seri numarasını gösterir.

Enzimlerin gösterdikleri özelliklere göre sınıflandırıldığı altı grup aşağıdaki gibidir (Hürtaş Tatlı 2013).

1- Oksidoretükteazlar:

2- Transferazlar:

3- Hidrolazlar

4- Liyazlar

5- İzomerazlar

6- Ligazlar

1.2.2.1. Oksidoredüktazlar:

2 substrat arasında redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

1.2.2.2. Transferazlar:

İki substrat arasında hidrojen dışındaki grupların transferini katalizleyen enzimlerdir.

1.2.2.3. Hidrolazlar:

Ester, peptit, C-Halojenür, anhidrit, glikozid, eter veya P—N bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bütün proteolitik enzimler, esteraz, lipaz, glikozidaz ve fosfataz gibi enzimler bu grupta yer alır

1.2.2.4. Liyazlar:

Substratlardan grupların uzaklaşarak çift bağların oluşturulduğu reaksiyonları katalizleyen enzimlerin genel adıdır. Hidratasyon ve Dehidratasyon enzimleri bu gruptandır.

1.2.2.5. İzomerazlar:

Optik veya geometrik izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir.

1.2.2.6. Ligazlar:

ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir.

1.2.3. Selülaz:

Selülaz; Hidrolaz enzim grubuna ait olup, selülozlardaki β -1,4 bağlarını hidroliz eder ve son ürün olarak glukoz, sellobiyoz ve selooligosakkaritleri meydana getirir. Mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar (memeliler hariç) tarafından üretilirler. Glikozil hidroliz enzim ailesinin üyesi olan selülazlar, bağımsız şekilde üç boyutlu şekil kazanan, yapı ve fonksiyon olarak ayrık enzim yapılarının bir araya gelmesiyle birden fazla enzimden oluşan bir enzim sistemidir (Aygan *et al.* 2011; Caf 2012). Selülaz yapısını içeren alt enzimler, substrat spesifikliğine göre veya yapısal özelliklerine göre bir diğer tabirle protein dizileri esas alınarak sınıflandırılmaktadır. Bu yapısal sınıflandırma, aktif bölgenin aminoasit sekanslarının farklılığı ve benzerliği, üç boyutlu yapısal katlanma ve katalitik mekanizmanın korunması hakkında bilgi verir. Bu iki sınıflandırmanın haricinde katalitik mekanizmaya göre de sürekli veya kesikli olarak da sınıflandırılabilir; fakat bu sınıflandırma metodu çok yaygın kullanılmaz. Sınıflandırma günümüzde yaygın olarak substrat spesifikliği üzerinden yapılmaktadır (Davies and Henrissat 1995; Aygan *et al.* 2011; Hürtaş Tatlı 2013).

Substrat spesifikliğine göre enzimler: (Saddler *et al.* 1986)

- a) Endoglukanazlar (EC 3.2.1.4),
- b) Ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.74) ve Sellobiyohidrolazlar (EC 3.2.1.91),
- c) Glukozidaz-Sellobiyaz (EC 3.2.1.21).

β (1-4) Endoglukanazlar, selülozu oluşturan polisakkarit yapısının iç bölgelerini gelişigüzel hidrolize ederek düşük polimerizasyon derecesine sahip ve çözünür oligosakkaridik yapılar ile polisakkaritleri meydana getirir (Kumar *et al.* 2009).

Ekzoglukanazlar olarak isimlendirilen glukanohidrolazlar (E.C. 3.2.1.74) ve sellobiyohidrolazlar (E.C. 3.2.1.91) ise selüloz zincirinin indirgen ve indirgen olmayan uçlarından sırasıyla hidroliz işlemi yaparlar. Sellobiyohidrolazlar sellobiyozu oluştururken Glukanohidrolazlar ise selüloz zincirinin uçlarından glukoz birimlerini serbest bırakmaktadır. Sellobiyohidrolazlar, glukanohidrolaz ve sellobiyazın nihai ürünü olan glukoz tarafından inhibe edilir (Sukumaran *et al.* 2005; Labes *et al.* 2008). β -glukosidazlar (sellobiyaz), sellobiyoz'u hidrolize ederek glukozu oluşturur. Tüm β -glukozidazlar sellobiyoz için spesifik değildir; bazı glukozidazlar sellobiyoz'un yanı sıra ksilibiyoz gibi farklı glikozidler de hidrolize edebilir. (Nidetzky ve Claeysens 1994; Haki and Rakshit 2003; Bayer *et al.* 2006). Selülaz enzimlerinin genel bir özelliği, hem katalitik bölgeyi (CD) hem de substrat bağlayan bölgeyi (CBD) modüler şekilde içermesidir. CBD selülotik hidrolizi kolaylaştırmak için muhtemelen CD'yi substrata yaklaştırır. Bu iki alan bağlayıcı peptitlerle birbirine bağlanır. Özellikle ekzoglukanazların hidrolitik aktivitelerinde CBM önemli fonksiyonlar üstlenir (Boraston *et al.* 2004). Selüloz bağlayan modüllerin bilinen üç ana fonksiyonu mevcuttur

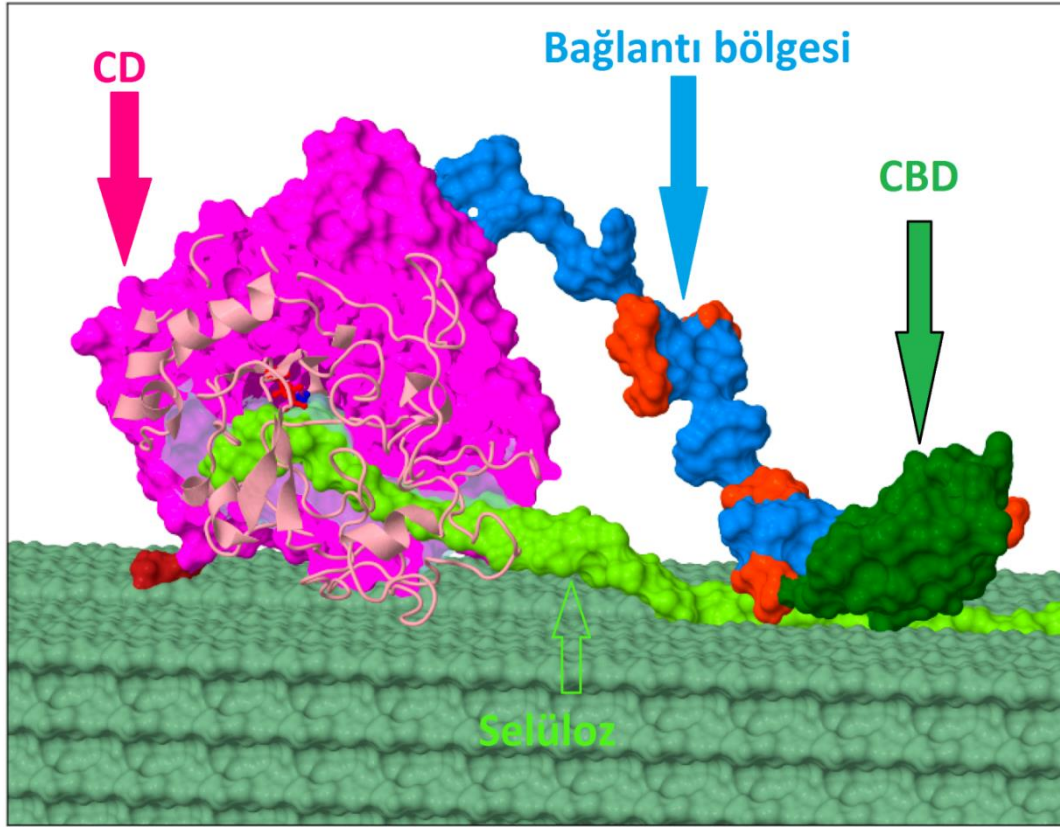
Yaklaşırma işlevi: enzimin çözünmez yapıda olan substrata erişebilirliğini artırma işlevidir.

Substrat Özgüllüğü: Bitki hücre duvarları sadece selülozdan müteşekkil değildir, CBM'ler kompleks yapıdaki hücre duvarında spesifik karbohidratları hedefler.

Nonhidrolitik selüloz degradasyonu: Selülozun düzenli rijit supramoleküler yapılarını bozma işlevidir.

Farklı kökenlere ait CBD'ler yüksek bir özgüllük ve fonksiyonel çeşitliliğe sahiptir. CBD'ler protein içinde tek bir domain olarak bulunabileceği gibi ikili veya üçlü olarak da bulunabilir ve ortalama 30-200 aminoasit içerir. CBM'nin polipeptit zinciri üzerindeki yerleşim bölgesi zincirin karboksil veya amino ucu olabileceği gibi zincirin ortalarında da bulunabilir. CBM ile CD'yi birbirine bağlayan bağlayıcı bölgeler bulunur, bu bağlantıyı prolin ve treonin'den zengin yapılar sağlar. CBD'nin CD ile substrat arasındaki reaksiyonu kolaylaştırdığı ve aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir; çünkü CBD'nin CD'den çıkarılması sonucu enzim aktivitesinde önemli ölçüde azalma olduğu belirlenmiştir (Lee and Brown 1997; Lynd *et al.* 2002). CBD'nin tam olarak bunu nasıl sağladığı bilinmese de substratı CD için en aktif

şekilde yönlendirdiği düşünülmektedir (Wilson 2008). CBD'ler ayrıca selüloz zincirleri arasındaki non-kovalent bağlantıların parçalanmasını da katalize eder ve selüloz kristallerinin yüzeyinde zincirlerin bozunmasını hızlandırır (Valjamae *et al.* 1998).

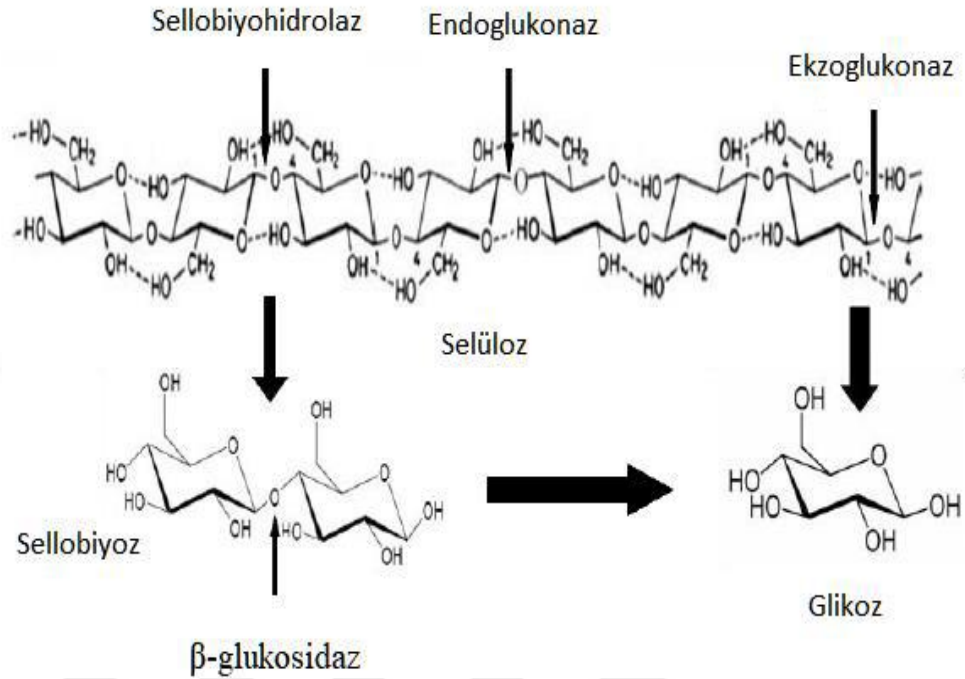


Şekil 1.6. Selüloz enziminin üç boyutlu yapısı (<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2119/htm#app1-ijms-20-02119>)

Selüloz enzimleri sinerjistik etkiye sahiptir. Bu sinerjistik aktivitenin birden fazla yolla meydana geldiği rapor edilmiştir.

Bunlar:

- Endoglukanaz ve Ekzoglukanazlar arasında meydana gelen endo-ekzo sinerjisi
- Selüloz zincirinin indirgen ve indirgen olmayan uçlarından ekzoglukanaz enzimleri (sellobiyohidrolazlar ve glukanohidrolazlar) arasındaki ekzo-ekzo (sellobiyo-glukano) sinerjisi
- Sellobiyaz (β -glukozidaz) ve ekzoglukanazlar arasındaki sinerji.
- CD ve CBM arasındaki molekül içi sinerji (Han *et al.* 2003; Sukumaran 2005).



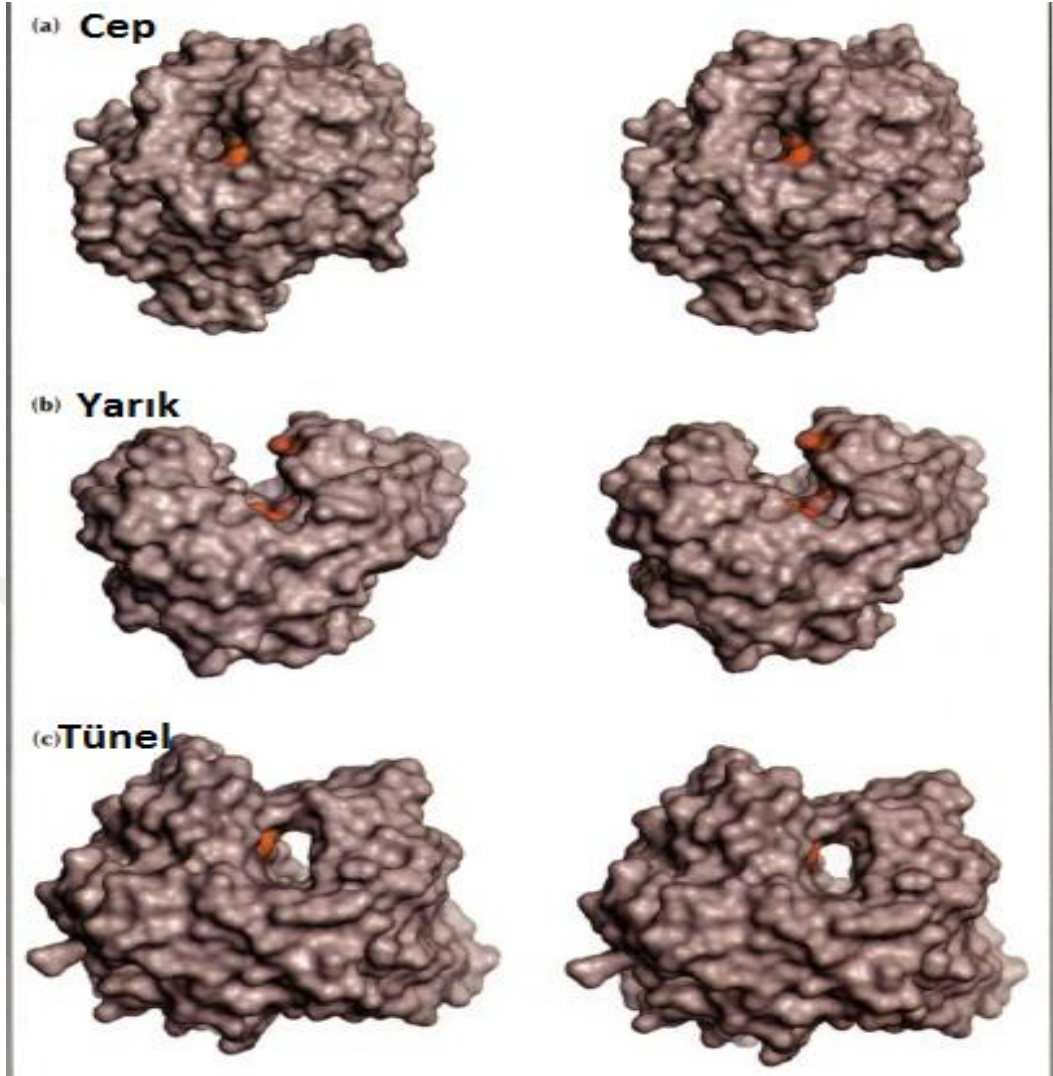
Şekil 1.7. Selülaz enzimlerinin hidroliz etme şekli (Beguin and Aubert 1994).

Glikozil hidrolazların aktif bölgenin kataliz mekanizmasında bilinen üç farklı kataliz metodu mevcuttur. Bu farklı metotlar selülaz enziminin çeşidine göre değişmektedir. Üç farklı katalitik şekil vardır. Bu katalitik yapılar: a) Cep veya Krater topolojisi b) Yarık veya Oluk Topolojisi ve c) Tünel topolojisi

Cep veya krater topolojisi: Sakkaritlerin indirgen olmayan uçları için kullanışlıdır, genelde β -galaktozidaz, β -glukozidaz gibi monosakkaridazlarda ve glukoamilaz ile β -amilaz gibi ekzopolisakkaritler de görülür. (Şekil 1.8-a)

Yarık veya oluk topolojisi: Bu “açık” yapı, polimerik substratlarda rastgele bir şeker ünitesinin bağlanmasına olanak verir ve genel olarak endoselülaz, lizozim ve kitinaz gibi endo aktiviteli enzimlerde görülür. (Şekil 1.8-b)

Tünel topolojisi: Aslında yarık biçimli yapıdan gelir. Yarık topolojisi uzun yarıklar geliştirdiğinde oluşur. Bilindiği kadarıyla sadece sellobiyohidrolazlarda bulunan bir yapıdır. Polisakkarit yapısının içinden geçmesine olanak verir (Davies and Henrissat 1995). (Şekil 1.8)

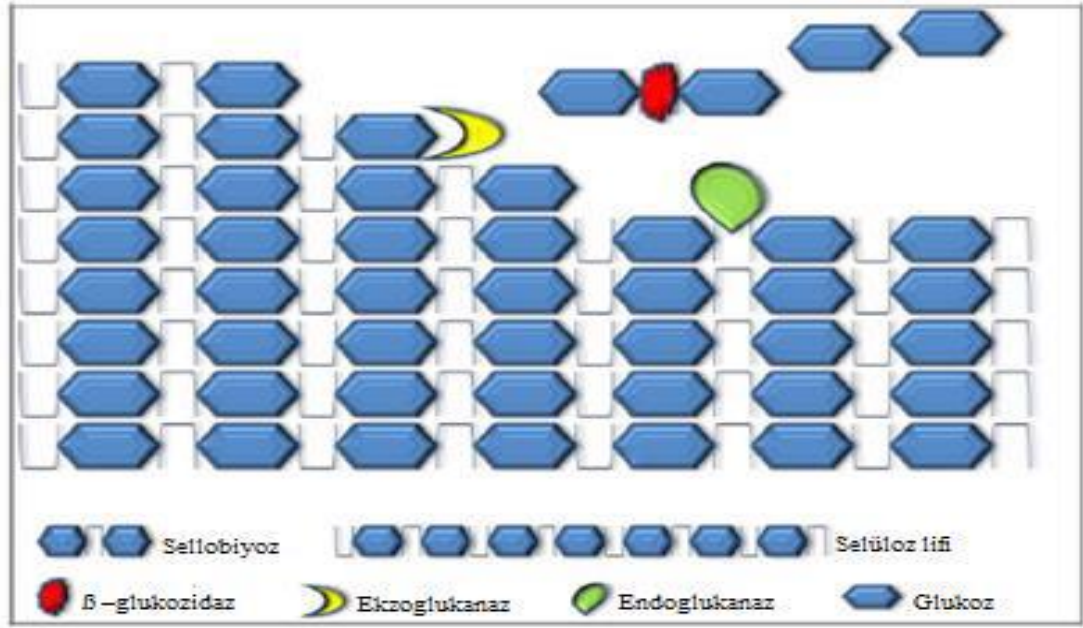


Şekil:1.8. Selülag Enziminin Katalitik etki mekanizmaları (Davies and Henrissat 1995).

1.2.3.1. Selülag enziminin bileşimlerine göre sınıflandırılması

Selülag enzimleri bileşimlerine göre basit ve kompleks olarak sınıflandırılabilir. Sınıflandırma, aynı zamanda selülagun parçalanma sistemini ve selülagın elde edildiği kaynağı da göstermektedir (Lakhundi *et al.* 2015).

1.Basit Selülagatik Sistem (Serbest Selülagazlar): Aerobik fungus ve bakterilerin ürettiği genelde endoglukonaz, ekzoglukonaz ve sellobiyaz (β - glukozidaz)’dan oluşan selülag enzimleridir. Genel olarak 6-10 arası selülag enzimi içerir. (Şekil 1. 9)

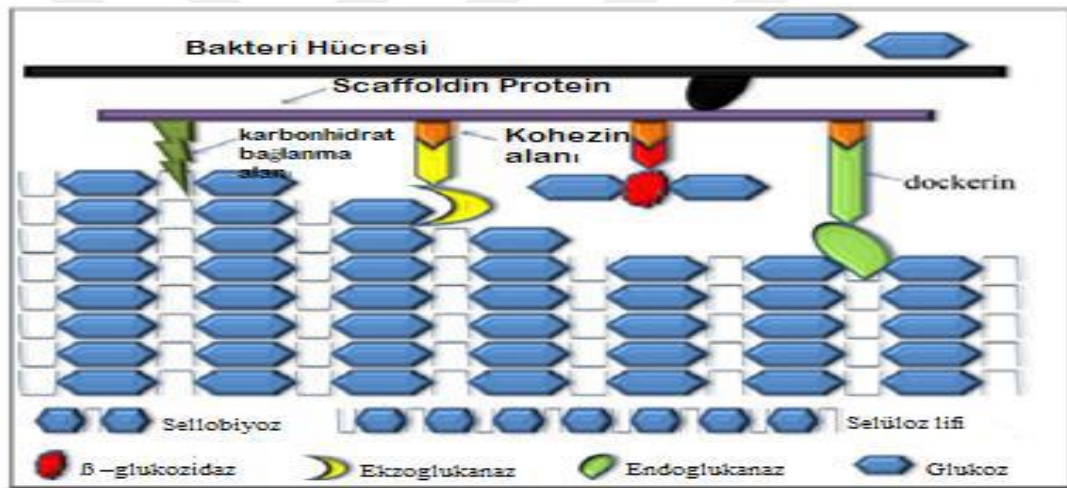


Şekil.1.9. Selülozun basit selüloz enzimi ile hidrolizi (Lakhundi *et al.* 2015)

2. Kompleks Selülatik Sistem (Selülozom)

Kompleks selüloz sistemi çoğunlukla anaerobik mikroorganizmalar tarafından kullanılan, genellikle organizmanın yüzeyine bağlı “selülozom” adı verilen, selüloz, hemiselüloz ve pektini parçalayabilen ekstraselular büyük protein komplekslerinden müteşekkil yapılardır (Teeri 1997; Lynd *et al.* 2002; Aygan *et al.* 2011). Lamed *et al.* (1983) ilk defa bu terimi *C.thermocellum*’u incelerken tanımlamışlardır, Selülozom enzimleri scaffoldin adı verilen ve enzimatik karakter taşımayan bir proteine bağlı halde bulunurlar. Scaffoldin basit bir protein olmayıp birden fazla proteinin birleşmesiyle meydana gelen kompleks bir yapıdır. Bu proteinlere CbpA, CipA ya da CipC denilir ve selülozomal enzimler bu yapılarla kompleks oluştururlar. Scaffoldin proteininde ayrıca işlevi bilinmeyen bir veya daha fazla hidrofil modül, CBD ve kohezin adı verilen bölgeler de bulunur. Nonenzimatik bu proteine bağlanan selülozomal enzimlerde dockerin II bölgesi bulunur ki bu bölge ve kohezin arasındaki bağlantı enzimin scaffoldin proteinine bağlanmasını sağlar. Enzimlerde enzim kodlayan bölge de mevcuttur. CBD protein ve selülozomal enzimin birbirlerini tanımasını sağlar. Kohezin ve dockerin arasında da spesifik bir özgülük yoktur (Bayer *et al.* 1998; Doi 2003). Basit enzimlerle selülozom arasındaki en önemli farklardan biri, CBD’lerin lokasyonudur. Selülozomlarda CBD’ler iskele proteinine (scaffoldin

proteini) bağlı bulurken serbest enzimlerde bu yapı enzimin bileşik bir yapısıdır. Fakat her iki enzimin aktif merkezlerinin ve CBD'lerin yapıları benzerdir (Bayer *et al.* 2006). Anaerobik canlıların kompleks olmayan selüloz yerine kompleks bir selüloz sistemi geliştirmelerinin nedeninin selülozu parçalayabilmek için, sınırlı olan ATP'yi en verimli şekilde kullanarak alternatif bir yol geliştirme olduğu düşünülmektedir ve bu selüloz metodunun çeşitli avantajlar sağladığı da rapor edilmiştir. Bu faydalar: Sinerjizmin selülozomal yapının doğru oranı sayesinde optimize olması ve verimli şekilde bağlanmayı sağlayıp verimin maksimize edilmesi. Tüm bileşenlerin aynı hedefe kolektif şekilde yönelerek rekabetin azaltılması ve enzimlerin spesifik düzeylerin farklı olması sayesinde maksimum verimin olması şeklinde belirtilmiştir (Lakhundi *et al.* 2015).



Şekil:1.10. Selülozun selülozom ile hidrolizi (Lakhundi *et al.* 2015)

1.2.4 Endüstride Selüloz enziminin kullanımı

Gıda, ilaç, yem, kâğıt, tekstil ve biyokütleden alkol üretimi gibi birçok farklı endüstriyel alanlarda selülozlar kullanılmaktadır (Hu *et al.* 2008; Lavanya *et al.* 2011). 2017 ve 2018'de yayınlanan iki farklı rapora göre selülozlar en çok tekstil endüstrisinde kullanılırken, gıda, yem, biyoyakıt ve deterjan endüstrileri selüloz'ın diğer endüstriyel alanları olmuştur. Asya-Pasifik bölgesi selüloz enzimlerinin en büyük tüketici pazarıdır. Rapordaki veriler üzerinden 2025 yılı sonuna kadar selüloz pazarının dünyada 230 milyon dolara ulaşacağı tahmin ediliyor (Jayasekara and Ratnayake 2019).

1.2.4.1. Gıda endüstrisinde Selülag enzimi kullanımı

1. Meyve ve sebze endüstrisinde Selülag kullanımı

Gıda sanayisinde selülag, alkollü içeceklerden meyve suyuna kadar sektörün birçok alt alanında kullanılır. Alkollü içecek endüstrisinde glukanaazlar glukana'nın hidrolizi, viskozite problemlerinin çözümü, filtrasyon kalitesinin arttırılması gibi durumlar için kullanılır (Bayer *et al.* 2007). Selülag, meyve suyu üretiminde de kullanılan enzimlerden biridir. Meyve ve Sebze sularının ekstrakte edilmesi, berraklaştırılması ve stabilizasyonu gibi farklı amaçlar için kullanılabilir. Selülaglar ayrıca zeytinyağı başta olmak üzere yağ teknolojisinde yağın ekstrakte edilmesi işleminde kullanıma potansiyeline sahiptir. Selülaglar bu alanda tohum ve hücre çeperinin hidrolize edilmesine katkıda bulunarak daha kısa sürede daha yüksek verimle ürün alınmasını sağlayabilir. Yapılan araştırmalar neticesinde enzimatik metotlar sayesinde elde edilen yağların antioksidan, polifenol ve aromatik bileşik miktarlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Selülag'ın gıda sanayisinde ağırlıklı olarak kullanıldığı alan meyve suyu ve alkollü içkiler olsa da ekmek ve fırıncılık sektöründe de kullanılmaktadır. Ekmek hamurunun kıvamının uygun hale getirilmesinde etkili olduğu bilinen selülag ayrıca farklı fırıncılık ürünlerin ürün kalitesinin geliştirilmesinde de kullanılır. Buna ilaveten selülaglar karotenoid gibi doğal boyar maddelerin ekstraksiyonunda ve kurutulmuş sebze ve çorbaların rehidrasyonunda da kullanılır (Godfrey *et al.* 1996; Bhat 2000; Kuhad *et al.* 2011; Saranraj *et al.* 2012). Bunların dışında; ferment soya ürünlerinin (soya sosu ve miso gibi) üretiminde soyanın dış kısmının uzaklaştırılmasında, hindistan cevizi ve soya fasulyesindeki proteinlerin ve mısır ile patatesteki nişastanın izole edilmesinde, sindirimini kolaylaştırmak için deniz yosununun arıtılmasında ve yosundan agar ekstraksiyonunda, gıda katkı maddesi olan lignosülozun parçalanmasında, ferment gıdaların besin değerlerinin arttırılmasında, selüloz içeren atık ürünlerden glukoz ve selooligosakkarit elde edilmesinde, tek hücre proteinlerinin üretilmesi amacıyla ve biyoetanol üretmek için substrat eldesinde de kullanılır (Coughlan 1985; Mandels 1985; Beguin and Aubert 1994; Sukumaran 2005). Sadece insan yiyeceklerinde değil; hayvan yemlerinde de selülag'ın kullanılması sindirilebilirlik ve yemlerin besin kalitesinde artışlar meydana getirmiştir. Selülag geniş getiren hayvanların yemleri ile kanatlı ve balık yemlerine de ilave edilmektedir (Gismondo *et al.* 1999). Selülag,

meyve-sebze sanayi için önemli bir enzimdir. Meyve-Sebze suyunun çıkarılmasında ürünler ilk önce yıkanır ve ayıklanır. Daha sonra sınıflandırılır, sap, çekirdek gibi kısımlar çıkarılır, doğranır veya ezilir. Daha sonra çeşitli işlemlerle meyve suyu elde edilir. Doğranmış veya ezilmiş, preslenmiş ürüne mayşe denilir. Mayşe, ürün çeşidine göre ısıtma, fermentasyon gibi çeşitli ön işlemlerden geçirilir. Fermentasyon aşamasında çeşitli enzimler uygulanır. Selüloz enzimi, mayşenin viskozitesinin düşmesini ve bu sayede daha fazla miktarda meyve suyu elde edilmesini ve ayrıca antosiyanin gibi çok değerli metabolitlerin de daha yüksek seviyede meyve suyuna geçmesini sağlar. Selüloz, sadece mayşe sıvılaştırmada değil; kabukların uzaklaştırılmasında da kullanılabilir. Kabuk soyma işleminde kimyasal ajanlar, mekanik soyma, dondurma gibi farklı metotların yerini enzimatik işlemlerin alması sonucu hem ürün kayıpları azalır ve verim artar hem enerji maliyetleri düşer hem de çevreye daha az zarar verilmiş olur. Sebze ve meyve sularının elde edilmesi en yoğun sebze-meyve işleme şekillerinden biridir. 1930'ların ilk yarısından itibaren meyve-sebze suyu endüstrisi verim başta olmak üzere filtrelemede kabul edilebilir bir seviyeye gelmek için çok zorluklarla yüzleşti; fakat günümüzde selüloz'un da içinde olduğu enzimlerin kullanılması bu zorluğu yenmelerine çok büyük katkılar sağladı (Cemeroğlu 2013). Kayısı, şeftali gibi sert çekirdekli meyvelerin kabuklarının soyulmasında selüloz da içeren bir enzim karışımının kullanılması orta derecede ısı kullanılmasından daha iyi sonuçlar vermiştir (Sharma *et al.* 2013; Touthik *et al.* 2017). Limon, portakal ve greyfurt gibi turunçgil ailesine ait meyvelerin kabuk soyma işleminde selüloz'un da bulunduğu enzim karışımını kullanan araştırmacılar daha iyi sonuçlar aldıklarını rapor etmişlerdir (Pagan *et al.* 2010; Sanchez-Bel *et al.* 2012). Eğer kabuk soyma işlemi gerekmiyorsa enzimler direkt uygulanarak çökelme ve filtrasyon gibi işlemler yoluyla seperasyon daha hızlı gerçekleşir (Touthik *et al.* 2017). Sadece kabuk soyma değil; selüloz aynı zamanda ürünün hacimsel verimine de etki etmiştir. Kaju ailesinin bir üyesi olan Chironji meyvesinin suyunun elde edilmesinde selüloz'un etkilerinin incelendiği bir çalışmada selüloz miktarı arttıkça meyve suyu veriminin de arttığı belirlenmiştir; fakat 30-50°C arası sıcaklığın verime çok fazla etki etmediği anlaşılmıştır. Yine aynı çalışmada süre ve selüloz aktivitesi arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir. 20-120 dk arasındaki periyotlarda selüloz aktivitesinin 100 dakikada maksimum etkiye ulaştığı tespit edilirken sıcaklık ve süre artışının

beraber değerlendirilmesinde ise süre arttıkça verimin arttığı belirlenmiştir (Pradhan *et al.* 2021). Elma pulpundan meyve suyu elde edilmesini ve veriminin araştırıldığı bir çalışmada (Srivastava and Tyagi 2013) pH 4,0'da ve 50°C'de selüloz ilavesinin en yüksek verimi sağladığı gösterilmiştir. Çalışmada pH 4,0'da ve 50°C'de 50 g elma pulpundan yaklaşık olarak 26 mL elma suyu elde edildiği ve elde edilen meyve suyunun enzim ilave edilmeyen meyve suyundan daha berrak olduğu belirtilmektedir. Pektinaz, amilaz ve selüloz'ın farklı miktarlarda kullanıldığı bir enzim kombinasyonunda kivi meyvesinden meyve suyunun elde edilmesi verimi kontrol grubuna göre önemli derece artmıştır. Enzim kullanılmadan elde edilen verim %58,44 iken enzimin kullanıldığı işlemde verim %78,46 bulunmuştur. Karışık enzim ilavesi sadece verimi arttırmakla kalmamış olup aynı zamanda meyve suyundaki çözünabilir katı madde içeriğini de arttırmıştır (Sreenath *et al.* 1994). Briks olarak tanımlanan katı madde içeriği hücresel dokuların daha fazla parçalanması sonucu, şeker gibi maddelerin ortama daha yüksek oranda salınmasıyla oluşur (Chang *et al.* 1995). Enzim ilavesi viskoziteyi azaltır ve jel yapının parçalanmasını sağlar (Singh *et al.* 2012). Bu sayede meyve suyu işlemlerinden olan filtrasyonun daha iyi düzeyde olmasını sağlar (Cheryan and Alvarez 1995). Yüksek viskozite ürünün reolojik özelliklerini etkilediği gibi içilebilirliğini de düşürür ve meyve suyundan çok meyve püresi tadının gelmesine neden olur. O sebeple yüksek viskoziteli ürün istenmez. Enzim ilavesi, hidrolitik etkileşimlerden dolayı viskoziteyi düşürür (Cheryan and Alvarez 1995; Will *et al.* 2008). Yapılan bir araştırmada havuç pulpuna ilave edilen selüloz ve pektinaz karışımının viskoziteyi değiştirmediği bulunurken sadece pektinaz ilavesinin selüloza göre daha iyi düzeyde viskoziteyi düşürdüğü belirlenmiştir (Anastasakis *et al.* 1987). Bora *et al.* (2017) yaptıkları araştırmada muz suyuna pektinaz ilavesinin verim yönünden selülozdan daha iyi etki ettiğini ve ultrason işleminin ise verime herhangi bir katkı sağlamadığını bulmuşlardır. Selüloz ilavesinin viskoziteyi ve pH'yı azalttığı bulanıklık ve briks değerlerinde ise herhangi değişime sebep olmadığı belirtilmiştir. Bir araştırmada enzim ilavesi ve ultrason işlemi, tropik bölgelerde yetişen noni meyvesinin suyunun elde edilmesinde kombine edilmiştir ve bu çalışmadan önemli sonuçlar elde edilmiştir. Pektinaz ve Selüloz karışımı ile ultrason'un kullanıldığı bu araştırmada, kombine yöntemin verimi ciddi düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre fenoller, flavonoidler ve diğer

biyoaktif bileşenler de korunmuştur ki bu durum antioksidan kapasiteye katkı sağlar. Bunun yanında kombine işlemin, bulanıklığa neden olan partikülleri ve reolojik viskoziteyi azalttığı belirlenirken noni suyunun kimyasal yapısının ve fonksiyonel gruplarını da çok değiştirmedeği rapor edilmiştir (Wang *et al.* 2023). Gıda atıklarından biyoaktif bileşiklerin geri kazanılması birçok yönden olumlu bir durumdur. Atıklar, toprak ve su başta olmak üzere kirliliğe neden olup canlı hayatını olumsuz yönde etkilerken aynı zamanda sera gazları oluşumuna da etki eder. Bunun yanı sıra sağlık yönünden oldukça yararlı olan biyoaktif bileşiklerin gıda atıklarından elde edilmesi sürdürülebilir bir gıda üretimi ve döngüsel ekonomi sistemi için gereklidir (Wadhwa and Bakshi 2013; Vilariño *et al.* 2017; Springmann *et al.* 2018).Yapılan bir araştırmada karnabahar atıklarından biyoaktif bileşikler elde edilmiştir. Biyoaktif bileşiklerin geri kazanılma miktarı ile ilave edilen selülotik enzim miktarının doğrusal bir ilişki içinde olduğu tespit edilmiştir. Geri kazanılan bu bileşikler içinde çeşitli polifenoller, epikateşin, epikateşingallat, izotiyosiyanat gibi önemli bileşikler bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre selülatik enzim ilavesi yüksek oranda bu biyoaktif bileşiklerin karnabahar sebzelerinden elde edilmesini sağlamıştır (Doria *et al.* 2022). Likopen, karotenoid grubuna ait bir nutrasötiktir. Domates dokusuna ilave edilen pektinaz ve selülaz enzimleri çok ciddi oranda likopen ekstraksiyonunu arttırmışlardır (Choudhari and Ananthanarayan 2007). Yapılan çalışmalarda selülaz'ın da içinde bulunduğu enzim kompleksi sakkarifikasyon aşamasını geliştirerek şeker kamışından daha fazla etanol elde edilmesini sağlamıştır (Geddes *et al.* 2011). Selülaz, Narenciye kabuğundan bir flavonoid olan naringin'in elde edilme verimini de arttırmıştır (Puri *et al.* 2011). β -glukanaz yaklaşık olarak 100 kilo zeytinden 2 litre daha fazla zeytinyağı elde edilmesini sağlamıştır. Ayrıca selülaz ve pektinaz enzimlerinin kullanıldığı çalışmada zeytinyağında kontrol grubuna göre daha fazla antioksidant madde elde edilmiştir (Iconomou *et al.* 2010). Havuç suyu endüstrisinin bir yan ürünü olan havuç posasındaki diyet liflerinin şeker içeriğini geri kazanmak için selülaz'ın da içinde olduğu çeşitli enzimler kullanılmış olup, araştırmacılar havuç suyu posası ve diğer gıda atıklarından başarılı şekilde şekerlerin enzimler sayesinde elde edilebileceğini belirtmişlerdir (Yoon *et al.* 2005). Keten tohumu ile yapılan bir çalışmada keten tohumunda bulunan bir difenol olan Sekoizolarisiresinol'un keten

tohumundan izole edilmesinde selülaazın kullanılabileceği belirtilmiştir (Renouard *et al.* 2010).

2. Yağ teknolojisinde Selülaaz enzimi kullanımı

Gıda sanayisinde selülaaz, sektörün birçok alt alanında kullanılır. Alkollü içecek endüstrisinde glukanazlar glukan'ın hidrolizi, viskozite problemlerinin çözümü, filtrasyon kalitesinin artırılması gibi durumlar için kullanılır (Bayer *et al.* 2007). Motuk (2020) selülaaz ve papain enzimlerinin soğuk pres yöntemiyle elde edilen zeytinyağı'na etkisini incelemiştir. Bu çalışmada selülaaz enzimi ile muamele edilen Ayvalık eşidi zeytinden elde edilen zeytinyağının en yüksek tokoferol içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada oleik, linoleik ve araşidonik asitlerin kompozisyonunda önemli farklılıklar bulunmuştur. Çalışma neticesinde genel olarak zeytinyağının eldesi için kullanılması önerilen en ideal enzimin selülaaz olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada pektinaz-selülaaz ve ksilanaz ilavesinin yağ verimini hem siyah hem de yeşil zeytin de arttırdığı belirlenmiştir. Yeşil zeytinden elde edilen zeytinyağının fenolik madde miktarında selülaaz-ksilanaz kombinasyonu az da olsa artış sağlarken siyah zeytinde bu artış daha yüksek miktarda olmuştur. Fenolik maddeler hem tat olarak arzu edilirken hem de sağlık yönünden önemli bileşenlerdir. Ayrıca selülaaz-ksilanaz karışımının uygulandığı hamurdan elde edilen zeytinyağındaki klorofil pigmenti miktarı ve A vitaminin öncülü olan beta karoten miktarında kontrol grubuna göre artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar göstermektedir ki selülaaz-ksilanaz enzim kombinasyonunun zeytinyağının elde edilmesinde istenen sonuçları vermiştir (Hadj-Taieb *et al.* 2012). Beta glukanaz'ın kullanıldığı bir araştırmada enzim kombinasyonunun zeytinyağında yüksek olması istenmeyen asitliği ve peroksit sayısını azalttığı ve yine yüksek olması arzu edilen klorofil miktarında ve zeytinyağı veriminde artış sağladığı belirlenmiştir. Bu alışma neticesinde ayrıca toplam fenolik bileşen miktarının ve zeytinyağının oksidasyona karşı korunmasını gösteren oksidatif stabilitenin de arttığı belirlenmiştir. Bu araştırmada enzim ilavesinin yağ asidi kompozisyonunu da değiştirmediği belirlenmiştir (Büyükgök ve Ötleş 2011). Yukarıdaki çalışmanın sonuçlarıyla paralel olan bir çalışma da Ranalli and Serraiocco (1996) tarafından yapılmıştır. Olivex isimli enzim preparatı kullanan araştırmacılar, çalışmalarının sonucunda enzim uygulanan hamurdaki zeytinyağı veriminin, kontrol grubuna göre arttığını bulmuşlardır. Olivex, selülatik aktiviteyi de içeren bir enzim

kombinasyonudur. Bu çalışma neticesinde zeytinyağında teknolojik ve duyu kalite göstergeleri olan asidite, peroksit sayısı, karbonil indeksi, toplam polifenol miktarı ve oksidasyon stabilitesi gibi parametreler de incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda düşük olması istenen; asitliğin, peroksit sayısının ve karbonil düzeyinin azaldığı, yüksek olması istenen polifenol içeriği, oksidasyon stabilitesi gibi değerlerin de enzim uygulaması sonucu arttığı belirlenmiştir.

1998-99 ve 1999-2000 sezonlarının zeytinlerinden elde edilen zeytinyağının içeriklerinin incelendiği bir projede enzim ilavesinin genel olarak zeytinyağında arzu edilen değerleri pozitif yönde etkilediği belirlenmiştir. Örneğin hem Arbequina çeşidinden hem de picual çeşidinden elde edilen zeytinyağının orthodifenol ve non-ortodifenol bileşiklerinin, her iki sezonda da enzim ilavesiyle arttığı belirlenmiştir. İlave edilen bu enzim karışımları olivex ve glukaneks isimli ve her ikisi de selülotik aktiviteye sahip olan enzim preparatlarıdır. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre enzim preparatlarının zeytinyağında istenmeyen bir parametre olan peroksit sayısını düşürdüğü ve yüksek olması arzu edilen ransimat stabilitesini arttırdığı belirlenmiştir (Garcia *et al.* 2001). Huang *et al.* (2022) yaptığı bir çalışmada selülaz ve pektinaz ilavesinin yağ verimini arttırdığını ve zeytin hamurunun viskozitesini azalttığını belirtmiştir. Dobozi *et al.* (1988) yaptıkları çalışmada selülotik enzim preparatları ilavesinin hardal yağı verimini arttırdığını belirlemişlerdir.

Cinnamomum camphora chvar. bitkisinden uçucu yağların elde edilmesi zorlu bir işlemdir. Uçucu yağlar birçok alanda kullanıma potansiyeline sahiptir. Yu *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada selülaz destekli damıtma metodunun uçucu yağ eldesini ciddi oranda arttırdıklarını bulmuştur. Nötral selülaz destekli metodun, geleneksel distilasyon metoduna göre yağ verimini %58 oranında arttırdığı rapor edilmiştir.

Mısır bitkisinden yağ elde edilmesi için yapılan bir çalışmada selülaz enzimlerinin kullanılmasıyla yağ veriminin %90'lara kadar çıktığı rapor edilmiştir. Enzim kullanılmadan yapılan yağ çıkarma işleminde ise yağ verimi yaklaşık olarak maksimum %37'lere kadar çıktığı belirlenmiştir (Moreau *et al.* 2004).

Hindistan cevizi yağının daha verimli şekilde elde edilmesi için yapılan bir çalışmada tek başına selülaz ve selüloz da içeren birkaç farklı enzimin birleştirildiği bir çalışmada enzimsiz içeriğe göre daha yüksek verim elde edilmiştir. Enzim olmadan

yağ verimi %19,26 iken sadece selüloz kullanıldığında bu oran %28,12 olduğu belirlenmiştir (Man *et al.* 1996).

Günümüzde bitkisel yağlara alternatif olarak mikrobiyal yağ veya diğer ismiyle tekli hücre yağı da gittikçe önemli hale gelmektedir. Mikrobiyal yağ, gıda sanayi başta olmak üzere çok farklı alanlarda kullanılma potansiyeline sahiptir. Selüloz sadece bitkisel yağların elde edilmesinde değil; mikrobiyal yağların üretimi için fermentasyon ortamındaki şeker miktarını ve dolayısıyla bakteri üremesini arttırarak da katkı sağlar (Darcan ve Sarıgül 2015). Zhao *et al.* (2017) yaptıkları araştırmada mikrobiyal yağ üretimi için fermentasyon ortamına selüloz ilavesinin daha yüksek verim sağladığını belirtmişlerdir.

3. Fırıncılık ürünlerinde Selüloz enzimi kullanımı

Selüloz sadece meyve sebze değil; fırıncılık alanında da kullanılır. Yapılan çalışma neticesinde amilaz, ksilaz ve selüloz enzimlerinin birlikte kullanılması halinde hamurun su emilimi, gelişme süresi ve stabilitesi'nin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Patindol *et al.* 2007). Yine yapılan benzer bir çalışmada tekli enzim ilavesi ile enzim kombinasyonunun eklenmesi karşılaştırılmıştır. Su emilimi açısından tekli enzim ilavesi herhangi bir etki göstermezken enzim kombinasyonunun ilave edilmesi değeri önemli miktarda düşürmüştür. Hem tekli enzim ilavesinin hem α -amilaz, ksilanaz ve selüloz kombinasyonunun ilave edilmesinin hamurun uzayabilirlik, yumuşama, karıştırma tolerans indeksi ve yapışkanlığını arttırdığı belirlenmiştir. Araştırmacılar bu üçlü enzim ilavesinin hamur reolojisi üzerine sinerjik bir etki meydana getirdiğini bildirmişlerdir (Liu *et al.* 2023). Deoksinivalenol (DON) ve onun bitkilerdeki farklı bir metaboliti olan Deoksinivalenol-3- Glukozit (DON-3- Glukozit) Fusarium gibi mantarlar tarafından üretilen ve tahıllarda bulunan bir mikotoksindir. Bu mikotoksinlerin toksik etkileri rapor edilmiştir. Bundan dolayı tahıl ve tahıllardan elde edilen ürünlerde olmaması istenir (Pitt 2000; Berthiller *et al.* 2009; Cano-Sancho *et al.* 2011). Ekmek yapımı sırasında bu metabolitlerin artış gösterdiğine dair çalışmalar mevcut olsa da azaldığına dair çalışmalar da mevcuttur. Bu birbirinin aksini gösteren çalışmaların nedeninin çalışmanın yapıldığı meteryal, hamurun yoğrulma şartları ve çalışmanın skalası olduğu düşünülmektedir (Simsek *et al.* 2012; Vidal *et al.* 2016). Yapılan bir çalışmada aynı enzimlerin farklı sıcaklıklarda bu mikotoksinlerin varlığını arttırdığını veya azalttığını belirlemişlerdir. Selüloz

enziminin de içinde bulunduğu bir enzim kombinasyonu kullanıldığında 30°C’de DON-3-glukozit miktarının daha da arttığı rapor edilmiştir (Vidal *et al.* 2016). Buğday unundan yapılan ekmeğin özelliklerinin ve hamurun reolojik özellikleri üzerine birden fazla enzimin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise selüloz enziminin lipaz ve amiloglikosidaz ile kullanılması sonucu hem hamurun reolojik özelliklerinde hem de ekmeğin karakteristik özelliklerinde herhangi bir değişimin olmadığı bildirilmiştir (Altinel and Ünal 2017).

1.2.4.2. Biyoetanol üretiminde Selüloz enzimi kullanımı

Fosil yakıtların tükenmesi ve çevre üzerine olan etkileri sebebiyle tüm dünyada alternatif enerji kaynaklarına yöneliş gerçekleşmektedir. Biyokütle olarak en yaygın bulunan materyal selülozdur. Selülozdan glukoz üretimi acil kıtlık ve açlık durumlarında bir önlem faktörü olabilir ve glukozdan etil alkol üretimi enerji sorunun çözümüne katkıda bulunacak önemli bir kaynak olabilir. Bu sayede CO₂ başta olmak üzere sera gazı salınımı azaltılabilir ve ayrıca zirai, endüstriyel ve evsel atıkların sakkarifikasyonu neticesinde de önemli bir çevresel problem çözüme kavuşabilir. Selülozdan biyoetanol eldesinde en önemli girdi enzimdir. Bu sebeple bu sektörde daha yüksek verimle ve daha düşük maliyete hidroliz yapabilecek bir enzim, endüstrinin ihtiyaç duyduğu en önemli faktördür (Sheehan and Himmel 1999; Kıran vd 2006). Selülozik biyoetanol, selülozik biyokütle atıklarından elde edilen ikinci nesil biyoyakıttır. Etanol üretimi biyoselülotik kütledeki yapının çeşitli işlemlerle basit şekerlere dönmesi ve mayalar tarafından şekerin kullanılarak etanol üretilmesidir. (Bajaj and Mahajan 2019). Selüloz ve ksilanaz’ın beraber kullanıldığı bir çalışmada bu iki enzimin birbiri ile sinerjik bir etki göstererek daha fazla şeker üretilmesini sağladığı ve bunun sonucunda daha yüksek miktarda etanol elde edildiği rapor edilmiştir (Arora *et al.* 2014). Selülotik etanol üretiminde maliyetlerin azaltılması yani verimli bir etanol üretimi sürdürülebilir biyobazlı ekonomi için çok önemlidir. Clavispora NRRL Y-50464 gibi hidrolitik enzimler üretebilen etanolojenik bir maya BGL1, BGL2 ve BGL3 olmak üzere üç tip β -glukosidaz izoenzimi üretebilir ve bu enzimler yüksek kinetik parametrelere sahip olduğu etanol üretimi için kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (Liu and Dien 2022). Selülozun serbest haliyle immobilize halinin karşılaştırıldığı bir çalışmada immobilize selüloz enziminin daha iyi yakıt verimine

katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Vijayalakshmi *et al.* 2021). *Chaetomium thermophilum* sellobiyohidrolaz'ı (CtCBH1), *Chrysosporium luckynowense* sellobiyohidrolaz'ı (ClCBH2), *Trichoderma reesei* endoglukanaz'ı (TrEGL2) ve *Saccharomycopsis fibuligera* β -glukosidaz'ın (SfBGL1) kombine şekilde kullanıldığı bir fermentasyon ortamında elde edilen verim'in ticari suşlara nazaran üç kat daha fazla olduğu belirlenmiş olup bu farklı kaynaklardan gelen enzimlerin sinerjik etkiye sahip olduğu ve endüstride kullanılabilir olduğu rapor edilmiştir (Lee *et al.* 2017) *Microbacterium* sp. CIAB417'den elde β -glukozidaz'ın düşük sıcaklığa, yüksek glukoz ve etanol miktarına toleranslı olduğu ve ticari olarak etanol üretiminde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Purohit *et al.* 2023).

1.2.4.3. Diğer endüstriyel alanlarda Selülaz enzimi kullanımı

Gıda ve yem alanının yanı sıra, tekstil, kâğıt, deterjan, biyoetanol gibi farklı alanlarda da selülaz kullanılmaktadır. Deterjan sanayiinde, partiküllerin uzaklaştırılması, ağartma, yumuşatma gibi işlemlerde, kâğıt sanayiinde, mürekkebin uzaklaştırılması, kâğıt hamurunun modifikasyonu, kartonların parçalanması, tekstil endüstrisinde ise yumuşatma, defibrilasyon, tüylenmenin giderilmesi gibi farklı amaçlarla kullanılmaktadır (Bhat 2000; Endo *et al.* 2001; Smith 2004).

1.3. Bakteriler ve Sınıflandırılması

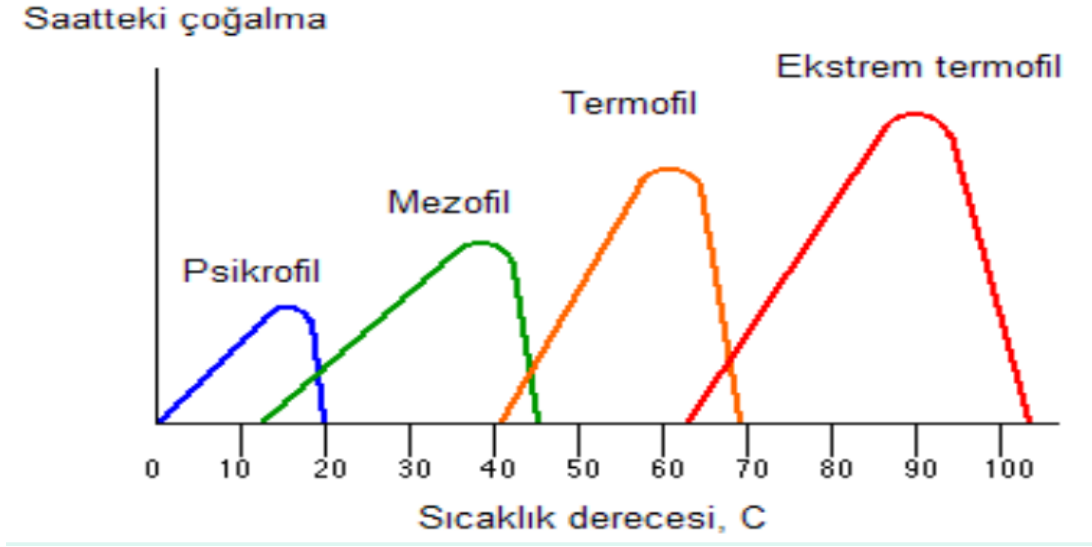
Üreme ve gelişme sıcaklık değerlerini baz alarak yapılan sınıflandırmada temel olarak bakteriler dört ana gruba ayrılır (Albayrak 2018).

Psikrofiller: düşük sıcaklık değerlerinde optimum aktivite gösteren bakteriler

Mezofiller: Orta sıcaklık değerlerinde optimum aktivite gösteren bakteriler

Termofiller: Yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite gösteren bakteriler

Hipertermofiller: Çok yüksek sıcaklıklarda optimum aktivite gösteren bakteriler



Şekil 1.11. Bakterilerin Optimum Sıcaklık Eğrileri (Albayrak 2018).

1.3.1. Termofilik Bakteriler ve Habitatları

Bakteriyolojinin ilk dönemlerinden beri termofilik bakterilerin varlığı biliniyordu. Termofilik bakteriler ilk defa 1879 yılında izole edildi. Bu bakteriler 72°C’de çoğalabilen bakteriler olup nehir, çamur, toprak gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmişlerdir (Güven 2011). Gıda ve çeşitli endüstrilerde kullanılanlar ile hastalık yapıcı patojen mikroorganizmalar hariç mikroorganizmaların büyük kısmı tanımlanmamış ve çalışılmamıştır. Mikroorganizmik çevre, hava, su, toprak başta olmak üzere kutuplardan volkanlara, buzullardan alkalili ve asidik sulara, okyanus diplerinden halofilik göllere kadar birçok yerdir. Prokaryotlar 65°C’den daha yüksek sıcaklıklarda bile çok iyi şekillerde gelişebilirler (Ercan 2005). Isıl değerler, mikroorganizmaları olumlu veya olumsuz şekilde etkiler. Mikroorganizmaların optimum gelişebilme sıcaklığından uzaklaştıkça üreme ve gelişme hızları yavaşlar. Mikroorganizmaların yaşayıp üreyebileceği maksimum ve minimum sıcaklık değerleri ile optimum sıcak değerleri mevcuttur. Bu üç sıcaklık değerine Kardinal Sıcaklıklar denilir ve organizmaya özgüdür. Belirli sıcaklık değerlerinin üstünde proteinler denatüre olurken diğer hücre bileşenleri de zarar görebilir veya tamamen fonksiyonelliğini tersinmez şekilde kaybedebilir (Madigan 2017).

1.3.2. Biyoteknolojik Açıdan Termofilik Bakteriyel Enzimler ve Önemi

Termofil karakterli bakterilerin hücre bileşenleri de termal stabiliteye sahip olmalarına ilave olarak yüksek asitli ve alkali ortamlara da daha dirençli olabilirler. Bundan dolayı termofil bakteriler biyoteknolojik olarak önemlidirler; çünkü endüstriyel bazda ekstrem koşullarda kullanılabilir ve üretilebilirler. Termofil ve ekstrem termofil bakterilerin biyoteknolojik açıdan en önemli özellikleri termofilik enzim üretebilme kabiliyetleridir (Albayrak 2018). Sıcaklık ve asit-baz gibi inhibe edici etkenlere karşı stabil olan termofilik enzimler bu sebeple farklı endüstriyel alanlarda tercih sebebidir. Termofilik karaktere sahip enzimler, ait oldukları bakterilerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinden daha yüksek değerlerde stabil ve aktif olabilirler. Yüksek sıcaklık, asidik ve alkali ortam, bulaşmayı da minimize eder. Yüksek sıcaklıklarda reaksiyon hızlarında artış meydana gelir ve suyun viskozitesi ile yüzey gerilimi azalır. Bu sayede fermentörlerde havalandırma için daha az enerji kullanılır ve bunun sonucunda daha fazla ürün meydana gelir (İnan 2011). Günümüzde farklı endüstriyel alanlarda kullanılan enzimlerin önemli kısmı mikroorganizma kökenlidir; çünkü hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilen enzimlere nazaran bakteriyel enzimler daha yüksek aktiviteye sahiptirler. Ayrıca istenmeyen ikincil ürün oluşumu çok daha düşük, daha stabil ve daha ekonomiktirler. Fazla miktarda elde edilmeleri, yüksek sıcaklarda kullanılmaları neticesinde bakteri ve virüs kontaminasyonlarına karşı da daha izoledirler. Enzimler polipeptit yapısında olan biyokatalizörler olup yüksek sıcaklıklarda (>100 °C) tersinmez olarak denatüre olur, bağlar hidrolize olur ve deaminasyon gerçekleşebilir. Bilim insanlarının araştırmaları neticesinde uygun şartlar altında bazı enzimlerin yarılanma ömrünün 125°C’de 10 dakikadan fazla olduğu belirlenmiştir. Bu kadar yüksek sıcaklığa erişebilen enzimler de doğal olarak endüstriyel alanlarda muazzam bir potansiyel barındırır (Sarigül 2007).

Genel olarak termostabil enzimlerin katkılarını özetlersek:

- a- Termostabil özelliklerinde ötürü uzun raf ömrüne sahiptirler,
- b- Farklı çözücü ve asit-alkali ortamlara dirençlidirler,
- c-Viskoziteyi azaltır, akışkanlık ve kütle transferini artırır, ürün miktarı ve verimlilik artışı sağlarlar

d- Mikrobiyal kontaminasyona karşı daha izole ortamlarda aktivite gösterdiklerinden bulaşı riski azdır (Kristjansson 1989).

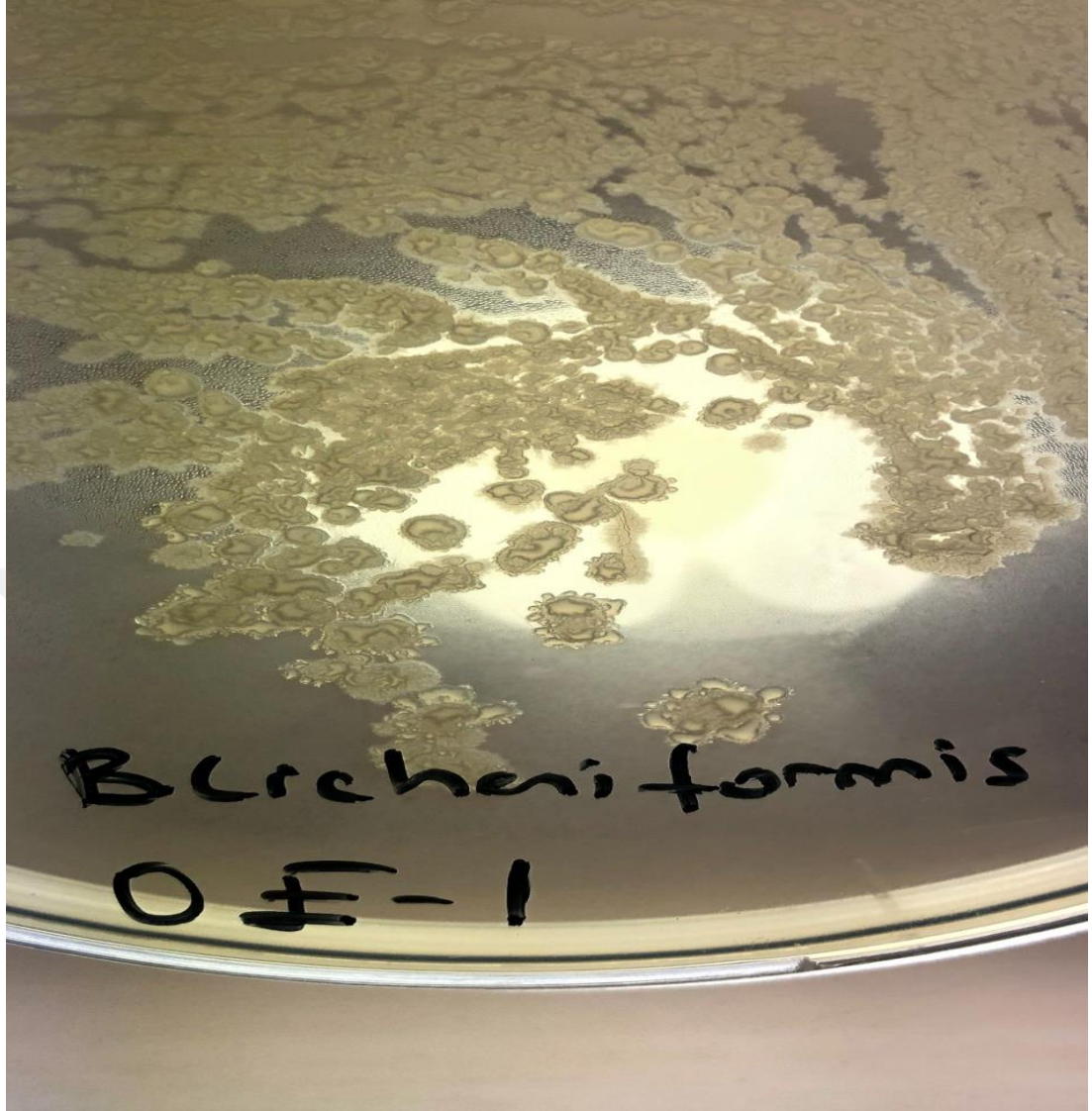
Bunun yanında dezavantajları da vardır, büyük miktardaki fermentasyon işlemlerinde mikroorganizmaların kültüre alınması güçtür. Buharlaşıma, yüksek sıcaklık nedeniyle artacağından su aktivitesi azalır bu da enzim üretiminde kayıplara neden olur. Ayrıca üretimi için ilave ekipmana gereksinim duyulabilir (Sarigül 2007).

1.3.3. *Bacillus* cinsi bakteriler, özellikleri ve endüstriyel uygulamaları

Bacillaceae familyası içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki ana alt grup bulunmaktadır (Sevinç 2010). *Bacillus* ve *Clostridium* bakterileri Bacillaceae familyası içinde yer alan iki ana alt gruptur. Daha önceleri *Bacillus* türü olarak tanımlanan bazı bakteriler ise DNA yapılarından dolayı ayrı cinsler olarak tanımlanmışlardır. rRNA dizileri esas alınarak üç ana *Bacillus* grubu belirlenmiştir. Bunlar; *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus circulans* gruplarıdır. *Bacillus* türleri genel olarak doğada çürükçül olarak görev yapıp çoğu patojen değildir; fakat bazı türleri organizmalarda patojen veya fırsatçı patojen olabilirler. Bu patojenlerden en bilinenleri *Bacillus anthracis* ve *Bacillus cereus*'tur. Genel olarak *Bacillus* türleri mezofildir; ancak zorunlu termofil, psikrofil, asidofil, halofil cinsleri de bulunur (Banwart 1983; Berkeley and Logan 1997; Logan and Turnbull 1999; Ustaçelebi 1999). *Bacillus*lar doğada her ortamda kolayca bulunabilirler. Toprak, yeşil sebzeler ve su gibi birçok ortamda yaşayabilirler. Kültürün yaşına bağlı olarak Gram (-) olanlar mevcut olsa da geneli Gram (+) oldukları rapor edilmişlerdir. *Bacillus*lar çift veya zincir halinde görülebilir olup çubukları da mevcuttur. Geneli endospor oluşturur ve endosporlar; oval, silindirik veya yuvarlak olabilirler. *Bacillus*lar aerobik veya fakültatif anaerob olabilirler. Farklı stres etkenlerine karşı (sıcaklık, pH vb.) oldukça dirençli olabilirler. *Bacillus*lar katalaz pozitif ve organotrofturlar (Holt *et al.* 1994). *Bacillus* kolonileri dalgalı veya saçaklı kenarlı olabilirler. *Bacillus*lar endüstriyel öneme sahip birçok enzimi üretme yetenekleri ile endüstriyel açıdan önemli bakterilerdir. Bazı türlerinde ince, dalgalı, uzun ve hareket etme kabiliyeti sağlayan flagellum yapısı bulunur (Sevinç 2010). *Bacillus* cinsi bakteriler sanayide enzim üretiminde yoğun şekilde kullanılır ve hidrolitik enzim üretirler. Endüstriyel uygulamalarda α -amilaz, proteaz, izomeraz gibi enzimlerin üretiminde *Bacillus*lar

kullanılır (Gözükara ve Arıkan 2012). Bazı bacilluslar sentezledikleri hidrolitik enzimler vasıtasıyla aerobik ortamda protein ve karbohidratları parçalayarak kokuşmaya sebep olabilirler. Örneğin gıda zehirlenmelerinin önemli faktörlerinden biri *Bacillus cereus*’tur. Bacillus sporları şekeri parçalayarak gaz oluşturmada asit üretebilir ve proteinleri parçalayıp amonyak oluşmasına neden olarak kokuşmaya sebep olabilirler. *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus cereus* türleri, sütün doğal florasında olup sporları pastörizasyon sıcaklığında tamamen yok olmayabilir; ama sterilizasyon ve UHT sıcaklığında tüm sporları inhibe olur. Bu türlerin vejetatif formları üretmiş oldukları ekstraselüler enzimler vasıtasıyla sütte üretim kayıplarına neden olabilirler. Bazı bacillus türleri glukoz fermentasyonu neticesinde laktik asit oluştururken *B. licheniformis*, *B. cereus* gibi bazı türlerde 2,3-butandiol ve gliserol gibi ürünler oluşturabilirler (Bingöl 1988; Kalkan 2006). Endüstride enzim üretiminde bacillusların çok yoğun şekilde kullanılmasının nedeni çeşitli avantajlarının olmasıdır: bacilluslar genelde patojen değildir, ekstraselüler enzim üretme potansiyelleri mevcuttur, yan ürün oluşturma noktasında diğer bakterilerden daha avantajlı bir durumda olup daha az yan ürün oluştururlar ve genetik manipülasyonlara yatkın olmaları bacillusların yoğun şekilde kullanılmasını sağlar. *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. stearothermophilus* endüstriyel alanda yoğun kullanılan türlerden bazılarıdır (Batur ve Aygan 2015). Enzim üreten bakterilerin neredeyse yarısı Bacillus suşlarıdır. *B. licheniformis* endüstride kullanılan bazı ekzoenzimlerin ve peptit yapılı antibiyotiklerin önemli bir kaynağı olmasının yanı sıra tarımda da mikrobiyal gübre olarak kullanılırlar (Rüzgar 2019).

B. licheniformis türü, Firmicutes şubesine ait, Bacili sınıfında yer alan Bacillales takımında ve Bacillaceae familyasında Bacillus cinsi bir bakteri olup maksimum gelişme sıcaklığı 50-55°C’dir (Şahabat 2019). *B. licheniformis*’in nükleotit uzunluğu 4.222.336 olup halkasal kromozomludur. *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. halodurans* ile çok benzerlik gösterse de sekonder metabolitleri, ekstraselüler enzimleri, profajları farklıdır (Rey et al. 2004).



Şekil 1.12. *Bacillus licheniformis* OE-1

1.4. Selüloz Enzim Kaynakları:

Endüstride kullanılan selülozlar genelde küf ve bakteri kökenli olsa da mantarlar, protozoalar, bitkiler ve memeliler hariç hayvanlar tarafından da üretilir (Lee 2001).

1.4.1. Mikrobiyal selüloz enzimleri

Doğada meydana gelen selüloz parçalanmasının büyük kısmını mikroorganizma kaynaklı enzimler yapar. Sadece bakteriler değil; mantarlar, küfler gibi farklı mikrobiyal canlılar da selüloz üretir (Saranraj *et al.* 2012). Mantar kökenli selülozların daha az komplike olması, ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarının daha kolay olması

ve mantarların kolayca selüloz üretebilmeleri gibi etkenlerden dolayı mantar kökenli enzimler çok kullanılsa da son yıllarda bakteriyel enzimler de önem kazanmıştır. Bunun birkaç nedeni vardır: Mantarlara göre bakteriler çok daha hızlı ürettiği için daha fazla selüloz elde edilebilir. Bakteriyel enzimler küf ve mantar kökenli enzimlere göre çok daha kompleks olmalarından ötürü daha fonksiyoneldir ve sinerjistik etkiye sahip çoklu enzim komplekslerine sahiptir. Bakteriler çevresel stres faktörlerine karşı son derece dirençli selüloz enzimleri üretebilirler. Bu suşlar, termofilik, halofilik, asidofilik gibi ekstrem ortamlara uyum sağlayabilir ve fonksiyonel olabilirler. Bu nedenlerden ötürü bakteriyel selülozlar son yıllarda oldukça fazla önem kazanmışlardır (Maki *et al.* 2009; Sadhu *et al.* 2013).

1.5. Ekzopolisakkaritler

Ekzopolisakkaritler (EPS) temelde monosakkaritlerin glikozidik bağ aracılığıyla bir araya gelerek oluşturmuş oldukları polimerik yapılardır. Bu yapılar düz veya dallanmış olup iyonik veya iyonik olmayan ve suda çözünebilen yapılardır. Bu biyopolimerik yapının anabileşeni olan monosakkaritler genelde heksozlar olmalarına rağmen bazen de pentozlar bu yapıyı oluşturabilir (Ergene ve Avcı 2015).

1.5.1. Bakteriyel ekzopolisakkaritler

Bakteriler, EPS ismi verilen bazı yapılar üretir. EPS'nin molekül ağırlığı birkaç binden birkaç milyona kadar değişkenlik gösterebilir ve molekül ağırlığı EPS'yi üreten türe ve ortam koşullarına bağlı olarak değişir. EPS sadece polisakkaritlerden ibaret değildir, EPS polisakkaritler hariç nükleik asitler, proteinler, fosfolipitler gibi farklı öğeleri de içerebilir. EPS sadece bakteriler tarafından değil; bitkiler tarafından da üretilir ama EPS'nin üretildiği süre ve hava şartlarına bağlı olmayışı bakteri üretimini avantajlı hale getirmektedir. Fakat substrat ve biyoreaktör maliyeti de bakteriyel EPS'nin dezavantajları arasındadır. Maya, küf ve bazı arke türleri EPS üretse de en iyi verimin bakteriyel EPS olduğu belirlenmiştir (Donot *et al.* 2012; Özcan and Öner 2015; Achal *et al.* 2017). Polimer biliminin yeni materyalleri olarak bakteriyel EPS'ler son zamanlarda gittikçe önem kazanmaktadır. EPS'lerin kendine özgü fiziki, kimyasal ve reolojik özellikleri bulunmaktadır. EPS'ler, tekstil, atık su iyileştirmesi, kozmetik, gıda katkı maddesi, deterjan ve eczacılık başta olmak üzere geniş bir kullanım alanı bulmuştur. EPS'lerin sulardaki ağır metal gideriminde de rolü

gittikçe artmakta olup kirlilik probleminin giderilmesinde alternatif bir metot olarak kullanım alanı mevcuttur. Ayrıca EPS'lerin ısı izolasyonunda da kullanılması önerilmektedir. Bakteriyel EPS, stres koşullarında biyofilm oluşturma ve bakteriyi fagositoz ve kurumadan koruma gibi görevleri mevcuttur (Gupta *et al.* 2012; Yalçın *et al.* 2018). Bakterilerin ürettiği EPS'ler gıda sanayi için önemli fonksiyonlara icra edebilme potansiyeline sahiptir. EPS'ler son üründe kalite artışını, yüksek verimi, viskoz çözelti oluşturmayı sağlayabilir. Ayrıca gıdada, tekstür düzenleyici, kıvam verici ve prebiyotik faktör olarak kullanılabilir ki bu durum onu sağlık yönünden de faydalı hale getirmektedir (Badel *et al.* 2011; Kurt *et al.* 2022). EPS'ler geri dönüşebilen, biyobozunur ve doğal polimerler olup bulunduğu yere bağlı olarak üçe ayrılır. Bunlar: hücre içi, hücre duvarı bileşeni ve hücre dışı olmak üzere farklı özellik ve yapılarıdadır. İntraselüler polisakkaritler enerji ögesi olarak bulunurken hücre duvarının doğrudan bileşeni olan polisakkaritler de mevcuttur. Hücre dışı polisakkaritler ise kapsüler polisakkarit (CPS) ve dış ortama salınan ekzopolisakkaritler (EPS) olarak ikiye ayrılır. CPS, hücre dış yüzeyine sıkı kovalent bağlarla bağlı olup bunlar intraselüler EPS'ler gibi kolayca izole edilemezler. EPS'ler ise intraselüler ortama salınır veya hücre dış yüzeyi ile zayıf bağlar oluşturur. Bakteriyel EPS'ler kimyasal kompozisyonlarına göre homopolisakkarit veya heteropolisakkarit olarak sınıflandırılır. Heteropolisakkaritler farklı sakkarit ünitelerinden oluşmuş iken homopolisakkaritler ise aynı şeker birimlerinin glikozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşur. EPS'ler bakteriyi çeşitli etkenlere karşı koruyan polimer ürünlerdir. EPS'ler monosakkarit üniteleri olan D- glukoz, D-Galaktoz ve L-ramnoz birimlerinin ve çok nadiren de olsa N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin ve glukoronik asit yapılarının bir araya gelip tekrarlı bir yapı oluşturmaları sonucu oluşur. En önemli ekzopolisakkaritler dekstran, ksantan, levan, selüloz olarak sayılabilir. EPS'nin antiviral, antitümör, antioksidan ve antimikrobiyal gibi çeşitli özelliklerinin de olduğu belirtilmiştir (Mıdık 2011; İspirli 2016; Soyuçok *et al.* 2016; Tuşar 2021).

1.5.2. Bakteriyel ekzopolisakkaritlerin antibakteriyel özellikleri

Laktik asit bakterileri gibi patojen olmayan bakterilerden elde edilen bakteriyel ekzopolisakkaritler genelde güvenli olarak kabul edilip hem *in vivo* hem *in vitro* şartlarda çeşitli biyolojik aktiviterin tespitinde kullanılırlar. Bakterilerden elde edilen

bu ekzopolisakkaritlerin antagonistik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Önemli EPS öğelerinden olan kefiran, dekstran ve levan gibi polisakkaritlerin antimikrobiyal özellikler barındırdığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Angelin and Kavitha 2020).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Termofil ve hipertermofil canlılar, ekstrem koşullarda yaşayabilen, optimum aktivite gösterebilen, sıcaklık ve diğer koşullara karşı stabilitelerini koruyabilen ve bu sebeple endüstride kendilerine geniş bir kullanım alanı bulabilen organizmalar olduğu için son yıllarda bu canlılardaki potansiyeli açığa çıkarmak amacıyla yoğun şekilde çalışmalar yapılmaktadır (Albayrak 2018). Beffa *et al.* (1996) optimum üreme sıcaklıklarının 65-75°C olduğu *Thermus* cinsine ait bakterileri termal kaynaklardan izole etmişlerdir. Pikuta *et al.* (2000), optimum 62°C ve 9,5-9,7 pH'da aktivite gösteren *Anoxybacillus* cinsine ait bakterileri izole etmişlerdir. Ağrı-Diyadin ve Balıkesir-Gönen kaplıcalarından izole edilen *Anoxybacillus* cinsi bakterilerin optimum üreme sıcaklıklarının 55-60°C olduğu belirlenmiştir (Beldüz *et al.* 2003). Das *et al.* (2014) izole ettikleri termofilik bakterilerin endüstriyel ve biyoteknolojik olarak kullanılabilir enzim ürettiklerini bildirmişlerdir. Fas'ta farklı kaynaklardan izole edilen 240 adet termofilik bakterinin %5'inden fazlasının yüksek selülotik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Aanniz *et al.* 2015). Christakopoulos *et al.* (1999), *Bacillus pumilus*'dan endo-1,4-D-glukanaz enzimi izole etmiş ve enzimin pH 7.0-8.0 ile 60°C'de optimum aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Ponpium *et al.* (2000) termofilik *Bacterioides* 'den selülozom tipi ekstraselüler enzim izole etmiş ve bunun deterjan sanayinde kullanım olanaklarını araştırmıştır. Singh *et al.* (2001) *Bacillus* 'dan selülaz enzimi izole edip inhibitör ve aktivatör olarak çeşitli maddelerin etkilerine baktığı bir çalışmada enzimin maksimum aktivitesini 65°C'de ve pH 9.0-10.0 arasında gösterdiğini ve CO₂, Na²⁺ ve K⁺ ile aktivitesinin arttığını ve Hg⁺² 'nin inhibitör etki gösterdiğini bulmuştur. Huang and Monk (2004), *Caldibacillus cellulosovorans*'tan izole edip saflaştırdıkları termostabil selülaz enziminin optimum aktivitesini 80°C'de, pH 6.5-7.0 aralığında gösterdiğini, 70 °C'de 3 saatten sonra aktivitesini %83 koruduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca inhibitör olarak Zn²⁺ ve Hg²⁺'nin oldukça etkili olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada Aygan *et al.* (2011), *Bacillus* cinsi bakterinin pH 10.0'da enzim ürettiğini belirlerken üretilen enzimin pH 10.0'da 100°C'ye kadar oldukça stabil olduğunu belirlemişlerdir.

Himalaya topraklarından elde edilen *Bacillus licheniformis*'ten selülaz izole edilmiştir. Enzim üretimi için optimal koşulların pH 6,5 ve 45 °C olduğu belirlenmiş olup %80

amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz yoluyla enzim 1,52 kat saflaştırılmıştır. Elde edilen selülazın maksimum aktivitesi 60 °C olup en iyi aktivitesini ise pH 5.0'da gösterdiği rapor edilmiştir. Enzimin pH 3.0 gibi asidik aralıkta bile stabil olduğu ve 55 °C'de %67 aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Enzim aktivitesi Cd^{2+} , Pb^{2+} ve Ba^{2+} gibi metal iyonları varlığında artış gösterirken selülaz'ın K_m değeri 1,8 mg/mL ve $V_{\max}$ değeri 10,92 $\mu\text{g} / \text{mL} / \text{dk}$ olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, elde edilen selülazın endüstriyel uygulamalar için uygulanabilir olduğunu belirtmişlerdir (Shyaula *et al.* 2023)

Topraktan izole edilen *B. licheniformis*'ten selülaz'ın saflaştırıldığı bir çalışmada SDS-PAGE analizi sonucu selülazın moleküler ağırlığının 54,5 kDa olduğu, optimum aktivitesini pH 7.4'te gösterdiği ve optimum sıcaklığının 30 °C olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada selülaz'ın 1 mM EDTA, Mg^{2+} ve Na^+ tarafından kuvvetlice, SDS tarafından ise kısmen inhibe edildiği ve sephadex G-100 tarafından saflaştırma sonucu verimin %3'e düştüğü belirlenmiştir (Elsababty *et al.* 2022). Yapılan bir çalışmada *B.licheniformis*'ten selülaz izole edilmiş ve enzimin maksimum sıcaklığının 70°C olduğu, stabil sıcaklığının da 70°C olduğu ve en iyi aktivitesinin pH 9.0'da gösterdiği belirlenmiştir. Aynı çalışmada enzimin maksimum aktivitesinin %20 NaCl içeren ortamda olduğu belirlenmiş olup moleküler ağırlığının ise 37 kDa olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak araştırmacılar enzimin halofilik, alkalifilik ve termostabil olduğunu belirtmişler ve endüstriyel uygulamalar için uygun olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar enzimin metanol, kloroform, tolüen, izopropanol ve sikloheksan gibi organik çözücülere karşı stabil olduğu ve aktivitesini genel oranda koruduğunu belirlenmişken 5 mM CoCl_2 , SDS, H_2O_2 , EDTA, KCl gibi bileşiklere karşı da aktivitesini yüksek oranda kaybettiği; hatta 5 mM EDTA'da tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir (Azadian *et al.* 2016).

Bacillus vallismortis'ten elde edilen selülazın özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada ise selülazın moleküler ağırlığının 80 kDa olduğu, optimum sıcaklık ve pH değerinin sırasıyla 64 °C ve 7.0 olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada ksilen, toluen, n-bütanol gibi organik maddelerin varlığında enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiş olup Hg tarafından enzimin kuvvetlice inhibisyona uğradığı belirlenmiştir. Saf enzim'in K_m değeri 1,923 mg/mL iken $V_{\max}$ değeri 769,230 $\mu\text{g}/\text{mL} / \text{dk}$ olduğu rapor edilmiştir (Gaur and Tiwari 2015). *Bacillus Subtilis*'ten elde edilen asidofilik selülaz enziminin

özelliklerini araştıran araştırmacılar, çalışma sonucu enzim aktivitesinin Na^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ ve EDTA tarafından indüklendiğini buna karşın Hg^{2+} ve Fe^{3+} tarafından ise kuvvetli şekilde inhibisyona uğradıklarını rapor etmişlerdir. Maksimum aktivitesini 60 °C’de gösteren enzimin optimum pH değeri ise 4.0 olduğu belirlenmiştir. Çalışma neticesinde elde edilen enzimin molekül ağırlığının ise 185 kDa olduğu, Km değerinin ise 2.2 mg/ml olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar hem asidofilik hem de termostabil olan bu selüloz enziminin biyokütle dönümüşünde, yakıt ve diğer endüstriyel alanlarda kullanılabilir olduğunu belirtmişlerdir (Rawat and Tewari 2012).

Paenibacillus terrae ‘den elde edilen selülazın pH 5.0-9,5 aralığında aktif olduğu ve suş tarafından en yüksek enzim üretiminin 5.5 pH’da ve 50 °C’de olduğu belirlenmiştir. Elde edilen selülazın Vmax değeri 0.17 U/mL olduğu bulunurken araştırmacılar enzimin maksimum aktivitesini pH 8.0’de ve 28°C’de gösterdiğini ispat etmişlerdir. Ayrıca enzim, 4°C’de ve pH 11.0’ da 24 saat inkübasyonun ardından %65 aktivitesini koruduğu rapor edilmiştir (Liang *et al.* 2014). Yapılan bir çalışmada araştırmacılar *Bacillus subtilis*’ten selülaz izole etmişlerdir. Bu çalışmanın neticesinde enzimin moleküler ağırlığının 37 kDa olduğu, 50°C’de ve pH 8.0’da maksimum aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Enzimin yarı ömrünün 60°C’de 82.67 dakika olduğu belirlenirken 50°C’de ise bu sürenin 139,53 dakika olduğu bildirilmiştir (İbrahim *et al.* 2021).

Ürdün kaplıcalarından alınan örneklerden *B.licheniformis* izole edilmiş ve bu bakterinin selülaz aktivitesine sahip olduğu Kongo-red testi ile belirlenmiştir. Yapılan çalışma neticesinde bu bakteriden elde edilen enzimlerin ticari olarak uygulanabilir olduğunu ve üretiminin optimize edilmesi gerektiği rapor edilmiştir (Mohammad *et al.* 2017).

Nepal’in sıcak su kaynaklarından elde edilen *Geobacillus sp.* KP43’ten selülaz izole edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde optimum selülaz üretiminin %1 CMC içeren ortamda 55°C’de olduğu belirlenirken enzimin yaklaşık moleküler ağırlığının 66 kDa olduğu belirlenmiştir. Enzimin 70°C’de maksimum aktivitesini gösterdiği ve geniş bir pH aralığında çalıştığı bulunmuş olup optimum aktivitesini pH 6.0’da gösterdiği belirlenmiştir. Ham enzimin spesifik aktivitesi 0.186 U/mg iken kolon ile kısmen saflaştırılan enzimin aktivitesi ise 0.467 U/mg olduğu bildirilmiştir. Ham enzimin Vmax değeri 0.01 U/mL iken çöktürme ve diyaliz sonucu elde edilen enzimin

aktivitesi 0.024 U/mL ve kolon ile saflaştırılan enzimin Vmax değeri ise 0.026 U/mL olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde ham enzimin, diyaliz ile kısmen saflaştırılan enzimin ve kolon ile saflaştırılan enzimin protein miktarları ise sırasıyla 0.051 mg/mL, 0.128 mg/mL ve 0.055 mg/mL olduğu belirlenmiştir. Ayrıca enzimin Fe²⁺ varlığında daha fazla aktifleştigi tespit edilmiştir (Khadka *et al.* 2022).

Yapılan bir çalışmada 22 izolatın selüloz pozitif olduğu anlaşılmıştır. En yüksek aktiviteyi de *Bacillus licheniformis* 380 olarak adlandırılan suş göstermiştir. Yapılan çalışmanın neticesinde enzimin aktivitesini optimum 60°C’de gösterdiği ve ağırlığının 20 kDa olduğu rapor edilmiştir. Enzimin aktifliğinin ve stabilitesinin en yüksek olduğu pH değeri ise 9,0 olarak belirlenmiştir (De Marco *et al.* 2017). Chen *et al.* (2017) Yaptıkları bir çalışmada *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876’dan β -glukosidaz geni izole edip *Escherichia coli*’ye aktarmışlardır. Daha sonra elde ettikleri enzimin moleküler ağırlığının 53.4 kDa olduğunu ve Vmax değerinin 45,44 U/mL olduğunu belirtmişlerdir. Türkiye’nin 7 farklı jeotermal kaplıcasından alınan örneklerde 83 adet termofilik Bacilli suşu izole edilmiştir. Yapılan 16S rDNA analiziyle bunların 5 farklı tür olduğu tespit edilmiş olup bu bakterilerin, amilaz, selüloz, proteaz gibi farklı enzim üretme yetenekleri araştırılmıştır. Araştırma neticesinde bu izolatlardan %41’inin selüloz ürettiği belirlenmiştir (Uluçay *et al.* 2022).

Etiyopya’nın belirlenmiş kaplıcalarından 252 bakterinin izole edildiği bir çalışmada bakterilerin çeşitli enzimleri salgılaması yönünden inceleme yapılmıştır. Yapılan araştırma neticesinde izolatlardan %76,58’nin selüloz üreticisi olduğu anlaşılmıştır. Bu bulgular sonucunda araştırmacılar Etiyopya kaplıcalarından izole edilen bakterilerin amilaz, selüloz, proteaz gibi çeşitli alanlarda kullanılan enzimler için uygun bir üretici olduğunu rapor etmişlerdir (Guta *et al.* 2024). Yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB2’den izole edilen selüloz, agaroz jel’de immobilize edilmiştir. Enzimin aktivasyon enerjisi (Ea) immobilizasyondan önce 16,38 kJ/mol iken daha sonra bu değer 44,08 kJ mol⁻¹’e yükselmiştir. Enzimin Km değeri ise 1,236 mg/mL’den 2,769 mg/L’ye yükselmiştir. Araştırmacılar bu enzimin çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir olduğunu rapor etmişlerdir (Karim *et al.* 2021). Araştırmacılar selüloz’ı akrilamidde immobilize etmişlerdir. Çalışma sonucu serbest enzimin aktivasyon entalpisi (ΔH) 13.61 kJ/mol olduğu bildirilirken

immobilize enzimin aktivasyon enerjisinin 0.29 kJ/mol olduğu rapor edilmiştir. Çalışma sonucu elde edilen bilgilere göre enzimin K_m değeri ise 1.267 mg/mL'den 1.5891 mg/mL'ye yükselmiştir. İmmobilizasyon sonucu V_{max} değeri ide düşmüş olup 8319,47 U/mL/dk'dan 5643,34 U/mL/dk olmuştur (Karim *et al.* 2021). *Aspergillus oryzae* cmc-1'den saflaştırılan endoglukanaz'ın moleküler ağırlığının 25 kDa olduğu belirlenmiş olup enzimin optimum sıcaklığı 55°C iken bu sıcaklıktaki aktivasyon enerjisi ise 3.32 kJ.mol⁻¹ olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar enzimin Q10 değerinin 1,0 olduğunu belirlemiş olup enzimin asidik karakter taşıdığını rapor etmişlerdir. Enzimin pH 4,1-5,3 arasında stabil olduğu ve pH 4.4'te optimum aktiviteyi gösterdiği belirlenmiş olup CMC hidrolizi için V_{max} değerinin 854 U/mg olduğu bildirilmiştir. Enzimin K_m değeri 20 mg/mL iken K_{cat} değerinin ise 356.s⁻¹ olduğu bildirilmiştir (Javed *et al.* 2009).

Bacillus licheniformis'ten elde edilen endoglukanaz'ın moleküler ağırlığının 37 kDa olduğu belirlenmiştir. Enzimin optimum çalıştığı sıcaklık değerinin 60°C olduğunu bildiren araştırmacılar, en iyi pH değerinin de 6,0 olduğunu rapor etmişlerdir (Bischoff *et al.* 2006) .

Himalayalardaki Tattapani kaplıcalarından elde edilen Sekiz izolattan *Geobacillus* sp. IP_80TP 'nin maksimum 80°C büyüdüğü ve optimum sıcaklığı 60°C olan selüloz ürettiği rapor edilmiştir. İzole edilen bakterilerden *Geobacillus thermodenitrificans* IP_WH1'in en yüksek V_{max} değerine sahip enzimi ürettiği bildirilmiş olup bu değer 0,94 EU/mL olarak belirlenmiştir. *Bacillus* sp.'lerden elde edilen enzimlerin V_{max} değerleri ise 0,14-0,39 EU/mL arası olarak belirlenmiştir (Priya *et al.* 2016).

Exiguobacterium sp.'den elde edilen selülazın özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada selülazın maksimum aktivitesinin pH 7,5 ve 45°C'de gösterdiği K_m değerinin 10,91 mg/mL olduğu ve V_{max} değerinin 74,6 U/mg protein olduğu tespit edilmiştir. Selülazın 40, 45, 50 ve 55°C'de yarılanma ömürleri sırasıyla 693 dk, 133 dk, 59,7 dk., 39,4 dk olduğu bildirilirken ΔH değerlerinin ise aynı sıcaklıklarda sırasıyla 158,67; 158,63; 158,58 ve 158,54 kJ/mol olduğu rapor edilmiştir. (Mohapatra 2017).

Ladisch *et al.* (1981) Yaptıkları çalışmada *Trichoderma*'dan endoglukanaz izole etmişlerdir. Substrat olarak sellobiyoz kullanıldığında 40°C de pH 4.8'de Km değerinin 1.6 mM olduğunu, K_i değerinin ise 0,98 mM olduğunu bulmuşlardır.

Yapılan bir araştırmada vanilin konsantrasyonu ile selülaz aktivitesinin ters orantılı olduğu belirlenmiştir. 60 g/L düzeyinde eklenen vanilin'in selülaz aktivitesini %90'dan fazla azaltmıştır. Çalışmada vanilin'in IC₅₀ değerinin yaklaşık 30 g/L olduğu belirlenirken vanilin'nin selülazın alt enzimleri olan endoglukanaz, ekzoglukanaz ve glukozidaz üzerine de farklı düzeylerde etki ettiği belirlenmiştir.

Yapılan başka bir araştırmada vanilin'in selülaz üzerine inhibisyon etkisinin non-kompetitif olduğu belirlenmiştir (Li *et al.* 2014). *Trichoderma viride*'den izole edilen selülaz'ın karakterize edildiği bir çalışmada araştırmacılar kolon ile saflaştırılan enzimin moleküler ağırlığının 58 kDa olduğunu belirtmişlerdir. Yazarlar, enzimin V_{max} değerinin 148 U/mL olduğunu bulurken Km değerinin ise 68 µM olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca ham enzimin spesifik aktivitesi 45 U/mg iken saf enzimin aktivitesinin 105 U/mg olduğu belirlenmiştir. pH 8.0'da maksimum seviyede çalışan enzimin optimum sıcaklığı ise 55 °C olduğu belirlenmiştir. 1 mM SDS ve EDTA selülaz aktivitesini % 50'ye yakın düzeyde azaltmışlardır. Çalışmada piyasada ticari olarak satılan deterjanların ise enzim aktivitesini arttırdıkları rapor edilmiştir (Iqbal *et al.* 2011).

Yapılan bir çalışmada endoglukanaz aktivitesinin MgCl₂ tarafından artırıldığı bulunmuştur. Fakat bu artış miktarı 1 mM'dan 20 mM'a doğru gidildikçe azalmıştır. Çalışmada ZnSO₄ ve KCl'nin endoglukanaz aktivitesini azalttığı, CaCl₂'nin ise 1 mM konsantrasyonun aktiviteyi azalttığı; ama 5, 10, 15 ve 20 mM'ın aktiviteyi kontrole göre arttırdığı belirlenmiştir. EDTA'nın ise 2 mM eklenmesi aktiviteyi arttırırken 5, 7.5 ve 10 mM konsantrasyonlarının aktiviteyi azalttığı belirlenmiştir. KCl'nin 1 mM seviyesi ekzoglukanaz aktivitesini düşürürken konsantrasyon artışı ile aktivitenin arttığı gözlemlenmiştir. Çalışmada MgCl₂'nin de aynı etkiyi gösterdiği rapor edilmiştir (Obeng *et al.* 2017).

Deniz *Streptomyces ruber*'den izole edilen tip-1 ve tip-2 selülaz için karakterizasyon çalışmalarının yapıldığı bir araştırmada enzimlerin moleküler ağırlıkları sırasıyla 27,0 ve 24,0 kDa olduğu belirlenmiş olup enzimlerin optimum

çalışma sıcaklıklarının 40°C ve pH'nın 6,0 olduğu, MgSO₄'ün enzim aktivitesini düşürdüğü belirlenmiştir (El-Sersy *et al.* 2010).

Yapılan bir çalışmada Mg⁺²'nin 10 mM değerinin selüloz aktivitesini %40 düşürdüğü, K⁺'nin ise %4 oranında aktiviteyi azalttığı tespit edilmiştir. Çalışmada Cu⁺², Fe⁺² ve Hg⁺²'nin ise 10 mM düzeyinde enzimi tamamen inhibe ettiği belirlenmiştir. Araştırmacılar SDS'nin 10 mM düzeyinde aktiviteyi %46'ya, aynı miktarda EDTA'nın ise aktiviteyi %76'ya düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Çalışmada enzimin optimum sıcaklığının 60°C ve pH'nın da 7.0 olduğu moleküler ağırlığının ise 43,7 kDa olduğu rapor edilmiştir (Yin *et al.* 2010).

Yapılan bir araştırmada araştırmacılar amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırdıkları selülozun yaklaşık 55 kDa olduğunu rapor ederken enzimin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 60°C ve 5,5 olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar enzimin Km değerini 0,996 mM olduğunu bulurken Vmax değerinin ise 1.647 U/mL olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada çeşitli iyonların etkisi de incelenmiştir. Yapılan araştırma neticesinde MgSO₄'ün 10 mM seviyesinin aktiviteyi değiştirmedığı aynı miktarda KCl'nin düşürdüğü rapor edilmiş ve 5 mM EDTA'nın ise aktiviteyi %80 oranında düşürdüğü belirlenmiştir (Malik and Javed 2021).

Bacillus felixus'tan elde edilen selüloz enziminin özelliklerinin incelendiği bir çalışmada araştırmacılar enzimin moleküler ağırlığını 97,4 kDa olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada ham enzimin spesifik aktivitesinin 4,14 U/mg olduğu belirlenirken saflaştırılan enzimin ise spesifik aktivitesinin 92,38 U/mg olduğu rapor edilmiştir. Enzimin optimum sıcaklık 45°C iken optimum pH'nın da 10,0 olduğu bildirilmiştir. Enzimin Vmax değeri 370,17 U/mL/dk iken Km değerinin 6,18 mg/mL olduğu da araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Trivedi *et al.* 2011).

Bacillus licheniformis'ten EPS üretiminin araştırıldığı bir çalışmada farklı substratlar için farklı miktarlarda EPS üretildiği rapor edilmiştir. EPS-1 ve EPS-2 olarak isimlendirilen EPS'lerin üretim miktarları glukozdan EPS-1 için 12,61 g/L ve fruktozdan EPS-2 için 7,03 g/L; her iki verim de *B. licheniformis* için şimdiye kadar bildirilen en yüksek verimler arasında olduğu bildirilmiştir. Araştırmada EPS-1'in *Vibrio cholerae* non-O1'e karşı antimikrobiyal etkisi olduğu da rapor edilmiştir. Çalışma, LB-Agar'da 37,8 °C ve pH 6,8'de gerçekleştirilmiştir (Petrova *et al.* 2021). Farklı substratların EPS üretimine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada araştırmacılar,

galaktoz, maltoz, sükröz, glukoz, fruktoz, riboz ve daha farklı şeker çeşitleri kullanmışlardır. Araştırmanın neticesine göre bakteri hücreleri en fazla sükröz ortamında büyürken en fazla EPS'nin ise galaktozun substrat olarak kullanılması ile (39,09 mg/L) elde edildiği bildirilmiştir (Radchenkova *et al.* 2011). *Pseudomonas oleovorans*'tan elde edilen EPS'nin bakteri tarafından en yüksek 30°C 'de ve pH 6,8'de üretildiği belirlenmiştir. Gliserol açısından zengin ürün (GRP)'nin besi ortamına eklenmesiyle üretilen EPS miktarı daha fazla olmuştur. Bu miktarlar sırasıyla 11,82 g/L ve 12,18 g. L⁻¹ olduğu belirlenmiştir (Freitas *et al.* 2010). *Weissella cibaria* 27'den EPS üretimi ve optimizasyonu ve özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada sükröz içeren MRS besiyerinde 9,8 g/L EPS üretiminin gerçekleştiği ve üretilen EPS'nin antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Yu *et al.* 2018).

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Buzdolabı : Arçelik (-20°C)
Derin dondurucu (-80°C) : Harris, İngiltere
Elektroforez : Owl Separation Systems P10DS
Hassas terazi : And
Homojenizatör : Wiggen Hauser D- 500
Karıştırıcı : Fisons Whirlmixer
Manyetik karıştırıcı : Hanna H1 2211
Masa santrifüjü : Hettich EBA 21
pH metre : WTW unilab pH metre
Soğutmalı santrifüj : Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre : Shimadzu UVmini-1240
Su Banyosu
Vorteks

3.1.2. Tez için kullanılan besiyerleri

Ağrı ili Diyadin İlçesinin termal kaplıcalarından alınan toprak ve su örneklerinden bakteri izolasyonu yapılabilmesi amacıyla aşağıda belirtilen besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.2.1. LB (Luria Bertani)-Agar besiyeri

Bakterilerin izolasyonu ve stok kültürlerin saklanması için kullanılmıştır (Sambrook and Russell 2001).

Kimyasal	gr/L
Trypton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	5
Agar	15

Luria Bertani Agar besiyerinden 35 g tartıldıktan sonra 1 L'ye saf su ile tamamlandı. Daha sonra besiyeri 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklavlandı.

3.1.2.2. CMC (Carboxymethyl Cellulose)- LB Agar besiyeri

İzolasyonu yapılan bakteri suşlarının katı besi ortamında selüloz aktivitesinin tespit edilmesi için aşağıda belirtilen besiyeri maddeleri kullanılmıştır. Tartım yapıldıktan sonra hazırlanan besiyeri 1 L'ye saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan besiyerinin pH'sı 1 N NaOH ile istenilen değere getirilmiştir (Hürtaş Tatlı 2013).

Kimyasal	gr/L
Trypton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	5
Agar	15
CMC	2

3.1.2.3. Nutrient Agar besiyeri

Patojen mikroorganizmaları geliştirmek için kullanılan besiyeridir. Bileşimi: Peptone from meat 5,0 g/L; Meat extract 3,0 g/L; Agar-agar 12,0 g/L şeklindedir. 20 g NA'dan tartılmış olup 1 L'ye tamamlanmıştır. 1 N NaOH ile pH'sı ayarlanmış ve sonra besiyeri 121°C'de 15 dakika boyunca sterilize edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler:

Ağrı ili Diyadin İlçesinin termal kaplıcalarından alınan toprak ve su örneklerinden izole edilen bakterinin saf olarak kültüre alınması ve selüloz enziminin karakterizasyonun yapılması amacıyla aşağıda belirtilen çözeltiler kullanılmıştır

3.1.3.1. Fizyolojik Tuzlu Su:

Dilüsyon yapmak amacıyla % 0,9'luk Fizyolojik Tuzlu Su kullanılmıştır. Bunun için 0,9 g Sodyum Klorür (NaCl) tartılıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Daha sonra hazırlanan çözelti 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiştir (Albayrak 2018).

3.1.3.2. Kongo Kırmızı Çözeltisi

CMC-LB Agar besi ortamında gelişen bakterilerin selüloz aktivitelerinin belirlenebilmesi için 0,2 g Kongo kırmızısı 100 mL'ye tamamlanmıştır (Caf 2012).

3.1.3.3. 1 M NaCl Çözeltisi

CMC- LB Agar besi ortamında gelişen bakterilerin selüloz aktivitelerini belirgin hale getirmek için kullanılır. Bu amaçla 58,5 g NaCl tartılıp saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır (Teather and Wood 1982).

3.1.3.4. Çeşitli Konsantrasyonlarda NaOH Çözeltileri

Bakterilerin gelişmesi için gerekli olan besi ortamlarının ve enzim karakterizasyon çalışmalarında kullanılan tampon çözeltilerin pH'larının ayarlanması ile DNS çözeltisinde kullanmak amacıyla için 0,2 N; 1 N ve 2 N olmak üzere üç farklı konsantrasyonda NaOH çözeltisi hazırlanmıştır (Aygan 2011).

Çözeltiler hazırlanırken aşağıdaki formülden yararlanılmıştır.

$$N=M \cdot Td$$

N: Normalite

M: Molarite

Td= Tesir değeri

3.1.3.5. Dinitro Salisilik Asit Çözeltisi (DNS)

Dinitrosalisilik Asit metodu karbohidrataz etkisine sahip enzimlerin aktivitelerini ölçmede kullanılan bir metottur. Bu yöntem 3,5- dinitrosalisilik asit'in 3-amino 5-nitrosalisilik aside dönüştüğü ve aldehit gruplarının karboksilik gruplarla okside olması sonucu gelişen ve nihayetinde renk değişiminin gözlemlendiği bir metottur. Bu metotta indirgen şekerin aldehit veya keton grubu 3,5-dinitrosalisilik asit ile reaksiyona girer. Reaksiyonun neticesinde 3-amino 5-nitrosalisilik oluşur. Oluşan asidin yoğunluğuna göre renk koyulaşması meydana gelir. Enzim aktivitesi sonucu meydana gelen serbest glukoz miktarı ne kadar fazlaysa oluşan rengin yoğunluğu da o kadar fazla olur. Meydana gelen renk spektrofotometrede 540 nm'de okunur. Çözelti aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır:

1 g DNS 50 mL distile edilmiş su içinde çözündürülerek üzerine 30 g Na-K-Tartarat ilave edilip manyetik karıştırıcı ile çözündürülmüştür. Daha sonra 2 N NaOH çözeltisinden 20 mL ilave edilmiş ve son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Çözelti koyu şişede, güneş görmeyecek ve hava almayacak şekilde muhafaza edilmiştir (Sumner *et al.* 1921).

3.1.4. Kullanılan tampon çözeltiler

Tampon çözeltiler çözelti ortamında meydana gelen pH değişimlerine karşın yapıyı korumak için kullanılır (Kavutçu 2014).

3.1.4.1. Sodyum-Fosfat Tamponu

Bakteriden izole edilen Selülaz enziminin pH 6,0-8,0 aralığındaki aktivite seviyesinin tespiti için kullanılmıştır. Tampon hazırlanırken NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 çözeltileri ve saf su kullanılmıştır. İstenilen pH değerini elde etmek için yukarıda belirtilen maddeler ve distile edilmiş su uygun oranlarda karıştırılmıştır (Caf 2012).

Çizelge 3.1. Fosfat Tamponu hazırlama çizelgesi

pH	0,2 M NaH_2PO_4 (mL)	0,2 M Na_2HPO_4 (mL)	Saf Su (mL)
6,0	87,7	12,3	100
6,5	68,5	31,5	100
7,0	39,0	61,0	100
7,5	16,0	84,0	100
8,0	5,3	94,7	100

3.1.4.2. Glisin-NaOH tamponu

Bakteriden izole edilen Selülaz enziminin pH 8.5-10.5 aralığındaki aktivite seviyesinin tespiti için kullanılmıştır. Tampon hazırlanırken 0.2M Glisin ve 0.2 M NaOH çözeltileri ile saf su kullanılmıştır. İstenilen pH değerini elde etmek için yukarıda belirtilen maddeler ve distile edilmiş su uygun oranlarda karıştırılmıştır (Caf 2012).

Çizelge 3.2. Glisin-NaOH Tamponu hazırlama çizelgesi

pH	0,2M Glisin (ml)	0,2 M NaOH (mL)	Distile Su (mL)
8,5	4,0	50	146
9,0	8,8	50	141,2
9,5	22,4	50	127,6
10,0	32,0	50	118
10,5	45,5	50	104,5

3.1.5. Elektroforez için kullanılan çözeltiler

1. 1M Tris-HCl (pH=8,8): 12,11 g Tris (0,1mol) tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
2. 1 M Tris-HCl (pH=6,8): 12,11 g Tris (0,1 mol) tartılarak 80 mL suda çözüldü, pH ayarı yapıldıktan sonra 100 mL'ye tamamlandı.
3. %30 Akrilamid-%0,8 Bisakrilamid çözeltisi: 15 g akrilamid, 0,4 g bisakrilamid ve 34,6 g su karıştırılarak çözüldü.
4. %10'luk amonyum persülfat çözeltisi: 1 g amonyum persülfat tartılarak su ile 10 mL'ye tamamlandı.
5. %10'luk SDS: 1 g SDS 9 mL suda çözülerek elde edildi.
6. Yürütme tamponu: 1,51 g Tris (12,5 mmol) ve 7,51 g glisin (0,1 mol) tartılarak 450 mL suda çözüldü %10'luk SDS'den 5 mL ilave edildi, pH=8,3'e ayarlandı ve toplam hacim 500 mL'ye tamamlandı.
7. Numune tamponu: 1 M Tris-HCl (pH: 8.0)'den 0,5 mL, %10'luk SDS'den 1 mL, %100'lük gliserinden 1 mL ve %0,1'lik bromtimol mavisinden 1 mL alınarak suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu tampon kullanılmadan önce 950 µL numune tamponunun üzerine 50 µL β-merkaptotanol ilave edilerek hazırlandı.
8. Sabitleştirme çözeltisi (jelde yürütülen proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılan çözelti): %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 su olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.
9. Jel boyama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su içerisinde 0,1 g coomassie brilliant blue R-250 reaktifinin çözülmesiyle hazırlandı.

10. Jel yıkama çözeltisi: 50 mL metanol, 10 mL asetik asit ve 40 mL su karıştırılarak elde edildi.

Gümüş boyama çözeltileri

1. **Tespit Çözeltisi:** 60 ml saf su, 30 ml %96'lık etanol, 10 mL asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

2. **Redüksiyon Çözeltisi:** 4,8 g sodyum asetat 80 mL saf su ve 45 mL etanol karışımının pH'sı asetik asitle 6,0'a ayarlandı. 150 mg sodyum tiyosülfat ve 3 mL glutaraldehit ilave edilerek son hacim saf suyla 150 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3. **Boyama çözeltisi:** 100 mL saf su, 20 µL formaldehit ve 0,1 g AgNO₃ (Gümüş nitrat) karıştırılarak hazırlandı.

4. **1. Yıkama çözeltisi:** 3,75 g sodyum karbonat, 270 mL saf su ve 120 µL formaldehit karıştırılarak hazırlandı.

5. **2. Yıkama çözeltisi:** 1 mL gliserin, 1,25 mL asetik asit (%5'lik 250 mL asetik asit çözeltisi) saf suyla 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı (Balcı 2015).

3.1.6. Diğer çözeltiler

3.1.6.1. Coomassie Brilliant Blue G-250 reaktifi (proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti):

100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml %95'lik etanolde çözülerek içerisine %95'lik 100 mL fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin son hacmi su ile 1 L'ye tamamlandı (Şentürk 2009).

3.1.6.2. Protein Standart Çözeltisi

Spektrofotometrik yöntemde kullanılacak grafiğin hazırlanması ise şu şekilde yapıldı; 1 ml saf su içinde 1 mg protein içerek şekilde sığır serum albümin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µg proteine denk gelecek hacimler tüplere aktarıldıktan sonra distile su ile tüplerdeki hacimler 0,2 mL'ye tamamlandı. Tüpler vortekslendi ve her bir tüp üzerine 3 mL Coomassie Brilliant Blue reaktifi ilave edildikten sonra tekrar vortekslendi. Şahit numune için ise 0,1 M fosfat tamponu ile 3 mL Coomassie reaktifi karıştırıldı. Standart grafik ise

spektrofotometre de 595 dalga boyundaki absorbans değerlerine karşılık gelen protein değerleri aracılığı ile elde edilir (Şentürk 2009).

3.2. Yöntemler

3.2.1. Bakteri izolasyonu ve tanısı

Ağrı ili Diyadin ilçesinde yer altından çıkan sıcak su kaynağının yakınındaki toprak ve suyun farklı noktalarından steril örnek alma çubuğu ile steril kaplara örnekler alındı. Alınan toprak ve su örneklerinden 1'er g toprak ve 1 ml su, steril 9 ml fizyolojik su ile 2 saat boyunca karıştırıldı ve böylece bakteri sporlarının suya geçmesi sağlandı. Sıvı ortamdaki vejetatif formların ölmesi için 80 °C su banyosunda 15 dakika kısmi pastörizasyon yapıldı. Her bir tüpteki süspansiyon örneklerinden 1 ml alınarak % 1 CMC LB-Agar besiyerine yayma yöntemi ile 8 petri kabına ekilerek 55 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra aynı petri kabında farklı morfolojik yapıya sahip olanlar yeniden belirlendi ve saf kültürler elde edilmesi için farklı yapıdaki bakteriler öze ile alınıp yeniden 55 °C'de 24 saat inkübe edildi. Toplamda CMC-LB Agar besiyerinde belirtilen koşullarda üreyen görünüşü farklı 22 bakteri elde edildi. Üreyen bu bakterilerin deney doğrulamasının yapılması ve stoğa en genç örneklerin alınması için tekrardan 22 farklı petriden alınan numuneler 55 °C'de 24 saat inkübasyon işlemine tabi tutuldu. Saf kültürden elde edilen izolatlardan her bir petri kabından alınan 1 öze dolusu kültür 2 farklı tüpe alınıp %30'luk Gliserol-Nutrient Broth'da -80 °C de saklandı ve bu çalışma stok üzerinden devam etti (Caf 2012).

3.2.2. İzolatların selüloz üretme yeteneklerinin tespiti

İzolatlar % 0.1 w/v CMC (Karboksimetil selüloz) içeren LB-Agar-CMC besiyerlerine ikişer kopya olacak şekilde ekildi ve 55 °C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda petri kaplarına Kongo-kırmızısı boyası (% 0.2 w/v) dökülerek 15 dk. oda sıcaklığında beklenildi. Fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla NaCl (1 M) solüsyonu eklendi ve 15 dakika beklenildi. Süre sonunda NaCl solüsyonu plaklardan uzaklaştırıldı ve plaklar negatoskop üzerine alınarak incelendi. CMClı agar plakları kırmızıya boyanmış zeminde etrafında sarımtırak zon bulunan bakteriler CMClı pozitif bakteriler olarak kabul edildi (Aygan 2011). Toplam 22

bakteri suşu içinden 14 tanesinin selüloz pozitif olduğu yapılan analizler sonucu tespit edildi.

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Kary Mullis tarafından 1985 yılında keşfedilmiştir. Keşiften sonra çeşitli değişikliklere uğrasa da temel prensipleri aynı kalmıştır. Bu metot, yüksek ölçüde duyarlı ve özgün olup kaşiflerine Nobel Ödülü getirmiştir. Çünkü bu metot tanı ve araştırma olanaklarında büyük değişim ve başarı getirmiş ve nükleik asit amplifikasyon metotları fenotip tanımlamaların yerini almıştır. PCR sayesinde Enfeksiyonların teşhisi, spesifik genlerin belirlenmesi, GDO tespiti, gıda içeriklerinin kontrolü gibi birçok alanda oldukça etkin şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Kahya *et al.* 2013). PCR esasında hücrede gerçekleşen DNA eşleşmesinin tüp içerisinde hızlı bir şekilde taklit edilmesidir. Bu işlemin çok hızlı gerçekleşmesi sayesinde çok kısa bir süre içerisinde DNA miktarı milyon kat artar. PCR işlemi temel bazı bileşen ve işlemlerden oluşur. Temel bileşenler: Taq DNA Polimeraz enzimi, Taq Polimeraz DNA enzim tamponu, $MgCl_2$, dNTP karışımı, ileri ve geri primerler ve kalıp DNA'dır. Taq DNA polimereaz kofaktör olarak Mg^{+2} iyonunu kullanır ki konsantrasyonu çok önemlidir. Az veya fazla konsantrasyonda az gelişme veya hatalı eşleşme olur. PCR'de genelde 20-40 döngü arası işlem yapılır. Her döngüde üç farklı aşama mevcuttur ve her birinin sıcaklığı farklıdır. Dolayısıyla her aşamada farklı işlemler gerçekleşir. Bu aşamalar, denatürasyon, birleşme (annealing) ve extension (uzama) aşamalarıdır. Denatürasyon: çift kalıplı çoğaltılacak hedef DNA'nın denatüre olması yani açılması işlemidir. Bu 95 °C'de olur ve işlem sonucu DNA tek iplik haline gelir. Birleşme aşaması ise kalıp DNA'nın primerler ile birleşme aşamasıdır ve 50-60 °C arasında gerçekleşir. Extension ise 72 °C'de gerçekleşen işlemdir. Bu sıcaklıkta enzim maksimum aktiviteye sahiptir. Taq polimeraz, dNTP'ler (ATP, GTP, TTP, CTP) vasıtasıyla tek iplikli hedef DNA'nın eşleniğini oluşturur ve DNA çift iplikli yapısı oluşur. Bu işlemler ortalama olarak 20-40 döngüyle gerçekleştirilir (Okutucu and Pehlivan 2003).

Prokaryotik yapılarda 16S, 23S ve 5S gibi üç farklı gen bölgesi rRNA'yı kodlar. 16S ve 23S rRNA bölgeleri oldukça yüksek seviyede korunmuş bölgeler olup bu bölgelerin PCR'da çoğaltılması ve sekanslama işlemi ile suş tanımlaması

yapılabilir. Sekanslama, hedef DNA'nın nükleotid dizilerinin tespit edilmesi işlemidir (Kabataş 2013).

OE-1 suşunun tanımlanması için genomik DNA izolasyonu ve sekans analizi yapıldı. Yapılan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

- 1- Bakteri örneğinden DNA izolasyonu için **EurX GeneMATRIXBacterial and Yeast DNA izolasyon kiti** (Polonya) kullanılmıştır.
- 2- DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir.
- 3- PCR çalışmasında universal primer olarak 27F – 1492R primerleriyle, tür tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. Kullanılan primer dizileri ve PCR koşulları aşağıda verilmiştir.

27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT

- 95°C 5 dakika – initial denaturation
- 30 döngü:
 - 95°C for 45 saniye - denatürasyon
 - 57°C for 45 saniye - annealing
 - 72°C for 60 saniye – extension
- 72°C for 5 dakika – final extension
- Sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PCR tamamlanmıştır

Bileşen	Stok Kons.	Reak. Kon.
PCR Buffer	10X	1X
MgCl2	25mM	1,5 mM
dNTP mix	20 mM	0,2 mM
F. Primer	10 µM	0,3 µM
R. Primer	10 µM	0,3 µM
Taq DNA Polymerase	5U/ µL	2 U
DNA template	3 µL	
PCR grade su ile35 µl'ye tamamlanır		

- 4- PCR (kyratec thermocycler) ile elde edilen amplifikasyon sonuçları 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütüldü ve ethidium bromide boyası kullanılarak UV ışığında görüntüsü alınmıştır. Yaklaşık 1470 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu **Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase** Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Örnek için PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir.
- 5- PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için **MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System"** (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılıp, kitin prosedürlerine uyarak saflaştırılmıştır.
- 6- Sanger Dizileme örnekleriniz için, Macrogen Hollanda laboratuvarında, **ABI 3730XL** Sanger dizileme cihazı (**Applied Biosystems, Foster City, CA**) ve **BigDye Terminator v3.1 Cycle** Dizileme Kiti kullanılmıştır (**Applied Biosystems, Foster City, CA**).
- 7- 27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde **BioEdit** yazılımı içinde **CAP contig** assembly algoritması kullanılmıştır.

3.2.4. Selülaz Enziminin kısmi saflaştırılması

Bu amaçla seçilen suşun literatürdeki veriler ve elde edildiği kaynak da dikkate alınarak pH 7.0'da ve 55°C'de çalkalayıcı inkübatörde ve 100 devir/dakika hızda 24 saat inkübasyonu yapılarak %1 CMC-LB sıvı besi ortamında üretimi gerçekleştirildi. Elde edilen kültür +4°C'de 15 dk süreyle 10.000 devir/dakika hızda santrifüj edildi ve bakteriler çöktürülüp sıvı faz steril falkon tüplerine aktarıldı (Srivastava 2013). Oluşan çökelti atılıp süpernatant'a %10'dan başlanmak üzere amonyum sülfat çöktürmesi uygulandı.

3.2.5. Selülaz Enzimi aktivitesinin belirlenmesi ve karakterizasyonu

DNS metodu (Sumner 1921) ile enzimin K_m ve V_{max} değerleri, Optimum Sıcaklık, Optimum pH, Stabil pH, +4°C'de depolama stabilitesi ve optimum iyon konsantrasyonu belirlenmiştir. Karakterizasyonun yapılması amacıyla en iyi sonucu

verecek enzim/substrat oranı ön çalışmalarla belirlenmiştir. Enzim ve substrat belirlenmiş sıcaklık ve pH koşullarında inkübe edildikten sonra üzerine 0,6 ml DNS ayracı konulmuş ve ısıtıcı blokta 100°C’de ve yine ön denemelerle belirlenen sürede (10 dakika) bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 10 dk. buz banyosunda bekletilerek spektrofotometrede köre karşı 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Kör olarak 0,4 mL substrat ve 0,2 mL saf su kullanılmıştır. Çalışmada hesaplama için kullanılan standart eğri oluşturulurken glukoz substrat olarak kullanılmıştır.

3.2.5.1. Glukoz Standart Eğrisi

18 mg glukoz 10 mL suda çözüldü 1,2,3,4 ve 4 µmol/mL’ye seyreltildi. Hazırlanan bu glukoz çözeltisinin 0,6 mL’sine 0,6 mL DNS çözeltisi eklenerek 100°C’de 10 dakika ısıtıcı blokta bekletildi ve daha sonra 10 dakika buz banyosunda bekletilerek soğuması sağlandı. Hazırlanan örneklerin spektrofotometre cihazı ile 540 nm’deki absorbansları ölçüldü. Denemeler çift örnek olarak çalışıldı ve hesaplamalarda ortalamaları kullanıldı. Glukoz miktarına karşı okunan absorbans değerlerinin grafiğinden elde edilen eğimden yararlanılarak aktivite hesaplandı (Şekil 4.2)

3.2.5.2. Selüloz Enziminin Çalıştığı Optimum pH’nın Belirlenmesi

Her enzimin en iyi çalışabileceği bir pH değeri ve aralığı bulunur. Süpernatantta bulunan enzimimize ait optimum pH’yı bulmak için literatür verileri ışığında 50°C’de ve 0.5 M iyonik şiddete sahip Sodyum-Fosfat tamponu ve Glisin-NaOH tamponu kullanılmıştır. Substrat olarak %1 CMC kullanılmıştır. Sodyum Fosfat tamponu enzimin 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 ve 8,0 pH değerlerindeki aktivitesini bulmak için kullanılırken Glisin-NaOH tamponu ise 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 ve 10,5 pH değerlerindeki aktiviteyi bulmak için kullanılmıştır. Tamponlar hazırlanırken 3.1.4.1 ve 3.1.4.2’de belirtilen miktarlar da çözelti hazırlanmış olup daha sonra kalibresi yapılmış pH metre ile tamponun doğru pH’da hazırlanıp hazırlanmadığı kontrol edilmiştir. Eğer gerekli ise ayarlamalar NaOH ve HCl ile yapılmıştır. Enzimin pH aktivite ölçümü 3.2.5’te belirtildiği şekilde yapılmış olup sonuçlar çizelgede ve % Aktivite-pH grafiği halinde gösterilmiştir.

3.2.5.3. Selüloz Enziminin Çalıştığı Optimum İyonik Şiddetin belirlenmesi

Santrifügasyon işlemi sonucunda süpernatatta bulunan enzimin en optimal çalışabileceği iyonik şiddetin bulunması amacıyla literatür verileri ve enzim kaynağının termofilik karakter taşıdığı göz önüne alınarak 50°C’de ve optimum pH’da %1 CMC içeren substrat ortamında aktivite ölçümü yapılmıştır. İyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla literatür verileri ışığında 50 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, 800 mM ve 1000 mM iyonik şiddet ortamında aktivite ölçümü 3.2.5’te belirtildiği şekilde yapılmış olup sonuçlar çizelgede ve % Aktivite-İyonik Şiddet grafiğinde gösterilmiştir.

3.2.5.4. Selüloz Enziminin Çalıştığı Stabil pH’nın belirlenmesi

Enzimin hangi pH değerinde stabil olduğunun belirlenmesi amacıyla 0,1 M iyonik şiddette %1 CMC besi içeren farklı pH değerlerine sahip tamponlarda 2’nci saat, 18’inci saat, 42’nci saat, 10’uncu gün ve 13’üncü gün aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite ölçümleri yapılırken optimum pH ve optimum iyonik şiddete sahip tamponlar kullanılmıştır. Ölçüm 3.2.5’te belirtildiği şekilde yapılmış olup daha sonra elde edilen değerler, %aktivite- süre grafiğinde ve çizelge de gösterilmiştir.

3.2.5.5. Selüloz Enziminin CMC substratı ile Çalıştığı Optimum Sıcaklığının belirlenmesi

Enzimin en iyi şekilde aktivite gösterdiği sıcaklığın belirlenmesi için optimum pH’da, optimum iyonik şiddette ve optimum substrat konsantrasyonunda 12,5; 20; 30; 45; 55; 60; 65; 70; 80 ve 95°C’lerde aktivite ölçümü yapılmıştır. Ölçüm 3.2.5’te belirtildiği şekilde yapılmış olup bağıl akitivite grafiği ve sıcaklık çizelgesinde sonuçlar belirtilmiştir.

3.2.5.6. Selüloz Enziminin CMC substratı ile 4°C’de Depolama stabilitesinin belirlenmesi

Enzim’in 4°C’deki depolama stabilitesinin belirlenmesi amacıyla 3.2.5’te belirtildiği şekilde aktivite ölçümleri belirli aralıklarla yapılmıştır. Aktivite ölçümünün ilk olarak ölçüldüğü an aktivite 100 kabul edilmiştir. Daha sonra 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3;

3,5; 4; 75; 100 ve 200'üncü saatlerde ölçüm yapılmış olup sonuç bağıl olarak belirlenmiştir.

3.2.5.7. Selüloz Enziminin CMC substratı ile K_m - V_{max} , K_{cat} ve V_o Değerlerinin belirlenmesi

K_m , bir enzimin substrata olan ilgisinin ifadesi olmasının yanı sıra enzimin hızın yarısına eriştiği substrat konsantrasyonunu da ifade eder. Dolayısıyla K_m değeri enzimlerde substrat afinitesinin önemli bir göstergesidir. Düşük K_m yüksek afiniteyi temsil ederken yüksek K_m ise düşük ilgiyi gösterir (Türkan 2015). K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi için Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Bu grafik yardımıyla K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Bu grafiğin elde edilmesi için ise optimum şartlarda ve farklı konsantrasyonlarda enzim aktivitesi E.U/mL olarak aşağıda belirtilen formüle göre belirlenmiştir. Eğim, Glukoz standart grafiğinin eğiminden bulunmuştur. Aktivite hesaplama formülü aşağıda belirtilmiştir:

$$\frac{\frac{OD_{540}}{Eğim} * Reaksiyon Hacmi (mL)}{Reaksiyon Süresi (dk) * Enzim Hacmi (mL)}$$

K_{cat} , aynı zamanda turnover sayısı olarak bilinir ve bir enzimin aktif bölgesi tarafından ürüne dönüştürülen substrat sayısını ifade eder. V_o (K_{cat}/K_m) ise özgülük sabitidir. Çeşitli enzimlerin katalitik etkilerinin veya farklı substratların aynı enzimle dönüşümünün karşılaştırılmasının en iyi yolu iki tepkime için K_{cat}/K_m oranının karşılaştırılmasıdır. K_{cat} ve K_m parametreleri enzimlerin kinetik verimliliklerini değerlendirmemizi sağlar.

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{E_t}$$

Formülünden hesaplandı. E_t , Bradford ile protein tayin metodu sonucunda bulundu. V_o ise;

$$V_o = \frac{K_{cat}}{K_m}$$

Formülü ile hesaplandı (Türkan 2015).

3.2.5.8. Selülaz Enziminin Aktivasyon Enerjisinin (E_a), Aktivasyon Entalpisinin (ΔH) ve Q_{10} Değerlerinin Belirlenmesi

Diyadin termal kaplıcıklarından izole edilen bakteriden elde edilen selülaz enziminin E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerini belirlemek için zaman ve ısı ayarlı ısıtıcı blok kullanıldı. Optimum sıcaklık daha önce optimal pH’da, molarik şiddet de ve konsantrasyon da belirlenip E_a , ΔH ve Q_{10} değerleri buna bağlı olarak belirlenmişlerdir. Enzimin 12,5-90°C arasında aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerin aktivite sonuçlarının logaritmaları ($\log K$) alındı ve sıcaklık değerleri Celcius’tan Kelvin’e çevrilerek grafikte $1/T \times 1000^{-1}$ olarak belirtildi. Çizilen grafik aracılığıyla Arrhenius eğrisi elde edilmiş olup bu eğrinin eğimi vasıtasıyla Aktivasyon Enerjisi (E_a) hesaplandı (Balcı 2015).

$$\text{Eğim} = \frac{-E_a}{2,303 \times R}$$

Aktivasyon entalpisinin (ΔH)’ın hesaplamasında ise $\Delta H = E_a - R \times T$ formülü kullanıldı. Daha sonra ise Q_{10} değeri hesaplandı. Bu değer, 10°C’lik sıcaklık değişimi arasındaki aktivite ölçeği farka denilir. Aralarında 10°C’lik fark olan iki aktivite değerinden yüksek olan, düşük olana bölününce çıkan sonuç Q_{10} olarak isimlendirilir (Balcı 2015).

3.2.6. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Selülaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Proteinler, molekül büyüklüklerine, çözünürlüklerine, elektriksel yüklerine, afinitilerine ve adsorbsiyon özelliklerine göre ayrıştırılabilirler. Jel filtrasyon kromatografisi, molekül büyüklüğünü esas alan bir ayırma metodudur. Oldukça basit ama etkili ve uygun bir metod olan bu yöntemde hidratize olmuş bir polimer kullanılır. Bu polimer, Sephadex, Sepharose gibi polisakkarit olabileceği gibi biogel gibi poliakrilamid türevi ürünlerde olabilir. Bu metod da küçük fraksiyonlar jelin gözeneklerine girerlerken büyük parçalar gözeneğe giremeyip daha hızlı hareket ederler. Böylece eluatta proteinler büyüklüklerine göre ayrışırlar. Polimer materyal kolona tatbik edilir ve tampon ile dengelenir. Daha sonra aynı tamponda çözünmüş

olan protein kolona tatbik edilir. Proteinler de molekül ağırlıklarına göre kolondan ayrılırlar (Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Diyadin termal kaplıcalarından elde edilen bakteriye ait selüloz enzimini kısmen saflaştırmak için jel filtrasyon kromatografisi kullanılmıştır. Jel olarak Sephadex G-100 kullanılmıştır.

3.2.6.1. Selüloz Enzimi için Sephadex G-100 jelinin hazırlanması

Yeteri kadar büyük bir beher içerisinde şişirme materyali olan Sephadex G-100 polimeri oda sıcaklığında 1 gece tampon içinde şişirildi. Şişirilmiş ve havası alınmış polimer materyali dengeleme tamponuyla dolu olan kolona hava kabarcığı kalmayacak şekilde kolonun cidarından yavaşça damlalıkla aktarıldı. Aynı tamponla dengeleme işlemi yapıldı. Kolonun dengelenip dengelenmediğinin kontrolü için alttan alınan tamponun pH'sı ve 280 nm'deki absorbansı ile üstten ilave edilen tamponun pH değeri ve 280 nm'de gösterdiği absorbans değeri belirli aralıklarla düzenli olarak ölçüldü. Her iki değerde aynı oluncaya dek dengeleme işlemine devam edildi. Kolonun akış hızı yaklaşık olarak 15-20 mL/saat olarak ayarlandı (Balcı 2015).

3.2.6.2. Süpernatanttaki Selüloz Enziminin Sephadex G-100 ile Saflaştırılması

Daha önce santrifügasyon işlemi sonucu süpernatant da bulunan enzimin Sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisi ile kısmen saflaştırılması için örnek kolona tatbik edildi. Örnek uygulanmadan önce tampon çözeltinin düzeyi jel seviyesine indirildi. Kolona %10'luk Gliserinli yaklaşık 5 mL protein çözeltisi uygulandı ve çözelti jele iyice emdirildi. Üzerine çok yavaş şekilde birkaç mL elüsyon tamponu ilave edilerek jele iyice nüfuz etmesi sağlandı. Kolonun üzeri elüsyon tamponu ile dolduruldu ve elüsyona devam edildi. Elüatlar 1'den başlayarak numaralandırılmış tüplere toplandı. Her bir tüpte yaklaşık olarak 3 mL elüat toplandı. Her tüpün 280 nm'de absorbansı elüsyon tamponuna karşı okundu ve örneklerin absorbans değeri 0,05 oluncaya kadar işlem devam etti. 280 nm'de kalitatif protein tayini için alınan absorbans değerleri ve enzim aktivite değerleri tüp sayısına karşı grafiğe aktarıldı.

3.2.7. Kalitatif Protein Tayini

Proteinler, aminoasitlerden oluşur. Kalitatif protein tayininde amaç, ilgili yapıda protein olup olmadığının belirlenmesidir. Bu amaçla aromatik gruplara sahip triptofan, fenilalanin ve tirozin gibi aminoasitlerin 280 nm’de maksimum absorbans göstermeleri sayesinde bir metot geliştirilmiştir. Bu metodun diğer bir ismi Warburg metodu olup bu sayede yapıda protein olup olmadığı hızlı şekilde belirlenir (Segel and Woodin 1968). Kromatografik işlemler neticesinde çözelti eşit hacimlerde tüplere alınmış olup her bir numune daha sonra kuvartz küvetler kullanılarak 280 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur.

3.2.8. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Bakteriden elde edilen homojenat ve kromatografi sonrası elde edilen kısmı olarak saflaştırılmış enzim örneklerinden 200 µL tüplere konularak üzerine üzerine 3 mL de Coomassie Brilliant Blue ilave edilir. Karışım vortekslendikten sonra 595 nm deki absorbans değerleri ölçüldü ve standart grafik aracılığı ile örneklerdeki protein miktarı belirlendi. Her bir örnek için üç adet deneme yapılmış olup bu üç değer aritmetik ortalaması kullanılmıştır.

3.2.9. SDS-PAGE Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Elektrofrez elektrik yük esasına dayanılarak yapılan bir ayırma metodudur. Genel olarak elektrofrez, bileşiklerin taşıdıkları yükün farklarına göre belirli bir pH’da ayrılması prensibine dayanır. Tampon çözeltisi pH’yı ayarlarken güç kaynağı tarafından da elektrik sağlanır. Proteinler elektrofrezde bir jel üzerinde yürütülür ve bu jel genelde çapraz bağlı ve poliakrilamitten yapılmış polimerlerdir. Protein gibi makromoleküller kendilerinden küçük moleküllere göre jelde daha yavaş hareket ederler; çünkü proteinlerde yükün kütleye oranı çok daha küçüktür. Jel, bir tür elek gibi iş görür aslında. Akım kesildiğinde her bileşik yük ve ağırlık durumuna göre belirli bir bölgede durur ve bu sayede ayırım gerçekleşir. İlk önce serbest elektrofrez geliştirilmiştir. Daha sonra Bölge Elektrofrez, Disk Elektrofrez gibi farklı elektrofrez çeşitleri geliştirilmiştir. Bu yöntemin çeşitli avantajları vardır: bu yöntemle proteinler hem görüntülenebilir hem de ayrıştırılabilir (Nelson and Cox 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2014). SDS-PAGE’de normal elektrofrezden farklı

olarak SDS ilave edilir. Ağırlığı bilinen protein ile bilinmeyen örnek poliakrilamid'in üst noktasından bırakılır ve elektrik akımına maruz bırakılır. Proteinlerde hareket normal elektroforetik işlemdeki gibi yük ve kütlelerine bağlı olmayıp sadece kütleyle bağlıdır; çünkü proteine yapışan SDS'nin yükü proteinden çok daha fazladır. Bu sayede tüm proteinlerin yük/kütle oranları eşitlenir ve akış sadece molekül büyüklüğüne göre olur. Akım kesildiğinde proteinler molekül ağırlıklarına göre durumuna göre belirli bir noktada dururlar ve bantlar oluşur. Oluşan bantlar boya ile boyanarak proteinler görünür hale gelir (Nelson and Cox 2005; Keha ve Küfrevioğlu 2014).

Laemmli (1970), metodu uygulanarak enzimin saflık düzeyi kontrolü yapılmıştır. Enzim, Jel Filtrasyon kromatografisinde saflaştırıldıktan sonra %3-8 kesikli Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi ile (SDS-PAGE) bu işlemler gerçekleştirilmiştir. İşlemin sorunsuz şekilde yapılması için elektroforez plakalarının temiz ve çizilmemiş olması gerekir. Bunun için öncelikle plakaların çizik olup olmadığı kontrol edildikten sonra elektroforez plakaları saf su ile ardından alkol ile iyice yıkandı. Plakalar aralarında jelin geçeceği bir boşluk oluşturacak şekilde üst üste getirilip kısıkaç yardımıyla tutturuldu. Bu sayede sabit hale gelen plakalar jel hazırlama aparatına konuldu. Önce ayırma jeli hazırlandı ve plakalar arası boşluğa çok dikkatli ve yavaş şekilde pipetle üst kesime 5 cm kalıncaya kadar dolduruldu ve jelin donması beklenildi. Jelin donduğu anlaşıldıktan sonra yeni hazırlanmış olan yığma jeli dikkatlice plakalar arasındaki boşluğa dolduruldu ve örneklerin yürütülmesi için kuyucuk tarafları dikkatli şekilde yerleştirildi. Yığma jelinin donduğu anlaşılmca taraflar kuyucuklara zarar verip şeklini deforme etmeden çok yavaş ve dikkatli şekilde çıkarıldı. Plaka önce saf su sonra yürütme tamponu ile yıkandı ve plaklar elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın üst ve alt kısmı yürütme tamponu ile dolduruldu. Enzim örneklerine son hacim 50 µL olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu ilave edildi ve üç dakika kaynar su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Elektroforez tankının kapağı kapatılarak 80 voltta 20 dakika yürütüldü ve numuneler ayırma jeline gelip yığıldılar. Sonra voltaj yükseltip 120'ye çıkarıldı ve örnekler jelin alt sınırına gelinceye kadar yürütüldü. Örneklerin hangi seviyede olduğu numune tamponuna ilave edilen brom-timol mavisi yardımıyla belirlendi. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra akım kesildi ve plakalar arasındaki jel dikkatli olarak yapının bütünlüğü

bozulmayacak şekilde çıkarılıp jel sabitleştirme çözeltisine konuldu. Bu çözeltide 30 dakika bekletilen jel çalkama düzeneğinde redüksiyon işlemine tabi tutularak 30 dakika bekletildi ve jel böylece boyanmış oldu. Jel boyalı hale geldikten sonra yıkama çözeltisine konuldu. Daha sonra jel gümüş nitrat çözeltisine konuldu. 25 dk çözeltide bekletilen jel çıkarılıp 1.yıkama çözeltisi ve 2.yıkama çözeltilerine konuldu. Protein bantları belirgin hale gelinceye kadar çalkalayıcı da bekletildi ve yıkanmış olan jelin fotoğraf çekimi yapıldı. Ayırma jeli ve Yığma jellerinin hazırlanışı aşağıda belirtilmiştir.

Ayırma Jeli:

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

%30'luk akrilamid ve % 0,8 bisakrilamid (4,4 mL)

% 0,1'lik SDS (0,2 mL)

% 5'lik TEMED (0,13 mL)

Saf su (3,13 mL)

Bu karışımın üzerine en son olarak %5'lik $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$ (0,27 mL) eklendi

Yığma jeli

1 M Tris-HCl pH:6,8 (0,41 mL)

%30'luk Akrilamid- %0,8 bisakrilamid, (0,44 mL)

%0,1'lik SDS (0,03 mL)

%5'lik TEMED (0,03 mL)

ve saf su (2,45 mL)karıştırıldı.

Bu karışımın üzerine en son olarak %5'lik $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$ (0,07 mL) eklendi.

3.2.10. Selülaz Enzimi Üzerine Bazı Bileşiklerin İnhibisyon Etkilerinin İncelenmesi

Farklı kimyasal bileşiklerin Ağrı Diyadin termal kaplıcalarından elde edilen selülaz enzimi üzerine etkilerini incelemek ve enzim aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonu belirlemek için ön denemeler yapılmış olup daha sonra aktiviteyi yarıya düşüren konsantrasyon belirlenmiştir. Aktivite ölçümleri yapılarak % aktivite-[I] grafikleri çizilmiş olup grafik eğrisinin denkleminde IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Kimyasal bileşikler olarak EDTA, MgSO_4 , KCl, PIO_3 ve SDS bileşikleri kullanılmıştır (Türkan 2015).

3.2.11. Selüloz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Bileşiklerin K_i Sabitlerinin Bulunması

EDTA, $MgSO_4$, KCl, $NaIO_3$ ve SDS bileşiklerinin K_i değerlerini belirlemek amacıyla kısmen saflaştırılan selüloz enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonunda uygun beş farklı substrat konsantrasyonu ile enzim aktivitesi ölçümleri yapılmıştır. Uygun beş farklı substrat konsantrasyonu ön çalışmalar ile belirlenmiştir. Her bir farklı inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş olup inhibisyon tipi ve grafik denklemi aracılığıyla K_i değerleri belirlenmiştir (Şentürk 2009). İnhibisyon tipine göre K_i değerlerinin hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

Yarışmasız ve Yarı Yarışmalı için

$$V_{max}I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Yarışmalı için:

$$K_M I = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$$

3.2.12. *Bacillus licheniformis* OE-1'in Gelişimi için Optimal pH'nın Belirlenmesi

Bakterinin optimum ürediği pH değerini bulmak için LB broth steril besiyerine daha önceden LB broth besiyerinde tüplerde geliştirilmiş *Bacillus licheniformis* bakterisinden %2 olacak şekilde farklı pH değerlerinde 55°C'de ekim yapılmıştır. Yapılan literatür taramasında maksimum üremenin bu sıcaklık değerinde olduğu belirlendiğinden bu sıcaklık değeri seçilmiştir. Literatür verileri de dikkate alınarak pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 ve 10,0 değerlerinde ekim yapılmış olup 55°C'de 24 saat boyunca 110 rpm'de bakteri geliştirilmiştir. Daha sonra bakteri yoğunluğu 600 nm'de

köre karşı ölçülmüştür. NaOH ve HCl ile pH ayarlaması yapılmıştır (Tuşar 2021). Kör olarak ekim yapılmamış steril besiyeri kullanılmıştır.

3.2.13. *Bacillus licheniformis* OE-1'in Optimum EPS Ürettiği pH Değerinin Belirlenmesi

Bakterinin en çok EPS ürettiği pH'nın hangisi olduğunu tespit edebilmek için farklı pH derecelerinde gelişen bakterilerin ürettikleri EPS miktarları tespit edilmiştir. EPS'yi besiyeri ortamından izole edebilmek için 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 ve 10,0 pH değerlerinde 40°C'de 110 rpm'de 24 saat boyunca bakteri geliştirilmiştir. Daha sonra bu sıvı besiyerine besiyeri hacminin %10'u kadar trikloroasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. TCA ilave edilmesinin amacı proteinleri ve bakteri hücrelerini çöktürmektir. %95'lik TCA ilavesinden sonra 20 dakika 50 rpm de tüpler çalkalanmıştır. Daha sonra 9000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüj işlemi yapılmış olup santrifügasyon sonucunda oluşan pellet (çökelti) atılmış olup işleme süpernatant (üst faz) ile devam edilmiştir. Tüplerdeki süpernatant miktarının iki katı oranında %96'lık etanol eklenmiş ve buzdolabı sıcaklığında (4°C'de) 36 saat bekletilmiştir. Süre sonunda oluşan çökeltiyi almak için 9000 rpm'de 30 dakika boyunca 4°C'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifügasyon sonunda pellet alınmış olup süpernatant (üst sıvı faz) atılmıştır. Sıvı fazın tamamı dikkatlice alındıktan sonra suyu buharlaştırılan pellet miktarları ölçülmüş ve mg cinsinden bakterinin ürettiği EPS miktarı belirlenmiştir (Tuşar 2021).

3.2.14. *Bacillus licheniformis* OE-1'in Optimum EPS Ürettiği Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.

Bakterinin en iyi EPS ürettiği sıcaklık değerinin tespit edilmesi amacıyla 20,30, 40, 50 ve 55°C'lerde optimum EPS'nin üretildiği pH değerinde bakteriler 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Üretilen EPS miktarının tespit edilmesi amacıyla bölüm 3.2.13'te anlatıldığı gibi EPS elde edilmiştir.

3.2.15. *Bacillus licheniformis* OE-1'den elde edilen EPS'nin antibakteriyel etkisinin belirlenmesi

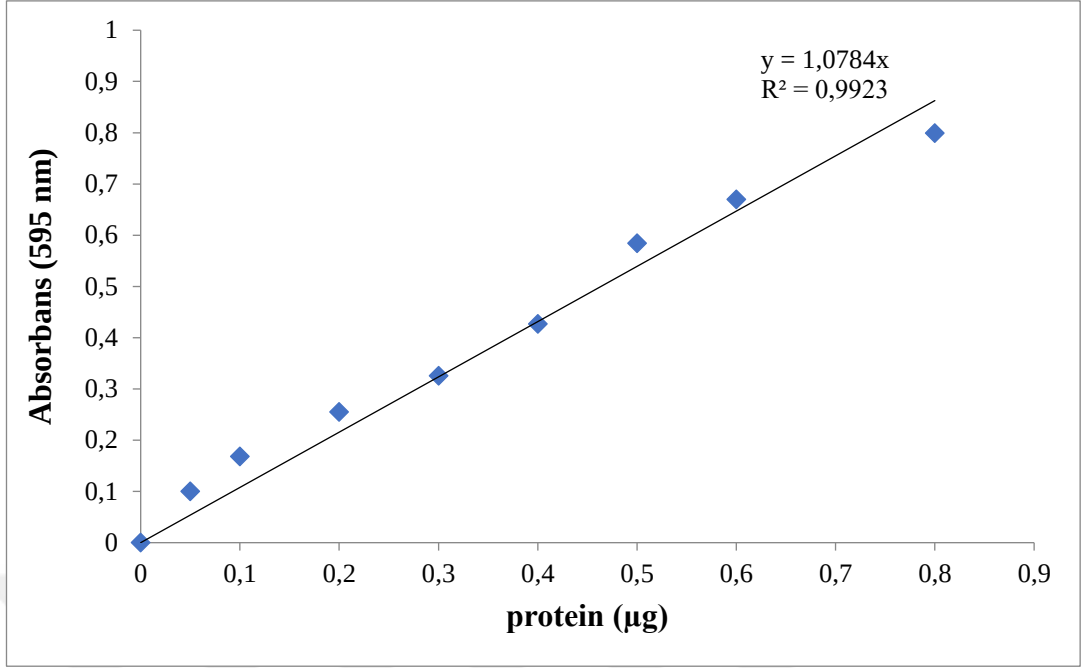
EPS'lerin çeşitli etkileri mevcuttur, bu etkilerden biri de EPS'lerin antimikrobiyal özellikte olmalarıdır. *Bacillus licheniformis* bakterisinden elde edilen

EPS'nin antimikrobiyal etkisinin olup olmadığının tespiti için patojen *Bacillus Subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, ve *Staphylococcus aureus* bakterileri Nutrient Agar besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir. Antimikrobiyal özelliğinin olup olmadığını tespit edilmesi için disk difüzyon yöntemi kullanılmış olup pozitif kontrol olarak gentamisin ve negatif kontrol olarak ise steril dH₂O kullanılmıştır. Daha sonra meydana gelen zon çapları ölçülerek etkinlik düzeyi tespit edilmiştir. 5 mm boyutunda steril diskler gentamisin (6,3 mg/mL) ve dH₂O'da çözündürülen EPS çözeltisine batırılmış olup disklerin maddeleri iyice emmesi sağlandıktan sonra bakterilerin ekilmiş olduğu petri kutusuna dikkatlice yerleştirilmiştir. Daha sonra yukarıda belirtilen koşullarda bakteriler 24 saat boyunca inkübe edilmişlerdir (Tuşar 2021). İnkübasyondan sonra meydana gelen zon çapları ölçülmüş ve sonuç mm cinsinden ifade edilmiştir.

4. ARASTIRMA BULGULARI

4.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Kullanılan Standart Grafik

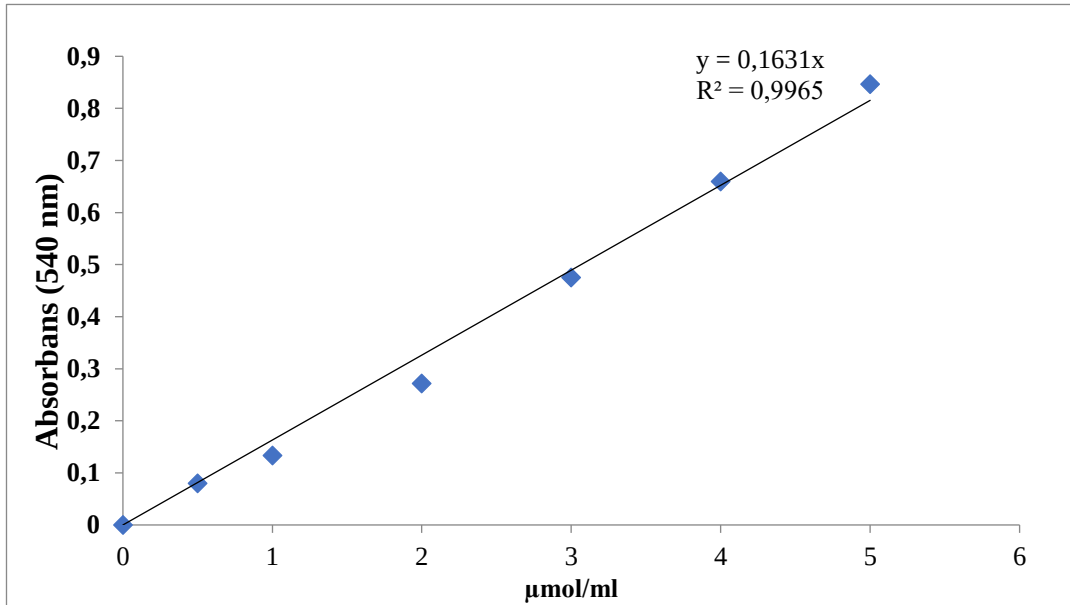
Bradford Yöntemi Kullanılarak daha önce elde edilen enzim çözeltilerinden kantitatif protein tayini yapıldı. Bunun için öncelikle standart grafik oluşturuldu (Şekil 4.1). Enzim çözeltilerinden elde edilen protein tayinleri Bradford metodu kullanıldıktan sonra bu standart grafik aracılığıyla protein miktarları hesaplandı. Bradford yönteminde boya olarak Coomassie Brilliant Blue G-250 kullanılır. Bu boya negatif yük ile yüklüdür ve bu sayede proteinlerin üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın hem mavi hem de kırmızı formları mevcut olup kırmızı formu maksimum 465 nm’de absorbans verirken mavi formu 595 nm’de absorbans verir. Reaksiyon iki dakika gibi çok kısa bir sürede olur ve yüksek oranda tekrarlanma özelliğine sahiptir. Tayin işlemleri şöyle gerçekleştirilir: 1 mL’inde 1 mg protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µL konulur ve saf su ile bütün tüplerin son hacmi 0,1 mL’ye tamamlanarak 4,9 mL Coomassie Brilliant Blue G-250 çözeltisi ilave edilip vorteks yardımıyla iyice karışması sağlanır. 10 dk’lık bir inkübasyondan sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans sonuçları okunur. Şahit olarak 0,1 mL enzim çözeltisi ve 4,9 mL G-250 çözeltisinden oluşan karışım kullanıldı. Elde edilen sonuçlardan absorbans değerine karşılık gelen µg protein değerleri standart grafik haline getirildi. Bu işlem 3 defa tekrar edilip sonuçların aritmetik ortalaması alındı (Bradford 1976).



Şekil 4.1. Proteinlerin kantitatif tayini için kullanılan standart grafik

4.2. Glukoz Standart Grafiği

Glukoz standart grafiği hazırlanırken 3.2.5.1’de anlatılan yöntemle grafik oluşturulmuş olup sonuçlar bu grafik yardımıyla bulunmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Aktivite ölçümlerinde kullanılan standart glukoz grafiği

4.3. İzolasyon Sonuçları

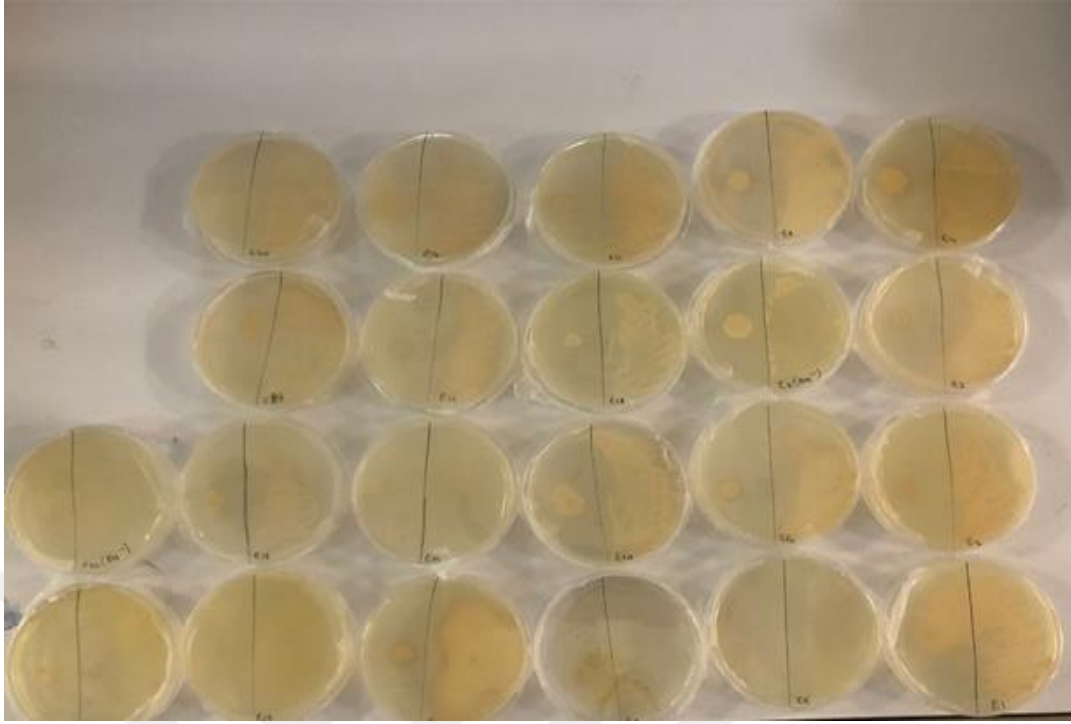
Ağrı-Diyadin termal kaplıcalarının 8 farklı yerinden alınan toprak ve su numunelerinden görünüş olarak farklı 22 suş bulunmuş olup bunlar 3.2.1’de belirtildiği şekilde izole edilip saflaştırılmışlardır.



Şekil 4.3. Toprak ve su örneklerinin alındığı yerler-A



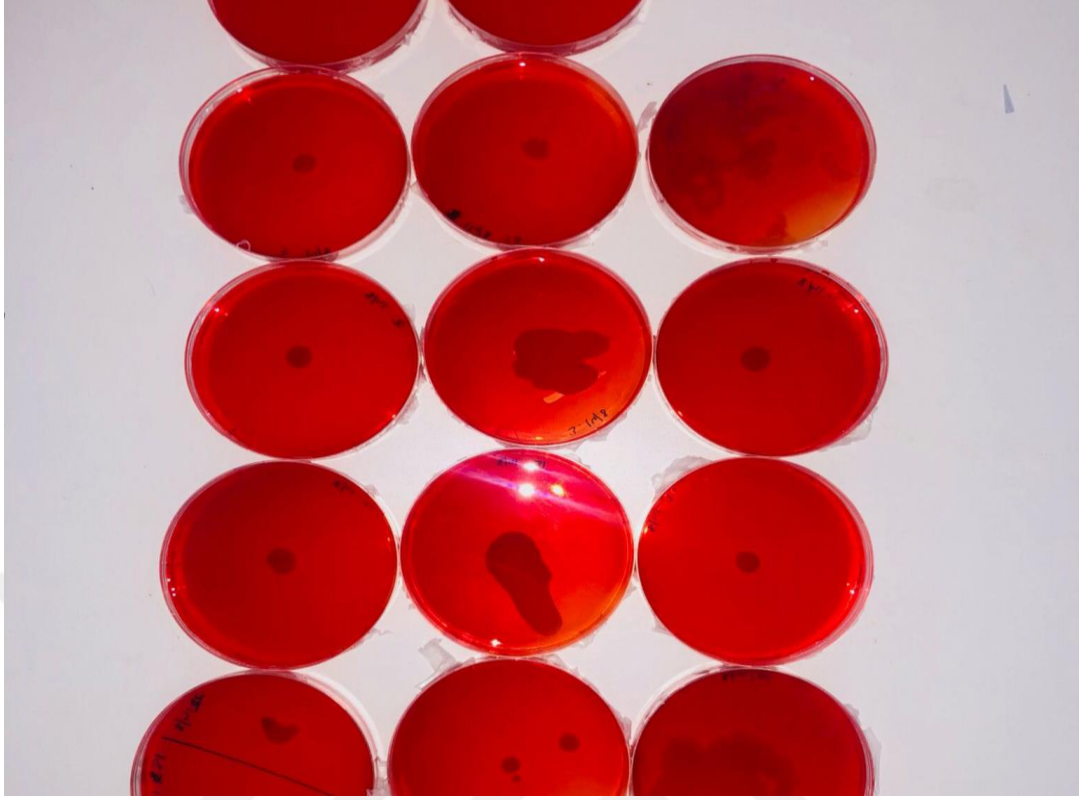
Şekil 4.4. Toprak ve su örneklerinin alındığı yerler -B



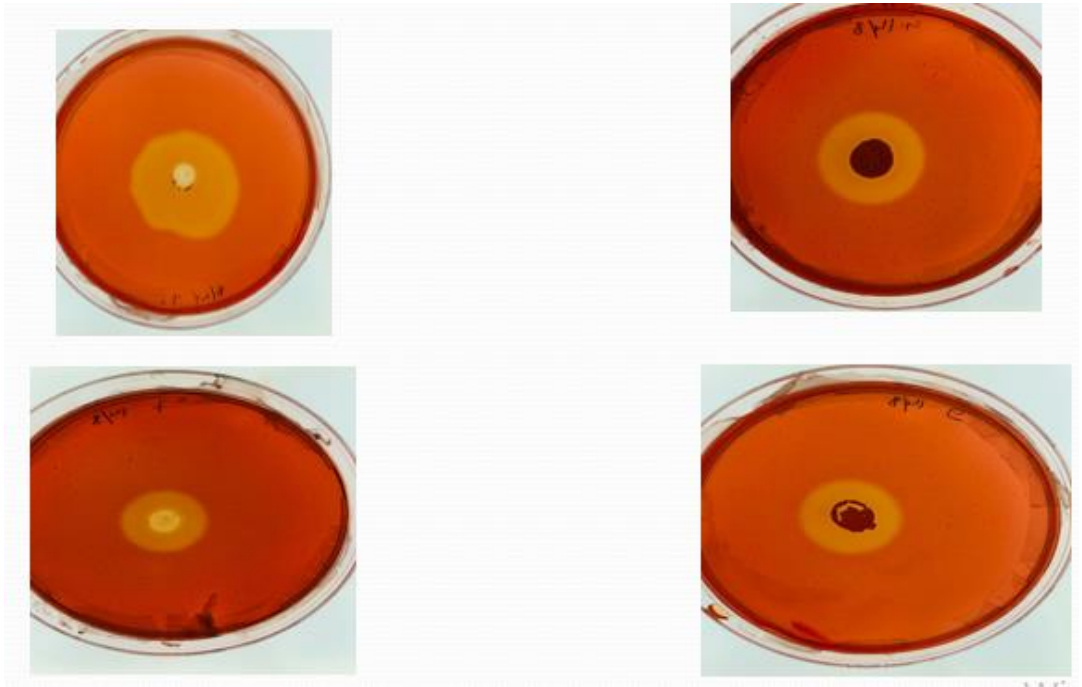
Şekil 4.5. Bakteri İzolasyonu ve saflaştırma sonuçları

4.4. İzolatların Enzim Üretme Yeteneği Sonuçları

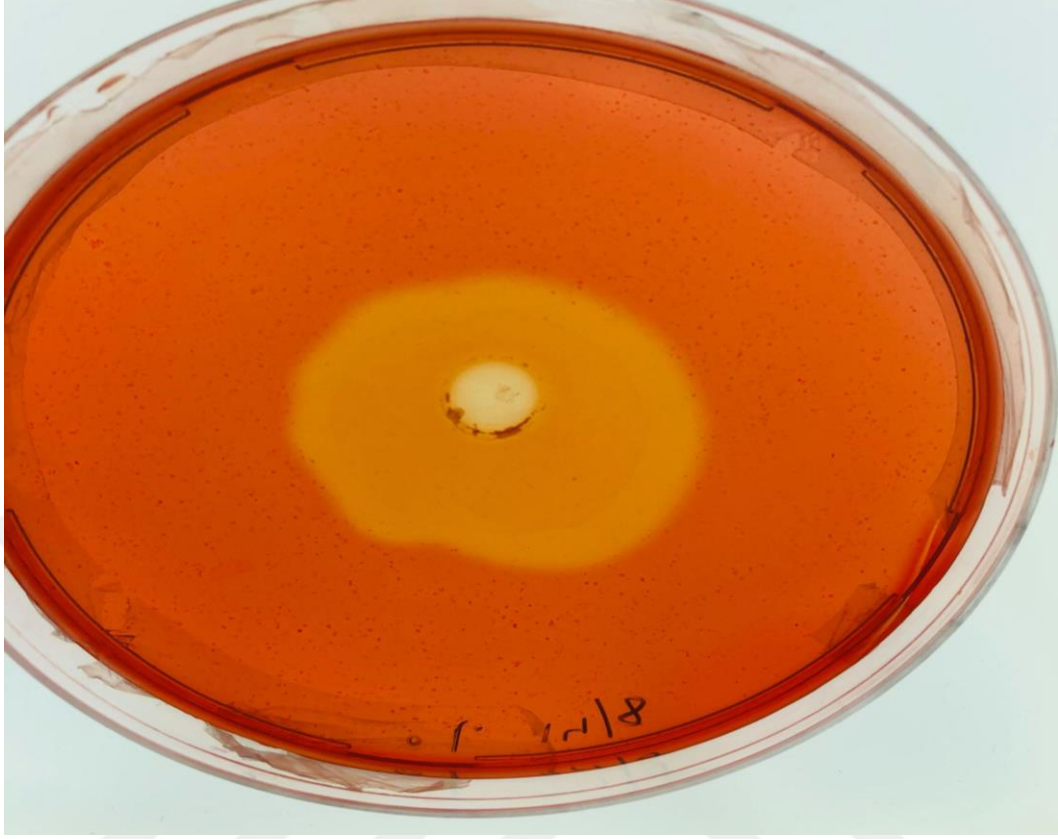
Katı besi ortamında enzim aktivitesinin olup olmadığını ve enzimin net aktivite zonunu belirlemek için 3.2.2’de belirtildiği şekilde işlemler gerçekleştirilmiştir. Petri kaplarının üzerine %0.2’lik Kongo Kırmızısı boyası dökülmüş olup 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra petri örnekleri 1 M NaCl ile yıkanmış olup petrilerde oluşan sarı zon varlığına göre suşlar selüloz pozitif veya selüloz negatif olarak değerlendirilmiştir (Hürtaş Tatlı 2013). Plaklar negatoskop üzerine alınarak incelenmiş ve kırmızıya boyalı zeminde etrafından sarımtırak zon bulunan bakteriler CMCaz pozitif bakteriler olarak kabul edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar sonucu 22 farklı örnekten 14’ünün selüloz pozitif olduğu belirlenmiş olup en yüksek net aktivite zonu OE-1 olarak isimlendirilen petri kabında bulunmuştur (Şekil 4.6-7-8) (Çizelge 4.1).



Şekil 4.6. İzolatların Kongo Kırmızı Testi Sonuçları



Şekil 4.7. Yüksek enzim üretme yeteneğine sahip izolatların Kongo Kırmızısı Testi sonuçları



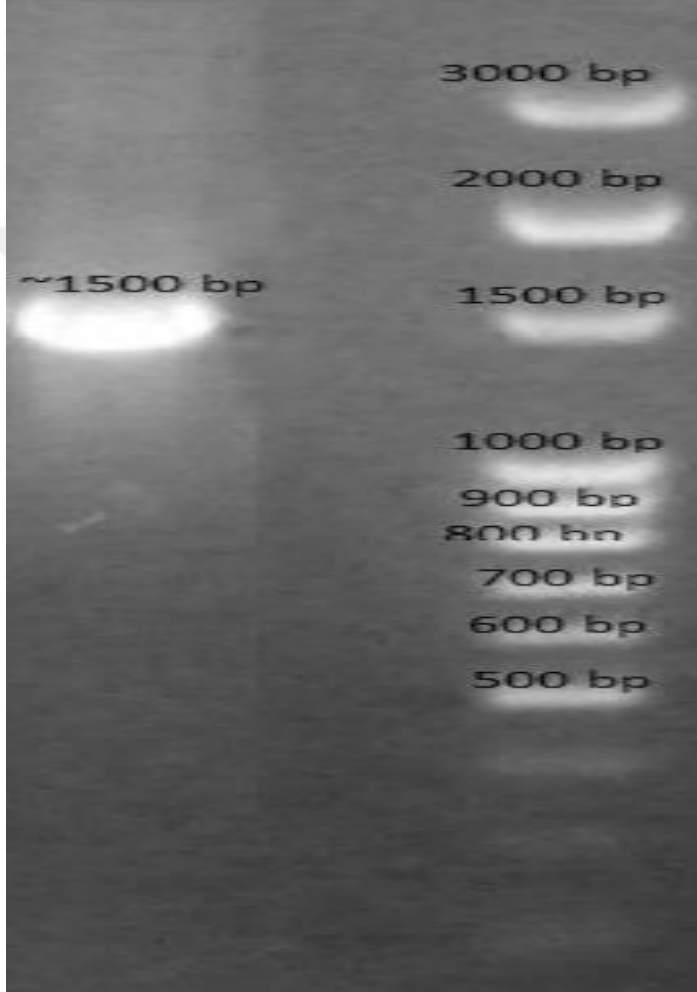
Şekil 4.8. OE-1'in Kongo Kırmızısı Testi Sonucu

Çizelge 4.1. En yüksek zon aktivitesine sahip bakterilerin net zon aktivitesi sonuçları

Petri No	Bakteri Çapı (mm)	Sarı Zon Çapı (mm)	Net Aktivite Zonu (mm)
OE-1	7	36	29
OE-4	10	25	15
OE-6	7	20	13
OE-7	7	20	13
OE-8	10	26	16
OE-8B	10	25	15
OE-9	10	26	16
OE-22	5	20	15

4.5. 16s rDNA PCR Sonucu

Bakterinin tanımlanabilmesi için 3.2.3'te belirtildiği şekilde işlemler yapılmış olup bakterinin sekans analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu, 1500 bp düzeyinde ve % 99,19 benzerlik oranıyla bakterinin *Bacillus licheniformis* olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9). 1 – 27F-1492R : OK067288.1



Şekil 4.9. Genomik DNA izolasyonu jel sonuç görüntüsü

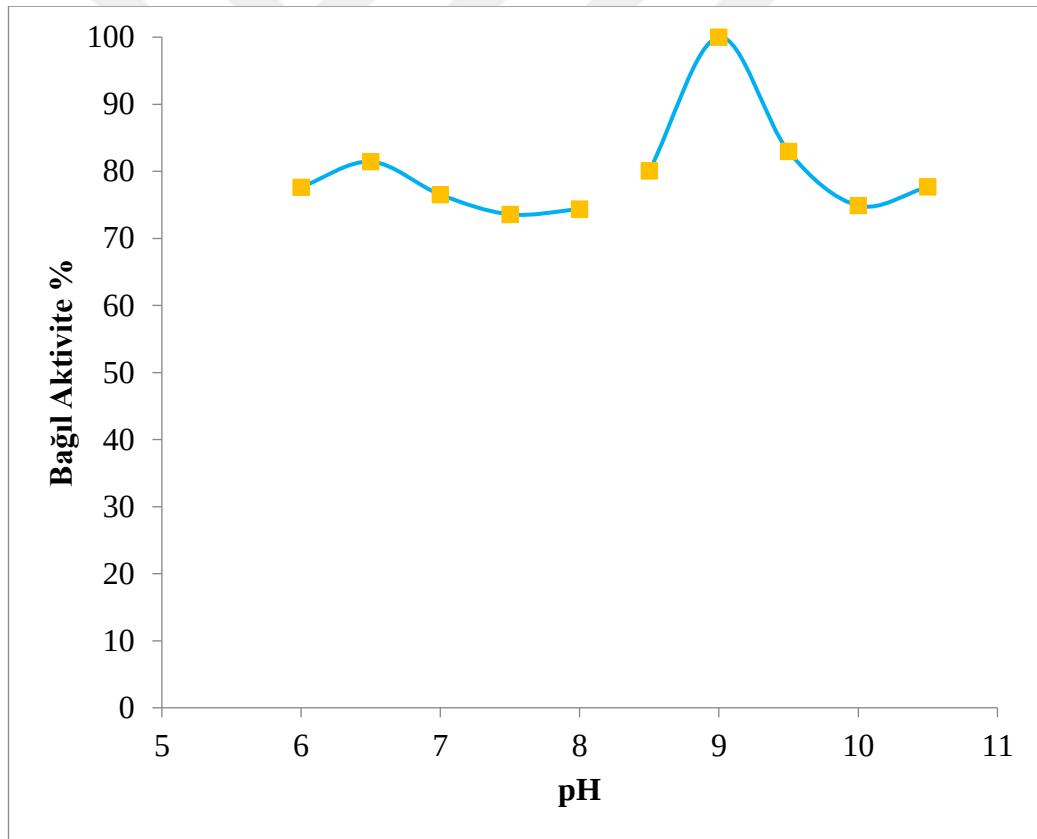
4.6. Kısmi Saflaştırma Sonucu

OE-1'in sıvı besi ortamında geliştirilmesinden sonra enzimin kısmi saflaştırılması için bölüm 3.2.4'te belirtildiği şekilde işlemler gerçekleştirilmiştir. Santrifüjasyon işlemi sonucu elde edilen sıvı fazda enzimin olduğu yapılan spektrofotometrik ölçümler ile tespit edilmiştir. Daha sonra enzimin kısmi olarak saflaştırılabilmesi için amonyum sülfat çöktürmesi uygulanmış fakat hiçbir basamakta

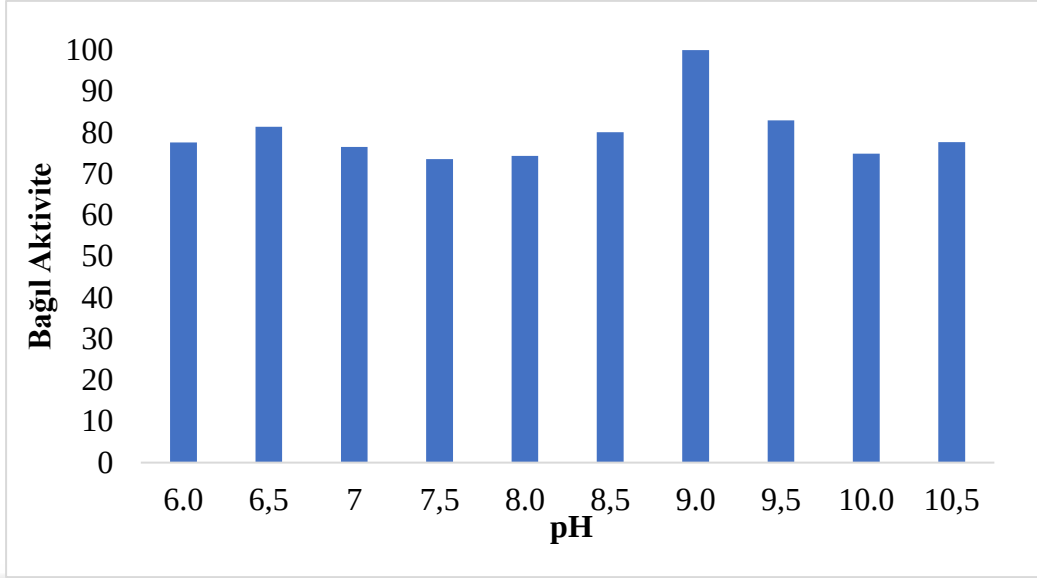
enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Saflaştırmaya % 10'luk amonyum sülfat ile başlanmış ve %80'e kadar uygulanmıştır. Aynı işlemler üç defa yapılmasına rağmen enzim aktivitesi tespit edilemeyince santrifüj işlemi sonucu elde edilen sıvı fazın içinde bulunan enzim ile çalışma devam etmiştir.

4.7. Selüloz Enziminin Optimum pH Sonuçları

Optimum pH'nın belirlenmesi amacıyla 3.2.4'te belirtildiği şekilde süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimin optimum pH değeri 3.2.5.2'de yazıldığı şekilde belirlenmiştir. Enzimin optimum pH değeri bağıl olarak ölçülüp en yüksek aktiviteyi gösterdiği değer 100 olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde enzimin bazik karakterli olduğu anlaşılmış olup maksimum aktivitesini pH 9,0'da göstermiştir (Şekil 4.10- 4.11, Çizelge 4.2).



Şekil 4.10. Selüloz Enziminin Optimum pH sonuçları



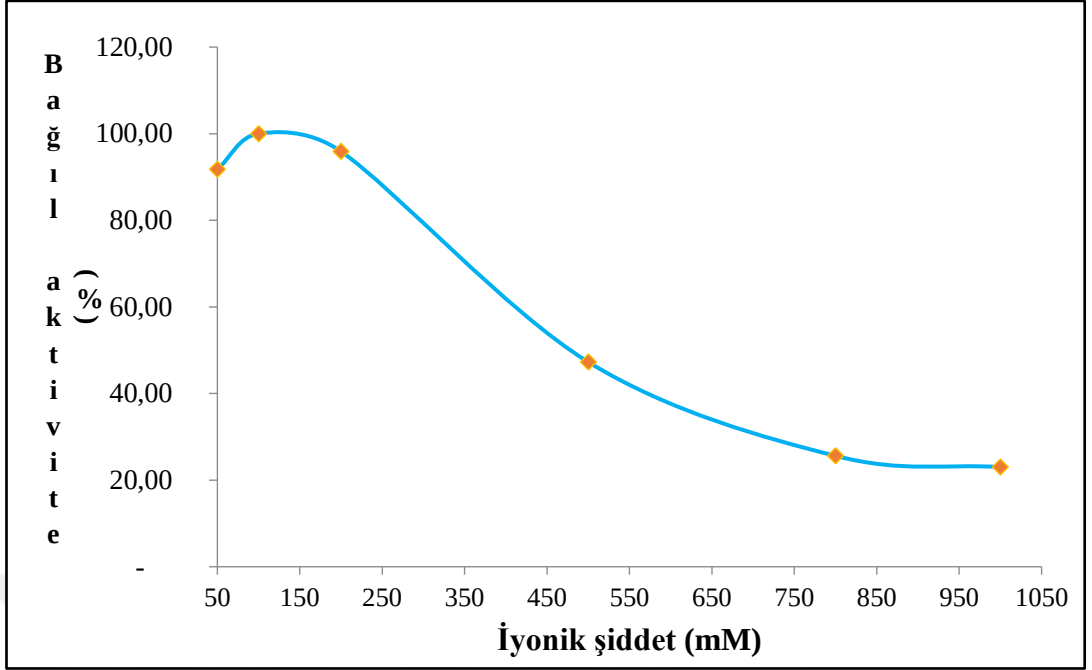
Şekil 4.11. Selülaz Enziminin Optimum pH grafiği

Çizelge 4.2. Selülaz Enziminin pH sonuçları çizelgesi

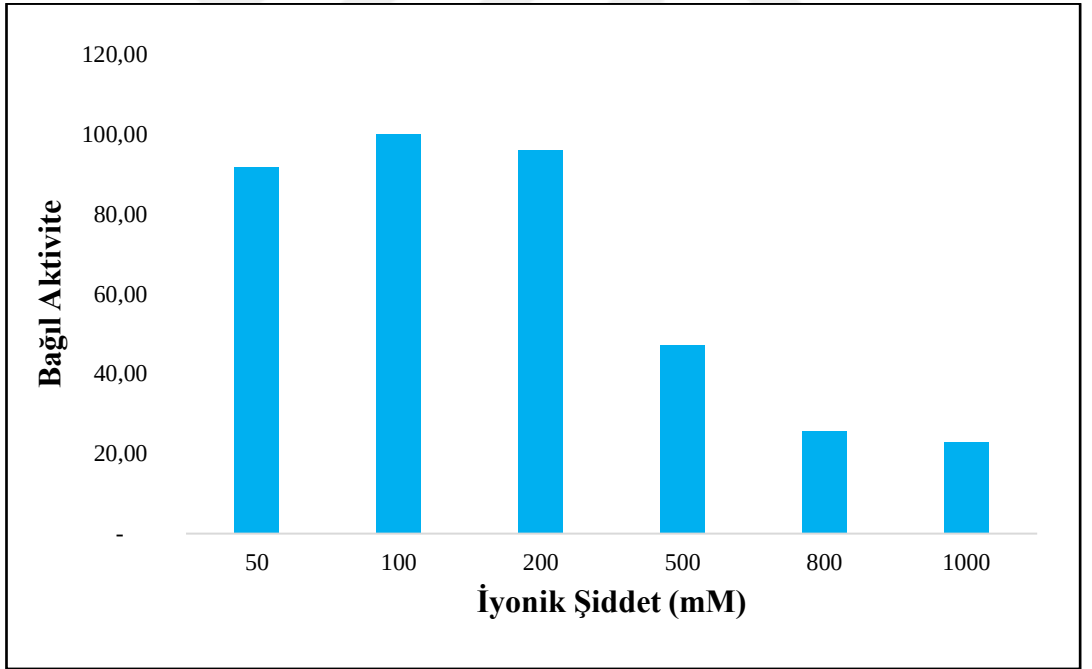
pH	Bağıl Enzim Aktivitesi (%)
6,0	77,63
6,5	81,43
7,0	76,51
7,5	73,58
8,0	74,35
8,5	80,06
9,0	100
9,5	82,95
10,0	74,89
10,5	77,66

4.8. Selülaz Enziminin Optimum İyonik Şiddeti Sonuçları

Optimum iyonik şiddetin belirlenmesi amacıyla 3.2.4'te belirtildiği şekilde süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimin optimum iyonik şiddeti 3.2.5.3'de belirtildiği şekilde belirlenmiştir. Enzimin optimum iyonik şiddet değeri bağıl olarak ölçülüp en yüksek aktiviteyi gösterdiği değer 100 olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde optimum değer 100 mM olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.12- 4.13 ve Çizelge 4.3).



Şekil 4.12. Selülaz Enziminin Optimum İyonik Şiddet sonuçları



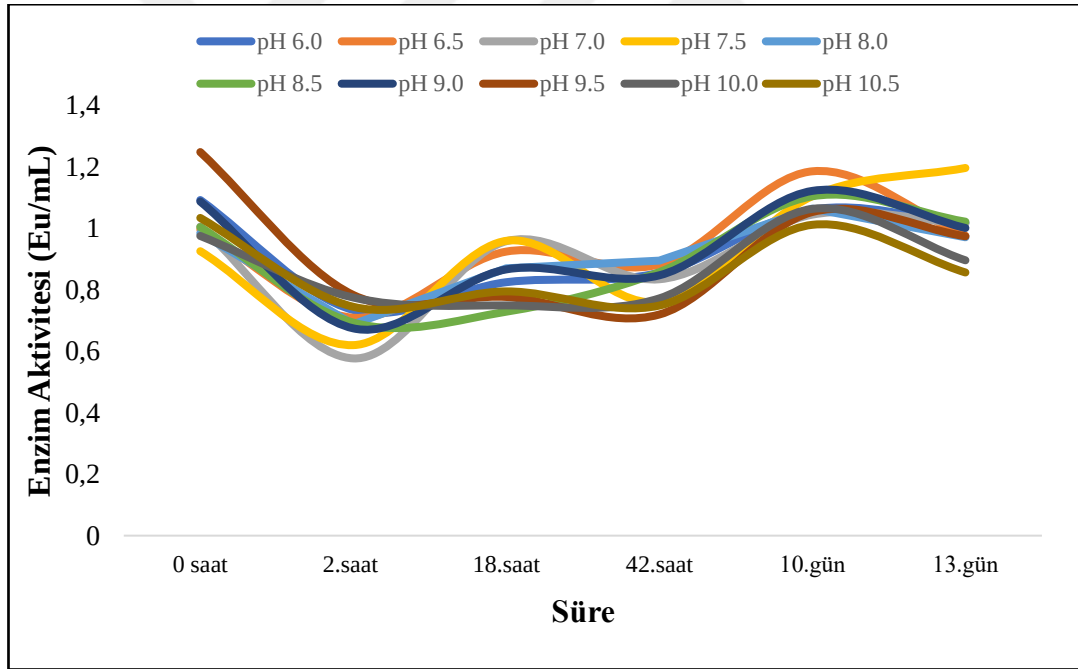
Şekil 4.13. Selülaz Enziminin Optimum İyonik Şiddet grafiği

Çizelge 4.3. Selülaz Enziminin iyonik şiddet sonuçları çizelgesi

İyonik Şiddet (mM)	Bağıl Enzim Aktivitesi (%)
50	91,74
100	100
200	95,90
500	42,78
800	25,60
1000	23,00

4.9. Selülaz Enziminin Stabil pH Sonuçları

Stabil pH'nın belirlenmesi amacıyla 3.2.4'te belirtildiği şekilde süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimin stabil pH değeri 3.2.5.4'te belirtildiği şekilde belirlenmiştir. Yapılan çalışma neticesinde enzimin stabil pH değerinin 7.5 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14 ve Çizelge 4.4).



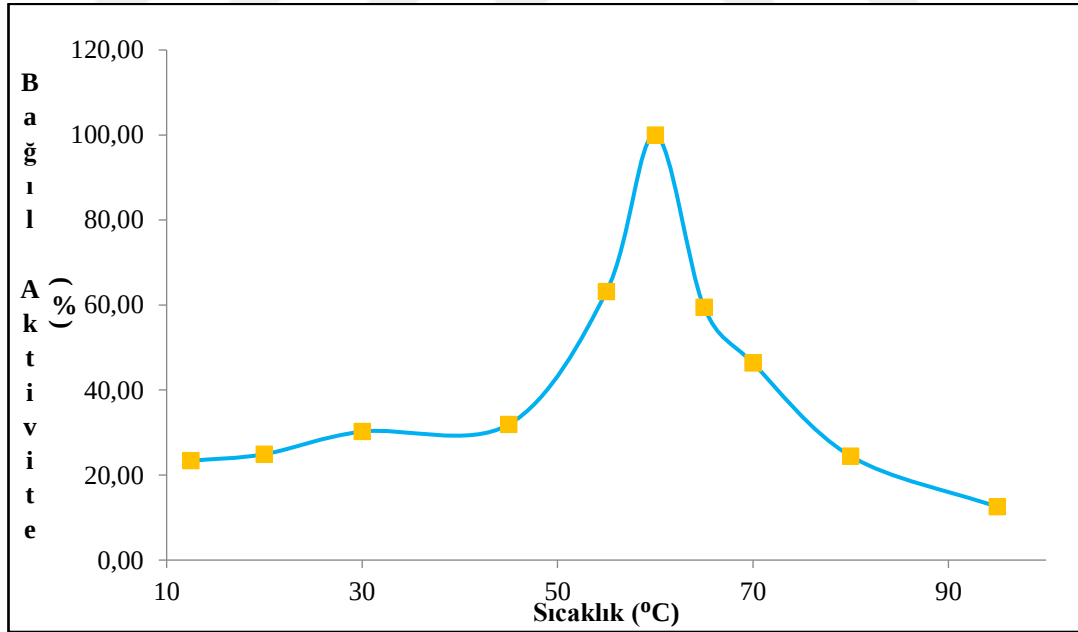
Şekil 4.14. Selülaz Enziminin Stabil pH Sonuçları

Çizelge 4.4. Selüloz Enziminin Stabil pH sonuçları Çizelgesi

pH	6.0	6,50	7.0	7,50	8.0	8,50	9.0	9,50	10.0	10,50
Zaman	Aktivite (EU/mL)									
0.saat	1,09	0,99	1,00	0,92	0,98	1,00	1,08	1,24	0,97	1,03
2.saat	0,73	0,71	0,57	0,61	0,68	0,69	0,67	0,78	0,77	0,74
18.saat	0,82	0,92	0,95	0,95	0,86	0,72	0,87	0,77	0,74	0,79
42.saat	0,85	0,88	0,83	0,76	0,89	0,85	0,84	0,71	0,77	0,74
10.gün	1,06	1,18	1,04	1,10	1,06	1,10	1,00	1,05	1,06	1,01
13.gün	1,01	0,97	1,01	1,20	0,97	1,02	1,12	0,97	0,89	0,85

4.10. Selüloz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları

Optimum sıcaklığın belirlenmesi amacıyla 3.2.4'te belirtildiği şekilde süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimin optimum sıcaklık değeri 3.2.5.6'da belirtildiği şekilde belirlenmiştir. Enzim aktivitesi bağıl olarak ölçülmüş olup en yüksek aktiviteyi gösteren sıcaklık değeri 100 olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde enzimin optimum sıcaklık değerinin 60°C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15, Çizelge 4.5).



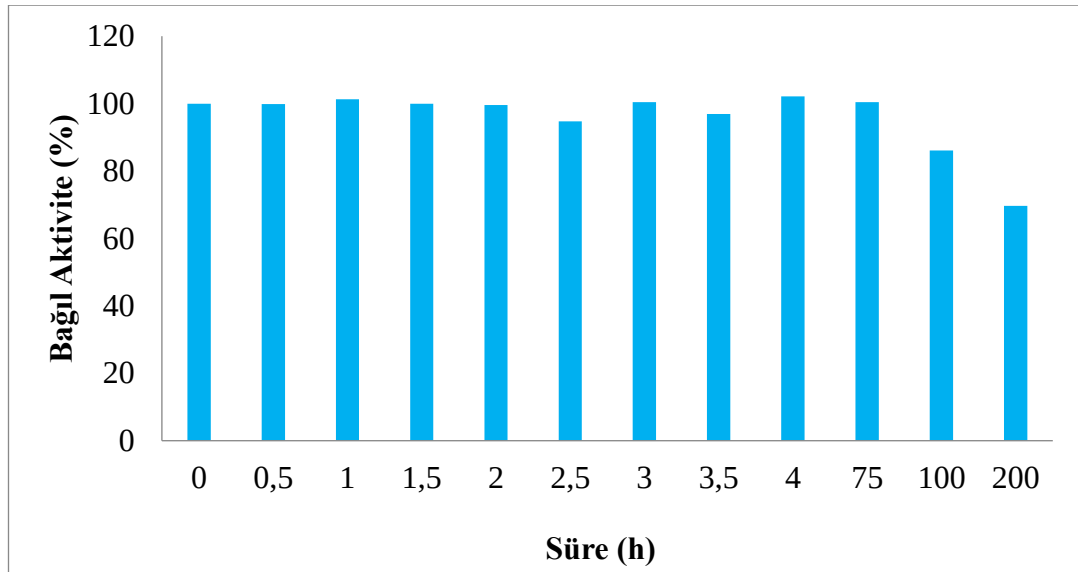
Şekil 4.15. Selüloz Enziminin Optimum Sıcaklık Sonuçları

Çizelge 4.5. Selülag Enziminin Optimum Sıcaklık çizelgesi

Sıcaklık (°C)	Aktivite (%)
12,50	23,85
20,00	24,91
30,00	30,22
45,00	31,89
55,00	63,16
60,00	100,00
65,00	59,44
70,00	46,34
80,00	24,46
95,00	12,51

4.11. Selülag Enziminin 4°C’de Depolama Stabilesi Sonuçları

Depolama Stabilesinin belirlenmesi amacıyla 3.2.4’te belirtildiği şekilde süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimin optimum sıcaklık değeri 3.2.5.7’de belirtildiği şekilde belirlenmiştir. Enzim aktivitesi bağıl olarak ölçülmüş olup ölçümün yapıldığı ilk andaki aktivite değeri 100 kabul edilmiştir. Yapılan çalışma neticesinde 200 saat sonunda bile enzimin yaklaşık olarak aktivitesinin %70’ini koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16, Çizelge 4.6).



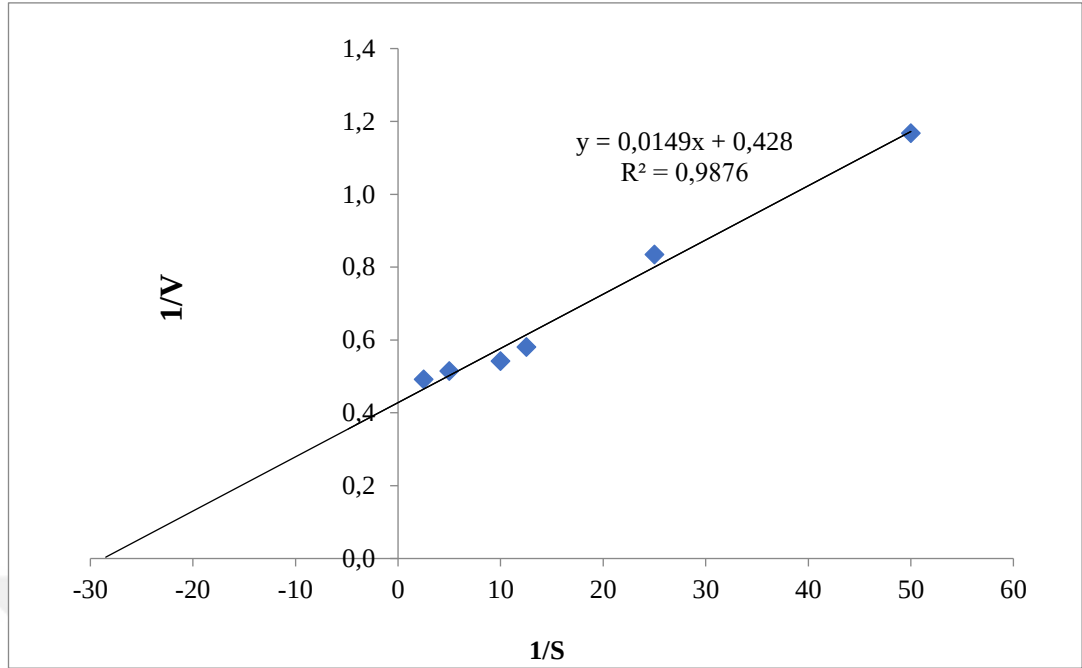
Şekil 4.16. Selülag enziminin 4 °C’de depolama stabilesi grafiği

Çizelge 4.6. Selülaz enziminin 4 °C’de depolama stabilitesi çizelgesi

Süre (saat)	Aktivite (%)
0	100
0,5	99,8
1	101,3
1,5	100
2	99,6
2,5	94,7
3	100,4
3,5	96,9
4	102,1
75	100,4
100	86,1
200	69,7

4.12. Selülaz Enziminin CMC substratı ile K_m - V_{max} , K_{cat} ve V_0 Değerleri sonuçları

K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla 3.2.4’te belirtildiği şekilde süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Enzimin optimum sıcaklık değeri olan 60°C’de ölçümler yapılmış olup enzimin V_{max} değeri 2,33 E.U/mL olarak belirlenirken K_m değeri ise 0,0348 mM olduğu belirlenmiştir. K_m ve V_{max} değerleri kullanılarak enzimin turnover sayısını gösteren k_{cat} değeri ve buradan enzimin özgülük sabiti değeri V_0 tespit edildi. (Şekil 4.17, Çizelge 4.7).



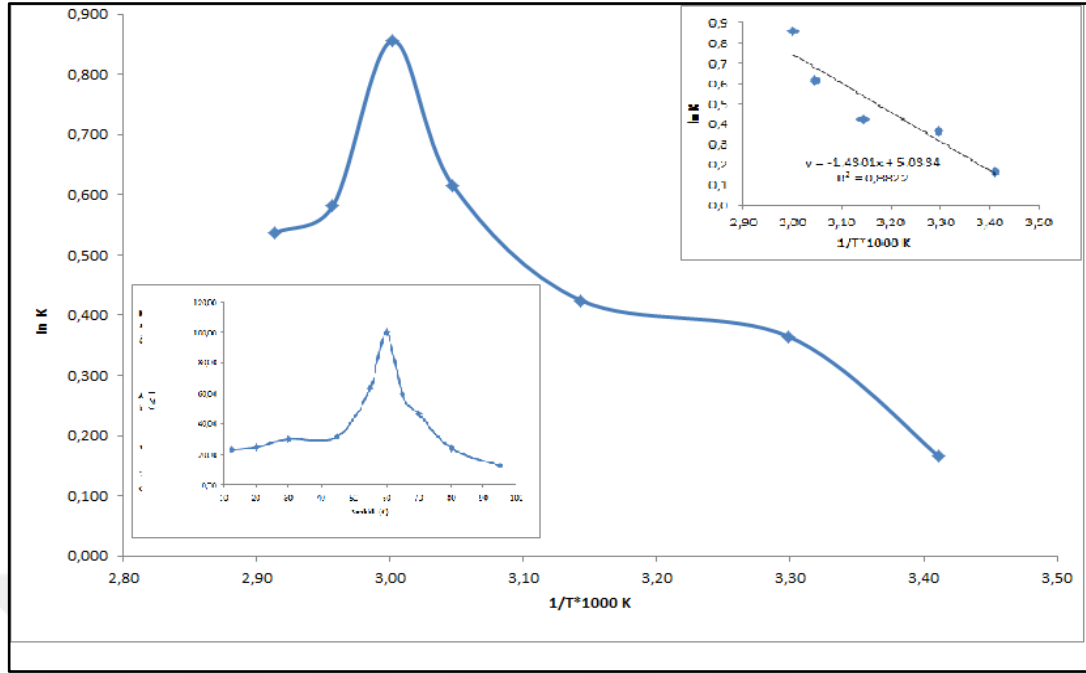
Şekil 4.17. Selülaz Enziminin CMC substratı ile K_m - V_{max} değerlerinin belirlenmesi amacıyla oluşturulan $1/V$ - $1/S$ grafiği

Çizelge 4.7. Selülaz Enziminin CMC substratı ile K_m , V_{max} , k_{cat} ve V_0 değerlerinin bulunmasına yönelik çalışma sonuçları

Enzim	Substrat	K_m (mM)	V_{max} (E.U/mL)	K_{cat} (s ⁻¹)	V_0 (M ⁻¹ .S ⁻¹)
Selülaz	CMC	0,0348	2,336	6,67	191,66

4.13. Selülaz Enziminin K_m - V_{max} , K_{cat} ve V_0 Değerleri sonucu

Bölüm 3.2.5.9’da belirtildiği gibi enzime ait Aktivasyon Enerjisi (E_a), Aktivasyon Entalpisi (ΔH) ve Q_{10} değerleri bölüm 3.2.5.9’da belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. (Şekil 4.18, Çizelge 4.8)



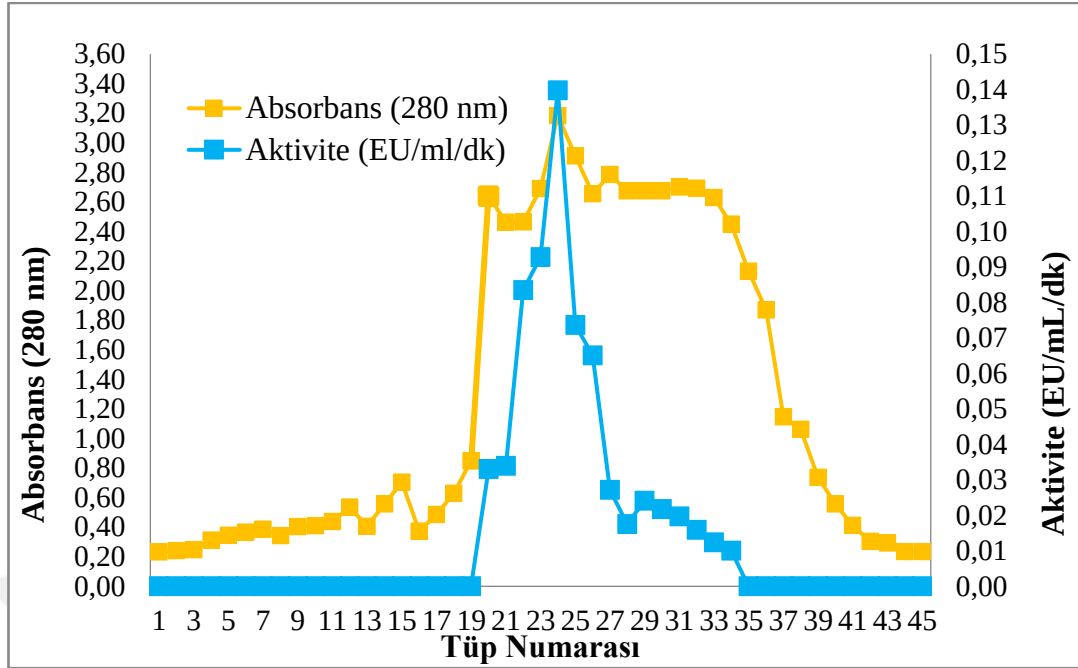
Şekil 4.18. Selüloz enzimi için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerine ait grafik

Çizelge 4.8. Selüloz enzimi için optimum sıcaklık, E_a , ΔH ve Q_{10} değerlerine ait tablo

Enzim	Optimum Sıcaklık (°C)	Aktivasyon Enerjisi (E_a) (kcal/mol)	Aktivasyon Entalpisi (ΔH) (kcal/mol)	Q_{10}
Selüloz	60	6,54	5,88	1,22

4.14. Selüloz Enziminin Sephadex G-100 ile Saflaştırma Sonucu

Süpernatantta bulunan enzimi kısmi olarak saflaştırmak için 3.2.6.1’de belirtildiği şekilde jel hazırlanmış ve 3.2.6.2’de belirtildiği gibi işlemler yapılmıştır. Kalitatif protein tayini 3.2.8’de belirtildiği gibi ve Bradford metodu ile protein tayini 3.2.9’da belirtildiği şekilde yapılmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi sonucu ve saflaştırılan Selüloz enzimi için aktivite, protein, toplam aktivite, toplam protein, spesifik aktivite, yüzde verim ve saflaştırma katsayısı gibi önemli bazı değerler hesaplanmıştır. (Şekil 4.19, Çizelge 4.9)



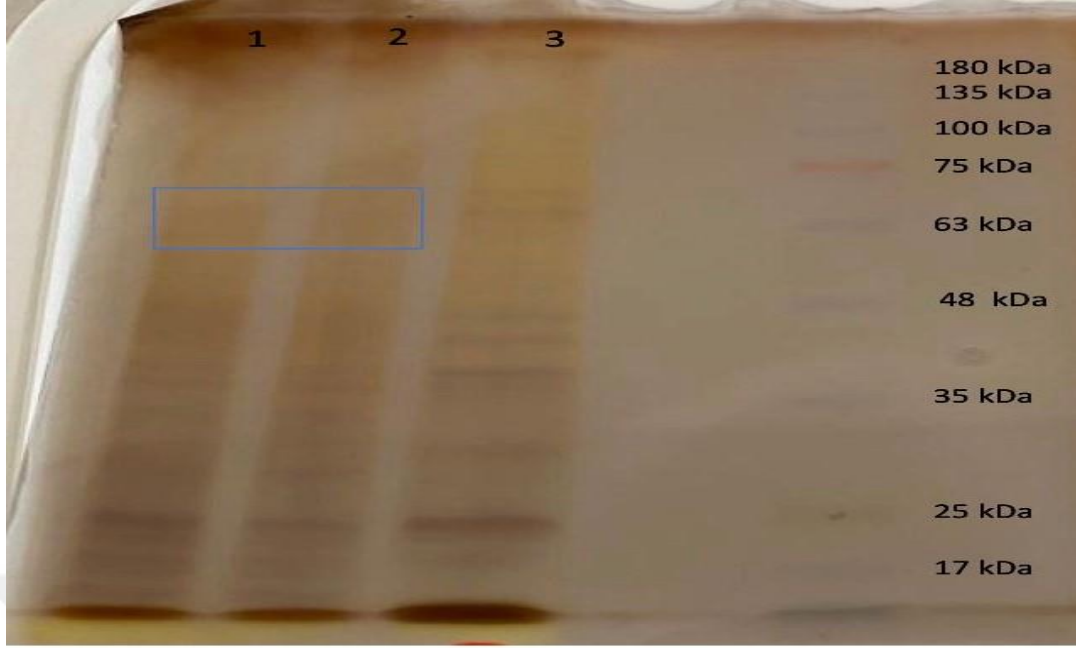
Şekil 4.19. Selülaz enzimi için sephadex G-100 jel filtrasyon kromatografisiyle elde edilen saflaştırma grafiği

Çizelge 4.9. Selülaz Enziminin Homojenat ve Jel Filtrasyon Sonucu Saflaştırma Tablosu

Numune Türü	Toplam Hacim (mL)	Aktivite (EÜ/mL)	Protein (µg/mL)	Toplam Aktivite (EÜ)	Toplam Protein (µg)	Spesifik Aktivite (EÜ/µg prot.)	% Verim	Saflaştırma Katsayısı
Homojenat	5	2,36	0,58	11,7	2,9	4,03	100	1,00
Jel filtrasyon Kromatografisi	5	0,20	0,07	1	0,3588	2,85	8,54	0,71

4.15. Selülaz Enziminin SDS-PAGE Elektroforez Sonucu

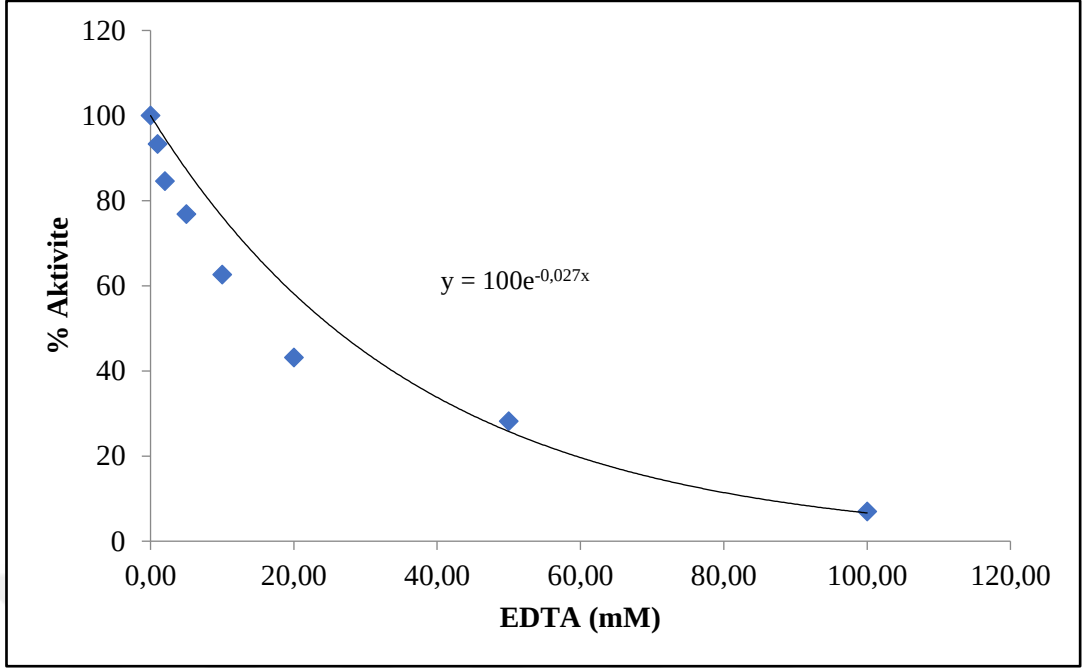
Jel filtrasyonu sonucu ve homojenattan elde edilen kısmi saflaştırılmış enzimin saflık kontrolünün yapılması amacıyla 3.2.7’de belirtildiği şekilde işlemler yapılmış ve enzimin saflık kontrolü yapılmıştır. (Şekil 4.20)



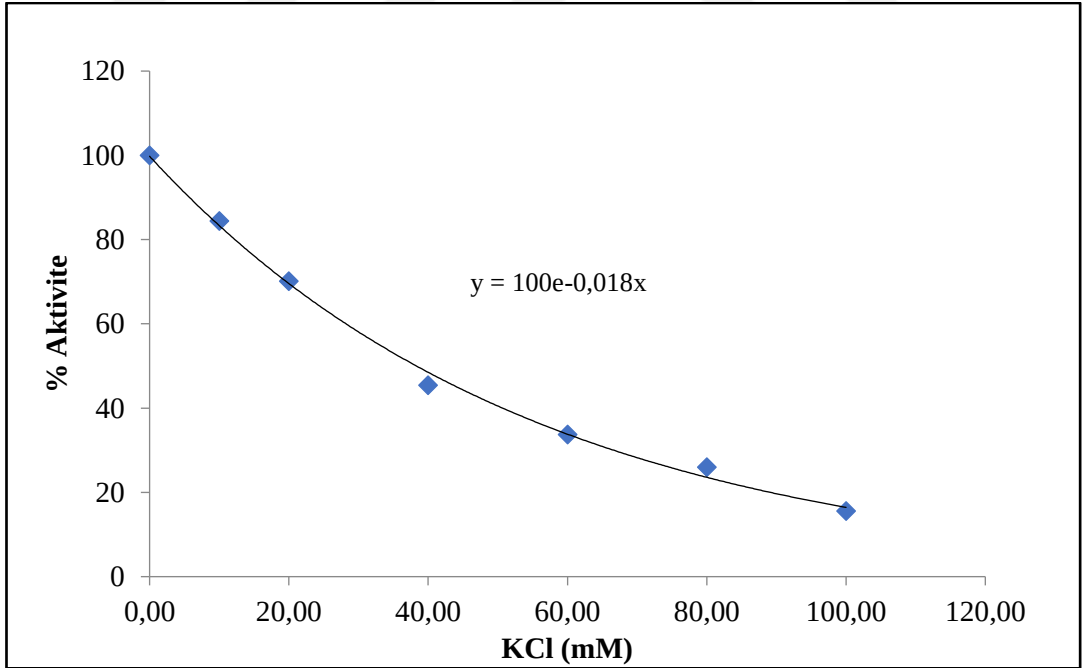
Şekil 4.20. Selülaz Enziminin SDS-PAGE görüntü sonuçları (1-2: Jel filtrasyonu sonucu elde edilen enzim numuneleri, 3: Homojenattaki enzim örneği)

4.16. Selülaz Enzimi Üzerine Bazı Bileşiklerin IC_{50} Değerleri Sonuçları

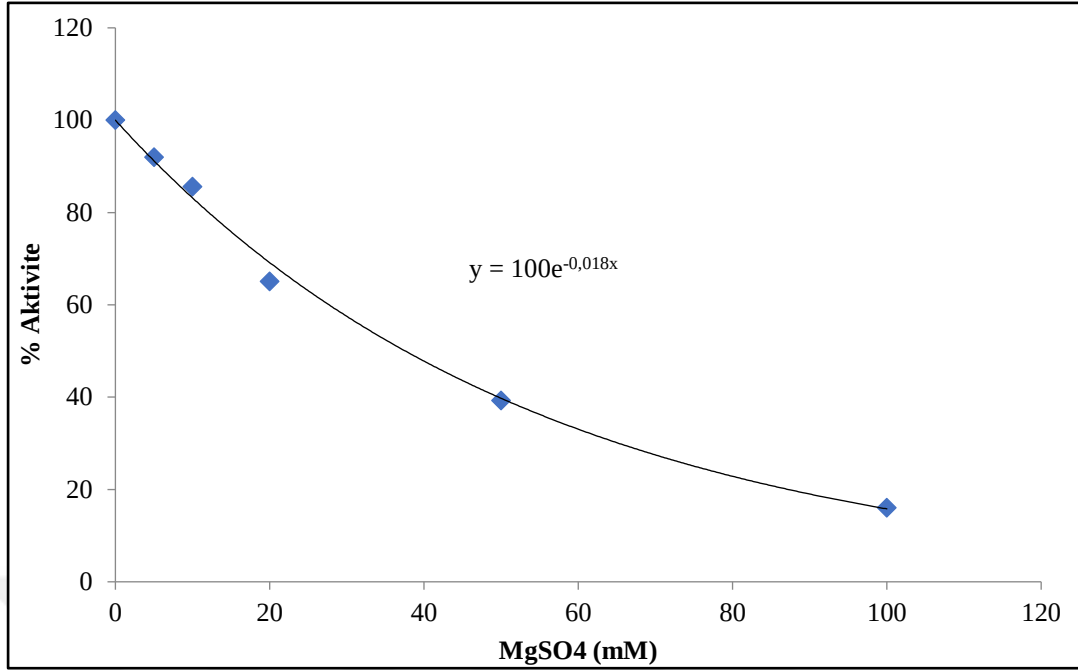
Selülaz enzimi üzerine bazı kimyasal bileşiklerin inhibisyon etkileri incelenmiş ve enzim aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyonlar (IC_{50} değerleri) belirlenmiştir. Bu değerler için EDTA, KCl, $MgSO_4$, $NaIO_3$, ve SDS bileşiklerinin 5 farklı konsantrasyonu kullanılmış olup sonuçlar %aktivite- [I] grafikleri çizilerek şekil 4.22-4.26 aralığında belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre EDTA için IC_{50} değeri 25,67 mM, KCl için IC_{50} değeri 38,51 mM, $MgSO_4$ için IC_{50} değeri 38,51 mM, $NaIO_3$ için IC_{50} değeri 12,37 mM ve SDS için IC_{50} değerinin 0,1791 mM olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.21- 4.25- Çizelge 4.10)



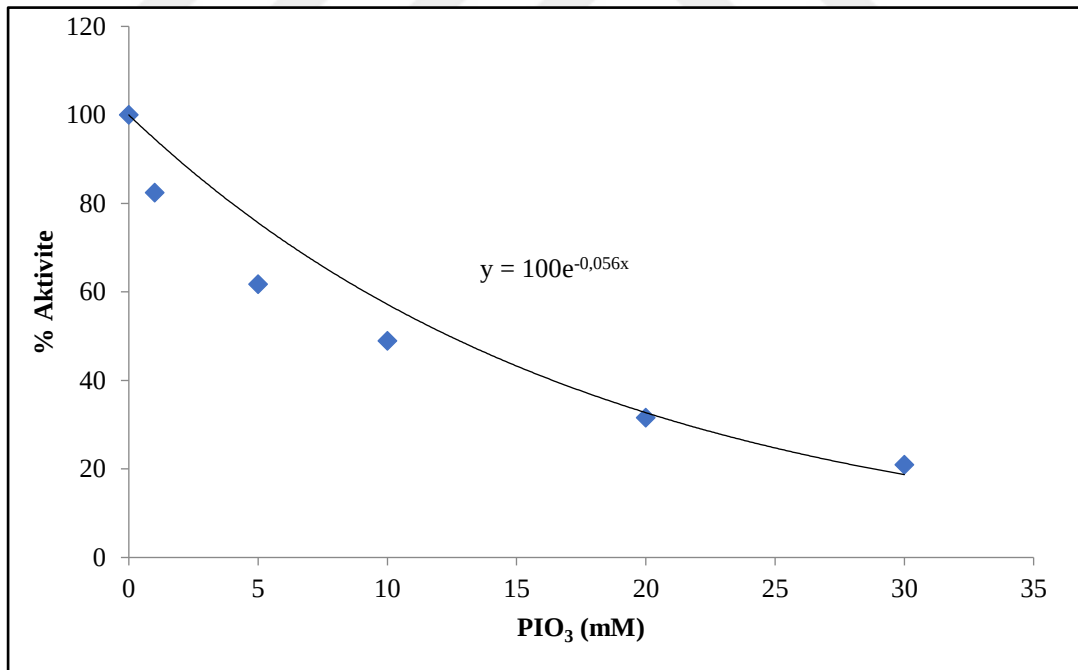
Şekil 4.21. Selülaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[EDTA] grafiği



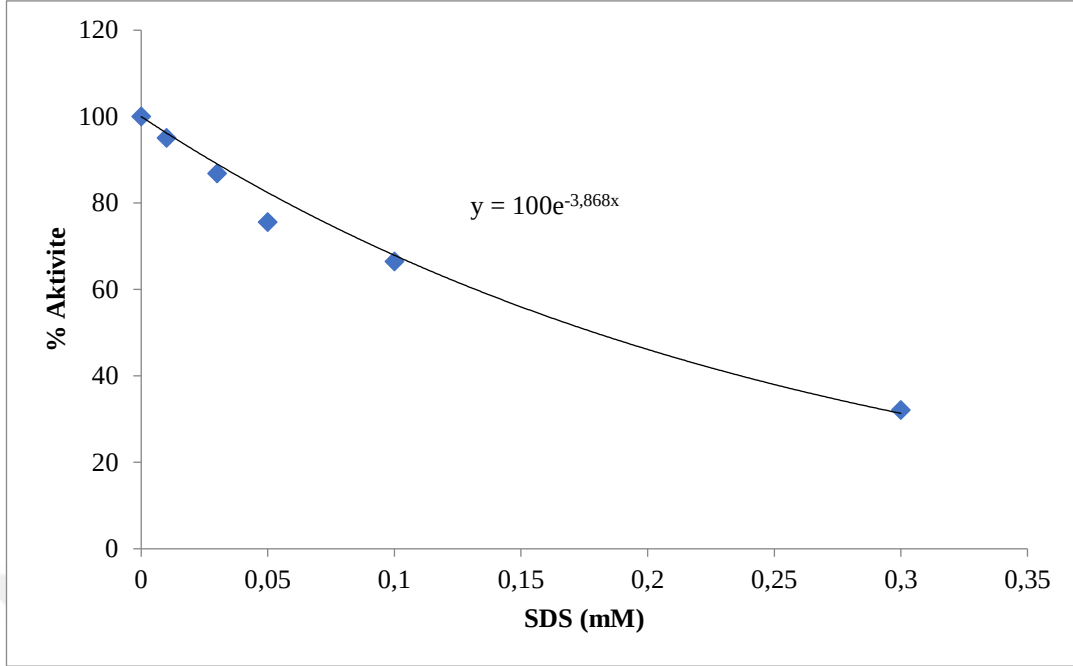
Şekil 4.22. Selülaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[KCl] grafiği



Şekil 4.23. Selüloz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[MgSO₄] grafiği



Şekil 4.24. Selüloz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki % Aktivite-[PIO₃] grafiği



Şekil 4.25. Selülaaz enzimi için farklı inhibitör konsantrasyonlarındaki %Aktivite-[SDS] grafiği

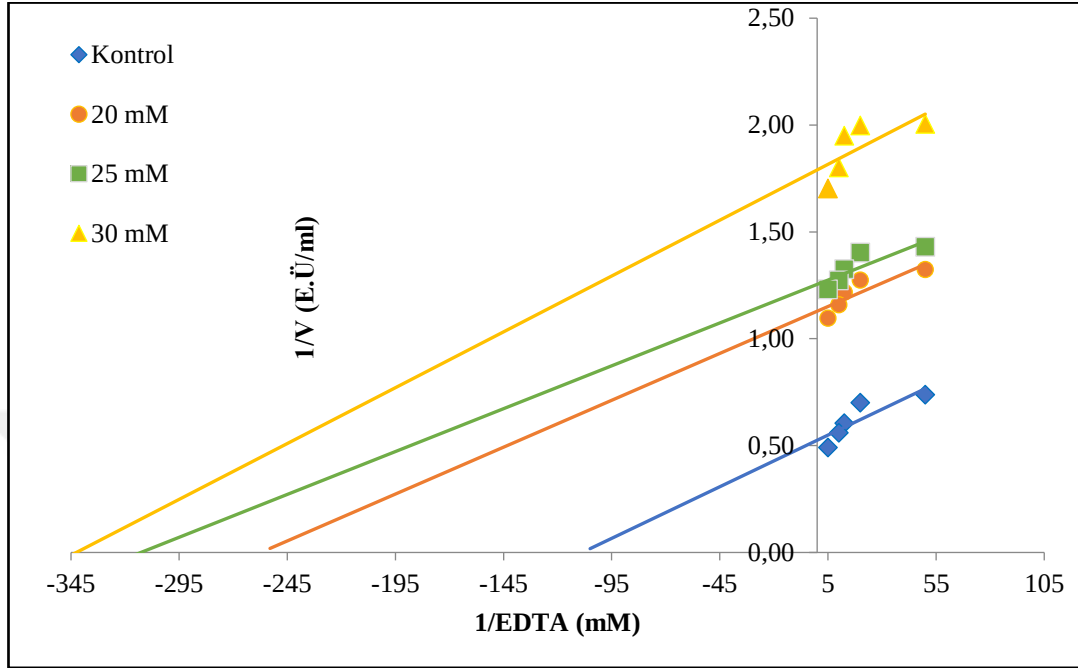
Çizelge 4.10. Selülaaz Enzimi üzerine etki gösteren bazı bileşiklerin IC₅₀ değerleri

Kimyasal Madde	IC ₅₀ (mM)
EDTA	25,67
KCl	38,51
MgSO ₄	38,51
PIO ₃	12,37
SDS	0,1791

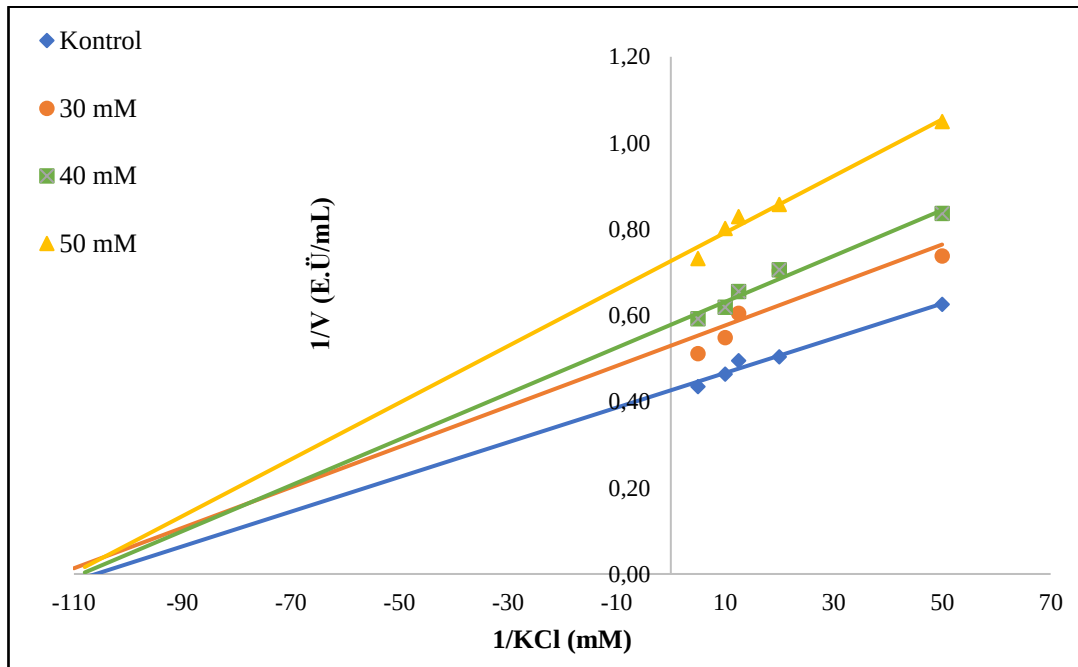
4.17. Selülaaz Enzimi Üzerine İnhibisyon Etkisi Gösteren Bazı Bileşiklerin K_i Sabitleri Sonuçları

Selülaaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren EDTA, KCl, MgSO₄, PIO₃ ve SDS bileşiklerinin K_i değerlerinin belirlenmesi amacıyla bölüm 3.2.13'te belirtildiği gibi işlemler ve hesaplamalar yapılmıştır. Daha sonra 1/V-1/S değerleri belirlenip Lineweaver-Burk grafiği ile K_i sonuçları ve inhibisyon tipleri tayin edilmiştir.

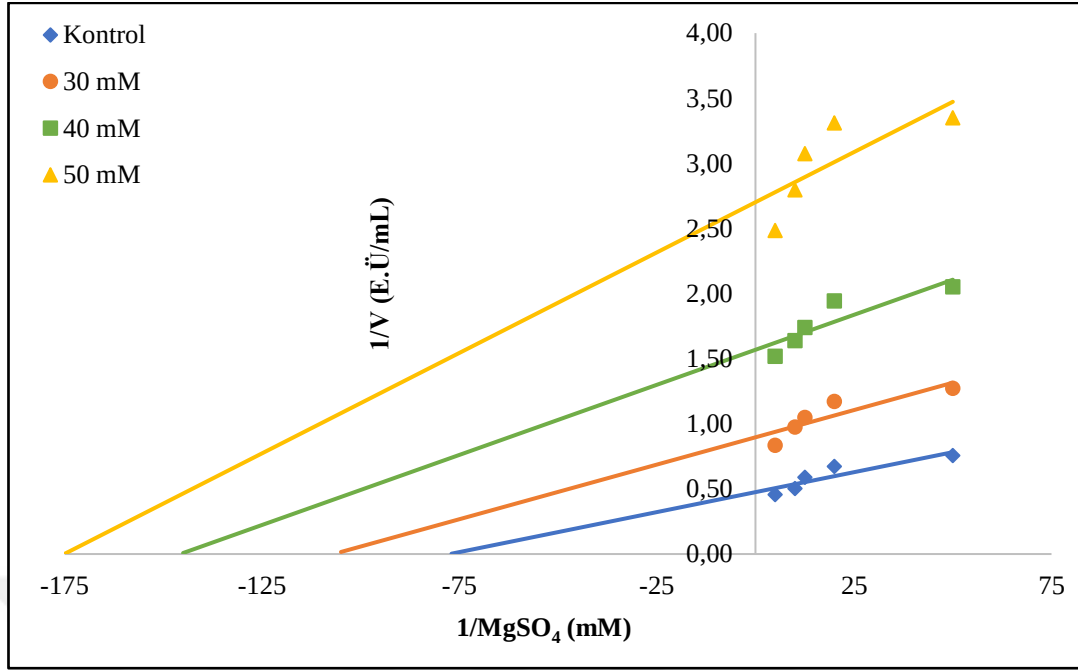
Elde edilen sonuçlara göre EDTA için K_i değeri 27,59 mM, KCl için K_i değeri 42,49 mM, $MgSO_4$ için K_i değeri 42,50 mM, PIO_3 için K_i değeri 15,65 mM ve SDS için K_i değerinin 0,023 mM olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.26- 4.30- Çizelge 4.11)



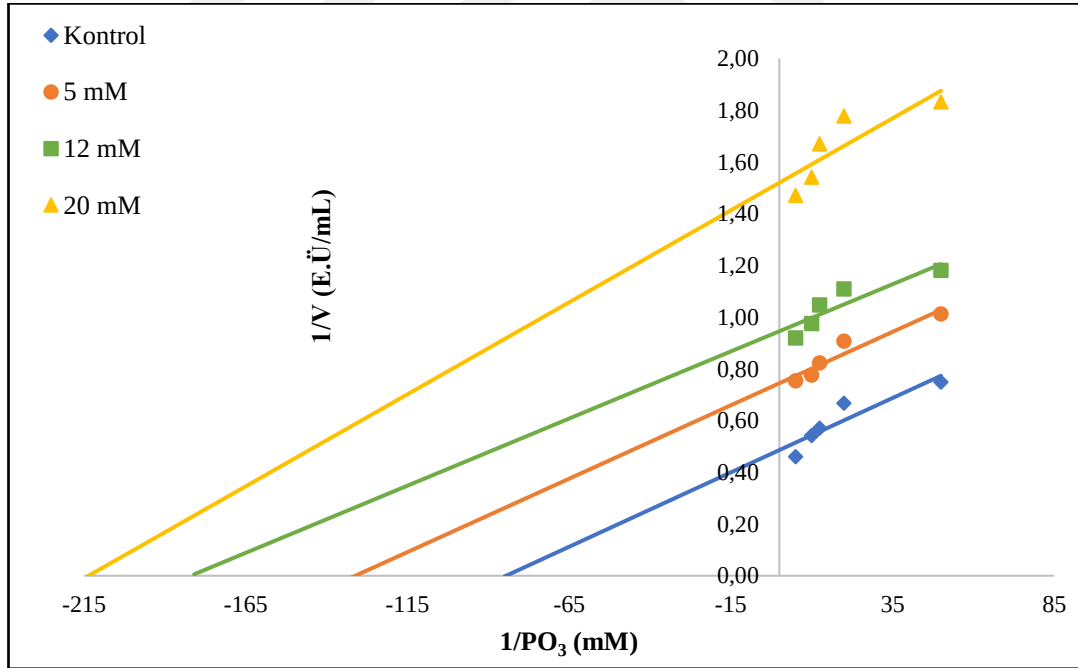
Şekil 4.26. Selülaz enzimi için EDTA'nın inhibisyon Etkisi



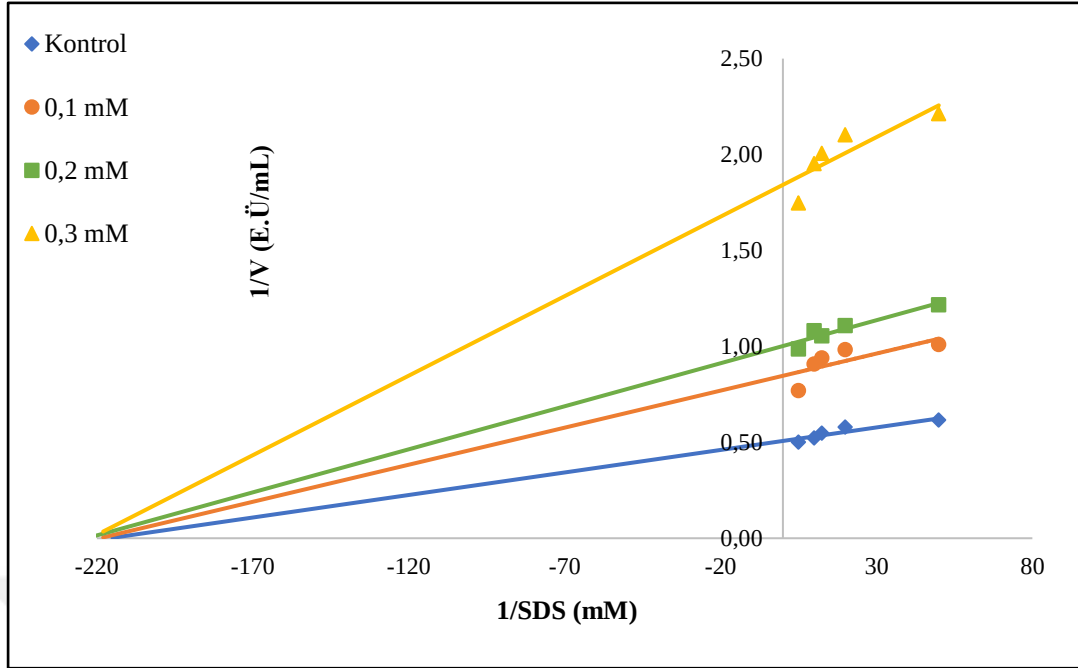
Şekil 4.27. Selülaz enzimi için KCl'nin inhibisyon Etkisi



Şekil 4.28. Selülaz enzimi için $MgSO_4$ 'ün inhibisyon etkisi



Şekil 4.29. Selülaz enzimi için PO_3 'ün inhibisyon Etkisi



Şekil 4.30. Selülaz enzimi için SDS'nin inhibisyon Etkisi

Çizelge 4.11. Selülaz Enzimi üzerine etki gösteren bazı bileşiklerin K_i değerleri ve İnhibisyon Tipleri

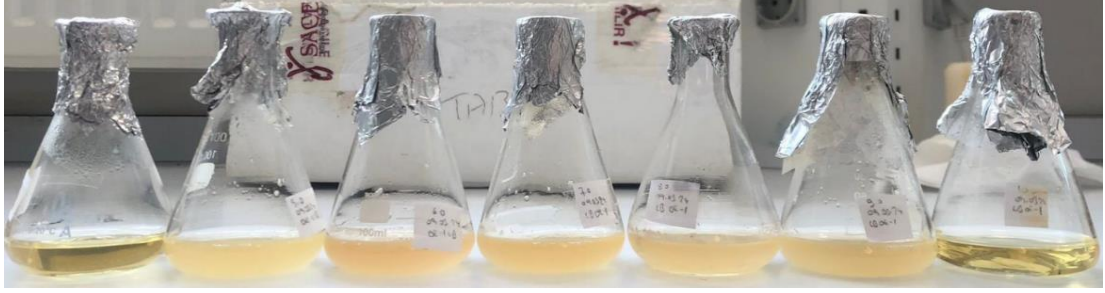
İnhibitör Cinsi	I (mM)	K_i (mM)	Ort. K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
EDTA	20 25 30	22,65 27,58 32,54	27,59	Yarı Yarışmalı
KCl	30 40 50	32,54 42,49 52,45	42,49	Yarışmasız
MgSO ₄	30 40 50	32,54 42,50 52,45	42,50	Yarı Yarışmalı
PIO ₃	5 12 20	9,39 14,90 22,65	15,65	Yarı Yarışmalı
SDS	0.1 0.2 0.3	0,005 0,019 0,045	0,023	Yarışmasız

4.18. *Bacillus licheniformis* OE-1'in Geliştiği Optimum pH değeri Sonuçları

Bakterinin en iyi geliştiği pH değeri bulmak için pH 4.0-10.0 aralığındaki farklı pH değeri lerinde bakteri LB broth besiyerinde 40°C'de 24 saat boyunca 110 rpm'de geliştirilmiş olup daha sonra 600 nm'de besiyeri yoğunluğu köre karşı okunmuştur. Kör ekim yapılmayıp bakteri yerine steril saf su eklenen steril besiyeridir. Yapılan çalışma neticesinde bakterinin en iyi pH 6,0'da geliştiği belirlenmiş olup pH 4,0 ve 10,0 değeri lerinde ise herhangi bir gelişmenin olmadığı belirlenmiştir. (şekil 4.31- 4.32 Çizelge 4.12)



şekil 4.31. Ekim öncesi farklı pH'larda hazırlanan besiyerleri



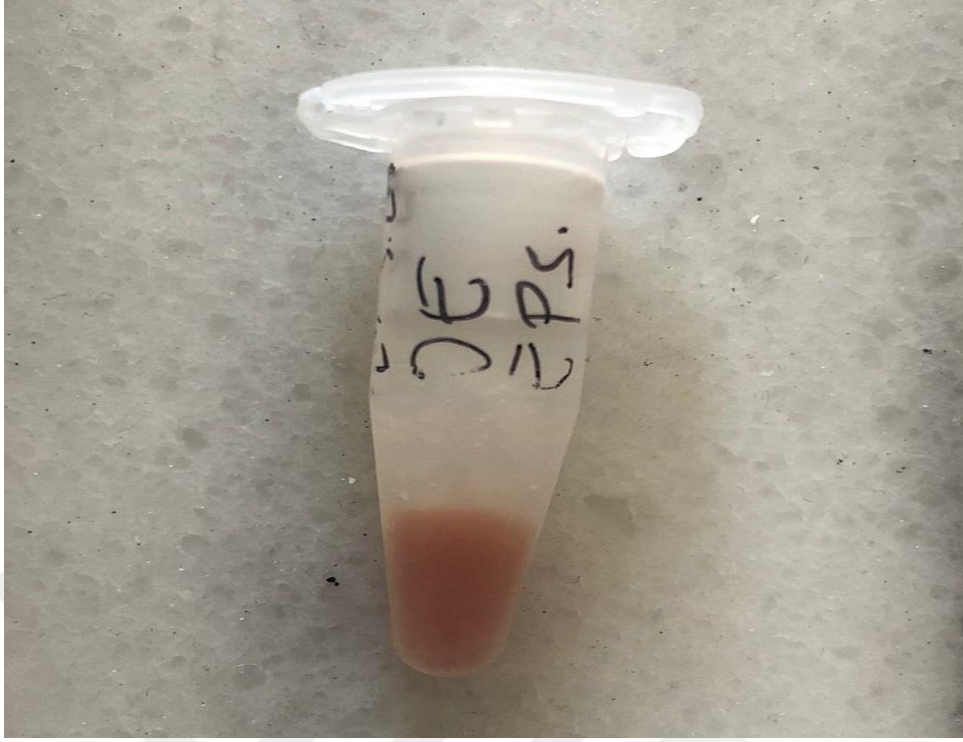
Şekil 4.32. Farklı pH’larda OE-1 gelişimi

Çizelge 4.12. *B.licheniformis* OE-1’in farklı pH’larda in üreme yoğunluğu

pH	Üreme Yoğunluğu (600 nm)
Kör	0,0655
4,0	0,0636 (üreme yok)
5,0	0,5398
6,0	0,8177
7,0	0,7888
8,0	0,6369
9,0	0,6059
10,0	0,0658 (üreme yok)

4.19. *Bacillus licheniformis* OE-1 Optimum Ekzopolisakkarit ürettiği pH değeri Sonuçları

Yapılan ölçümler neticesinde en çok EPS’nin, en çok üremede olduğu gibi pH 6,0’da üretildiği belirlenmiştir. Bu amaçla bölüm 3.2.13’te belirtilen şartlarda EPS elde edilmiş daha sonra 105°C’de su buharlaştırılmış ve kuru EPS elde edilmiştir. Daha sonra EPS tartılmış ve sonuçlar mg/L cinsinden belirtilmiştir (Şekil 4.33, Çizelge 4.13)



Şekil 4.33. *B.licheniformis* OE-1'in pH 6,0'da ürettiği EPS

Çizelge 4.13. *B.licheniformis* OE-1'in farklı pH'larda EPS üretim miktarı

pH	EPS üretimi (mg/L)
Kör	Bakteriyel üreme görülmedi
4,0	Bakteriyel üreme görülmedi
5,0	0,3298
6,0	110,8
7,0	71,51
8,0	52,14
9,0	40,25
10,0	Bakteriyel üreme görülmedi

4.20. *Bacillus licheniformis* OE-1'in En Yüksek Ekzopolisakkarit Ürettiği Optimum Sıcaklık Değeri Sonucu

20, 30, 40, 50 ve 55°C'de bakterinin optimum geliştiği pH değerinde (pH 6,0'da) 110 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edilen bakterinin ürettiği EPS miktarları belirlenmiştir. Yapılan işlemler neticesinde en iyi üretimin 40°C'de olduğu belirlenmiş

olup 20°C’de herhangi bir bakteriyel üreme olmazken 55°C’de herhangi bir EPS üretimi tespit edilememiştir. 50°C ‘de ve 30°C ise çok az EPS üretimi olduğu görülmüştür (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. *B.licheniformis* OE-1’in farklı sıcaklıklarda ürettiği EPS miktarı

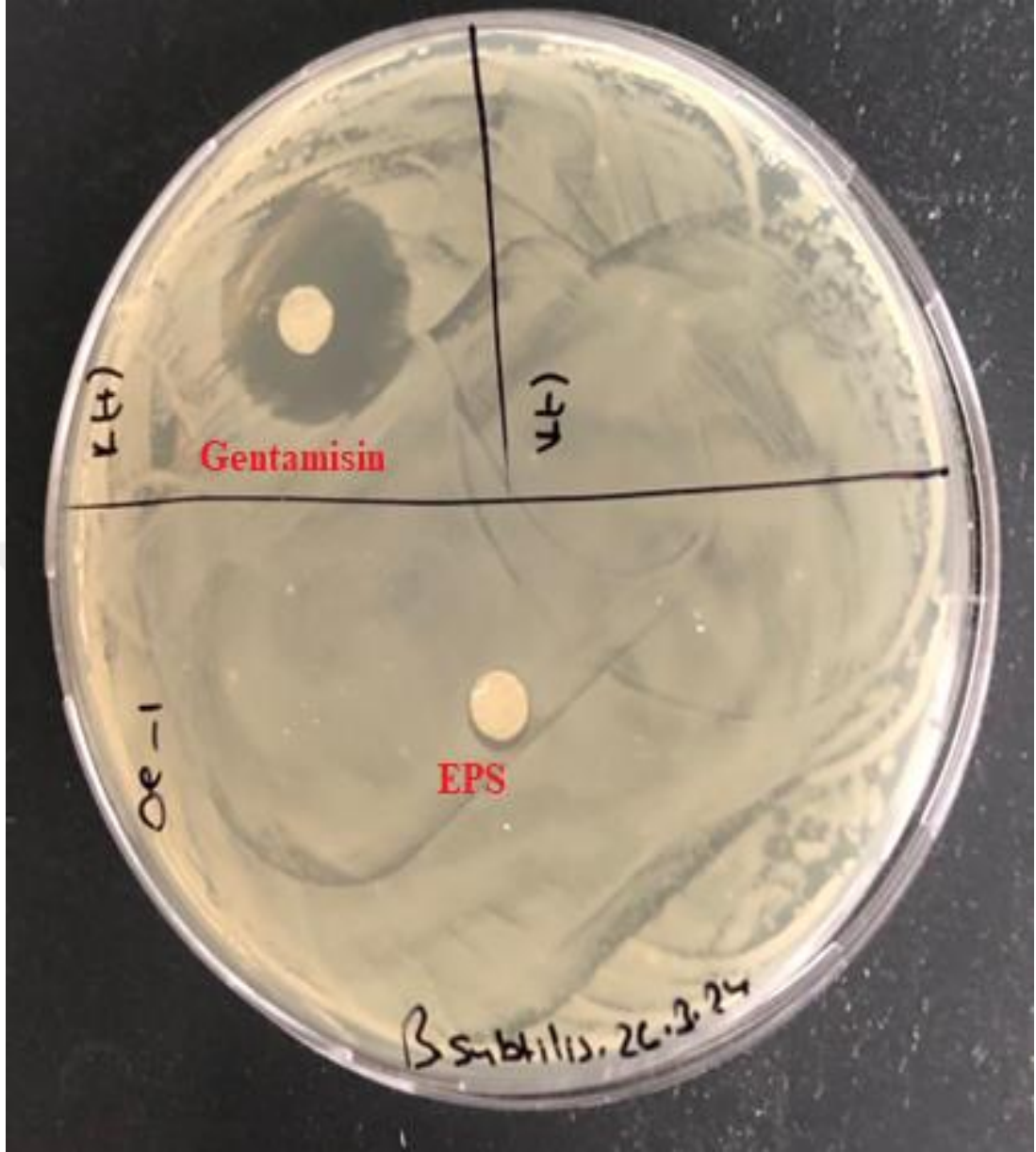
Sıcaklık	EPS üretimi (mg/L)
20	Bakteriyel üreme yok
30	19,92
40	110,80
50	12,35
55	EPS tespit edilemedi

4.21. *Bacillus licheniformis* OE-1’den Elde Edilen EPS’nin Antibakteriyel Etkisi Sonuçları

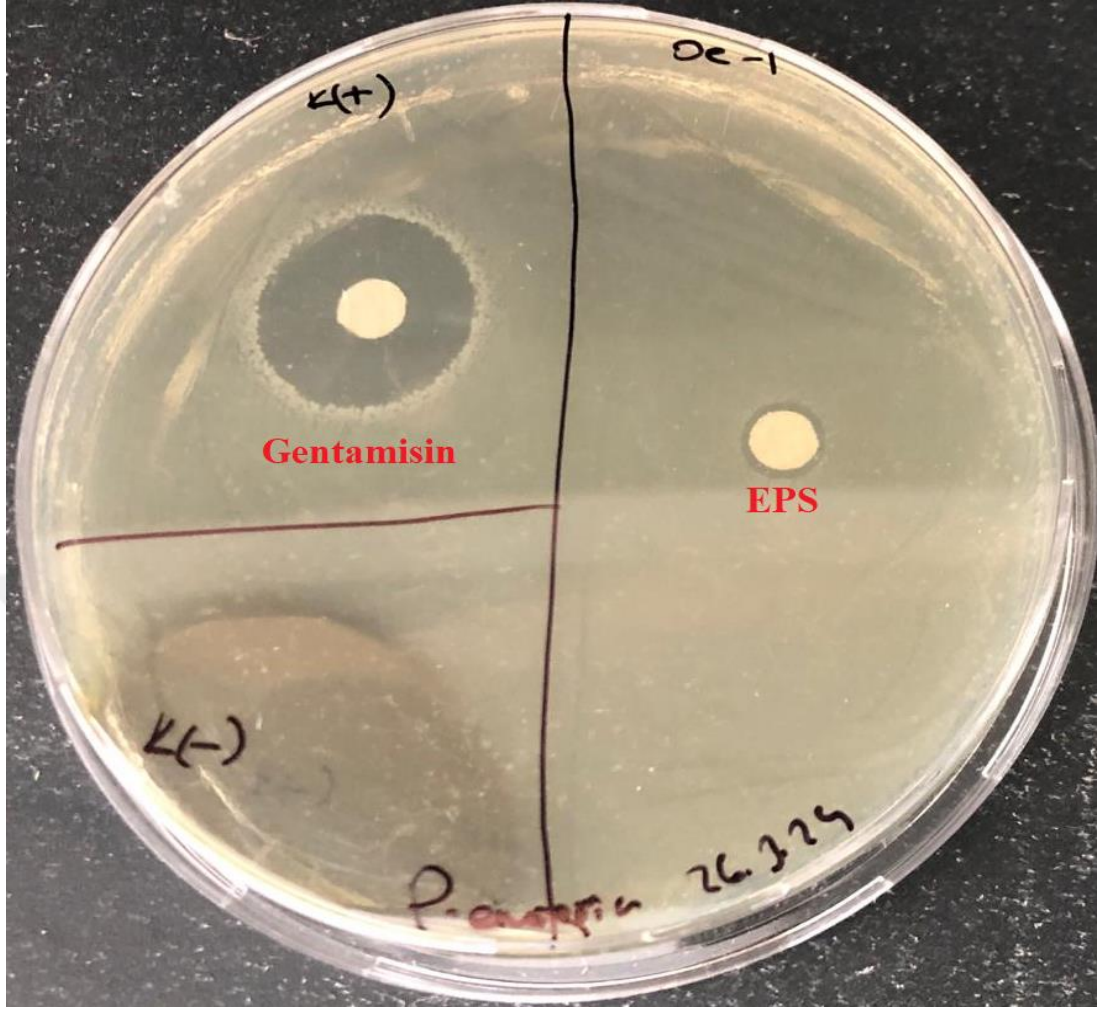
Bölüm 3.2.15’de belirtildiği gibi EPS’nin antimikrobiyal özelliği *Bacillus Subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde uygulanmış ve EPS’nin antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. EPS’nin etkisi zon çapı ölçülerek mm cinsinden çizelge olarak belirtilmiştir (Şekil 4.34- 4.37, Çizelge 4.15)

Çizelge 4.15. *B. Licheniformis* OE-1’in ürettiği EPS’nin antibakteriyel etkisi

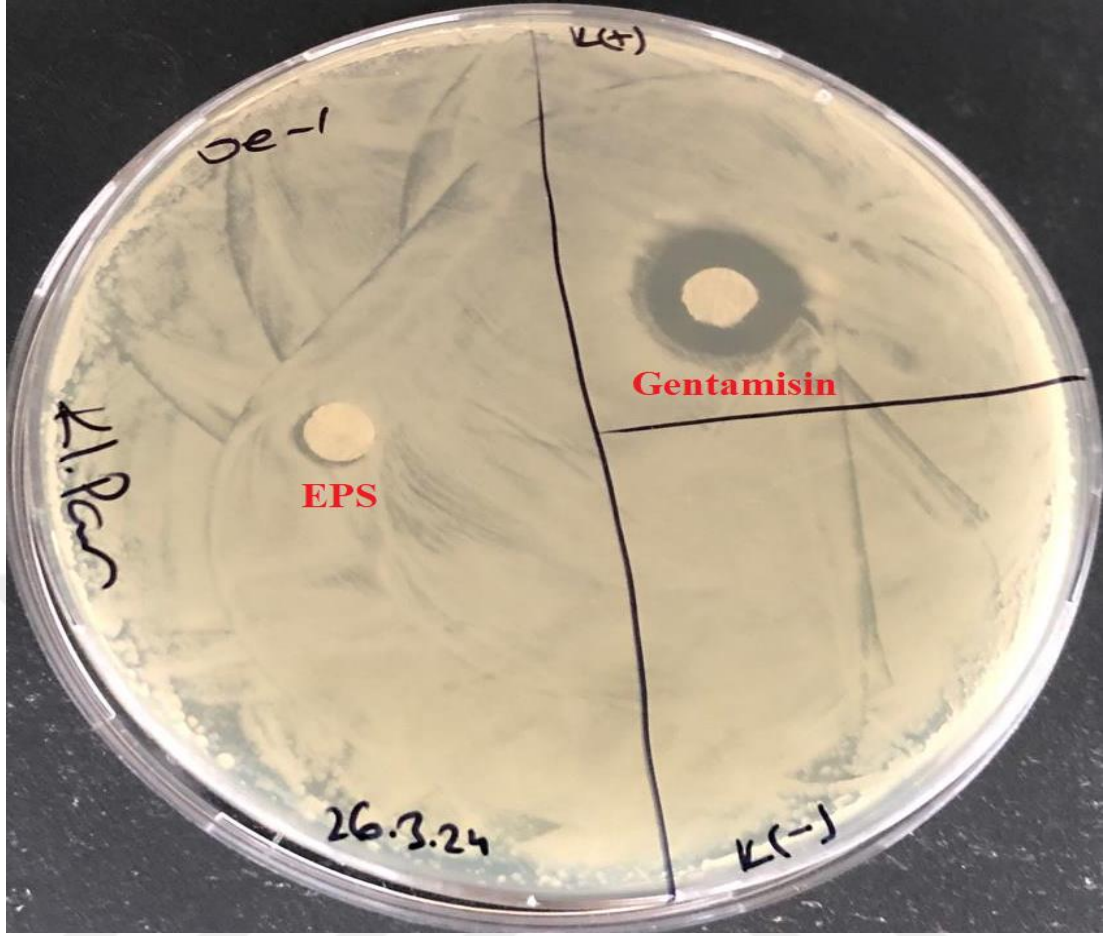
Bakteri	Gentamisin (pozitif kontrol-mm)	EPS (mm)	Negatif kontrol
<i>Bacillus subtilis</i>	20	7	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	8	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	7	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	8	0



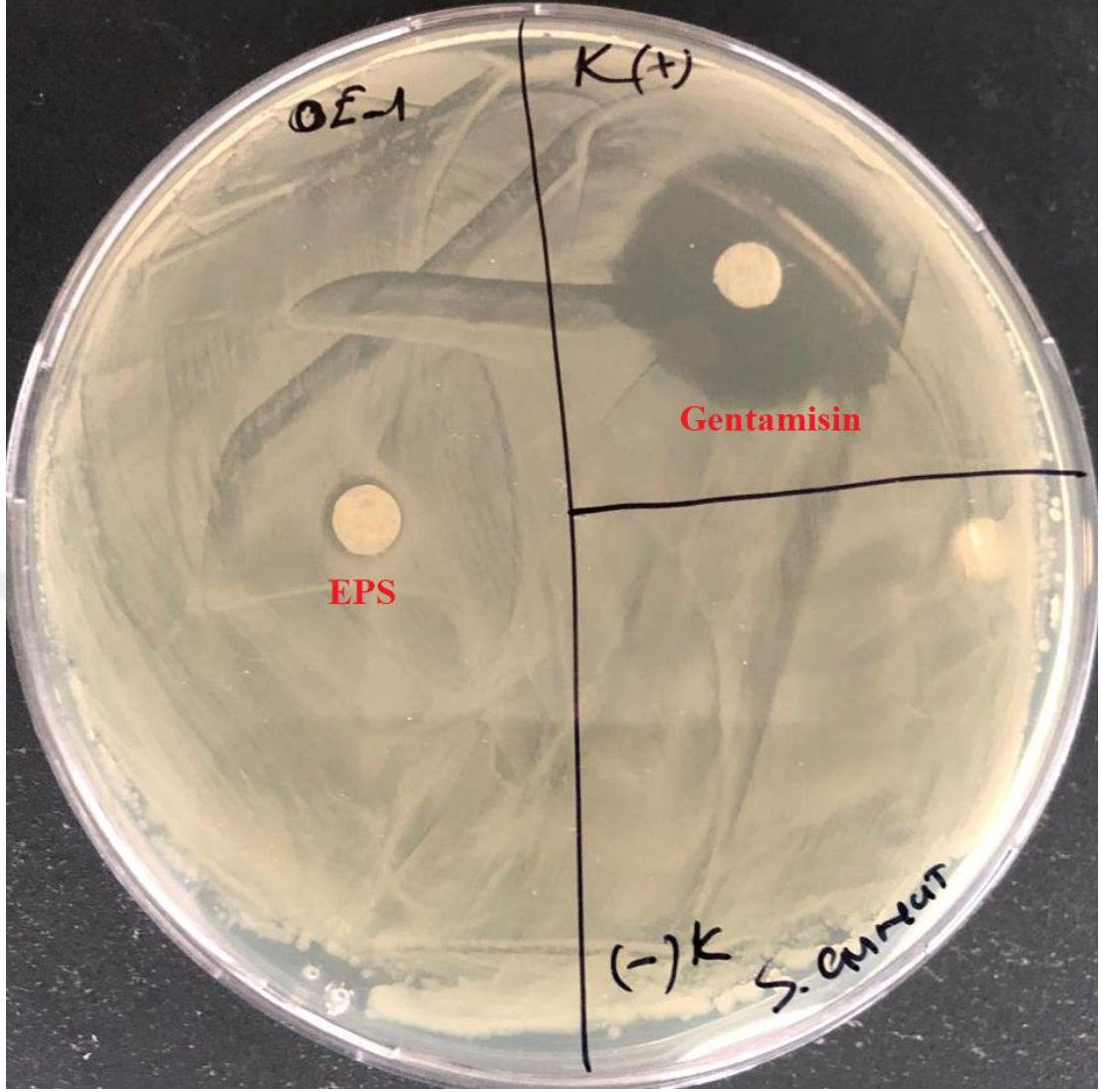
Şekil 4.34. EPS'nin *B.subtilis* üzerine etkisi



Şekil 4.35. EPS'nin *P. aeruginosa* üzerine etkisi



Şekil 4.36. EPS'nin *K. pneumoniae* üzerine etkisi



Şekil 4.37. EPS'nin *S. aureus* üzerine etkisi

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Kimya sanayi endüstrileşmeyi sağlayıp daha önce görülmemiş seviyede yenilik ve insanlığa katkı sağladı. Fakat günümüzde kimya endüstrisinin yol açmış olduğu çeşitli problemler nedeniyle kimyasal üretim yerini biyoteknolojik üretime bırakmaktadır. Ekstrem ortamlarda yaşayan bakterilerin bulunması ve bu bakterilerin biyoteknolojik açıdan fonksiyonel olması nedeniyle bakteri biyomateryalleri ve enzimleri üzerine yoğun çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Günümüzde enzim ve biyomateryal teknolojisinin gelişmesi, ürünlerin farklı kullanım alanlarına sahip olması, ekonomik olarak daha avantajlı olması, kimya endüstrisinin çeşitli dezavantajlarını içermemesi gibi etkenler dolayısıyla biyoteknoloji endüstrisi gittikçe önem kazanmaktadır (Güven 2011).

Çalışmamızda Diyadin termal kaplıcalarının toplam 8 farklı yerinden sıcak su ve toprak örnekleri alınmıştır. Bu örneklerden morfolojik olarak birbirinden farklı 22 izolat elde edilmiş ve elde edilen bu izolatlar %1 CMC içeren LB-Agar besi ortamında büyütülmüşlerdir. Bakterilerin selüloz enzimi üretme yeteneklerinin tespiti için Kongo-red testi uygulanmış ve 14 izolatın selüloz enzimi içerdiği belirlenmiştir. İzolatların tür ve cins bilgileri bilinmediğinden her bir izolata OE-1'den başlamak üzere OE-22'ye kadar isim verilmiştir. Kongo red testi sonucu en yüksek selülotik zona OE-1 olarak isimlendirilen bakterinin sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan 16S rDNA analizi sonucu bakterinin *Bacillus licheniformis* olduğu tespit edilmiştir.

OE-1 suşunun aktivite zonu ölçülmüş olup bu zonun net 29 mm olduğu tespit edilmiştir. Akan Gümüşburun (2017) yaptığı çalışmada farklı pH'larda geliştirmiş olduğu *Bacillus* sp. SAK-5 'in 1 mm ile 10 mm arası net aktivite zonuna sahip olduğunu göstermiştir. Yine aynı çalışmada *Candida* 'nın da 2 mm ile 9 arası net aktivite zonuna sahip olduğunu göstermiştir. Haliskaranfil (2012) *Bacillus* sp. SHK-7 ile yaptığı çalışmada net aktivite zonunu 1, 2 ve 3 mm olarak tespit etmiştir. İzole edilen bakterimizin yüksek bir aktivite zonuna sahip olması onu çeşitli alanlarda potansiyel bir selüloz üreticisi konumuna getirmektedir.

Çalışmamızda enzimin amonyum sülfat ile çöktürülmesi hedeflenmiştir. Safılaştırmaya %10'luk amonyum sülfat ile başlanılmış olup %80'e kadar çıkılmıştır; ancak hiçbir basamakta enzim aktivitesi tespit edilememiştir. Aynı işlemler üç kere yapılmasına rağmen %10'luk çöktürmeden sonra bile enzim aktivitesi tespit

edilemediğinden bu işlem yapılmamış ve enzim amonyum sülfat ile çöktürülemediğiştir. Bunun sebebi olarak bakterinin mevcut inkübasyon koşullarında çok düşük düzeyde selüloz üretmesi ve bundan dolayı çok az miktardaki amonyum sülfat ile dahi enzimin inhibisyonu uğraması olabilir. Nitekim süpernatantta toplam protein miktarının tespit edilmesi için yapılan analizde protein miktarının çok düşük çıkması bu düşüncüyü desteklemektedir.

Süpernatanta bulunan enzimin optimum pH değerinin 9,0 olarak tespit edilmesi enzimin bazik karakterli olduğunu göstermektedir. Deterjan gibi çeşitli endüstrilerde yüksek pH'da çalışabilen enzimler istenmektedir. (Niyonzima 2019). Enzimin yüksek pH'da optimum aktivite göstermesi deterjan başta olmak üzere farklı endüstriyel alanlarda potansiyel olarak kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Diyadin termal kaplıcıklarından izole edilen bakteriden elde edilen selüloz enziminin stabil pH'sının 7,5 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, enzimin nötr pH'larda uzun süre kullanılabileceğini göstermektedir.

Enzimin maksimum aktivite gösterdiği iyonik şiddetin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda enzimin 100 mM Glisin-NaOH tamponunda en iyi şekilde çalıştığı tespit edilmiştir.

Çalışmada enzimin optimum sıcaklık değerinin 60°C olduğu belirlenmiştir. Termal kaplıcadan alınan bu bakteriden elde edilen enzimin de yüksek sıcaklıklarda optimum şekilde çalışması endüstride yüksek sıcaklık gerektiren uygulamalar için birer avantajdır. Ayrıca sıcaklık artışı ile paralel olarak mikrobiyal bulaşı da azalacaktır bundan dolayı gıda endüstrisi başta olmak üzere bu enzimin farklı endüstriyel alanlarda yüksek sıcaklık gerektiren işlemlerde kullanılması o proste mikrobiyolojik risk faktörlerini minimize edecektir. Enzimin 70°C'de bile kısmen aktif olduğu belirlenirken geniş bir sıcaklık aralığında çalışması farklı alanlarda kullanılma ihtimali olduğunu gösterir.

Depolama stabilitesinin uzun olması arzu edilen bir durumdur. Enzim ve diğer protein yapıların bozulmadan kalması için genelde -20°C veya -80°C gibi aşırı düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmeleri gerekir. Bu da ekonomik olarak maliyetlidir. Enzim buzdolabı sıcaklığında 8,3 gün sonunda aktivitesinin %70'ini korumaktadır. Çalışmamızda 100 saat (4,16 gün) sonunda bile enzim aktivitesi başlangıç düzeyini korumaktadır.

Diyadin termal kaplıcalarından izole ettiğimiz enzimin V_{max} değeri 2,33 E.U/mL olarak belirlenirken K_m değeri ise 0,0348 mM olduğu belirlenmiştir. Bu değerler literatür ile karşılaştırıldığında enzimin ortalama olarak yüksek bir aktivite hızına sahip olduğu ve substrata ilgisinin ise yüksek olduğunu göstermektedir. Bu da az miktarda substratı bile hızlı şekilde ürüne dönüştürebileceğini göstermektedir. Endüstride hızlı enzimlerin olması önemlidir; çünkü enzim aktivitesi zaman, maliyet ve verimliliği etkiler. Yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen selülozün V_{max} değeri 0,493 IU/mL bulunmuştur. Yine farklı çalışmalarla enzimin V_{max} değeri, 284 μ M/dak bulunmuştur. Bir çalışmada enzimin alt üniteleri olan β -1,4-endoglukanaz'ın V_{max} değeri 2.5 IU/mL, β -1,4-ekzoglukanaz'ın V_{max} değeri 0,8 IU/ml ve β -glukosidaz'ın V_{max} değeri 0,084 IU/mL bulunmuştur (Amore *et al.* 2013; Pandey *et al.* 2014; da Silva *et al.* 2021).

Jel filtrasyon kromatografisi sonucu elde edilen elüattan yapılan protein analizi sonucu enzim miktarının çok düşük olduğu görülmektedir. Bu durum bir dezavantajdır; fakat pH, sıcaklık, besi ortamı gibi faktörler değiştirilip nihayetinde optimal şartlar altında bakterinin daha fazla enzim üretilip üretilmediğine bakılabilir.

SDS-PAGE elektroforez sonuçları incelendiğinde de jel filtrasyonu sonucu elde edilen bantların koyuluk miktarının ham enzim kaynağı olan homojenattan daha az olduğu görülmektedir. Bu durum protein miktar sonuçlarıyla uyumlu olup enzimin az üretilmediğini göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalar neticesinde farklı canlılardan selülozün farklı moleküler ağırlıkta olduğu belirlenmesine rağmen *Bacillus licheniformis*'ten elde edilen selülozların moleküler ağırlıkları farklı çalışmalarda 54,5 kDa, 61,7 kDa, 65,8 olduğu belirlenmiştir (Kim and Ku, 2018; De Araújo *et al.* 2019; Elsababty *et al.* 2022) Çalışmamızda tek bant oluşmadığından enzimimizin moleküler ağırlığı net olarak belirlenememesine rağmen 55-65 kDa arası olduğu düşünülmektedir.

Enzimler için IC_{50} değerleri önemlidir; çünkü enzimin kullanılması esnasında ürün oluşturmamasını engelleyen veya azaltan inhibitör madde miktarlarının ve türlerinin bilinmesi üretimde planlama noktasında hayati işleve sahiptir. Yapılan analizler neticesinde elde edilen sonuçlara göre EDTA için IC_{50} değeri 25,67 mM, KCl için IC_{50} değeri 38,51 mM, $MgSO_4$ için IC_{50} değeri 38,51 mM, PIO_3 için IC_{50} değeri 12,37 mM ve SDS için IC_{50} değerinin 0,1791 mM olduğu belirlenmiştir. IC_{50} değerlerine

dayanılarak yapılan K_i analizleri sonuçlarına göre de EDTA için K_i değeri 27,59 mM, KCl için K_i değeri 42,49 mM, $MgSO_4$ için K_i değeri 42,50 mM, PIO_3 için K_i değeri 15.65 mM ve SDS için K_i değerinin 0.023 mM olduğu belirlenmiştir.

Yapılan analizler neticesinde bakterinin en yoğun şekilde pH 6,0'da geliştiği gözlenmiştir. pH 5,0'da da gelişen bakterinin gelişim aralığı pH 5,0 ve 9,0 arası olduğu tespit edilmiştir. Bakterinin pH 4,0 ve 10,0'da gelişmemesi ise bakterinin nötral ve hafif asidik ile hafif alkali ortamlarda geliştiğini göstermektedir. Bakteri bitki için prebiyotik özellik taşımakta ve mikrobiyal gübre olarak kullanılmaktadır (Rüzgâr 2019).

Bakterinin en çok hangi pH'da EPS ürettiğinin tespit edilmesi için farklı pH'larda bakteri geliştirilmiş ve ürettiği EPS miktarları tartılmış sonuçlar mg/mL cinsinden belirtilmiştir. Yapılan analizler neticesinde bakterinin pH 6,0'da en yüksek miktarda EPS ürettiği belirlenmiştir.

Bakterinin en çok EPS ürettiği sıcaklık değeri ise 40°C olarak tespit edilmiştir. 20°C'de bakteriyel üreme gerçekleşmediğinden herhangi bir EPS üretimi söz konusu olmayıp 55°C'de ise bakteriyel üreme olduğu halde EPS üretimi tespit edilememiştir. 50°C'de ise az miktarda da olsa EPS ürettiği tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek EPS üretim miktarı 110 mg/L olarak tespit edilmiştir. Farklı çalışmalarda araştırmacılar 335 mg/L, 262 mg/L, 2.83 g/L gibi daha yüksek EPS seviyelerine ulaşmışlardır; (Çelik *et al.* 2008; Zhou *et al.* 2014) fakat çalışmamızda sadece pH ve sıcaklık optimizasyonu gerçekleştirilmiş olup besi ortamı gibi şartların değişmesiyle daha yüksek EPS verimine ulaşılabilir. EPS, stres koşullarında bakterinin özellikle kendini koruması için ürettiği bir polisakkarittir. OE-1 suşunun optimal üreme sıcaklığı 55°C olup 40°C'nin bakteri için sıcaklık yönünden stres ortamı olduğunu ifade edebiliriz.

Termofil karakterli bakteri olan *Bacillus licheniformis* OE-1'in optimal üreme sıcaklığından düşük sıcaklıkta üretmiş olduğu bu EPS'den çeşitli alanlarda yararlanılabilir. Çalışmamızda EPS'nin antibakteriyel özelliğinin olup olmadığı incelenmiştir. Elde edilen EPS'nin *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* gibi patojen bakterilerin üremesini inhibe ettiği belirlenmiş olup olası bir antimikrobiyal ürün olarak kullanılma potansiyeli mevcuttur.

Ağrı Diyadin Termal kaplıcalarından elde ettiğimiz *Bacillus licheniformis* OE-1 bakterisi sel l z enzimi salgılamaktadır. Enzimin  zelliklerine baktığımızda alkali ortamda ve yüksek sıcaklıkta maksimum aktiviteye sahiptir. Bu koşullarda enzimin verimli çalışması onu endüstri açısından potansiyel bir enzim haline getirmektedir.

Enzimin yüksek V_{max} değeri ve düşük K_m değeri enzimin pozitif yönleri iken bakterinin bu enzimi çok düşük seviyede salgılaması ise negatif yön olarak karşımıza çıkmaktadır; ancak enzim üretimi için şartların optimize edilmesi halinde daha yüksek miktarda enzim üretimi sağlanabilir. Bakteri enzim harici EPS denilen polisakkarit ağırlıklı polimer de salgılamaktadır. EPS'ler çok çeşitli alanlarda kullanılabilir. Organik ve biyoteknolojik ürün olması onu kimyasal sentez yolu ile elde edilen maddelerden daha avantajlı kılmaktadır. Ayrıca antibakteriyel özelliğe sahip olması onu tıp ve sağlık alanında potansiyel bir ürün haline getirmektedir. Sonuç olarak, bu bakteriden sel l z ve EPS'nin daha çok üretilmesi için çalışmalar yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aanniz, T., Ouadghiri, M., Melloul, M., Swings, J., Elfahime, E., Ibijbjen, J., Ismaili, M., Amar, M., 2015. Thermophilic Bacteria in Moroccan Hot Springs, Salt Marshes and Desert Soils. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 46 (2), 443-453.
- Achal, V., van Hullebusch, E. D., Decho, A. W. and Gutierrez, T. 2017. Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPSs) in Ocean Systems. *Frontiers in Microbiology*, 8, 922. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00922>
- Akan Gümüşburun, S. 2017. Kombuçya Simbiyosizindeki Mikroorganizmalardan Selülaz Enzimi İzolasyonu ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Albayrak Ş. 2018. Türkiyenin Farklı Bölgelerinde Bulunan Kaplıcalardan Alınan Örneklerden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu, Endüstriyel Açıdan Önemli olan Enzimleri Üretme Potansiyeline Sahip Suşların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,Erzurum.
- Altınel, B. and Ünal, S. S. 2017. The effects of certain enzymes on the rheology of dough and the quality characteristics of bread prepared from wheat meal. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1628–1637. <https://doi.org/10.1007/S13197-017-2594-8>
- Anastasakis, M., Lindamood, J. B., Chism, G. W. and Hansen, P. M. T. 1987. Enzymatic hydrolysis of carrot for extraction of a cloud-stable juice. *Food Hydrocolloids*, 1(3), 247–261. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(87\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(87)80008-5)
- Angelin, J., and Kavitha, M. 2020. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 853–865 <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.190>
- Amore, A., Pepe, O., Ventrino, V., Birolo, L., Giangrande, C. and Faraco, V. 2013. Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. *FEMS Microbiology Letters*, 339(2), 93–101. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12057>

- Arora, A., Choudhary, J., and Nain, L. 2014. Enhanced Saccharification of Steam-Pretreated Rice Straw by Commercial Cellulases Supplemented with Xylanase. *J Bioprocess Biotech Citation*, 4, 188. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000188>
- Aygan, A., Karcioğlu, L. and Arikan, B. 2011. Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology*, 10(5), 789-796.
- Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A. and Hassanshahian, M. 2016. Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Molecular Biology Research Communications*, 5(3), 143. [/pmc/articles/PMC5219909/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5219909/)
- Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. 2011. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29(1), 54–66. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.08.011>
- Bajaj, P. and Mahajan, R. 2019. Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(21–22), 8711–8724. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-10146-0>
- Balcı, N. 2015. Yaban Mersini Meyvesinden (*Vaccinium Arctostaphylos* L.) Glutathyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Banwart, G.J., 1983. *Basic Food Microbiology* Avi. Publishing Company Inc. New York, U.S.A, 118- 120.
- Bayer, E. A., Shoham, Y. and Lamed, R., 2006. Cellulose-Decomposing Thermostable and Bacteria and their enzyme systems. *Prokaryotes*, 2nd ed., M. Dworkin, New York (NY), U.S.A, 578-617
- Bayer, E.A., Lamed R., Himmel M.E., 2007 The potential of Cellulases and cellulosomes for cellulosic waste Management. *Current opinion biotechnology*, 18, 237-245

- Bayer, E.A., Shimon, L.J.W., Shoham, Y., Lameds, R. (1998). Cellulosomes-Structure and ultra structure., *Journal of Structural Biology.*, 124 (2-3), 221–234.
- Beffa, T., Blance, M.; Lyon. P.F., Vogt, G.; Marchiani, M.; Lott-Fischer, J.; Aragno, M. 1996 izolation of *Thermus* Strains From Hot Composts (60 to 80°C), *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1723- 1727
- Beguin, P., Aubert, J.P., 1994. The biological degradation of Cellulose. *Fems Microbiology review*, 13, 25-58.
- Beldüz, A. O. Dulger, S. and Demirbag, Z. 2003. *Anoxybacillus Gonensis* Sp. Nov., A Moderately Thermofilic, Xylose-Utilizing, Endospore-Forming Bacterium, *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 53, 1315-1320.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. 2010. *Biochemistry Streyer* (5th ed.). W.H. Freeman and Company. U.S.A
- Berkeley, R.C.W, N., Logan, 1997. *Bacillus, Alicyclobacillus and Paenibacillus*. In: Emmerson A.M., Hawkey P.M., Gillespie S.H. Ed. *Principles and practice of Clinical Bacteriology*. Chichester: Wiley, 185 p. *Biotechnol.*, 45: 327-332.
- Berthiller, F., Dall’asta, C., Corradini, R., Marchelli, R., Sulyok, M., Krska, R., Adam, G., and Schuhmacher, R. 2009. Occurrence of deoxynivalenol and its 3-β-D-glucoside in wheat and maize. *Food Additives and Contaminants*, 26(4), 507–511. <https://doi.org/10.1080/02652030802555668>
- Bhat, M.K., 2000. Cellulase and related enzymes İn *Biotechnology. Biotech. Advances*. 18(5):355-383.
- Bingöl, A., (1998), *Dondurulmuş Gıdaların Mikrobiyolojik Yönden İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, İstanbul üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, İstanbul.
- Bischoff, K. M., Rooney, A. P., Li, X. L., Liu, S., and Hughes, S. R. 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 28(21), 1761–1765. <https://doi.org/10.1007/S10529-006-9153-0>

- Bora, S. J., Handique, J., and Sit, N. 2017. Effect of ultrasound and enzymatic pre-treatment on yield and properties of banana juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 445–451.
<https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2017.01.039>
- Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J. 2004. Carbohydrate-Binding modules: Fine-Tuning polysaccharide recognition., *Biochem. J.*, 382: 769-781.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–25
- Brown Jr, R. M. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(3), 487-495.
- Büyükgök, E.B., Ötleş, S. 2011. Metaller ve Zeytinyağının Etkileşimi. *Zeytin Bilimi*, 2, 75-82,
- Caf, Y. 2012. Termofil *Bacillus* sp.'den Alkalın, Termofilik, Oksidant Dirençli Selüloz Üretimi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana
- Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., Burdaspal, P., Legarda, T. M., Ramos, A. J., Sanchis, V., and Marín, S. 2011. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia Spain. *Food Control*, 22(3–4), 490–495. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.09.033>
- Cemeroğlu, Bekir S., Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1. Cilt 5. Baskı, Ankara, 2013
- Chang, T. -S, Siddiq, M., Sinha, N. K., and Cash, J. N. 1995. Commercial Pectinases and The Yield and Quality of Stanley Plum Juice 1. *Journal Of Food Processing And Preservation*, 19(2), 89–101.
- Cheryan, M., and Alvarez, J. R. 1995. Chapter 9 Food and beverage industry applications. *Membrane Science and Technology*, 2(C), 415–465.
[https://doi.org/10.1016/S0927-5193\(06\)80011-2](https://doi.org/10.1016/S0927-5193(06)80011-2)

- Choudhari, S. M., and Ananthanarayan, L. 2007. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*, 102(1), 77–81.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.04.031>
- Chen, Z., Meng, T., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., He, N., and Liang, D. 2017. Characterization of a beta-glucosidase from *Bacillus licheniformis* and its effect on bioflocculant degradation. *AMB Express*, 7(1).
<https://doi.org/10.1186/S13568-017-0501-3>
- Christakopoulos, P., Hatzinikolaou, D. G., Fountoukidis, G., Kekos, D., Claeysens, M., and Macris, B. J., 1999. Purification and Mode of Action of An Alkali-Resistant Endo-1,4-B-Glucanase From *Bacillus Pumilis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 364(1):61-66.
- Coughlan, M. P. 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 3(1), 39-110.
- Çankaya, N. and Sökmen, Ö. 2016. Selüloz-Cloisite kili içeren biyonanokompozitler. In 1st International Academic Research Congress, Antalya/Side.
- Çelik, G.Y., Aslım, B., Beyazlı, Y. 2008. Characterization and Production of The Exopolysaccharide (EPS) From *Pseudomonas Aeruginosa* G1 And *Pseudomonas Putida* G12 Strains, *Carbohydrate Polymers*, 73, s.178–182,
- Da Silva, R. N., Melo, L. F. de A., and Luna Finkler, C. L. 2021. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 29.
<https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2021.E00599>
- Darcan, S., ve Sarıgül, N. (2015). Mikroorganizmalardan tek hücre yağları üretimi. *Türk Mikrobiyal Cem Derg*, 45, 55-67.
- Das, S., Dash, H., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S., 2014. Understanding Molecular Identification and Polyphasic Taxonomic Approaches For Genetic Relatedness and Phylogenetic Relationships of Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 2014 (103), 80-100.
- Davies, G., and Henrissat, B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853-859.

- De Araújo, E. A., de Oliveira Neto, M., and Polikarpov, I. 2019. Biochemical characterization and low-resolution SAXS structure of two-domain endoglucanase BICel9 from *Bacillus licheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1275–1287. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9508-1>
- De Marco, É. G., Heck, K., Martos, E. T., and Van Der Sand, S. T. 2017. Purification and characterization of a thermostable alkaline cellulase produced by *Bacillus licheniformis* 380 isolated from compost. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(3), 2359–2370. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170408>
- Doi, R. H. 2008. Cellulosomes from mesophilic bacteria. In *Bioenergy* Washington, DC, USA, ASM Press., 97-106
- Doria, E., Buonocore, D., Marra, A., Bontà, V., Gazzola, A., Dossena, M., Verri, M., and Calvio, C. 2022. Bacterial-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cauliflower. *Plants* Basel, Switzerland, 11(6). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11060816>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C. and Schorr-Galindo, S. 2012. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.08.083>
- Elsababty, Z. E., Abdel-Aziz, S. H., Ibrahim, A. M., Guirgis, A. A., and Dawwam, G. E. 2022. Purification, biochemical characterization, and molecular cloning of cellulase from *Bacillus licheniformis* strain Z9 isolated from soil. *Journal, Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/S43141-022-00317-4>
- El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H. A. H., and El-Toukhy, N. M. K. 2010. Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber*. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6355–6364. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92266>
- Endo, K., Hakamada, Y., Takizawa, S. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced

- amino acid sequences. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 109–116 (2001).
<https://doi.org/10.1007/s002530100744>
- Ercan, S., 2005. Sıcak Su Kaynaklarından Termofilik Bakteri Türlerinin İzolasyonu ve İdentifikasyonu. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Ergene, E., and Avcı, A. 2016. Microbial exopolisaccharides. *Sakarya University Journal of Science*, 20(2), 193–202.
<https://doi.org/10.16984/SAUFENBILDER.91974>
- Freitas, F., Alves, V. D., Pais, J., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, R., and Reis, M. A. M. 2010. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. *Process Biochemistry*, 45(3)297–305.
<https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2009.09.020>
- Garcia, A., Brenes, M., Moyano, M. a. J., Alba, J., García, P. ve Garrido, A., 2001. Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation, *Journal of Food Engineering*, 48 (3), 189-194.
- Gaur, R., and Tiwari, S. (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnology*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/S12896-015-0129-9>
- Geddes, C. C., Mullinnix, M. T., Nieves, I. U., Peterson, J. J., Hoffman, R. W., York, S. W., Yomano, L. P., Miller, E. N., Shanmugam, K. T., and Ingram, L. O. 2011. Simplified process for ethanol production from sugarcane bagasse using hydrolysate-resistant *Escherichia coli* strain MM160. *Bioresour Technol*, 12(3), 2702–2711.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.10.143>
- Gismondo, M. R., Drago, L., and Lombardi, A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International journal of antimicrobial agents*, 12(4), 287-292.
- Gözükar, F., Arkan, B., 2012, Termofil *Bacillus* sp. Bakterisinden Lichenaz (β -1,3 ve 1,4 Glukanase) Enzimi Üretimi, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik

- Kullanılabilirliği, Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 27(5), 121-127.
- Godfrey, T., S West,S., 1996. Introduction to industrial enzymology, Industrial enzymology, MacMillan Press Ltd 2nd et. London, England
- Guta, M., Abebe, G., Bacha, K., and Cools, P. 2024. Screening and characterization of thermostable enzyme-producing bacteria from selected hot springs of Ethiopia. Microbiology Spectrum, 12(3). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.03710-23>
- Gupta, K., Chatterjee, C. and Gupta, B. 2012. Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), West Bengal, India. Biologia, 67(5), 827–836. <https://doi.org/10.2478/S11756-012-0099-5/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Güven, R. G. 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 9(1), 1–10. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110101.pdf
- Hadj-Taieb, N. 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
- Haki, G. D., and Rakshit, S. K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Bioresource technology, 89(1), 17-34.
- İspirli, H. 2016. Erzincan Tulum Peynirinden Laktik Asit Bakterilerinin (Lab) İzolasyonu, Moleküler Metotlarla Tanımlanması ve Ekzopolisakkarit (Eps) Üretim Potansiyellerinin Genetik Olarak Belirlenmesi.Yüksek Lisans Tezi,Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzincan
- Haliskaranfil, S. 2012. Termoalkalifilik Amilaz ve Selülaz Enzim (Multienzim) Üreticisi Bacillus Sp. İzolasyonu, Enzimlerin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulanabilirliği. <https://Acikbilim.Yok.Gov.Tr/Handle/20.500.12812/137912>
- Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M., and Doi, R. H. 2003. Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in Clostridium cellulovorans. Journal of bacteriology, 185(20), 6067-6075.

- Hockenberger, A., 2004. Tekstil Fiziği (1. Baskı). Alfa Yayıncılık, İstanbul.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. 559 p.
- [Http://Www.Cazy.Org/Carbohydrate-Binding-Modules.Html](http://Www.Cazy.Org/Carbohydrate-Binding-Modules.Html) (Erişim Tarihi 15/05/2021)
- [Http://Www.Cazy.Org/Glycoside-Hydrolases.Html](http://Www.Cazy.Org/Glycoside-Hydrolases.Html) (Erişim Tarihi 16/05/2021)
- [Https://Www.Easybiologyclass.Com/Polysaccharides-Structure-Classification-And-Examples-Biochemistry-Lecture-Notes/](https://Www.Easybiologyclass.Com/Polysaccharides-Structure-Classification-And-Examples-Biochemistry-Lecture-Notes/)
- Hu, Y., Zhang, G., Li, A., Chen, J., and Ma, L. 2008. Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-derived metagenomic library with an efficient approach. Applied microbiology and biotechnology, 80, 823-830.
- Huang X. P., and Monk C., 2004. Purification and characterization of A Cellulase (Cmcase) from A Newly isolated thermophilic aerobic bacterium caldibacillus cellulovoransgen. Nov., Sp. Nov. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20:85-92.
- Huang, M., Huang, S., Wang, Q., Hayat, K., Ahmad, M., Ying, R., and Hussain, S. 2022. Mixed pretreatment based on pectinase and cellulase accelerates the oil droplet coalescence and oil yield from olive paste. Food Chemistry, 369, 130915.
- Hürtaş Tatlı, İ.S. 2013. Termohalofil Bacillus Sp.'Den (Asidik, Alkali ve Nötral) Selüloz Enzimi Üretimi ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana
- Ibrahim, A. M., Hamouda, R. A., El-Naggar, N. E. A. and Al-Shakankery, F. M. 2021. Bioprocess development for enhanced endoglucanase production by newly isolated bacteria, purification, characterization and in-vitro efficacy as anti-biofilm of Pseudomonas aeruginosa. Scientific Reports 2021 11:1, 11(1), 1–24. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87901-9>
- Iconomou, D., Arapoglou, D., and Israilides, C. 2010. Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. Grasas y Aceites, 61(3), 303-311.

- Iqbal, H. M. N., Ahmed, I., Zia, M. A., and Irfan, M. 2011. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 02 (03), 149–156. <https://doi.org/10.4236/ABB.2011.23024>
- İnan, K., 2011. İzmir ve Aydın İllerindeki Bazı Kaplıcalardan İzole Edilen Termofilik Bakteri İzolatlarının Moleküler Taksonomisi ve D1021 İzolatının Glukoz İzomerazın Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Jaeger, K. E., and Eggert, T. 2004. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(4), 305–313. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2004.06.007>
- Javed, M. R., Rashid, M. H., Nadeem, H., Riaz, M., and Perveen, R. 2009. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(3), 483–497. <https://doi.org/10.1007/S12010-008-8331-Z>
- Jayasekara, S., and Ratnayake, R. 2019. Microbial cellulases: an overview and applications. *Cellulose*, 22, 92.
- Kabataş, B. 2013. Stronsiyumu tolere eden bakterilerin 16S rDNA sekanslaması ile tanımlanması. <http://acikerisim.kku.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12587/16895>
- Kahya, S., Buyukcangaz, E., and Carlı, K. T. 2013. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. *Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 32(1), 31–38. <https://dergipark.org.tr/en/pub/uluvfd/issue/13516/163496>
- Kalkan, S., 2006, Çiğ Sütte *Bacillus Cereus* Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara
- Karcıoğlu Batur, L., Aygan A., 2015, Kahramanmaraş Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Tarafından Alfa-Amilaz Üretimi ve Karakterizasyonu, *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(2), 68-74.
- Karim, A., Bibi, Z., Nawaz, M. A., Aman, A., and Qader, S. A. U. 2021. Thermodynamics, kinetics and optimization of catalytic behavior of

- polyacrylamide-entrapped carboxymethyl cellulase (CMCase) for prospective industrial use. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(11), 2417–2427. <https://doi.org/10.1007/S00449-021-02614-7>
- Karim, A., Bibi, Z., Rehman, H. U., Aman, A., Qader, S. A. U., and Rashid, M. H. 2021. Single step immobilization of CMCase within agarose gel matrix: Kinetics and thermodynamic studies. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 200. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2021.111583>
- Kavutçu, M., 2014. Su, Asitler, Bazlar ve Tampon çözeltiler. *Biyokimya Açıklamalı, Soru ve Cevaplı Ed.: K.Sunguroğlu, Pegem Yayıncılık. Ankara*, 33-40
- Keha, E., and Küfrevioğlu, İ. 2014. *Biyokimya* (10th ed.). Aktif Yayınevi.
- Khadka, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Bhandari, M., Baidya, P., Sijapati, J., and Maharjan, J. 2022. Production Optimization and Biochemical Characterization of Cellulase from *Geobacillus* sp. KP43 Isolated from Hot Spring Water of Nepal. *BioMed Research International*, <https://doi.org/10.1155/2022/6840409>
- Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U., and Dostbil, N. 2006. Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. *Fen ve Mühendislik Derg*, 9, 12-19.
- Kim, D., and Ku, S. 2018. *Bacillus* Cellulase Molecular Cloning, Expression, and Surface Display on the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *Molecules* 23(2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23020503>
- Kristjansson, J. K. 1989. Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. *Trends in Biotechnology*, 7(12), 349-353.
- Kuhad, R. C., Gupta, R., and Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21912738/>
- Kumar, R., and Wyman, C. E. 2009. Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies. *Biotechnology progress*, 25(3), 807-819.
- Kurt, Z., and Turgay, Ö. 2022. Maraş Et Sucuğunda Ekzopolisakkarit Üreten Mikroorganizmaların Tespiti. *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 12(1), 11–20. <https://doi.org/10.53518/MJAVL.974714>
- Labes, A., Karlsson, E. N., Fridjonsson, O. H., Turner, P., Hreggvidson, G. O., Kristjansson, J. K., and Schönheit, P. 2008. Novel members of glycoside

- hydrolase family 13 derived from environmental DNA. *Applied and environmental microbiology*, 74(6), 1914-1921.
- Ladisch, M. R., Hong, J., Voloch, M., and Tsao, G. T. 198). Cellulase kinetics. *Basic Life Sciences*, 18, 55–83. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3980-9_5
- Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- Lakhundi, S., Siddiqui, R., and Khan, N. A. 2015. Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of *Acanthamoeba* infections. *Parasites and vectors*, 8, 1-16.
- Lamed, R., Setter, E. V. A., and Bayer, E. 1983. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *Journal of bacteriology*, 156(2), 828-836.
- Lavanya, D. K. P. K., Kulkarni, P. K., Dixit, M., Raavi, P. K., and Krishna, L. N. V. 2011. Sources of cellulose and their applications. *International Journal of Drug Formulation and Research*, 2(6), 19-38.
- Lee, C. R., Sung, B. H., Lim, K. M., Kim, M. J., Sohn, M. J., Bae, J. H., and Sohn, J. H. 2017. Co-fermentation using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains Hyper-secreting Different Cellulases for the Production of Cellulosic Bioethanol. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-04815-1>
- Lee, H. J. and Brown Jr, R. M. 1997. A comparative structural characterization of two cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*: a high resolution electron microscopy study. *Journal of biotechnology*, 57(1-3), 127-136.
- Lee, S. M., and Koo, Y. M. 2001. Pilot-scale production of cellulase using *Trichoderma Reesei* rut C-30 fed-batch mode. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(2), 229-233.
- Li, Y., Qi, B., and Wan, Y. 2014. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 167, 324–330. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.06.035>
- Liang, Y. L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y., and 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, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/512497>
- Liu, W., Brennan, M., Tu, D., and Brennan, C. 2023. Influence of α -amylase, xylanase and cellulase on the rheological properties of bread dough enriched with oat bran. Scientific Reports, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-023-31591-Y>
- Liu, Z. L., and Dien, B. S. 2022. Cellulosic Ethanol Production Using a Dual Functional Novel Yeast. International Journal of Microbiology, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7853935>
- Logan N A, Turnbull P.C.B., 1999. *Bacillus* and recently derived genera. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Editors). Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, P:357-358.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and molecular biology reviews, 66(3), 506-577.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2017. Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ondördüncü Baskıdan Çeviri
- Maki, M., Leung, K. T., and Qin, W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. International journal of biological sciences, 5(5), 500.
- Malik, W. A., and Javed, S. 2021. Biochemical Characterization of Cellulase From *Bacillus subtilis* Strain and its Effect on Digestibility and Structural Modifications of Lignocellulose Rich Biomass. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 800265. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.800265/BIBTEX>
- Man, Y. C., Asbi, A., Azudin, M. ve Wei, L., 1996, Aqueous enzymatic extraction of coconut oil, Journal of the American Oil Chemists' Society, 73 (6), 683-686.
- Mandels, M., 1985. Applications Of Cellulases. Biochem. Soc. Trans., 13, 414-415. Microbiol. Rev., 13, 25-58.
- Mıdık, F. 2011. Bazı Laktik Asit Bakterilerinin Ekzopolisakkarit (Eps) Üretimi Yönünden İncelenmesi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., and Kennes, C. 2017. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes. *International Journal of Microbiology*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6943952>
- Mohapatra, B. R. 2017. Kinetic and thermodynamic properties of alginate lyase and cellulase co-produced by *Exiguobacterium* species Alg-S5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 103–110. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.01.091>
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., and Youngblood, J. 2011. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3941-3994.
- Moreau, R. A., Johnston, D. B., Powell, M. J., and Hicks, K. B. 2004. A comparison of commercial enzymes for the aqueous enzymatic extraction of corn oil from corn germ. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(11), 1071-1075.
- Motuk, F. 2020. Farklı Zeytin Çeşitlerinden Soğuk Preslenmiş Zeytinyağlarının Biyoaktif Bileşenleri Üzerine Selüloz ve Papain Enzimlerinin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Konya.
- Nelson, D. L., and Cox, M. M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry* (3rd ed.). Worth Publishers.
- Nidetzky, B., and Claeysens, M. 1994. Specific quantification of *Trichoderma reesei* cellulases in reconstituted mixtures and its application to cellulase–cellulose binding studies. *Biotechnology and bioengineering*, 44(8), 961-966.
- Niyonzima, F. N. 2019. Detergent-Compatible Bacterial Cellulases. *Journal Of Basic Microbiology*, 59(2), 134–147. <https://doi.org/10.1002/Jobm.201800436>
- Obeng, E. M., Budiman, C., and Ongkudon, C. M. 2017. Identifying additives for cellulase enhancement—A systematic approach. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 67–74. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2017.06.006>
- Okutucu, B., and Pehlivan, S. 2003. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *Arşiv*, 12, 138.

- Özcan, E., and Öner, E. T. 2015. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass sources. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*, 161–184. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_51
- Pagan, A., Conde, J., Ibarz, A., and Pagána, J. 2010. Albedo hydrolysis modelling and digestion with reused effluents in the enzymatic peeling process of grapefruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(14), 2433–2439. <https://doi.org/10.1002/JSFA.4103>
- Pandey, S., Tiwari, R., Singh, S., Nain, L., and Saxena, A. K. 2014. Evaluation of β -1,4-endoglucanases produced by bacilli isolated from paper and pulp mill effluents irrigated soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1073–1080. <https://doi.org/10.4014/JMB.1311.11051>
- Pradhan, D., Abdullah, S., and Pradhan, R. C. 2021. Chironji (*Buchanania lanzan*) fruit juice extraction using cellulase enzyme: modelling and optimization of process by artificial neural network and response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 58(3), 1051–1060. <https://doi.org/10.1007/S13197-020-04619-8>
- Patindol, J., Wang, L., and Wang, Y. J. 2007. Cellulase-assisted extraction of oligosaccharides from defatted rice bran. *Journal of Food Science*, 72(9). <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2007.00551.X>
- Petrova, P., Arsov, A., Ivanov, I., Tsigoriyna, L., and Petrov, K. 2021. New Exopolysaccharides Produced by *Bacillus licheniformis* 24 Display Substrate-Dependent Content and Antioxidant Activity. *Microorganisms*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9102127>
- Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., and Laurinavichius, K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavitherms* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2109-2117.
- Pitt, J. I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56(1), 184–192. <https://doi.org/10.1258/0007142001902888>

- Ponpium, P., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K. L. 2000. Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic *Bacteroides* sp. strain P-1. *Enzyme and microbial technology*, 26(5-6), 459-465.
- Priya, I., Dhar, M. K., Bajaj, B. K., Koul, S., and Vakhlu, J. 2016. Cellulolytic Activity of Thermophilic Bacilli Isolated from Tattapani Hot Spring Sediment in North West Himalayas. *Indian Journal of Microbiology*, 56(2), 228–231.
<https://doi.org/10.1007/S12088-016-0578-4>
- Puri, M., Kaur, A., Schwarz, W. H., Singh, S., and Kennedy, J. F. 2011. Molecular characterization and enzymatic hydrolysis of naringin extracted from kinnow peel waste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 58–62.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2010.09.012>
- Purohit, A., Pawar, L., and Yadav, S. K. 2023. Structural and functional insights of a cold-adaptive β -glucosidase with very high glucose tolerance from *Microbacterium* sp. CIAB417. *Enzyme and Microbial Technology*, 169.
<https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2023.110284>
- Radchenkova, N., Tomova, A., and Kambourova, M. 2011. Biosynthesis of an Exopolysaccharide Produced by *Brevibacillus Thermoruber* 438. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 25(SUPPL. 4), 77–79.
<https://doi.org/10.5504/BBEQ.2011.0115>
- Ranalli, A., and Serraiocco, A. 1996. Quantitative and qualitative effects of a pectolytic enzyme in olive oil production. *Grasas y Aceites*, 47(4), 227-236.
- Rawat, R., and Tewari, L. 2012. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, 16(4), 637–644.
<https://doi.org/10.1007/S00792-012-0463-Y>
- Renouard, S., Hano, C., Corbin, C., Fliniaux, O., Lopez, T., Montguillon, J., Barakzoy, E., Mesnard, F., Lamblin, F., and Lainé, E. 2010. Cellulase-assisted release of secoisolariciresinol from extracts of flax (*Linum usitatissimum*) hulls and whole seeds. *Food Chemistry*, 122(3), 679–687.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.03.036>

- Rey, M. W., Ramaiya, P., Nelson, B. A., Brody-Karpin, S. D., Zaretsky, E. J., Tang, M., de Leon, A., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, I. G., Olsen, P. B., Rasmussen, M. D., Andersen, J. T., Jørgensen, P. L., Larsen, T. S., Sorokin, A., Bolotin, A., Lapidus, A., Galleron, N., ... Berka, R. M. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, 5(10), r77. <https://doi.org/10.1186/GB-2004-5-10-R77>
- Rüzgar, D. 2019. *Bacillus licheniformis* Osbs6'dan Amilaz ve Proteaz Enzimlerinin Üçlü Faz Ayırma Sistemi (Tpp) ile Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Saddler, J. N. 1986. Factors limiting the efficiency of cellulase enzymes. *Microbiol. Sci*, 3(3), 84-87.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S. K., Mayilraj, S., and Maiti, T. K. 2013. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *SpringerPlus*, 2(1), 1-10.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Saranraj, P., Stella, D., and Reetha, D. 2012. Microbial cellulases and its applications. *International Journal of Biochemistry and Biotechnology Science*, 1, 1-12.
- Sanchez-Bel, P., Egea, I., Serrano, M., Romojaro, A., and Pretel, M. T. 2012. Obtaining and storage of ready-to-use segments from traditional orange obtained by enzymatic peeling. *Food Science and Technology International = Ciencia y Tecnologia de Los Alimentos Internacional*, 18(1), 63–72. <https://doi.org/10.1177/1082013211414208>
- Sarıgül, N., 2007. Ege Bölgesi'ndeki Çeşitli Sıcak Su Kaynaklarından *thermus* Genusu Bakterilerin İzolasyonu, Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyonu ve β -galaktosidaz Aktivitesinin Saptanması. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Sevinç, N. 2010. Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Sp. Suşlarından Proteaz Üretimi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Bursa

- Sharma, A., Shrivastava, A., Sharma, S., Gupta, R., and Kuhad, R. C. 2013. Microbial pectinases and their applications. *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*, 107–124. https://doi.org/10.1007/978-81-322-0876-1_7/COVER
- Segel, H.I. and Woodin, T.S., 1968. Glutathione reductase-dependent metabolism of cysteine- S-sulfate by *Penicillium chrysogenum*. *Biochim. Biophys., Acta* 167(1), 78-88.
- Sheehan, J., and Himmel, M. 1999. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US Department of Energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnology Progress*, 15(5), 817-827.
- Shyaula, M., Regmi, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Dhakal, A., Koirala, D., Sijapati, J., Singh, A., and Maharjan, J. 2023. Characterization of Thermostable Cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L Isolated from the Himalayan Soil. *International Journal of Microbiology*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/3615757>
- Simsek, S., Burgess, K., Whitney, K. L., Gu, Y., and Qian, S. Y. 2012. Analysis of Deoxynivalenol and Deoxynivalenol-3-glucoside in wheat. *Food Control*, 26(2), 287–292. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.01.056>
- Singh, J., Batra, N., and Sobti, R. C. 2001. A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 761-765.
- Smith, J. E. 2004. Public perception of biotechnology. *Basic biotechnology*, 3rd Edition, ed. Colin Ratledge, Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Soyuçok, A., Ekiz, T., and Kılıç, G. B. 2016. Ekzopolisakkaritlerin Özellikleri ve Gıda Sanayindeki Önemi. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi Targid Özel Sayı*, 332–344. <https://doi.org/10.17100/Nevbiltek.211029>
- Springmann, M., Clark, M., Mason-D'Croz, D., Wiebe, K., Bodirsky, B. L., Lassaletta, L., de Vries, W., Vermeulen, S. J., Herrero, M., Carlson, K. M., Jonell, M., Troell, M., DeClerck, F., Gordon, L. J., Zurayk, R., Scarborough, P., Rayner, M., Loken, B., Fanzo, J., Willett, W. 2018. Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature*, 562 (7728), 519–525. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0594-0>

- Sreenath, H. K., Sudarshanakrishna, K. R., and Santhanam, K. 1994. Improvement of juice recovery from pineapple pulp/residue using cellulases and pectinases. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(6), 486–488. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(94\)90054-X](https://doi.org/10.1016/0922-338X(94)90054-X)
- Srivastava, S., and Tyagi, S. K. 2013. Effect of Enzymatic Hydrolysis on the Juice Yield from Apple Fruit (*Malus Domestica*) Pulp. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 4(4), 299–306. <http://www.ripublication.com/ijbbr.htm>
- Sukumaran, R. K., Singhanian, R. R., and Pandey, A. 2005. Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2005, 64(11): 832.
- Sumner, J.B., 1921. Dinitrosalicylic acid: A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine. *J. Biol. Chem.* 47:5-9.
- Szakacs-Dobozi, M., Halasz, A., Kozma-Kovacs, E., and Szakacs, G. 1988. Enhancement of mustard oil yield by cellulolytic pretreatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 29, 39-43.
- Şahabat, S. 2019. Termofilik *Bacillus licheniformis* Bakterisinden Fitaz Enzim Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kars
- Şentürk, M. 2009. İnsan eritrosit karbonik anhidraz I ve II izoenzimlerinin saflaştırılması için yeni afinite jellerinin hazırlanması ve yeni sentezlenen bazı sülfonamid türevlerinin bu izoenzimler üzerindeki inhibisyon kinetiklerinin incelenmesi . Doktora Tezi, Atatürk üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum
- Teather, R. M., and Wood, P. J., 1982. Use of Congo red- polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(4):777.
- Teeri, T. T., Penttilä, M., Keränen, S., Nevalainen, H., and Knowles, J. K. 1992. Structure, function, and genetics of cellulases. *Biotechnology*, 21, 417-445.
- Toushik, S. H., Lee, K. T., Lee, J. S., and Kim, K. S. 2017. Functional Applications of Lignocellulolytic Enzymes in the Fruit and Vegetable Processing Industries. *Journal of Food Science*, 82(3), 585–593. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13636>

- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., and Jha, B. 2011. An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 891–897.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2010.08.069>
- Tuşar, F. R. 2021. Çeşitli Mezofilik ve Termofilik Bakterilerde Ekzopolisakkarit Üretimi, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Türkan, F. 2015. Karayemiş meyvesinden (*Prunus Laurocerasus* L.) glutatyon transferaz enziminin saflaştırılması, karakterizasyonu ve kinetik özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Uluçay, O., Gormez, A., and Ozic, C. 2022. Identification, characterization and hydrolase producing performance of thermophilic bacteria: geothermal hot springs in the Eastern and Southeastern Anatolia Regions of Turkey. *Antonie van Leeuwenhoek*, 115(2), 253–270. <https://doi.org/10.1007/S10482-021-01678-5>
- Ustaçelebi, Ş. 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Sayfa: 411-412, 624-625.
- Valjamae, P., Sild, V., Pettersson, G., and Johansson, G. 1998. The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface–erosion model. *European Journal of Biochemistry*, 253(2), 469-475.
- Vidal, A., Ambrosio, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., and Marín, S. 2016. Enzyme bread improvers affect the stability of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during breadmaking. *Food Chemistry*, 208, 288–296.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.04.003>
- Vijayalakshmi, S., Govindarajan, M., Al-Mulahim, N., Ahmed, Z., and Mahboob, S. 2021. Cellulase immobilized magnetic nanoparticles for green energy production from *Allamanda schottii* L: Sustainability research in waste recycling. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 901–910.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.034>

- Vilariño, M. V., Franco, C., and Quarrington, C. 2017. Food loss and waste reduction as an integral part of a circular economy. *Frontiers in Environmental Science*, 257971. <https://doi.org/10.3389/FENV.S.2017.00021/BIBTEX>
- Wadhwa, M., and Bakshi, M. P. S. 2013. Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value-added products. www.fao.org/
- Wang, S., Liu, Z., Zhao, S., Zhang, L., Li, C., and Liu, S. 2023. Effect of combined ultrasonic and enzymatic extraction technique on the quality of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 92, 106231. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2022.106231>
- Will, F., Roth, M., Olk, M., Ludwig, M., and Dietrich, H. 2008. Processing and analytical characterisation of pulp-enriched cloudy apple juices. *LWT*, 41(10), 2057–2063. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2008.01.004>
- Wilson, D. B. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 289-297.
- Yalçın, S., Öztürk, Ş., Keloğlu, B. 2018. Atık Sulardan İzole Edilen *Pseudomonas* spp.'lerin Ekzopolisakkarit Üretimine Bazı Ağır Metallerin Etkisi. *Hacı Bektaş Üniversitesi Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(2), 223–239. <https://doi.org/10.17100/nevbiltek.402196>
- Yin, L. J., Huang, P. S., and Lin, H. H. 2010. Isolation of Cellulase-Producing Bacteria and Characterization of the Cellulase from the Isolated Bacterium *Cellulomonas* Sp. YJ5. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9833–9837. <https://doi.org/10.1021/JF1019104>
- Yoon, K. Y., Cha, M., Shin, S. R., and Kim, K. S. 2005. Enzymatic production of a soluble-fibre hydrolyzate from carrot pomace and its sugar composition. *Food Chemistry*, 92(1), 151–157. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.07.014>
- Yu, H., Ren, X., Liu, Y., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., and Yao, W. 2019. Extraction of *Cinnamomum camphora* chvar. Borneol essential oil using neutral cellulase assisted-steam distillation: optimization of extraction, and analysis of chemical constituents. *Industrial Crops and Products*, 141, 111794.

- Yu, Y. J., Chen, Z., Chen, P. T., and Ng, I. S. 2018. Production, characterization and antibacterial activity of exopolysaccharide from a newly isolated *Weissella cibaria* under sucrose effect. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(6), 769–777. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2018.05.028>
- Zhao, C., Fang, H., and Chen, S. 2017. Single cell oil production by *Trichosporon cutaneum* from steam-exploded corn stover and its upgradation for production of long-chain α , ω -dicarboxylic acids. *Biotechnology for biofuels*, 10(1), 1-16.
- Zhou, F. Wu, Z., Chen, C., Han, J.L. , Ai, B. Guo, 2014 “Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties,” *Food Hydrocolloid*, vol.36, pp.362- 368,

