

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

İnci Suna HÜRTAŞ TATLI

**TERMOHALOFİL *BACILLUS* sp.'DEN (ASİDİK, ALKALİ VE NÖTRAL)
SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2013

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TERMOHALOFİL *BACILLUS* sp. DEN SELÜLAZ ENZİMİ (ASİDİK, ALKALİ
VE NÖTRAL) ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

İnci Suna HÜRTAŞ TATLI

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu Tez/....../2013 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof.Dr.Burhan ARIKAN
DANIŞMAN

.....
Prof.Dr.HaticeKORKMAZGÜVENMEZ
ÜYE

.....
Prof.Dr.KadirAYDIN
ÜYE

.....
Doç.Dr.Ramazan BİLGİN
ÜYE

.....
Yrd. Doç. Dr. Özlem EREN KIRAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

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

**Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FEF2010D15**

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

ÖZ

DOKTORA TEZİ

TERMOHALOFİL *BACILLUS* sp.'DEN (ASİDİK,ALKALİ VE NÖTRAL) SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU

İnci Suna HÜRTAŞ TATLI

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Yıl: 2013, Sayfa: 137

Jüri : Prof. Dr. Hatice Korkmaz GÜVENMEZ

: Prof. Dr. Kadir AYDIN

: Doç. Dr. Ramazan BİLGİN

: Yrd. Doç. Dr. Özlem Eren KIRAN

Bu çalışmada, topraktan ve komposttan izole edilen termofilik *Bacillus* sp.suşlarından asidik, alkali ve nötral selülaaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bacillus sp.SC61 suşundan izole edilen CMCaz optimum aktivitesini pH3.0 ve 60°C’de göstermiştir. pH2.0-6.0 aralığında %42, 80-100°C aralığında %72 stabil olduğu, MnCl₂ ve β-merkaptotetanolla indüklendiği ve NaCl’ün değişen konsantrasyonlarında %89 stabil olmasıyla halostabil olduğu belirlenmiştir. Enzimin son ürünü maltozdur. Moleküler ağırlığı 88 kDa olarak belirlenmiştir. SC61 CMCaz enziminin EDTA ile %52 inhibe olması metalloenzim yapısında olduğunu PMSF ile tamamen inhibe olması serin veya thiol grubu bulundurduğunu göstermektedir.

Bacillus sp.SC6 suşundan izole edilen CMCaz’ın optimum aktivitesini pH 6.0 ve 70°C’de gösterdiği, pH 4.0-8.0 aralığında %93, 50-90°C’de %97 stabil olduğu belirlenmiştir. Tween-20, β-merkaptotetanol, EDTA, MnCl₂ve NaCl ile indüklenmektedir. Enzimin son ürünü maltotriozdur ve moleküler ağırlığı 121kDa olarak hesaplanmıştır. PMSF ile %4 inhibe olması setin rezidüsü bulundurmadığını, EDTA ile %99 indüklenmesi metalloenzim yapısında olmadığını göstermektedir.

Bacillus sp.SC41 suşundan izole edilen enzimin optimum aktivitesi pH 12.0 ve 70°C’de göstermiştir. %3-25 NaCl varlığında ortalama %109 aktivite göstermiştir. Son ürünü maltoz olarak belirlenmiştir. 30-100°C’de %87 ve pH 9.0-12.0 aralığında %87 stabildir. Moleküler ağırlığı 76 kDa olarak hesaplanmıştır. EDTA ile %35 inhibe olan enzim metalloenzim özelliğindedir. PMSF’yle %31 inhibe olması serin rezidüsü bulundurduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlara göre elde edilen CMCaz enzimlerinin, biostoning ve biofinishing uygulamalarında, gazete kağıtlarının geri dönüştürülmesinde, meyve suyu endüstrisinde, biyoetanol ve biyoyakıt üretiminde kullanılması önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, CMCaz, asidik, alkali, nötral

ABSTRACT

PhD. THESIS

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF (ACIDIC, ALKALINE AND NEUTRAL) CELLULASE ENZYMES FROM THERMOHALOPHILE *BACILLUS sp.*

İnci Suna HÜRTAŞ TATLI

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Prof. Dr. Burhan ARIKAN

Year: 2013, Pages: 137

Jury : Prof. Dr. Hatice Korkmaz GÜVENMEZ

: Prof. Dr. Kadir AYDIN

: Assoc. Prof. Dr. Ramazan BİLGİN

: Asst. Prof. Dr. Özlem Eren KIRAN

In this study, *Bacillus sp.* strains which isolated from soil and compost were used for production and characterization of acidic, alkaline and neutral cellulase enzymes

Acidic CMCase of *Bacillus sp.*SC61 showed maximal activity at pH 3.0 and 60°C. The enzyme retained 42% and 72% of original activity at pH2.0-6.0 and temprature 80-100°C, respectively. MnCl₂ and β-mercaptoethanol induced activity. The end product of the CMCase was maltose. Molecular weight estimated as 88 kDa. CMCase inhibited with EDTA(52%) and completely inhibited with PMSF, these results shows the enzyme is a metalloenzyme and had serin residues Neutral CMCase from *Bacillus sp.*SC6 presented optimal activity at pH 6.0 and 70°C , this enzyme showed 93% and 97% of its optimal activity at pH 4.0-8.0 and 50-90°C, respectively. Tween-20, β-merkptoetanol, EDTA, MnCl₂ and NaCl induced enzyme activity. The end product of neutral CMCase was maltotriose. Molecular weight of the enzyme was detected as 121 kDa. The enzyme not inhibited with PMSF or EDTA, thus enzyme is not a metalloenzyme and serine protein.

For SC41 alkaline CMCase optimal activity pH and temprature detected as pH 12.0 and 70°C, respectively. The end product of enzymatic hydrolysis was determined as maltose. The enzyme was %87 stable at 30-100°C and 87% stable at pH 9.0-12.0. Molecular weight estimated as 76.1 kDa. 35% inhibition by EDTA shows that the enzyme is a metalloenzyme, 31% inhibition with PMSF shows that SC41 CMCase has serine residues.

These results show that the isolated enzymes can be used for biostoning and biofinishing in textile industry, biological deinking of wastepapers, fruit juice industry, bioethanol and biofuel production.

Keywords: *Bacillus*, CMCase, acidic, neutral, alkaline.

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim boyunca bilgisi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan ve tüm çalışmalarımda desteğini benden esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Burhan ARIKAN'a teşekkürü borç bilirim.

Doktora çalışmalarım sırasında bana her zaman yardımcı olan sayın Prof. Dr. Hatice KORKMAZ GÜVENMEZ'e teşekkür ederim.

Lisans üstü eğitimim sırasında tüm yardımları, güler yüzleri ve dostlukları için Moleküler Biyoloji Laboratuvarı Yüksek Lisans ve Doktora Öğrencisi Arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Toprak ve kompost örneklerimin temini sırasında gösterdiği ilgi ve özveri için Sayın Zakir ZENGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

İlk günden beri yanımda olan beni sabırla dinleyen kıymetli arkadaşım S. Berna KUZU'ya bana olan desteği için minnettarım.

Sevgili eşim Can Fatih TATLI'ya her zaman yanımda olduğu ve desteğini bir an olsun esirgemediği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olduğunu bildiğim babam Ayhan HÜRTAŞ'a teşekkürü borç birlim.

Gölgesini her an üzerimde hissettiğim yaşama sebebim, canım annem Oya (Suna) HÜRTAŞ'a, hayatım boyunca, hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bana destek olduğu ve yol gösterdiği için ne kadar teşekkür etsem azdır.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGE VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1.Enzimler ve Bazı Özellikleri	4
1.2.Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması	6
1.2.1.Oksidoredüktazlar	6
1.2.2.Transferazlar	6
1.2.3.Hidrolazlar	7
1.2.4.Liyazlar	7
1.2.5. İsomeraazlar	7
1.2.6. Ligazlar	7
1.3. Selüloz	7
1.4. Selülaz	9
1.4.1.Serbest Enzim Sistemleri	10
1.4.2.Çok bileşenli (Multikomponent) enzimler	10
1.4.3.Selülozomlar	11
1.5.Selülazın Kullanım Alanları	11
1.5.1.Selülazların Gıda ve İçecek Endüstrisindeki Kullanım Alanları	11
1.5.2.Selülazların deterjan endüstrisinde kullanımları	12
1.5.3.Tekstil Endüstrisinde Selülazların Kullanımı	12
1.5.4.Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Selülazların Kullanımı	13
1.5.5.Hayvan Yemlerinde Selülazların Kullanımı	13
1.5.6.Diğer Alanlar	13
1.6. <i>Bacillus</i> Cinsinin Temel Özellikleri	14

1.7. Ekstremofiller ve Ekstremozimler.....	16
1.7.1. Termofiller	16
1.7.2. Alkalifiller ve Asidofiller	17
1.7.4. Halofiller	18
1.8. Protein İzolasyonu ve Saflaştırması	19
1.9. Kromotografi	20
1.9.1. İnce tabaka kromatografisi	20
1.10. Elektroforez	22
1.10.1. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	23
1.10.2. SDS-PAGE	24
1.10.3. Native Jel Elektroforezi	24
1.11. Çalışmanın Amacı	24
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	25
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. MATERYAL	35
3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisinde Kullanılan Besiyerleri	35
3.1.1.1. N1 agar	35
3.1.1.2. CMC-Agar	35
3.1.1.3. Enzim üretim besiyeri	36
3.1.2. Kullanılan Çözeltiler	36
3.1.2.1. NaOH Çözeltisi	36
3.1.2.2. Etanol	37
3.1.2.3. Kongo Kırmızısı	37
3.1.2.4. NaCl Çözeltisi	37
3.1.2.5. KCl-HCl Tamponu	37
3.1.2.6. Sitrat-fosfat tamponu	38
3.1.2.7. Sodyum-fosfat tamponu	38
3.1.2.8. Glisin-NaOH tamponu	39
3.1.2.9. Borax-NaOH tamponu	39
3.1.2.10. Dinitro Salisilik Asit (DNS)	39
3.1.3. Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar	40

3.1.3.1. Solüsyon A (Akrilamid Solüsyonu).....	40
3.1.3.2. Solüsyon B (4X)	40
3.1.3.3. Solüsyon C (4X)	40
3.1.3.4. Amonyum Persülfat (AMPS) %10	40
3.1.3.5.Yürütme Tamponu	40
3.1.3.6. Örnek Yükleme Tamponu	40
3.1.3.7. SDS Jel Boyama (Staining) Solüsyonu	41
3.1.3.8. SDS Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu	41
3.1.3.9.SDS-PAGE’de Zimogram Analizi İçin Renatürasyon Solüsyonları	41
3.1.4.İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları	42
3.1.4.1. Kloroform-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi	42
3.1.4.2. Anilin-Difenilamin-Ortofosforik Asit Çözeltisi	42
3.1.4.3. D-glukoz Çözeltisi	42
3.1.4.4. Maltoz çözeltisi.....	42
3.1.4.5. Maltotrioz Çözeltisi	42
3.2.Metod.....	43
3.2.1.Topraktan <i>Bacillus sp.</i> Suşlarının İzolasyonu	43
3.2.2.Bakterilerin teşhisi.....	43
3.2.3.Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	43
3.2.3.1. Katı besiyerinde CMCaz Aktivitesinin Belirlenmesi	43
3.2.3.2.Bakterilerin Katı Besiyerinde Ürettiği, Enzim Sentezlerinin Gerçekleştiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması.....	44
3.2.3.3. Sıvı kültürde CMCaz Enzimi üretimi ve Saflaştırılması	44
3.2.3.4. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığının Belirlenmesi	45
3.2.3.5.Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi	46
3.2.3.6. Enzimlerin Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi	47
3.2.3.7. Enzimlerin pH Stabilitelerinin Belirlenmesi.....	47
3.2.3.8. Enzimlerin Aktivitelerine NaCl’ün Etkisinin Belirlenmesi.....	48

3.2.3.9. İnhibitörlerin Enzim Aktivitesine Etkisi.....	48
3.2.4.Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) ile Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi.....	49
3.2.4.1. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması	49
3.2.4.2. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	50
3.2.4.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizi	50
3.2.5.Enzim Substrat Reaksiyonuna Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi	51
3.2.5.1.Enzimlere Ait Son Ürünlerin Saptanması.....	51
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1. <i>Bacillus sp.</i> Suşlarının İzolasyonu.....	53
4.2. Bakterilerin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	53
4.3. Suşların Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretme Özellikleri.....	54
4.3.1.SC61 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretme Özellikleri.....	54
4.3.2.SC6 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretme Özellikleri.....	55
4.3.3.SC41 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretimi Sonuçları	57
4.4. SC61 CMCaz Enziminin Karakterizasyonu.....	59
4.4.1.SC61 CMCaz Enziminin Katı Besiyerindeki Aktivitesi	59
4.4.2.SC61 CMCaz Enziminin Optimum pH Aralığı	59
4.4.3.SC61 CMCaz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklığı	61
4.4.4.SC61 CMCaz Enziminin pH Stabilesi	63
4.4.5.SC61 CMCaz Enziminin Termal Stabilesi	64
4.4.6.SC61 CMCaz Enziminin Aktivitesine NaCl'ün Etkisi	66
4.4.7.SC61 CMCaz Aktivitesine Şelatör İnhibitör ve Metal İyonlarının Etkisi	67
4.4.8.SC61 CMCaz Enziminin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesi	70
4.4.9.SC61 CMCaz Enziminin TLC Analizi.....	71
4.5. SC6 CMCaz Enziminin Karakterizasyonu.....	72

4.5.1.SC6 CMCaz Enziminin Katı Besiyerindeki Aktivitesi	72
4.5.2.SC6 CMCaz Enziminin Optimum pH Aralığı	72
4.5.3.SC6 CMCaz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklığı	73
4.5.4.SC6 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi	75
4.5.5.SC6 CMCaz enziminin termal stabilitesi	76
4.5.6.SC6 CMCaz enziminin aktivitesine NaCl'ün etkisi.....	78
4.5.7.SC6 CMCaz Aktivitesine Şelatör İnhibitör ve Metal İyonlarının Etkisi	79
4.5.8.SC6 CMCaz Enziminin SDS-PAGE Zimogram Analizi	82
4.5.9.SC6 CMCaz Enziminin TLC Analizi.....	83
4.6. SC41 CMCaz Enziminin Karakterizasyonu.....	83
4.6.1.SC41 CMCaz enziminin Katı besiyerindeki aktivitesi	83
4.6.2.SC41 CMCaz Enziminin Optimum pH Aralığı	84
4.6.3.SC41 CMCaz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklığı	85
4.6.4.SC41 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi	87
4.6.5.SC41 CMCaz Enziminin Termal Stabilitesi	88
4.6.6.SC41 CMCaz Enziminin Aktivitesine NaCl'ün Etkisi	90
4.6.7.SC41 CMCaz Aktivitesine Şelatör İnhibitör ve Metal İyonlarının Etkisi	92
4.6.8.SC41 CMCaz Enziminin SDS-PAGE Zimogram Analizi	95
4.6.9.SC41 CMCaz Enziminin TLC Analizi.....	95
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	97
KAYNAKLAR	123
ÖZGEÇMİŞ	137

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3. 1. KCl-HCl Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	37
Çizelge 3. 2. Sitrat-Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	38
Çizelge 3. 3. Sodyum-Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	38
Çizelge 3. 4. Glisin-NaOH Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması	39
Çizelge 3. 5. Örnek Yükleme Tamponunun Hazırlanması	41
Çizelge 4.1. SC61 Suşunun pH 4.0-7.0 aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim üretme sonuçları.	54
Çizelge 4. 2. SC6 Suşunun pH 5.0-8.0 aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim üretme sonuçları.	56
Çizelge 4. 3. SC41 Suşunun pH 8.0-13.0 aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim üretme sonuçları.	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 4. 1. <i>Bacillus sp.</i> SC61 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim	55
Şekil 4. 2. <i>Bacillus sp.</i> SC6 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim	56
Şekil 4. 3. <i>Bacillus sp.</i> SC41 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim	58
Şekil 4. 4. SC61 CMCaz Enziminin CMCagar Üzerindeki Aktivite Zonu.	59
Şekil 4. 5. SC61 CMCaz Enziminin Optimum pH Grafiği.....	60
Şekil 4. 6 SC61 CMCaz Enziminin Optimum Sıcaklık Grafiği.	62
Şekil 4. 7. SC61 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi Grafiği	63
Şekil 4. 8. SC61 CMCaz Enziminin Termal Stabilite Grafiği	65
Şekil 4. 9. SC61 CMCaz Enzimi Üzerine NaCl'ün Etkisi.....	66
Şekil 4. 10. SC61 CMCaz Enzime Şelatör, Metal İyonları ve İnhibitör Etkisi.	68
Şekil 4. 11. SC61 CMCaz enziminin SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Analizi	70
Şekil 4. 12. TLC Yöntemiyle SC61 CMCaz Enzime Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi.....	71
Şekil 4. 13. SC6 CMCaz Enziminin Optimum pH Grafiği.....	72
Şekil 4. 14. SC6 CMCaz Enziminin Optimum Sıcaklık Grafiği.	74
Şekil 4. 15. SC6 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi Grafiği.	75
Şekil 4. 16. SC6 CMCaz Enziminin Termal Stabilite Grafiği.	77
Şekil 4. 17. SC6 CMCaz Enzimi Aktivitesine NaCl'ün Etkisi	78
Şekil 4. 18. SC6 CMCaz Enzime Şelatör, Metal İyonları ve İnhibitör Etkisi	80
Şekil 4. 19. SC6 CMCaz Enziminin Zimogram Analizi Sonucu.....	82
Şekil 4. 20. TLC Yöntemiyle SC6 CMCaz Enzime Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi.....	83
Şekil 4. 21. SC41 CMCaz Enziminin CMCagar Üzerindeki Aktivite Sonucu.....	83
Şekil 4. 22. SC41 CMCaz Enziminin Optimum pH Grafiği.....	84
Şekil 4. 23. SC41 CMCaz Enziminin Optimum Sıcaklık Grafiği.	86
Şekil 4. 24. SC41 CMCaz enziminin pH Stabilitesi Grafiği.....	88
Şekil 4. 25. SC41 CMCaz Enziminin Termal Stabilite Grafiği.	89
Şekil 4. 26. SC41 CMCaz Enzimi Aktivitesine NaCl'ün Etkisi Grafiği	91
Şekil 4. 27. SC41 CMCaz Enzime İnhibitör, Metal İyonları ve İnhibitör Etkisi.....	92

Şekil 4. 28. SC41 CMCaz enziminin SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Analizi	95
Şekil 4. 29. TLC Yöntemiyle SC41 CMCaz Enzimine Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi.....	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

mM	: Milimolar
M	: Molar
CMC	: Karboksimetilselüloz
DNS	: Dinitrosalisilik asit
PMSF	: Fenil metil sülfonil florid
α	: Alfa
β	: Beta
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
AMPS	: Amonyum persülfat
v/v	: Hacim/hacim
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki dönüş sayısı)
dev.	: Devir
TLC	: Thin Layer Chromatography
EDTA	: Etilen diamino tetra asetik asit
sp.	: Tür
CBD	: Cellulose Binding Domain
EGTA	: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

1. GİRİŞ

Canlı dünyasında, her kimyasal reaksiyon kendine özgü bir enzim tarafından katalizlenir. Enzimler, aralarında çok küçük farklılıklar bulunan substratları dahi ayırdedebilecek yüksek özgüllüğe sahiptir. Buna ek olarak, ılımlı sıcaklık, basınç ve pH'da etki göstermeleri endüstriyel ve evsel uygulamalarda kullanılan ürünler için uygun olmalarını sağlamaktadır. Enzimlerin endüstriyel uygulamadaki ilk kullanımı geçen yüzyılın başlarında gerçekleşmiştir. Sığır pankreas ekstraktının kirli kumaşlardaki lekeleri çıkarmak için kullanılabileceğini gösteren Alman bilim adamı Röhm 1915 yılında çalışmasına patent almıştır (Röhm, 1915; Quax, 2006). Mikrobiyal fermentasyon çalışmalarının geçen yüzyılın ikinci yarısında gelişim göstermesi ile enzimlerin endüstriyel alandaki kullanımı artmıştır. Dünya genelindeki yeni çalışmalar, sürdürülebilir ve çevre dostu biyokatalitik prosesler için yeni enzimler üretmeyi amaçlamaktadır.

Tam karşılığı 'maya' olan enzim terimi 1876 yılında Buchner tarafından bulunmuştur. Fermentasyonun popüler bir araştırma konusu olarak kabul gördüğü dönemde Liebig ve Pasteur, fermentasyon prosesinin canlı hücre olmadan da gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini tartışmışlardır. 1897 yılında, Buchner, hücresiz maya ekstraktından alkolik fermentasyonunun gerçekleştirilebileceğini göstermiştir. (Bu deneysel başarının sebebi ekstraselüler enzimlerin varlığıydı). 1783 yılında, Spallanzani mide öz suyunun in vitro koşullarda eti sindirebildiğini göstermiş ve 1836 yılında Schwann aktif kısma, 'pepsin' adını vermiştir (Aehle, 2007).

Uzak doğu ülkelerinde enzim üretimi, bakteriyel ve filamentöz fungi kaynaklı enzimlerin, sake üretimi ve yiyeceklerin fermentasyonu uygulamalarıyla başlamıştır. Batıda ise, endüstriyel enzim anlayışı maya ve malt çevresinde dönerken geleneksel ekmekçilik ve biracılık büyük bir hızla gelişme göstermiştir. Biyokimyadaki en erken çalışmalar maya fermentasyonu ve nişastanın şekere dönüştürülmesi uygulamalarıdır. 1896 yılı, *Aspergillus oryzae*'den elde edilen hidrolitik enzim karışımının elde edilmesiyle, modern mikrobiyal enzim teknolojisi ve pazarının başlangıç yılı olmuştur.

Mikrobiyal enzimlerden önce enzim uygulamalarında bitkisel ve hayvansal kaynaklardan da yararlanılmıştır. Papain'den elde edilen papaya, incirden elde edilen ficin ve ananastan elde edilen bromelain ticari olarak hala önemli enzimlerdir. Hayvansal olarak da hala kullanılabilen enzimler vardır. Esteraz, proteaz, rennet, pepsin, kimozin, lizozim ve lipazlar, hayvansal kaynaklı bu enzimlere örnektir. Bu kaynaklar hala endüstriyel öneme sahip olsalar da, istikrarlı bir kaliteye sahip olmamasının yanısıra özellikle bitki kaynaklı enzimlerde iklim ve politik etkenler enzimlerin üretimini ve kullanımını zorlaştıran faktörler arasında yer almaktadır (Smith, 2004).

Enzimlerin potansiyel kullanım alanlarının artışı, endüstri, klinik ilaç ve laboratuvar uygulamalarında enzime olan ihtiyacı da artırmıştır. Ticari olarak ulaşılabilen enzimlerin çeşitliliğinde de bir artış görülmektedir. Yıllık 10000 tonun üzerinde satışı yapılan enzimler, kilogramı 5-30 ABD doları, yıllık bir tondan daha az satışı gerçekleşen daha özel enzimler, kilogramı 50000 ABD doları ve tedavi amaçlı üretilen enzimler ise gramı 5000 ABD doları olarak satılmaktadır.

Endüstriyel boyutlarda kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı, ekstraselüler enzimlerdir. Ekstraselüler enzimler, substratlarına etki etmesi için mikroorganizmalar tarafından dış ortama salgılanan ve hayvanlardaki sindirim enzimlerinin analogu olan enzimlerdir. Bu yüzden, mikroorganizmalar büyük molekülleri asimile edilebilir bir forma getirmek için enzim sentezlediğinde bunlar üretim ortamında birikirler. Bunun sonunda bakteri, küf mantarı ve maya gibi mikroorganizmalar proteaz, amilaz, selüloz, lipaz gibi enzimlerin üreticileri durumuna gelirler. Endüstriyel enzimlerin çoğu hidrolaz özelliğinde olup, kompleks kofaktörlere ihtiyaç duymadan etki gösterebilir, hücre duvarını parçalamaya ihtiyaç duymadan mikroorganizmadan ayrılabilirler ve suda çözünebilir özelliktedirler (Smith, 2004).

Günümüzde kullanılmakta olan enzimlerin büyük çoğunluğu, doğal materyallerin parçalanması için kullanılan hidrolitik enzimlerdir. Proteinazlar deterjan ve mandıra uygulamalarında kullanılmalarından ötürü en yaygın kullanılan enzim türüdür. Nişasta, tekstil, deterjan ve ekmekçilik endüstrilerinde kullanılan amilaz ve selüloz enzimlerinin de içinde bulunduğu karbohidratazlar ikinci büyük grubu oluşturur (Godfrey ve West, 1996; Smith, 2004). Deterjan, nişasta, tekstil ve

yakıt, endüstriyel enzimlerin en büyük uygulama alanlarıdır. Dünya çapındaki enzim satışları 1995 yılında 1 milyar ABD dolarıyken 2000 yılında 1.5 milyar ABD dolarına yükselmiştir (Godfrey ve West, 1996; McCoy, 2000; Smith, 2004). Pazardaki bu hızlı büyüme, fırıncılık ve hayvan yemi endüstrileriyle başlamış, sağlıkla ilgili organik sentez uygulamalarından, kağıt-kağıt hamuru ve kişisel bakım ürünlerine kadar uzanmıştır (Smith, 2004).

Selülozlar üzerine yapılan çalışmalar, 1950’li yılların başında dünyada en bol bulunan enerji kaynağı lignoselüloz ve selülozun glukoz ve çözünebilir şekerlere dönüştürülmesini sağlama potansiyelinin fark edilmesiyle başlamıştır. 1970’ler ve 1980’lerde lignoselülozik materyalin glukoz ve çözünebilir şekerlere dönüştürülmesi zor ve ekonomik olmayan uygulamalardır. Fakat yine de, selüloz, hemiselüloz ve pektinazlar üzerine devam eden çalışmalar, bunların, yiyecek, şarap, bira, hayvan yemi, tekstil, kuru temizleme, kağıt ve kağıt hamuru ile tarımsal uygulamaların yanında araştırma ve geliştirme çalışmalarındaki potansiyellerini de açığa çıkarmıştır (Bhat, 2000).

Bacillus türleri Japonya’da *Bacillus subtilis*’in soya fasulyesinden ‘natto’ üretimi için kullanıldığı yüzlerce yıl öncesinden beri, uygulamalı mikrobiyolojinin ‘fabrikaları’ gibidirler (Hara ve Ueda, 1982; Schallmey ve ark., 2004). Bu özellik geçtiğimiz yüzyıl boyunca gelişim ve değişim göstermiştir. Son zamanlarda moleküler biyolojiye ait tekniklerle suş geliştirilmesi, üretim stratejilerinin geliştirilmesine de katkı sağlamıştır. *Bacillus* türleri yüksek çoğalma hızı, fermentasyon sürelerinin kısa olması, proteinlerini ekstraselüler ortama salgılama yeteneklerinin yanı sıra *B. subtilis* ve *B. licheniformis* gibi türlerin yiyecek ve ilaç uygulamaları için güvenli olmaları gibi sebeplerden ötürü özellikle tercih edilen endüstriyel organizmalardır (Schallmey ve ark., 2004).

Günümüze kadar kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı, mezofilik organizmalardan elde edilmiştir. Önemli avantajlarının yanı sıra yüksek sıcaklık, pH ve iyonik bileşiklere karşı stabilitelerinin düşük olması nedeniyle uygulama alanları kısıtlıdır. Diğer taraftan, ekstrem sıcaklıklar (-2-15°C, 60-110°C), iyonik bileşikler (2-5M NaCl) veya pH (4, >9) gibi ekstrem ortamda üreyen organizmalar ekstremofiller olarak tanımlanır. Ekstremofiller, her açıdan alışılmışın dışındaki

koşullarda aktivite gösteren ve stabilitelerini koruyan enzimlerin kaynaklarıdır. Ekstremofillerden izole edilen enzimlerin biyokatalistler olarak kullanılması ekstrem stabilite özelliklerinden ötürü oldukça etkindir (Hough ve Danson, 1999).

1.1.Enzimler ve Bazı Özellikleri

Enzimler, biyolojik sistemlerde önemli katalitik rolü olan moleküllerdir. Katalizörler, reaksiyonun hızını artırırken reaksiyondan etkilenmeden çıkan moleküllerdir. Enzimler olmadan, çok sayıda reaksiyon biyolojik sistemler içerisinde gerçekleşebilecek olandan çok daha yüksek enerji ve yüksek sıcaklığa ihtiyaç duymaktadır. Enzimler, substrat yapıları için uygun spesifik bağlanma bölgelerine sahiptir. Çok sayıda zayıf bağlanma özellikleri enzimin reaksiyon hızını artırmasına yardımcı olur.

Enzimler, birden fazla polipeptit zincirinden meydana gelebilirler, her polipeptit zinciri alt ünite olarak isimlendirilir ve ayrı bir katalitik işleve sahip olabilir. Bazı enzimler aktivitelerini gösterebilmeleri için, protein olmayan gruplara ihtiyaç duyarlar. Bu bileşenler, metal iyonları ve koenzim adı verilen organik moleküller olabilir. Koenzimler, protein kısma (apoenzim) sıkıca veya gevşek bir şekilde bağlanarak prostetik grup adını alırlar. Prostetik grup, bütün katalitik reaksiyonun gerçekleşmesi için en önemli kısmı bulunduruyor olabilir.

Enzimler, substratlarına bağlanırken özel bir katlanma gösterir ve bir oyuk meydana getirir. Çünkü, aktif bölge substrata doğru şekilde bağlanacak kimyasal grupları içermekte olup yüksek derecede substrat spesifitesine sahiptir. Enzimin aktif bölgesi iki temel grup bulundurur: Reaksiyon süresince substratla etkileşime giren katalitik bölge, substratı bağlayan kimyasal grupların bulunduğu, katalitik bölgedeki etkileşimlerin gerçekleşmesini sağlayan bağlanma bölgesi. Aktif bölgedeki çukur yapı, özellikleri reaksiyon için oldukça önemli olan bir mikro-çevre meydana getirir. pH, yük ve aktif bölgedeki aminoasitlerin hidrofobik olup olmamaları ve enzim-substrat arasındaki kimyasal grupların etkileşimi enzim aktivitesini etkileyen çevresel faktörlerdir.

Enzimler genellikle aktivite gösterdikleri optimum pH aralığına sahiptirler. Ortamın pH'sı aktif bölgedeki katalitik grupların ve substratın iyonizasyonunu etkiler. Bu nedenle elektrostatik etkileşimler pH'ya bağlı olarak düzenlenirler. Bir reaksiyonun pH'sı, makromolekülün üç boyutlu yapısında önemli rolü olan aminoasitleri etkileyerek enzimin konformasyonunu kontrol eder.

Bazı maddeler, enzimlerin aktivitelerini durdurur veya yavaşlatır, bu maddeler genel olarak inhibitör olarak adlandırılırlar. İnhibitörler farklı şekillerde etki gösterip substratın bağlanmasını değiştirerek enzim aktivitesini etkileyebilir. Substrata benzeyen özellikteki inhibitörler enzimin substratı bağlayacak bölgesine bağlanarak enzim aktivitesini etkileyebilir. Genel olarak inhibitör maddeler, büyük organik moleküller, küçük moleküller veya iyonlardan oluşur (Lerner ve Lerner, 2003).

Doğada gerçekleşen çok sayıda reaksiyon için, çok sayıda farklı ve özgün enzimler bulunmaktadır. Aynı substrata ait farklı bağ yapılarına etki eden çok sayıda enzim olduğu gibi benzer kimyasal yolları kullanarak farklı substratlara etki eden enzimler de bulunmaktadır. Bu sebeple, enzimlerin doğru ve evrensel biçimde sınıflandırılması için bazı yöntemler geliştirilmiştir.

Sınıflandırmanın temel özellikleri: Enzimlerin sınıflandırılması ve adlandırılması için kullanılan sistem 3 temel prensibe dayanır.

Birincisi, sonu -az ekiyle biten enzimler. Bunlar tek bir enzim için, yani tek bir kataliz yolu için kullanılabilir ve birden fazla enzimin bulunduğu sistemlerde uygulamak için yetersizdir.

İkinci temel prensip, enzimlerin katalizledikleri reaksiyona göre adlandırılmaları ve sınıflandırılmalarıdır. Bu yöntem sadece, enzim tarafından gerçekleştirilen kimyasal değişikliklerle ilgilidir. Etki mekanizması göz ardı edilir ve kofaktörler veya prostetik gruplar, isimlendirmede yer almazlar. Bu yüzden, enzim, katalizlediği reaksiyon tam olarak aydınlatılmadan adlandırılmaz.

Üçüncü temel prensibe göre enzimler, katalizledikleri reaksiyonun tipine göre enzim komisyonunun (E.C.) enzimlerin sonraki zamanlarda da açıkça tanınmasını sağlamak üzere belirledikleri kod numaralarıyla isimlendirilir ve adlandırılırlar. Sistematik adlandırmanın amacı, belirli bir sınıftaki enzimlere ait reaksiyonların

belirtilen doğrultuda gerçekleştiğinin, tersi reaksiyonların ise deneysel olarak belirlendiğinin bilinmesidir.

Bu nedenlerle, bazen enzimler iki isimle adlandırılır, bunlardan biri sistematik, diğeri ise önerilen ya da alışılmış isimlerdir.

1.2.Enzimlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Enzim komisyonunun 1961 yılındaki raporuna göre, enzimler katalizledikleri reaksiyonun çeşidine göre altı temel sınıfta toplanırlar. Enzimler E.C tarafından atanan noktalarla ayrılmış dört farklı numaradan oluşan kodlarla sınıflandırılırlar.

- İlk numara enzimin altı sınıftan hangisine dahil olduğunu gösterir.
- İkinci numara enzimin altı sınıfını
- Üçüncü numara enzimin alt-alt sınıfını
- Dördüncü numara enzimin alt-alt sınıfındaki seri numarasını verir.

Enzim sınıflandırılmasındaki altı temel grup şu şekildedir;

1.2.1.Oksidoredüktazlar

Bu sınıf redoks reaksiyonlarını katalizleyen enzimleri kapsar. Tavsiye edilen ismi olan dehidrojenaz da kullanılabilir. Oksidaz, sadece O₂'nin akseptör olduğu durumlarda kullanılır. Sistematik ismi donör:akseptör oksidoredüktaz'dır.

1.2.2.Transferazlar

Transferazlar, metil, asil, amino, glikozil veya fosfat gibi spesifik grupların transferini katalizler. Önerilen ismi, akseptör grup transferaz veya donör grup transferazdır. Sistematik ismi ise donör:akseptör gruptransferaz.

1.2.3.Hidrolazlar

Hidrolazlar, C-O, C-N, C-C ve diğer bazı bağların hidrolitik koparılması reaksiyonlarını katalizlerler. Önerilen isim, basitçe, substrat isminin sonuna –az eki getirilerek oluşturulur. Sistematik isim her zaman hidrolaz ismini bulundurur.

1.2.4.Liyazlar

Liyazlar C-O, C-N, C-C ve diğer bağları hidrolitik olmayan yollarla koparma reaksiyonlarını katalizlerler. Önerilen isim ayırdığı gruplara göre verilir, dekarboksilaz, aldolaz, dehidrataz (sırasıyla CO₂, aldehid ve suyu uzaklaştırırlar) gibi. Sistematik isim ise hedef substrat grup-liyaz şeklindedir.

1.2.5. İzomerazlar

İzomerazlar, molekülde geometrik veya strüktürel yeniden düzenlemeler gerçekleştirir. Farklı izomerizmlere göre rasemaz, epimeraz, izomeraz, tautomeraz, mutaz veya siklomeraz gibi isimlendirilirler.

1.2.6. Ligazlar

Ligazlar iki molekülün, ATP'deki veya başka bir nükleosid trifosfattaki pyrofosfatın hidroliz edilmesiyle bir araya getirilmesini katalizler. 1983 yılına kadar, önerilen isim sentetazdı ancak, şimdiki ismi X-Y ligazdır. Sistematik isim ise X:Y ligaz olarak belirlenmiştir (Aehle, 2007).

1.3. Selüloz

Selüloz, biyosferde en bol bulunan yenilenebilir doğal üründür. Selülozun bitki dokularındaki kuru ağırlığı %20-45 arasında değişiklik gösterirken, pamuk liflerinde bu oran %90'dır (Slonoker, 1971). Selüloz glukoza dönüştürülebilecek en

önemli karbon kaynağı olup etanol, organik asit ve diğer kimyasalların üretilmesi için kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Kim ve ark, 2009).

Selüloz son derece stabil bir homopolimer olup, lineer β -1,4-glikozid bağı ile bağlanmış glukoz ünitelerinden oluşmuştur. Kimyasal olarak tekrarlayan üniteler glukoz ise de strüktürel olarak bu üniteler disakkarit sellobiyoz'dur. Çünkü her glukoz birimi diğerine 180° dönerek bağlanır. Bir selüloz zinciri 100 ile 10000 arasında glukoz biriminden meydana gelir. Glukozlar, mikrofibriller halinde çok sayıda zincir içi ve zincirler arası hidrojen bağları ile sıkıca paketlenmişlerdir. Bu yapı selülozun kuvvetli strüktürel stabilitesinden de sorumludur. Selüloz moleküllerinin mikrofibril yapıları halinde bir araya gelmesi hücre duvarına yüksek gerilim kuvveti sağlar. Mikrofibriller polimerizasyon derecelerine, hidrojen bağ sayısına ve selüloz kaynağına göre değişen miktarlarda kristalin ve amorf bileşenlere sahiptir. Mikrofibriller bitki hücre duvarlarında çok daha fazla bulunmakla beraber, bazı deniz hayvanlarının kabuklarında bulunabilirler veya bakteriyal kaynaklı olabilirler. Yüksek kristallığe sahip pamuk, bakteriyal selüloz (*Acetobacter xylinum*) ve alg selülozu (*Valonia ventricosa*) sırasıyla %45, %75 ve %95 kristalin özelliğe sahiptir (Bayer ve ark, 2006). Bitkinin selülozik çeperindeki boşluklar, odunsu dokularda lignin, diğerlerinde kitin, pektin veya suberin ile doldurulur. Selülozun önemli bazı özellikleri arasında, suda çözünmez olması, organik çözücüler, kimyasal ve enzimatik parçalanmaya dirençli olması olarak sayılabilir (Pallardy, 2008).

Lignoselülotik biyomas, biyoenerji ve kimyasal madde üretimi için oldukça büyük potansiyele sahiptir. Nisan 2005'de, ABD enerji ve tarım bakanlığı; Birleşik Devletlerde kullanılabilir özellikteki, kuru ağırlığı yaklaşık 1,3 milyar ton olan biyomasın, ülkenin yakıt ihtiyacının üçte birini karşılayabileceğini rapor etmiştir (Somerville, 2006). Son zamanlarda selülozik biyomasın biyo-yakıtlara dönüştürülmesi için termofilik biyoprosesler ilgi çekmeye başlamıştır. Termofilik biyoprosesler, selülozik substratların hidrolizinin daha fazla olması, yüksek kütle transfer hızının daha fazla substrat çözünürlüğüne yol açması, potansiyel kontaminasyon riskinin azalması ve prosesin düzenlenmesi için esnek olanaklar sağlaması, bu sayede prosesin maliyetini iyileştirmesi gibi potansiyel avantajlarıyla çok tercih edilmesini sağlamaktadır (Rastogi ve ark, 2010).

1.4. Selülaz

Selülazlar bağımsız katlanan, strüktürel ve işlevsel olarak bağımsız modüler enzimlerin bir araya gelmesiyle oluşmuşlardır. Katalitik bölgelerindeki aminoasit sekanslarına göre sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma sistemi sekanslardaki benzerliğin, strüktürel katlanma ve katalitik mekanizmanın korunması hakkında bilgi vermesi prensibine dayanır. Selülazlar, selüloz polimerinin yapısını meydana getiren β -1,4-glukozidik bağları hidrolizleyen endo ve ekzo-glukanazlardan meydana gelirler. Bu yüzden, prensipte, selülozun parçalanması sadece tek tip bağın hidrolizine ihtiyaç duymaktadır. Enzimler, selüloz yüzeyine bağlanmalı, lokalize olmalı ve hidroliz için uygun zincirleri koparmalıdır. Bu durum, kristalin yapıdaki amorf veya hasarlı bölgelerin enzim prosesi için başlangıç bölgesi olmaya uygun olduğunu gösterir. Örneğin, endo etkiye sahip bir enzim polisakkarit iskeletinin iç kısımlarında yeni zincir uçları meydana getirebilir ve iki yeni zincir ekzo-etkili enzimler için uygun hale getirilir.

Endo ve ekzoglukanazlara ek olarak diğer bir selülaz, sello-oligodekstrinlerden indirgenmeyen β -D-glukoz birimleri meydana getiren β -glukozidazlardır (EC 3.2.1.21). Bu enzim özellikle, selülaz hidrolizasyonunun son ürünü olan sellobiyozu iki molekül glukoz oluşturacak şekilde hidroliz eder. Bazı β -glukozidazlar sellobiyozlar için spesifik iken, diğerleri sellobiyozların yanı sıra ksilobiyoz gibi diğer β -D-glikozidler de hidroliz edebilir. β -glukozidazlar genellikle mikrobiyal hücre yüzeyine bağlı olup enzimin hücreden salgılanması öncesinde, sırasında ve sonrasında polisakkarit yapıyı glukozu hidroliz ederler (Bayer ve ark, 2006).

Selülaz enzimleri, selülozu hidroliz ederek (β -1,4-D-glukan bağları) reaksiyon sonunda glukoz, sellobiyoz ve selooligosakkaritlerin oluşumunu sağlarlar. Üç büyük grup selülaz enzimi vardır: Sellobiyohidrolazlar (CBH veya 1,4- β -D-glukan sellobiyohidrolaz, EC 3.2.1.91), Endo- β -1,4-glukanaz (EG veya endo-1,4- β -D-glukan 4-glukanohidrolaz, EC 3.2.1.4) ve β -glukozidazlar (BG-EC 3.2.1.21). Mikrobiyal selülazlar, bir veya daha fazla CBH, bir veya daha fazla EG ve β -glukozidaz bulundurabilir. Tam bir selülaz sistemi, Sellobiyohidrolaz, Endoglukanaz

ve β -glukozidazı bir arada bulundurur. Bu enzimler, kristalin selülozu glikoza dönüştürmek için sinerjistik etki gösterirler. Exosellobiyohidrolazlar ve endoglukanazlar selülozu küçük selooligosakkaritlere dönüştürmek üzere hidroliz ederler. Oligosakkaritler, (çoğunlukla sellobiyoz) β -glukozidaz tarafından glukoza hidroliz edilirler (Sukumaran ve ark, 2005).

1.4.1.Serbest Enzim Sistemleri

Çok sayıda selüloolitik mikroorganizmanın selülaz sistemlerini oluşturan enzimleri birbirlerine benzerdir. Selülaz sistemi terimi, tüm hücre duvarı hidroliz edici enzimleri ve farklı tipteki selülaz ve hemiselülazları kapsayan diğer glikozil hidrolazları içerir. Mezofilik ve aerobik *Cellulomonas fimi*'ye ait selülaz sistemi ilk ve en çok çalışılmış selülaz sistemlerinden birisidir. Bu bakteriye ait enzimler temel olarak serbest enzimlerdir ve ayrı ayrı izolasyon ve karakterizasyonları mümkündür. Bu zamana kadar *Cellulomonas fimi*'ye ait 10 glikozil hidrolaz enziminin sekans analizi yapılmıştır (6 selülaz, 3 ksilanaz ve 1 manannaz enzimi)(Bayer ve ark, 2006).

1.4.2.Çok bileşenli (Multikomponent) enzimler

Ekstrem termofil bir bakteri olan *Caldicellulosiruptor* enzimleri bu sistemdeki enzimler olarak karakterize edilmişlerdir. Bu enzimler serbest enzimler olsalar da modüler organizasyonları farklılık göstermektedir. Bu sistemdeki enzimlerin çoğu bifonksiyoneldir, yani iki ayrı katalitik bölgeyi aynı polipeptit zincirinde bulundurlar. İki katalitik bölgenin aynı enzimde yer alması iki enzim arasında sinerjistik bir ilişki olduğunu göstermektedir. En az bir serbest bifonksiyonel enzim sistemini bulunduran diğer bakteriler; *Anaerocellum thermophilum*, *Bacillus stearothermophilus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptomyces chattanogensis* ve termofilik anaerob NA10'dur (Bayer ve ark, 2006).

1.4.3.Selülozomlar

Selülozomlar selülozik substrata bağlanarak etkili şekilde degradasyonunu gerçekleştiren multienzim kompleksleridir. İlk selülozom, anaerobik termofilik bakteri *Clostridium thermocellum*’dan bulunmuştur. Selülozomlar, çoğu enzimatik aktiviteye sahip çok sayıda komponent içerir. Selülozomal enzim subüniteleri enzimatik olmayan multimodüler protein yapıda ‘scaffoldin’ adı verilen yapı üzerine bağlanmış durumdadır (Bayer ve ark, 1994; Bayer ve ark, 2006). Bu skafoldin yapıları selüloza bağlanma yeteneğini artıran CBD’ler bulundurur. Bu yapıda ayrıca, kohezin adı verilen birimler de yer almaktadır. Buna ek olarak tamamlayıcı bir modül olan dokerin birimleri de skafoldine bağlı halde bulunur. Kohezin ve dokerin arasındaki etkileşim enzim alt birimlerinin selülozom kompleksine entegre olmasında etkilidir. Serbest enzimlerle selülozomlar arasındaki temel fark, serbest enzimlerin genellikle substrata katalitik bölge için yol gösteren CBD’ler taşıırken, selülozomal enzimlerin ‘dokerin’ adı verilen enzimi selülozom komplekse bağlayan yapıların bulunmasıdır. Bunların yanında selülozomla serbest enzimlerin benzer tarafları da vardır: iki grupta da katalitik bölgelerde benzerlik söz konusudur ve selülozomal enzimler kristalin selüloza bağlanmak için serbest enzimlerle aynı gruptan CBD’ler taşır. Enzimlerin katalitik olmayan skafoldin yoluyla bir arada tutulması daha yüksek bir organizasyona olanak tanır. Tamamlayıcı enzimlerin bir kompleksle bağlı olması, selüloz veya diğer hücre duvarı polisakkaritleri üzerine etkilerini geliştirmektedir (Bayer ve ark, 2006).

1.5.Selülazın Kullanım Alanları

1.5.1.Selülazların Gıda ve İçecek Endüstrisindeki Kullanım Alanları

Bitki hücre duvar yapısını kısmen veya tamamen hidroliz ederek; tahılların homojen olarak su almasını ve yeterince ıslanmasını sağlar.

Kurutulmuş sebze ve çorbaların geri sulandırılmasının artırılmasında,

Şarap yapımında aromanın artırılmasında kullanım alanı bulmuştur.

Pektinaz, selüloz ve hemiselülozlar'dan oluşan maserating (yumuşatma) enzim sistemleri, meyve ve sebze suyu ekstraksiyonu ve berraklaştırılmasında kullanılmaktadır (Bhat, 2000). Bu enzimler, meyve nektarı ve pürelerinin hazırlanması işlemlerinde vizkoziteyi düşürmek için de kullanılmaktadır.

Pektinaz, selüloz ve hemiselülozlardan oluşan enzim karışımı, zeytinyağı üretiminde, anti-oksidantların artırılması, ekstraksiyonun artması, atık sudaki yağ miktarının azaltılması gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

1.5.2.Selülozların deterjan endüstrisinde kullanımları

Selüloz enzimlerinin, çamaşır deterjanları için önemi büyüktür. Bu enzimler lekeleri diğer hidrolazlar gibi çıkarmazlar. Bunun yerine pamuklu kumaşa, mikrofibrilleri hidroliz ederek leke partiküllerinin serbest kalmasını sağlarlar. Mikrofibrillerin uzaklaştırılması kumaşın yumuşaklığını ve rengini korumaya yardımcı olur. Deterjanlar için en yaygın kullanılan selüloz enzimleri endo-1,4- β -glukanazlardır (EC 3.2.1.4) (Shirai ve ark, 2001).

Selülozların, temizleme performansı, selülozik moleküler fragmentlerin uzaklaştırılması esasına dayanır. Polimerik glukanlar renkli lekelerin selülozik kumaşlara bağlanmasını artırır. Bu enzimler kumaşa temizlik etkisinin yanında kumaşın görüntüsünü de yenileyebilme özelliğindedir. Kumaş üzerinde gözle görülür büyüklükteki pürüzlerden kaynaklanan eskimiş görüntü, deterjan içerisindeki selüloz enzimlerinin etkisiyle giderilir ve kumaş yeni görüntüsünü korumaya devam eder. Selüloz enzimleri bu etkiyi sağlayabilecek tek enzim sınıfıdır.

1.5.3.Tekstil Endüstrisinde Selülozların Kullanımı

Kot kumaşlarının eskitilmesi (biostoning) işlemlerinde selüloz enzimlerinden faydalanılır. Tekstil endüstrisinde ağartma, boyama, eskitme gibi prosesler sırasında, kumaşlar üzerinde küçük iplik yapılarının kumaş üzerinde pürüzlü yapılar oluşturması söz konusudur. Yeni üretilmiş kumaşlara eskimiş ve yıpranmış görüntü veren bu yapılar selüloz enzimleriyle bio-finishing işlemleri yapılarak üzerindeki

pürüzlerden arındırılır (Schäfer ve ark, 2007). Bu uygulamalar, selüloz enzimi kullanılması, yumuşak ve parlak görünüm kazandırma, canlı renkler ve her yerde aynı renk tonunun oluşturulması, yüksek hidrofilik özellik kazanması ve çevreyle dost bir uygulama olması gibi avantajlara sahiptir (Bhat, 2000).

Selüloz enzimleri pamuk üzerindeki toprak partiküllerinin temizlenmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Kıran ve ark, 2006).

1.5.4.Kağıt ve Kağıt Hamuru Endüstrisinde Selülozların Kullanımı

Kağıtların geri dönüşümünden elde edilen kağıt hamurlarının kullanılabilmesi için üzerlerindeki mürekkeplerin uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla selüloz enzimlerinden yararlanılır. Selüloz kağıttaki selüloz lifleri gevşeterek mürekkeplerin bağlı oldukları yerden uzaklaştırılmasını sağlar.

1.5.5.Hayvan Yemlerinde Selülozların Kullanımı

Lignoselülozik materyalin selüloz ve hemiselülozlarla kısmi hidrolizi, tahılların kabuk kısmını uzaklaştırır, β -glukanların hidrolizi barsak viskozitesini düşürür, yem materyallerin daha iyi çözünmesini sağlar ve kullanılabilirliğini, bu yolla da ruminant ve monogastrik hayvanların yemden daha fazla yararlanmalarını sağlar.

1.5.6.Diğer Alanlar

Selülozik materyaller doğada en bol bulunan glukoz kaynağı olmalarından dolayı biyo-etanol ve hidrokarbon üretimi için de önemli yer teşkil etmektedir. Selüloz enzimi selülozik maddelerden glukoz ve glukoz polimerleri oluşturarak alkol fermentasyonu için hazır hale getirir. Alkol üretiminde sıvı veriminin artması ve ürünün iyi bir renk alması için de bu enzimlerden faydalanılmaktadır. Selüloz enzimleri zirai ve endüstriyel atıkların biyolojik sakkarifikasyonunda görev almaktadır (Kıran ve ark, 2006).

1.6.*Bacillus* Cinsinin Temel Özellikleri

Tanımlanan en eski bakterilerden biri Ehrenberg tarafından 1835 yılında tanımlanan '*Vibrio subtilis*' tir. 1872 yılında, Cohn bu organizmayı *Bacillus subtilis* olarak yeniden adlandırmıştır (Gordon, 1981; Slepecky ve Hemphill, 2006). Bu organizma *Bacillaceae* familyasının bir üyesidir. Bu familyanın ayırt edici özelliği yuvarlak, oval veya silindirik sporlar üretmesidir. Endospor, serbest olarak veya vejetatif hücre içerisinde faz kontrast mikroskobu kullanılarak belirlenebilir. İlk araştırmacılar kimyasal olarak yarı geçirgen olan sporları görünür hale getirmek için boya ve özel koşullar kullanmışlardır. Bununla beraber gram boyama vejetatif hücreyi boyarken hücre içerisindeki sporun boyanmadan kalmasını sağlayarak sporlu mikroorganizmalar için belirleyici bir yöntem olarak kullanılmıştır. Bu mikroskobik özellikleri ve ısıya karşı dirençli olmaları nedeniyle endosporlu organizmalar kolaylıkla bulunabilirler. Toprak, su, yiyecek maddeleri gibi her türlü ortam kullanılarak, örneklerin suyla süspanse edilmesinden sonra 80°C'de 10 dakika inkübe edilmesi sonucunda kolaylık izole edilir. Vejetatif hücreler ve diğer yapılar bu sıcaklıkta canlılıklarını kaybeder. Sıcaklığa dirençli endosporlar uygun ortama koyulur ve 24-48 saat sonunda izolatlar elde edilirler. İnokülümün ısıtılması, farklı sıcaklıklar, hidrojen iyonu konsantrasyonu, aerob ve anaerob koşullar ve substratlar ile birleşince çok sayıda farklı türde endosporlu mikroorganizma elde edilmesini sağlar.

Spor yapısı en eski zamanlardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında temel rolü üstlenmiştir. *Bacillaceae* familyası ilk defa 1895 yılında Fisher tarafından bulunmuştur. *Bacillus* cinsi üyelerini diğer *Bacillaceae* üyelerinden ayıran özellikleri aerobik veya fakültatif aerobik olması, çomak şekilli olması ve katalaz üretimidir. Diğer spor formlu bakterilerden *Sporolactobacillus* mikroaerofilik ve katalaz negatiftir. *Clostridium* anaerobik özellik taşıırken, *Sporosarcina* kok şeklindedir (Slepecky ve Hemphill, 2006).

Bacillus genusunun üyeleri ve zorunlu termofilik bacilli genellikle basit besin kaynaklarına ihtiyaç duyarlar, bu yüzden üremeleri için özel aminoasitlere ihtiyaç duymazlar ve tripton soy agar (TSA) gibi basit besin ortamlarında üreyebilirler.

Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalabilirler.

Termofilik bacilli için optimum üreme sıcaklığı genellikle 40-70°C aralığındandır. Temofilik ve mezofilik ortamlardan elde edilebilirler. Termofilik bakterilerle ilgili yapılan ilk yayında, *Bacillus thermophilus*'un aerobik, sporlu ve 70°C'de üreyebilen bir organizma olduğu bildirilmiştir. Bu bakteriler, lipaz, proteaz, amilaz, pullulanaz, ksilanaz, glukoz-izomeras ve DNA restriksiyon endonükleazlar gibi termostabil enzimleri sentezleyebilme yetenekleri nedeniyle önem taşımaktadırlar (Maugeri ve ark, 2001; Güray, 2009).

Zincir oluşturabilen, gram pozitif çomaklar olan *Bacillus* cinsinin çok sayıda üyesi toprak, su, hava ve bitkiler üzerinde yaygın olarak bulunabilen saprofitik organizmalardır. Bazıları ise böcek patojenidir. *Bacillus cereus* enterotoksin üretebilen ve besinlerde üreyen bir patojen türdür. Cinsin en önemli patojeni ise *Bacillus anthracis*'dir.

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi özellikleri ve kolay üretilmeleri nedeniyle endüstriyel açıdan da önemlidir. *Bacilluslar* tarafından üretilen subtilisin, selüloz ve amilazlar deterjan endüstrisinde; nötral proteazlar süt endüstrisinde; amilaz ve pullulanaz gibi enzimler besin ve meyve suyu endüstrilerinde kullanım alanı bulmaktadır.

Bakteriler, hızlı üremeleri ve yüksek protein sentez kapasiteleriyle ticari önemi olan proteinlerin büyük oranda üretilmesi için etkili organizmalardır. Bakteriyal enzimlerin yaklaşık %50'si *Bacillalar* tarafından üretilmektedir (Quax, 2006).

Bazı *Bacillus* türleri ilaç endüstrisi için de önemlidir. Örneğin; *B. licheniformis* bacitrasin, *B. polymyxa* polymyxin, *B. brevis* tyrocidine, *B. subtilis* subtilin ve bacilycin gibi peptid antibiyotikler üretme yeteneğindedirler. *B. subtilis* tarafından üretilen siklik lipoprotein özellikteki iturin çeşitli mantar ve mayaların neden olduğu hastalıkları engelleyebilir özelliktedir. *B. thuringiensis*, *B. larvae* ve *B. popilliae* türleri Lepidoptera larvalarına patojenik etki gösterirler (Ediz ve Beyatlı, 2005).

1.7. Ekstremofiller ve Ekstremozimler

Bugüne kadar kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mezofilik organizmalardan elde edilmiştir. Birçok avantajının yanında, bu enzimlerin ekstrem sıcaklık, pH ve benzeri koşullarda stabilitelerinin sınırlı olması endüstriyel uygulamalardaki kullanımlarını da sınırlamaktadır. Diğer yandan, ekstremofiller, ekstrem ortamlarda bulunan organizmalardır. Ekstremofiller ekstrem stabiliteye sahip enzimlerin (ekstremozimler) kaynağıdır ve bu enzimlerin belirtilen koşullarda aktif ve stabil olması çeşitli uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlar. Bu organizmalardan elde edilen biyokatalistler de organizmayla benzer özellikteki koşullarda aktivite gösterir. Kitin, selüloz ve nişasta gibi polimerlerin hidrolizi için yüksek sıcaklıkta stabil enzimler sıklıkla tercih edilirler. Bu koşullarda substratın çözünebilirliği ve doğru bağlanabilme başarısı artırılmış olur. Termofiller, psikrofiller, asidofiller, alkalifiller, halofiller, piezofiller ekstremofillerin bazı örnekleridir (Kumar ve ark, 2011).

1.7.1.Termofiller

Termofilik ekstremofillerden elde edilen proteaz, lipaz, selülaz, kitinaz ve amilaz gibi polimerik yapıları hidroliz eden enzimler, endüstriyel uygulamalarda daha çok dikkat çekmektedirler. Bunun nedeni yüksek sıcaklıklarda polimerik yapıların çözünürlüklerinin artmasıdır. Bunun yanı sıra, yüksek sıcaklık kontaminasyon riskini de azaltmaktadır (Kumar ve ark, 2011).

Termofiller (50-80°C’de üreyenler) ve hipertermofiller (80°C’nin üzerinde üreyenler) ‘şaperonin’ adı verilen termostabil ve sıcaklıkla denatürasyona karşı dirençli proteinlere sahiptirler (Bouzas ve ark, 2006). Proteinlerin yüksek sıcaklıktaki stabiliteleri için çok farklı özellikler belirtilmiştir: Disülfid köprüleri, aromatik interaksiyonlar, hidrofobik interaksiyon ve hidrojen bağları gibi (Vieille ve Zeikus, 2001). Bunun yanında, farklı proteinler için olası farklı özellikler belirtilmiştir stabilitenin bütün proteinler için geçerli kuralları olmadığı bildirilmektedir (Bouzas ve ark, 2006).

Termofil enzimlerin çoğu 70-125°C aralığında yüksek termostabiliteye sahiptirler (Antranikian ve ark., 2005; Morozkina ve ark., 2010). Termofilik ve hipertermofilik organizmalar, çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılan yüksek stabiliteye sahip, selüloz, ksilanaz, pektinaz, kitinaz, amilaz, pullulanaz, proteaz, lipaz gibi hidrolaz enzimlerinin kaynağıdır (Morozkina ve ark, 2010).

Termostabil enzimlerin mezofilik enzimlere göre daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı olması, onları yüksek sıcaklık uygulamalarına daha uygun kılar. Ek olarak, bu enzimlerin termostabiliteleri genellikle çok sayıda endüstriyel reaksiyonlarda kullanılan kimyasal denatüranlara karşı yüksek dirençle de ilişkilidir. Enzimlerin yüksek sıcaklıklarda proses verimini artırmasının nedenleri: Düşük vizkosite, substratın difüzyon kat sayısını artırması, substrat ve ürünlerin çözünürlüğünün artması ve mezofillere göre kontaminasyon riskini azaltmasıdır (Bouzas ve ark, 2006).

1.7.2. Alkalifiller ve Asidofiller

Mikroorganizmalar üredikleri ortamın pH'sına göre asidofiller (pH 4.0'un altında üreme gösterenler), nötrofiller (pH 6.0-8.0 arasında üreyenler) ve alkalifiller (pH 9.0'un üzerinde üreyenler) olarak sınıflandırılırlar (Kumar ve ark, 2011). Asidofilik ve alkalifilik mikroorganizmalar intraselüler homeostasiyi korumak ve pH değerlerini nötrale yakın tutmak için etkili mekanizmalara sahiptirler (Ogawa ve Shimizu, 1999). Asidofiller, yüksek protonik membran gradiyentine sahiptir (ΔpH) örneğin *Picrophilus oshimae*, dörtten fazla pH ünitesine sahiptir ve bunlar temel proton itici güçler olarak çalışırlar. Bu yüzden asidofiller, transmembran yükünü, hücre içini negatiften pozitive değiştirerek dengelemek zorundadır, bunu pozitif yüklü K^+ iyonlarını hücre içerisinde biriktirerek gerçekleştirir (Morozkina ve ark, 2010). Asidofillerin düşük pH'larda canlı kalabilmek için geliştirdikleri yöntemler, pozitif yüklü hücre membranı, yüksek tamponlama kapasitesi, H^+ pompalayan enzimlerin yüksek düzeyde üretilmesi ve özel taşıma sistemleri olarak özetlenebilir (Wiegel ve Kevbrin, 2004; Horikoshi, 1999; Kumar ve ark, 2011).

Alkalın pH'da üreyebilen mikroorganizmalar söz konusu olduğunda ise, düşük proton ve yüksek Na^+ ortamında üredikleri için sadece osmotik adaptasyona ihtiyaç duyarlar ve ayrıca hücre içi pH homeostasiyi de korumaları gerekmektedir. Hücre içerisindeki H^+ 'ler ve hücre dışındaki Na^+ iyonları yer değiştirerek hücreyi dengede tutarlar Alkalifilik bakterilerdeki hücresel yağ asitleri doymuş ve tekli doymamış düz zincirli yağ asitleridir (Ma ve ark, 2004).

Bilinen başka bir özellik de, sadece sitoplazmik membranın değil aynı zamanda hücre duvarının da alkalifilik hücreler için bir koruma bariyeri oluşturduğudur. Alkalifiller, peptidoglikana ek olarak hücre yüzeyindeki yük yoğunluğunu azaltacak negatif yüklü hücre duvarı polimerleri içerir bu sayede hücre membranını stabilize eder ve hidroksil iyonlarını uzaklaştırırken proton ve sodyum iyonlarını toplar (Horikoshi, 1999; Wiegel ve Kevbrin, 2004; Morozkino ve ark, 2010;Kumar ve ark, 2011).

Asidofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların kullandıkları proton pompaları hücre içi pH'yı nötrale yakın değerlerde tutar. Dolayısıyla bu organizmalara ait intraselüler enzimler ekstrem koşullara uyum sağlamak zorunda kalmaz. Ancak ekstraselüler enzimler, alkalın ve asidik koşullara adapte olmak zorundadırlar. Bununla beraber, adaptasyon mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır. Ekstrem pH koşullarında üreyebilen mikroorganizmalara ait enzimler özellikle yüksek alkali ve asidik reaksiyon koşullarında kullanım alanı bulmuşlardır.

Termoalkalifiller ve alkalifiller, selülozlar, ksilanazlar, amilazlar, proteazlar, lipazlar, pektinazlar, kitinaz, katalaz, peroksidaz ve oksidoredüktazlar gibi alkalifilik enzimlerin kaynağıdırlar. Termoalkalifilik enzimler yüksek pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebilirler. Örneğin, proteazlar, lipazlar ve selülozlar çamaşır ve bulaşık deterjanı katkısıdırlar (Wiegel ve Kevbrin, 2004; Horikoshi, 1999; Kumar ve ark, 2011).

1.7.4.Halofiller

Mikroorganizmalar geniş aralıktaki tuz konsantrasyonu bulunan ortamlardan izole edilebilirler, tatlı su kaynakları, deniz suları ve NaCl konsantrasyonunun

neredeyse doygunluk seviyesinde olduğu yüksek tuzluluktaki göller gibi. Bu organizmalar, sodyum ve potasyum klorür gibi tuzları hücre içerisinde biriktirerek hücre içi osmotik dengeyi kurmaya çalışırlar. Bunun yanında, yüksek tuz konsantrasyonundan korunabilmek için, sitoplazmalarında glisin, betain, çeşitli şekerler, aminoasitler ve ektoinleri de biriktirebilirler, bu moleküller hücreleri yüksek sıcaklık, kurutma ve donmaya karşı da korur (Kumar ve ark, 2011). Sonuç olarak halofilik organizmalara ait proteinler yüksek tuz konsantrasyonlarına uyum sağlamak zorundadırlar (örn; 4M KCl veya 5M 'ın üzerindeki NaCl konsantrasyonu) (; Danson ve Hough, 1997; Demiorijan ve ark, 2001; Kumar ve ark, 2011). Bu ekstrem ortamlara adapte olmuş enzimler yüzeylerinde negatif yüklü aminoasitlere ihtiyaç duyarlar böylece presipitasyonu engellerler. Düşük tuz konsantrasyonlarında halofilik enzimlerin çözünürlüğü azalır ve böylece aktiviteleri düşebilir veya sınırlı kalabilir (Madern ve ark, 2000; Kumar ve ark, 2011).

Osmotik adaptasyonu olan organizmaların proteinlerinde asidik amino asitler (glutamat ve aspartat) baskın olarak yer alır. Hidrofobik amino asitlerin oranı düşüktür ve bunların yerini serin ve thrionin amino asitleri almıştır (Morozkina ve ark, 2010). Asidik amino asitler proteinin yüzeyinde yer alırlar ve yüksek oranda hidrate olmuş bu amino asitler proteinin hidrofilik özelliğini artırarak birikme prosesini engeller.

1.8. Protein İzolasyonu ve Saflaştırması

Proteinler canlı organizmaların tamamında bulunur, her hücre metabolik aktiviteleri için çok sayıda farklı protein sentezler. Proteinlerin izolasyonu için kullanılacak yöntem izole edilecek proteinin bulunduğu yerle doğrudan alakalıdır. Proteinler, kompleks biyolojik karışımlar içerisinde bulunur ve buralardan izole edilirler. İzolasyonda kaynağın bitkisel, hayvansal ve mikroorganizma olması da yöntem seçimindeki önemli parametreler arasındadır.

Mikroorganizmalar, özellikle enzimler için çok önemli kaynaklardır. Kullanılan enzimlerin çoğu ekstraselüler enzimlerdir ve izolasyonları için ilk aşama hücrenin solüsyondan uzaklaştırılmasıdır. İntraselüler enzimler için, hücre duvarını

uzaklaştırmak gerekmektedir. Bu işlemler için yüksek basınç, kimyasal, termal veya enzimatik lizis uygulanmaktadır.

Özellikle *Bacillus* cinsi bakterilerde ekstraselüler enzim sentezi gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle enzim üretimi sırasında hücrelerin lizi edilmesi için ayrı bir uygulama yapılmasına gerek kalmaz bunun yerine santrifüj veya filtrasyon uygulamasıyla hücreler ortamdan uzaklaştırılır. Böylece bakterilerin üreme süresince, üredikleri ortama bıraktıkları enzimler süpernatantta toplanmış olurlar.

Elde edilen enzimlerin bulundukları ortamdan toplanması için çeşitli izolasyon yöntemleri kullanılmaktadır. İzolasyonda amaç proteinlerin mümkün olduğunca saf halde elde edilmesidir.

1.9.Kromotografi

Kromotografi, iki fazdan meydana gelen fiziksel bir ayırma yöntemidir. Fazlardan biri, durağan faz (sabit faz) diğeri ise, belirli bir yönde süzme işlemi yapan hareketli fazdır. Mobil faz hareket ederken, bileşenler başladıkları noktadan harekete başlar ve diğeri uca doğru hareket ederken birbirlerinden ayrılırlar. Kromotografi yöntemleri sabit ve hareketli fazların özelliklerine göre ayrılırlar.

Genel olarak, hareketli (taşıyıcı) faz, gaz kromatografisinde (GC) olduğu gibi gaz, yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) olduğu gibi sıvı veya düzlemsel (planar chromatography) olabilir. Sabit faz (Stationary) genellikle poröz bir katı materyal veya yüksek yüzey alanı olabilir. Bir kolona paketlenmiş veya düzlemsel bir alana yayılmış olabilir. TLC için sabit faz, cam bir plaka veya benzeri inert destek üzerine homojen ve ince bir tabaka halinde yayılmıştır. Hareketli faz sabit faz üzerinde kapiler güçlerle hareket eder.

1.9.1.İnce tabaka kromatografisi

TLC genellikle, çok çeşitli maddeler için basit, hızlı ve ucuz bir ayırma, basit bir tanımlama, ve görsel-yarı kantitatif değerlendirme yöntemi olarak kabul edilir.

Son zamanlarda TLC , kompleks karışımları ayırabilme yeteneği ve gelişmiş kantitatif analizleriyle HPLC ve GC'ye rakip olmuştur.

TLC, bir karışımdaki maddeleri ayırmak ve referans materyallerin ayrılma özelliklerine göre, bu bilinmeyen maddelerin tanımlamasını gerçekleştirmek için kullanılır.

TLC'nin temel amacı, karışımları ayırmak veya içeriğini çözmektir. Örneğin kromatogramı nokta veya zonların sayısı ve konumlarına göre karakterize edilir. Örnek kromatogramları referans materyalleri ile kıyaslanarak, örneklerin belirlenmesi sağlanabilir.

TLC'de kimyasal seperasyon, moleküllerin hareketli ve sabit fazla interaksiyonuna göre gerçekleşir. Hareketli faz, örneklerin içeriklerinin sabit fazda, kapiler güçle hareket etmesini sağlayan ortamdır. Solvent sistem plaka içerisinden geçerken, örnekler iki zıt güçten etkilenirler, hareketli fazın sürüklenme gücü ve sabit fazın engelleme ve yavaşlatma etkileri. Sürükleyici güç, komponentlerin hareketli fazın hareket yönünde ilerlemesine neden olurken, sabit fazın engelleyici kuvvetleri bu hareketi komponentlere ait molekülleri adsorbsiyonla sürüklenme ortamından uzaklaştırarak sabit fazın yüzeyine iter. Bu yüzden, her molekül 'dur ve ilerle' (stop and go) yolunu izler. Uygulamanın sonunda her komponent lekisi belirli bir mesafe yol kat eder. Sabit tabaka tarafından daha kuvvetli çekilen komponentler daha kısa mesafelere giderken, sıvı faz tarafından çözülebilen komponentler daha uzun mesafe ilerleyebilirler.

Bir TLC sistemi, örnek veya örnekler, hareketli faz, sabit faz, yürütme tankı ve belirleyici ajandan meydana gelir. TLC sistemlerinde uygulaması yapılacak örnek veya örneklerin özelliklerinin belirlenmesi ilk aşamayı oluşturur. Moleküllerin kimyasal yapısına göre hareketli faz, sabit faz ve belirleme ajanları seçilir.

En yaygın kullanılan sabit faz, silika jeldir. Silika jel SiO_2 iskelete bağlı polar $-\text{OH}$ gruplardan oluşan bir ağ şeklinde bir tabakadan meydana gelir. Silia jel üzerine adsorbsiyon, örnekte bulunan işlevsel gruplarla, silika jel yüzeyindeki $-\text{OH}$ gruplar arasındaki hidrojen bağ etkileşimleriyle gerçekleşir. Bazı moleküller silika jeldeki $-\text{OH}$ gruplarına daha kuvvetli bağlanır ve başlama noktasından daha kısa mesafe kat eder. $-\text{OH}$ gruplarıyla daha gevşek etkileşen moleküller daha uzun mesafe ilerlerler.

Bu etkileşim ince tabaka kromatografisinin en etkili aşamalarından biri olan ‘adsorbsiyon’dur.

TLC solvent sistemi bir veya daha fazla karışabilir sıvıdan meydana gelen sıvı hareketli fazdır. Hareketli faz ayırımı yapılacak olan örneğe göre seçilir. Analiz edilecek örnek- hareketli faz ve hareketli faz- sabit faz etkileşimleri örnekteki işlevsel grupların sayısına ve yapısına göre belirlenir.

TLC plakalarında yürütme işlemi sonunda havada kurutma yapılarak solvent çözeltisi buharlaştırılarak uzaklaştırılır. UV ışığında görüntüleme gibi fiziksel veya sülfirik asitle reaksiyona girdirerek kahverengi veya koyu renkli zonlar meydana gelmesi gibi kimyasal bir yolla lekeler görünür hale getirilir (Striegel ve Hill, 1996).

1.10.Elektroforez

Elektroforez yüklü moleküllerin elektriksel alanda sahip oldukları yüke bağlı olarak göç etmeleri prensibine dayanır. Protein elektroforezi kromatografinin, yüklü moleküllerin elektrik alanında ayrılmasına izin veren hassas ve analitik formudur. Protein, DNA ve RNA gibi geniş çeşitlilikteki moleküller elektroforezle ayrılabilir. Ayrılma derecesi ve moleküler hareketin hızı moleküllerin büyüklüğüne ve şekline bağlıdır, moleküllerin yükleri elektrik alanının uzunluğu, kullanılan ortamın özelliği (örn: selüloz asetat, nişasta jeller, kağıt, agaroz, poliakrilamide jel) ve ortamın koşullarına (elektrolit konsantrasyonu, pH, iyonik yük, vizkosite, sıcaklık gibi) bağlıdır.

Bazı ortamlar (destek matrisi) makromoleküller için elek görevi gören porlu yapıya sahip olabilir.

Genelde, destek ortamı sisteme uygulanan elektriği iletecek bir tampon sisteme ihtiyaç duyar. Destek ortamı tamponla doldurulmuş sisteme yerleştirilir. Örnekler jelin bir tarafındaki kuyulara yüklenir. Elektrik akımı sisteme verildiğinde örnekler pozitif veya negatif tarafa doğru hareket ederler. Sonuç olarak, negatif yüklü DNA ve RNA jelin pozitif ucuna doğru hareket eder.

Moleküller değişik şekillere, boyutlara ve yüklere sahip olduklarından matrix içerisinde farklı hızlarda göç ederler ve bu, moleküllerin ayrışmasına neden olur. Genellikle, daha küçük ve daha yüklü molekül daha hızlı hareket eder.

Proteinler yapılarını meydana getiren aminoasitlerin yapılarına bağlı olarak bir yüke sahiptirler. Proteinler amfoterik bileşiklerdir yani, ortam koşullarına göre pozitif veya negatif yüklü olabilir. Bir solüsyon içerisindeki protein pozitif yüklü olabilir, bu durumda negatif yöne doğru hareket edebilir. Başka bir solüsyon içerisinde aynı protein negatif yüklenebilir ve pozitif uca doğru hareket edebilir. Her protein için proteinin net yükünün bulunmadığı bir pH değeri olan izoelektrik noktası vardır. Bu sebeple destek materyalinde değişen pH değerleri separasyon özelliklerini de değiştirir (Lerner ve Lerner, 2003).

1.10.1.Poliakrilamid Jel Elektrofrez

Poliakrilamid jel uygulamalarında destek ortamı akrilamid monomerlerinin çapraz bağlayıcı ('cross-linker') moleküller yardımıyla kovalent olarak bağlanması sonucu oluşan bir polimerdir. Polimerizasyonun kimyasal olarak gerçekleştirilmesi için ortama amonyum persülfat ilave edilirken, katalizör olarak, N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) kullanılmaktadır. Fotokimyasal yoldan polimerizasyonun gerçekleştirilmesi için TEMED'e ek olarak ortama riboflavin ilave edilerek floresan ışığı gönderilir.

Elektrofrezde kesikli (continuous) ve kesiksiz (discontinuous) olmak üzere iki farklı metod kullanılır. Kesiksiz sistemde tanklarda ve jelde aynı tamponun kullanıldığı tek bir ayırıcı jel varken, kesikli sistemde düşük konsantrasyonda hazırlanmış (örn; %5 akrilamid çözeltisi) dengeleyici jel ve daha yüksek konsantrasyonda hazırlanmış (örn; %10 akrilamid çözeltisi) ayırıcı jelden oluşan iki farklı jel yapısı söz konusudur. Kesikli sistemde fark sadece iki ayrı jel sistemi olması değil aynı zamanda tank tamponlarıyla jel tamponunun farklı olmasıdır.

Gradyent jellerde ise akrilamid konsantrasyonunda jelin alt kısmından üst kısmına doğru azalan değişim söz konusudur. Gradyent jellerin en önemli avantajı, homojen jelde tek bir bant gibi görünen birbirine yakın bantların birbirinden

ayrılmasını sağlayarak sağlıklı bir değerlendirme yapılmasına olanak sağlamaktır (Temizkan ve Arda, 2004).

1.10.2.SDS-PAGE

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), proteinlerin belirlenmesi, karşılaştırılması ve karakterizasyonu için ucuz, tekrarlanabilir ve hızlı bir metoddur. Bu metod proteinleri öncelikle moleküler ağırlıklarına göre ayırır. Anyonik özellikteki SDS proteinlere bağlanarak onları denatüre etmesinin yanında proteinlere negatif yük de kazandırır.

SDS-PAGE proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlayan bir uygulama olduğundan, kuyucuklardan birine marker protein uygulandıktan sonra elektroforez gerçekleştirildiği takdirde proteinlerin moleküler ağırlıkları belirlenebilmektedir (Temizkan ve Arda, 2004).

1.10.3. Native Jel Elektroforezi

Native jel elektroforezinde kullanılan tamponlar deterjan ve benzeri denatüre edici maddeler içermediklerinden elektroforez doğal koşullarda gerçekleşir. Çok sayıda protein içeren karışımların ayrılmasında, bir protein ya da protein kompleksinin aktivitesi ya da yapısı ile ilgili çalışmalarda, proteinin denatüre olup olmadığının belirlenmesinde, proteinin saflığının kontrolünde bu uygulamalardan faydalanılabilir (Temizkan ve Arda, 2004).

1.11.Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada doğal ortamlardan selüloz üreticisi *Bacillus sp.* suşlarının izolasyonu; izole edilen suşlardan asidik, nötral ve alkali karakterde selüloz enzimi üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Enzimlerin endüstride kullanımıyla ilgili ilk rapor Alman bilim insanı Röhm'e aittir. Röhm, 1913 yılında, sığır pankreas özütünün kirli çamaşırlardaki lekelerin uzaklaştırılması için kullanılabileceğini bildirmiştir (Quax, 2006; Röhm, 1915).

Miller (1951), Karbonhidrataz etkisi gösteren enzimlerin aktivite analizlerinde indirgen şeker miktarının saptanması için Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemini kullanmıştır. Bu metod ile 3,5-dinitrosalisilik asitin, 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgendiğini ve aldehit grupların karboksilik gruplara okside olarak gelişen renk reaksiyonunu oluşturdıklarını bildirmiştir.

1982 yılında yaptıkları çalışmada Teather ve Wood, sığır rumeninden elde edilen selülitik bakterilerin karakterizasyonu için kongo kırmızısı- polisakkarit interaksiyonundan yararlanmışlardır. Kongo kırmızısı boyasının β -D-glukanlarla doğrudan bağlanması sayesinde, β -1,3-1,4-D-glukanohidrolaz, β -1,4-D-glukanohidrolaz ve β -1,3-D-glukanohidrolaz aktivitelerinin görüntülenebildiği belirtilmiştir.

1985 yılında, Fukumori ve ark yaptıkları çalışmada alkalofilik, *Bacillus sp.* No. 1139'dan, pH 9.0'da optimal aktivite gerçekleştirirken pH 6.0'da aktivite göstermeyen, 92 kDa ağırlığında ve izoelektrik noktası 3.1 olarak belirlenen CMCaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Ito ve ark (1989), *Bacillus sp.* KSM-635'den deterjanlarda kullanılmak üzere alkalın selülaaz enzimi üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin, 40°C'de pH 9.5'de optimal aktivite gösterdiğini, sürfaktanlar, şelatör ajanlar ve alkalın proteazlara dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Ozaki ve Ito (1991), *Bacillus sp.* KSM-330'den 42 kDa'luk, pH 5,2'de ve 45°C'de optimal aktiviteye sahip selülaaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Khyami-Horani (1996), *Bacillus sp.*'den elde edilen selülaaz enziminin optimum aktivitesini pH 9.5 ve 40°C'de gösterdiğini, pH 7.0-11.0 aralığında 4°C'de 24 saat stabil kaldığı belirtmişlerdir. Enzimin Ca^{+2} ile indüklenirken, Hg^{+2} ile

tamamen inhibe olduğu, EDTA ve EGTA'nın ise aktiviteye etki etmediği bildirilmiştir.

Hakamada ve ark (1997), *Bacillus sp.* KSM-S237'den termostabil alkalın selüloz elde etmişlerdir. Bu enzimin optimum aktivitesini pH 8.6-9.0 ve 45°C'de gösterdiği, 50°C'ye kadar stabil olduğu, 100°C'de 10 dakika sonunda %30 aktif olduğu bildirilmiştir.

Sıddıqı ve ark (1997), *Aspergillus niger* ve *Cellulomonas biazotea*'dan CMCaz enzimi saflaştırmışlardır. Araştırmacılar, Mn^{+2} iyonlarının değişen konsantrasyonlarının ve değişen CMC konsantrasyonlarında Mn^{+2} iyonlarının enzim aktivitesinde meydana getirdikleri değişiklikleri değerlendirmişlerdir. Mn^{+2} iyonlarının, düşük konsantrasyonlarda enzim aktivitesini artırdığını, CMC'nin artan konsantrasyonlarında ise Mn^{+2} iyonlarının aktivitede düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir.

Ito ve ark (1998ö), deterjan içeriklerinde en az bir veya daha fazla sayıda enzimin yer aldığını belirtmektedir. İzolasyonunu gerçekleştirdikleri çok sayıdaki alkalın *Bacillus* suşundan alkalın deterjan enzimlerinin izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Christakopoulos ve ark (1999), *Bacillus pumilus*'dan alkalın dirençli, endo-1,4-β-glukanaz enzimi saflaştırmışlardır. Enzimin moleküler ağırlığı 67 kDa, izoelektrik noktası 3.7 olarak belirlenmiştir. Optimum aktivitesini pH 7.0-8.0 ve 60°C'de gösterdiğini, pH 12.0'de stabilitesini %50 koruduğunu bulmuşlardır.

Mawadza ve ark (2000), Zimbabwe'de kaplıcalardan selüloz üreticisi iki *Bacillus* suşu izole etmişlerdir. CH43 ve HR68 suşlarının moleküler ağırlığının 40 kDa izoelektrik noktalarının ise 5.4 olduğunu bildirmişlerdir. Enzimlerin pH 5.0-6.5 aralığında optimal aktiviteye sahip olduğu, optimum aktivite sıcaklığının CH43 için 65°C, HR68 için ise 70°C olduğu belirtilmiştir. Enzimlerin 50°C'de 24 saat stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Endo ve ark (2001), *Bacillus sp.* KSM-N252 suşundan pH 10.0'da 55°C'de optimal aktivite gösterdiğini belirledikleri, 50 kDa moleküler ağırlığa sahip ve pH 4.2 izoelektrik noktası gösteren endoglukanaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Singh ve ark (2001), izole ettikleri *Bacillus sp.* VG1'den termostabil ve alkalik CMCaz enzimi üretmişlerdir. Enzimin pH 9.0-10.0'da optimum aktivite gösterdiği ve 100°C'de 12 dakika yarılanma ömrüne sahip olduğu, Hg⁺² ile aktivitesinde azalma gözlenirken ; Co⁺², Na⁺ ve K⁺ ile indüklendiği bildirilmiştir.

Coral ve ark (2002), *Aspergillus niger* Z10 yaban tip suşundan elde ettikleri CMCaz enziminin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Zimogram analizi sonucunda 83 ve 50 kDa ağırlığında iki aktivite bandı elde edildiği bildirilmiştir. Enzimin optimum sıcaklığının 40°C, aktivite pH'sının 3.0-9.0 aralığında olduğu bulunmuş, 90°C'de 15 dakika sonunda aktivitesinin %41.2 olduğu belirtilmiştir.

Hakamada ve ark (2002), *Bacillus circulans* KSM-N257'den CMCaz enzimi izolasyonu, kristalizasyonu gerçekleştirilmiş ve amino asit sekansı ortaya çıkarılmıştır. Enzimin optimum aktivitesini, pH 8.5'de ve 55°C'de gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

Vyas ve Lachke (2003), *Fusarium sp*'den elde edilen alkalik aktif selüloz enziminin ofis kağıtlarının geri dönüşümünde mürekkebin geri alınması işlemlerindeki aktivitesini değerlendirmişler, kağıtların parlaklığının arttığını ve mürekkep miktarında düşüş olduğunu bildirmişlerdir.

Miettinen- Onionen ve ark (2004), *Melanocarpus albomyces*'den biri 20 kDa diğeri 50 kDa ağırlığında iki endoglukanaz, üçüncü olarak da 50 kDa ağırlıkta bir sellobiyohidrolaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzimlerden 20 kDa endoglukanaz enzimi nötral pH'da kumaşların biostoning uygulamalarında, diğeri iki enzim ise biostoningde geri boyamanın azaltılması işlemlerinde kullanılabilir olduğunu belirlemişlerdir.

Singh ve ark (2004), *Bacillus sphaericus* JS1 tarafından üretilen termostabil alkalik selüloz enziminin saflaştırmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, pH 9.5'de ürettikleri enzimi amonyum sülfat, iyon değişim ve jel kromatografisiyle 192 kat saflaştırmışlardır. CMCaz enziminin native PAGE ile molekül ağırlığı 183 kDa bulunurken SDS-PAGE ile 42 kDa olarak hesaplandığı bildirilmiştir. Enzimin Fe⁺³ ve Hg⁺² ile inhibe olduğu, Co⁺², K⁺ ve Na⁺ ile aktive olduğu belirtilmiştir.

Kim ve ark (2005), yeni izolat alkalofilik *Bacillus sp.* HSH-810'dan alkalın selüloz saflaştırması ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin pH 10.0'da ve 50°C'de optimal aktivite gösterdiği, pH 6.0-10.0 aralığında 60°C'de 60 dakika sonunda %60 stabil kaldığı ve moleküler ağırlığının 80 kDa olduğu bildirilmiştir.

Bischoff ve ark (2006), *Bacillus licheniformis* termofilik suşundan endoglukanaz enziminin saflaştırmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimal sıcaklığının 65°C olduğu ancak enzimin en stabil olduğu sıcaklığın 60°C olduğu belirtilmiştir. Enzimin pH 6.0'da maksimal aktivite gösterdiği, pH 4.5'da orijinal aktivitesinin %75'ini, pH 10'da ise orijinal aktivitesinin %40'ını koruduğunu belirlemişlerdir.

Hirasawa ve ark (2006), deniz suyundan izole ettikleri *Bacillus agaradhaerens* 'den alkalın ve salt-activated endoglukanaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin NaCl bulunmayan ortamda pH 6.5-7.0'de 50°C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği bildirilirken, 0.2 M NaCl bulunan ortamda pH 7.0-9.4 aralığında ve 60°C'de en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Enzimin ayrıca, KCl, Na₂SO₄, NaBr, NaNO₃, CH₃COONa, LiCl, NH₄NO₃ ve NH₄Cl ile aktivitesini 2.4 kat artırdığı belirlenmiştir.

Li ve ark (2006), bir yumuşakça olan *Ampullaria crosseans*'den selüloz aktivitesine sahip *Bacillus sp.* AC-1 suşunu izole etmişler, bakteriden elde ettikleri endoglukanaz enziminin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ba-EGA enziminin amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişimi, hidrofobik ve jel filtrasyonu kromatografisiyle 150 kat saflaştırıldığı belirtilmiştir. CMC substrat olarak kullanıldığında, maksimum aktivitenin 4.5-6.5 ve 70°C'de gerçekleştiği, enzimin 30°C'de pH 7.5-10.5 aralığında 2 saat stabil olduğu, 50°C'de 1 saat sonunda ise %80'den fazla stabilitesini koruduğu bildirilmiştir. Enzim aktivitesinin Fe⁺², Cu⁺² ve SDS ile inhibe olduğu, Tween 20 ve Triton X-100 ile aktive olduğu belirlenmiştir.

Mayende ve ark (2006), komposttan izole ettikleri *Bacillus spp.*'den CMCaz ve polifenool oksidaz enzimi üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Selüloz enziminin optimum aktivitesini 70°C'de, polifenol oksidaz enziminin ise optimal aktivitesini 40°C'de gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

Jung ve ark (2007), molekül ağırlığı SDS PAGE ile 33 kDa olarak belirlenen, pH 6.0 ve 60°C’de optimum aktivite gösteren termostabil β -1,3-1,4 glukanaaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin orijinal aktivitesini pH 9.0-12.0 aralığında %40 koruduğu bildirilmiştir. Enzimin izole edildiği *Bacillus sp.* A8-8 suşunun CMC, xylan, selüloz ve kazein üzerinde üreme gösterdiği bulunmuştur.

Apiraksakorn ve ark (2008), *Bacillus subtilis* GN156’den J1 ve pJ2 olmak üzere iki β -1,3-1,4- glukanaaz enzimi saflaştırması gerçekleştirilmiştir. J1 ve pJ2 enzimlerinin moleküler ağırlıkları ve pI değerleri sırasıyla 25 kDa ve 3.5, 90 kDa ve 3.6 olarak belirlenmiştir. Optimum pH ve sıcaklık değerleri ise her iki enzim için 6.0-6.5 ve 60°C olarak bildirilmiştir. Enzimler Li^{+2} ile inhibe olmazken, Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Zn^{+2} ile önemli oranda inhibe oldukları belirlenmiştir.

Aygan ve Arıkan (2008), Van soda gölünden izole ettikleri *Bacillus sp.* C14’ün 37°C’de ve pH 9’da halo-alkalofilik endoglukanaz enzimi üretimi gerçekleştirmişlerdir. SDS-PAGE ile enzimin moleküler ağırlığı tek bant halinde 61 kDa olarak belirlemişlerdir. Enzimin optimum pH’sının 11, sıcaklığının 50°C olduğu bildirilmiştir. Enzimin, 20-40°C’de 30 dakika sonunda %89 olduğu, pH stabilitesinin ise pH 6.0-12.0 aralığında 24 saat sonunda ortalama %65 olduğu bildirilmiştir. 5mM CaCl_2 (%132) ile indüklendiği, ve 5mM ZnCl_2 , EDTA, KCl, PMSF, 8M üre, %1 Triton X-100, %1 β -merkaptoetanol ve %1 SDS varlığında sırasıyla %23, %7, %60, %57, %58, %48, %31 ve %19 inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, endoglukanaz enziminin en yüksek aktiviteyi %20 NaCl konsantrasyonunda (%132) gösterdiği, 1 ve 6 saat sonunda orijinal aktivitesinin sırasıyla, %75 ve %70 koruduğunu bildirmişlerdir.

Dutta ve ark (2008), ekstremofilik filamentöz bir fungi olan *Penicillium citrinum*’dan selüloz enzimlerinin üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Zimogram analizleri ile 38 ve 90 kDa ağırlığında iki aktivite bandının varlığı bildirilmiştir. Enzimin, pH 5.5 ve 8.0’da iki pik meydana getirdiği belirtilmiştir.

Gao ve ark (2008), *Aspergillus terreus* M11’den optimum aktivitelerini pH 2.0 ve pH 3.0’de gösteren endoglukanaz ve β -glukozidaz enzimleri izole etmişlerdir. Enzimlerin, maksimum aktivitelerini 70°C’de gösterdikleri bildirilmiştir.

Lee ve ark (2008), *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 suşu tarafından üretilen selüloz enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. SDS-PAGE ile moleküler ağırlığını 54 kDa olarak belirlemişlerdir. Saf selüloz enziminin avicel, CMC, sellobioz, β -glukan ve xylanı hidroliz edebildiği, ancak, *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG)'i hidroliz edemediği bildirilmiştir. Selüloz enziminin 50°C ve pH 7.0'de maksimal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. CMCaz aktivitesi çeşitli metal iyonlarıyla $Hg^{+2} > EDTA > Mn^{+2} > N$ -bromosuccinimide $> Ni^{+2} > Pb^{+2} > Sr^{+2} > Co^{+2} > K^{+}$ doğrultusunda inhibe olduğu bulunmuştur.

Liu ve ark (2008), Çin'in Neimenggu bölgesindeki soda gölünden elde edilen β -glukanaz üreticisi *Bacillus sp.* III-3 suşunu izole edip enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Alkali karakterdeki suşun, III-3-A nötral ve III-3-B alkali β -glukanaz enzimlerini ürettiğini bildirmişlerdir. Kolon kromotografisiyle saflaştırılan enzimlerden III-3-A'nın moleküler ağırlığının 45 kDa, III-3-B'nin moleküler ağırlığının ise 85 kDa olduğu belirtilmiştir. III-3-A ve III-3-B enzimlerinin optimum aktivite pH'ları sırasıyla 7.0 ve 8.0-10.0 olduğu, optimum sıcaklıklarının ise 45°C olduğu belirtilmiştir. Ca^{+2} iyonunun enzimin aktivitesini indüklediği bulunmuştur.

Thongekkaew ve ark (2008), *Cryptococcus sp.* S-2'den elde edilen CMCaz'ın optimum aktivite pH'sının 3.5, optimum aktivite sıcaklığının ise, 40-50°C olduğunu belirlemişlerdir. Enzimin pH 5.5 ve 7.5 aralığında stabil olduğu ve 90°C'de 1 saat sonunda aktivitesini %50 koruduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve ark (2009), deniz bakterisi olan *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53'den izole edilen CMCaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 56 kDa olarak belirlemişlerdir. CMCaz enziminin optimum pH ve sıcaklık değerlerinin sırasıyla, 6.5 ve 50°C olduğu bildirilmiştir.

Kumar ve ark (2009), *Bacillus sp.* FME1 ve FME2 suşlarının farklı substratlar üzerinde ürettikleri CMCaz FPaz ve β -glukozidaz enzimlerini kıyaslamışlar ve FME1 suşuna ait enzimlerin FME 2 suşuna ait olandan daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Liang ve ark (2009), *Brevibacillus sp.* strain JXL suşundan optimum aktivitesini 50°C'de ve pH 6.0-8.0 aralığında gösteren, 100°C'de 1 saat sonunda %50 stabil kalabilen termostabil selüloz enzimlerinin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

Wang ve ark (2009), *Salinivibrio sp.* strain NTU-05 suşundan halostabil selüloz enzimi saflaştırması ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Protein likid kromatografi yöntemiyle kültür süpernatantından saflaştırılarak elde edilen enzimin, moleküler ağırlığı 29 kDa olarak belirlenmiştir. Enzimin %0-25 NaCl konsantrasyonunda aktif olduğu ve %5 NaCl ile optimum selüloz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir. K^{+} , Mg^{+2} , Na^{+} iyonlarında enzim aktivitesinin indüklendiği, Hg^{+2} varlığında ise aktivitenin düştüğü belirtilmiştir.

Aygan ve ark (2011), Van Gölü'nden izole ettikleri *Bacillus licheniformis* C108 halofilik alkalın suşundan, pH 10.0'da ve 30°C'de optimal aktivite gösteren endoglukanaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzim aktivitesinin SDS, Triton X-100, $ZnCl_2$, PMSF ve üre ile inhibe olduğu bildirilmiştir. Enzimin, pH 10'da ve 100°C'ye kadar stabil olduğu, %7-10 NaCl konsantrasyonunda 6 saate kadar stabil kaldığı belirtilmiştir.

Bai ve ark (2010), ekstrem asidik β -1,4- glukanaz, CelA4, enzimini termoasidofil karakterdeki *Alicyclobacillus sp.*A4 suşundan izole etmişlerdir. Elde edilen bu enzimin, 65°C'de ve pH 2.6'da optimum aktivite gösterdiği, pH 1.8-7.6 aralığında stabil olduğu, asidik ve nötral proteazlara karşı direnç gösterdiği bildirilmiştir.

El-Zawahry ve ark (2010), *Trichoderma sp.* (Shmosa tri)'den kısmi saflaştırma ile elde ettikleri endo- β -1,4-glukanaz enziminin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. 34 ve 58 kDa ağırlığında iki CMCaz bulundurduğu SDS PAGE ile belirlenen enzimin, 50°C'de 60 dakika sonunda aktivitesini hiç kaybetmediği belirlenmiştir. Optimum pH değeri 5.0, sıcaklık değeri ise 50°C olarak bildirilmiştir.

Luo ve ark (2010), *Biospora sp.* MEY-1'den izole ettikleri asidik β -1,3-1,4-glukanaz enzimini *Pichia pastoris*'e klonlamış ve eksprese olmasını sağlamışlardır. Rekombinant enzimin maksimum aktivitesi pH 5.0'de olan, pH 1.5, pH 3.5 ve pH 5.0'de olmak üzere üç aktivite piki olduğu, optimum sıcaklığının 60°C olarak belirlendiği ve pH 1.0-8.0 aralığında stabil kaldığı bildirilmiştir.

Rastogi ve ark (2010), WSCUF1 suşunu komposttan, DUSELR13 suşunu ise altın madeninden izole etmişlerdir, iki enzimin de optimal aktivite pH'sı 5.0, sıcaklıkları ise sırasıyla 70°C ve 75°C olarak bildirilmiştir.

Shanmughapriya ve ark (2010), *Marinobacter sp.* MSI032'den mezofilik alkalın selüloz enzimi karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum aktivitesini 27-35°C aralığında ve pH 9.0'da gerçekleştirdiğini pH 12'de ise yüksek stabiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Yang ve ark (2010), *Bacillus subtilis strain* I15 suşundan maksimal aktivitesini pH 6.0'da ve 60°C'de gösteren, 65°C'de 2 saat sonunda %95 stabil kalan CMCaz enzimi izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu enzime ait *celI15* genini *Escherichia coli* BL21 (DE3)'e klonlamış ve ekspresyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, klonlanan enzimin de doğal izolata ait enzimle aynı özelliklere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Annamalai ve ark (2011), termostabil ve halostabil karakterde CMCaz enziminin izolasyonunu bir deniz bakterisi olan *Bacillus licheniformis* AU01'den gerçekleştirmişlerdir. Moleküler ağırlığını 37 kDa olarak buldukları enzimin pH 9.0-10.0'da ve 50-60°C'de maksimal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin, pH 12.0'de %20-30 NaCl konsantrasyonunda oldukça stabil olduğu, katyonik, anyonik ve ticari deterjanların ise aktivitesini etkilemediği bildirilmiştir.

Korpole ve ark (2011), şehir çöplüğüne ait ekosistemde CMCaz enzimi üreticisi 22 mikroorganizma izole etmişlerdir. İzole edilen tüm mikroorganizmaların en yüksek üremeyi pH 9.0-10 aralığında gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar *Bacillus* LCF15 suşunun en yüksek selüloolitik aktiviteye sahip organizma olduğunu bulmuşlardır.

Peng ve ark (2011), yaptıkları araştırmada *Clostridium thermocellum*'dan *celD* selüloz genini, pET-20b(+) ve pHsh vektörleriyle *Echerichia coli*'ye klonlamışlardır. Ekspresyonu gerçekleştirilen enzimin, optimum aktivitesini pH 5.4 ve 60°C'de gerçekleştirdiği, Ca^{+2} ile indüklenirken, EDTA ile inhibe olduğu bildirilmiştir.

Trivedi ve ark (2011), organik solvent stabil alkalın selüloz sentezleyebilen, solvent tolerant *Bacillus aquimaris* bakterisinin izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir. pH 11.0'de ve 45°C'de optimal aktivite gösteren enzimin, pH12 ve 75°C'de sırasıyla %85 ve %95 stabil kalabildiğini göstermişlerdir. Enzimin, benzen ile %122 aktivite

gösterdiği belirtilirken, metanol (%85), aseton (%75), toluen (%73) ve heptan (%42)'a karşı stabil olduğu bildirilmiştir.

Asha ve ark (2012), selülitik *Paenibacillus barcinonensis*'den pH 6.0'da ve 65°C'de optimum aktivite gösterebilen, CMC, avicel, filtre kağıdı ve β -glukani hidroliz edebilen, moleküler ağırlığı 58.6 olarak belirlenmiş selülaiz izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir.

Gupta ve ark (2012), *Anabaena laxa*'dan iki ayrı antifungal karakterde endoglukanaz enzimi izole etmiş ve biyokimyasal, strüktürel ve işlevsel analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Enzimlerin 38 ve 74 kDa moleküler ağırlıkta olduğu, optimum aktivitesini ise pH 6.0'da ve 30°C'de gerçekleştirdiği bildirilmiştir.

Li ve ark (2012), halofilik *Thalassobacillus*'dan organik solvent tolerant alkalik selülaiz saflaştırması ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. SDS PAGE ile enzimin moleküler ağırlığı 61 kDa olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, enzimin optimum aktivitesini, 60°C, pH 8.0 ve %10 NaCl konsantrasyonu koşullarında gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir. Enzimin, 30-80°C ve pH 7.0-11.0 aralığında ve %7.5-17.5 NaCl konsantrasyonunda stabil olduğu bildirilmiştir.

Li ve Yu (2012), halotolerant karakterdeki *Bacillus sp.* L1 suşundan organik solvent tolerant selülaiz enzimi karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimal aktivitesinin 60°C, pH 8.0'de ve %7.5 NaCl konsantrasyonunda gerçekleştiği bildirilmiştir. Molekül ağırlığının ise 45 kDa olduğu, EDTA ve PMSF ile inhibe olduğu bununla beraber çeşitli sürfaktanlara dirençli olduğu belirtilmiştir.

Rawat ve Tewari (2012), *Bacillus subtilis* LFS3 suşundan asidotermofilik selülaiz enzimi saflaştırması ve karakterizasyonu yapmışlardır. Enzimin native-PAGE ile moleküler ağırlığı 185 kDa olduğu bildirilmiştir. CMCaz enziminin 60°C'de pH 4.0'de optimal aktivite gösterdiği, Na^+ , Mg^{+2} , NH_4^+ ve EDTA ile indüklenirken, Hg^{+2} ve Fe^{+3} ile kuvvetli şekilde inhibe olduğu belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri İzolasyonu ve Teşhisinde Kullanılan Besiyerleri

3.1.1.1. N1 agar

Alkalifilik, nötral ve asidofilik *Bacillus sp.* suşlarının izolasyonu ve eğik katı agarda saklanması için kullanılmıştır (Anonymous, 1978).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Pepton	10
Et özütü	10
Maya	5
Glikoz	1
Agar	15
Distile su	1000ml

İstenilen özellikteki bakterilerin izolasyonu için pH 5.0, pH 7.0 ve pH 9.0 olarak ayarlanmış, otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

3.1.1.2.CMC-Agar

Seçilen bakterilerin CMC hidroliz yeteneklerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Test edilen suşun özelliğine göre pH’sı; pH5.0, pH7.0 ve pH9.0 olarak ayarlanmıştır. LB agar besiyeri içerisine CMC ilave edilmesiyle modifiye edilmiştir (Sambrook ve Russell, 2001).

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Trypton	10
Maya ekstraktı	5
NaCl	5
CMC	10
Agar	15

3.1.1.3. Enzim üretim besiyeri

Enzim üretimi için kullanmak amacıyla seçilen organizmanın enzim üretmesi için inoküle edildiği besiyeridir. pH'sı organizmanın optimum ürettiği ve enzim ürettiği pH değerine göre ayarlanmıştır.

<u>Bileşimi</u>	<u>g/l</u>
Trypton	10
Maya	5
NaCl	5
CMC	10

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

3.1.2.1. NaOH Çözeltisi

Besiyerlerinin pH'sının ayarlanması ve tampon çözeltilerin hazırlanması amacıyla, 0,2N ve 2N NaOH çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.2.2. Etanol

Sıvı besiyerinde üretilen enzimlerin presipitasyonu ve kısmi saflaştırılması amacıyla %96'lık olarak hazırlanmış ve soğutulmuş kullanılmıştır.

3.1.2.3. Kongo Kırmızısı

Bakterilerin katı besiyerindeki CMCaz aktivitesini belirlemek ve zimogram analizinde oluşan aktivite bantlarını görünür hale getirmek için kullanılmıştır. 1mg/ml konsantrasyonda 100 ml hazırlanmıştır (Teather and Wood, 1982).

3.1.2.4. NaCl Çözeltisi

Petri kutusunda CMCaz aktivitesinin belirlenmesi sırasında ve zimogram analizinde jelde bulunan aktivite bantlarını görünür hal getirmek amacıyla boyanın geri alınması işleminde kullanılmıştır. 1M konsantrasyonda hazırlanmıştır (Teather and Wood, 1982).

3.1.2.5. KCl-HCl Tamponu

Enzimin pH 1.0-2.0 aralığındaki aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. 0.2M KCl ve 0.2M HCl çözeltileri hazırlandıktan sonra, istenilen pH'ya ayarlamak için çizelge 3.1.'de belirtilen hacimlerde karıştırılmış ve distile su ile belirlenen miktarlara tamamlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3. 1.KCl-HCl Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.2 M KCl (14.91 g/L)	0.2 M HCl	Distile Su	Toplam Hacim
1.0	50 ml	97.0ml	53 ml	200 ml
2.0	50 ml	10.6ml	140.6 ml	200ml

3.1.2.6. Sitrat-fosfat tamponu

Enzimin pH 3.0-5.0 aralığındaki aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır. Tamponun hazırlanması için 0.2 M Sitrik asit ve 0.2 M Na_2HPO_4 çözeltilerinden çizelgede belirlenmiş olan miktarlarda alınır ve distile su ile istenilen hacme tamamlanır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3. 2.Sitrat-Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.2M Sitrik asit (19.21 g/ml)	0.2M Na_2HPO_4 (53.65 g/ml)	Distile su	Toplam Hacim
3.0	39.8 ml	10.2 ml	50 ml	100ml
4.0	30.7 ml	19.3 ml	50 ml	100ml
5.0	24.3 ml	25.7 ml	50 ml	100ml

3.1.2.7. Sodyum-fosfat tamponu

Enzimin pH 6.0-8.0 aralığındaki aktivitesinin tespiti için kullanılmıştır. Tamponu hazırlamak için 0.2M Na_2HPO_4 ve 0.2M NaH_2PO_4 çözeltilerinden yararlanılır. Tampon çözeltilerinin istenilen pH'ya göre uygun konsantrasyonda karıştırılmasından sonra saf suyla istenilen hacme tamamlanır. Çözeltiler çizelge 3.3. 'e göre hazırlanır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3. 3.Sodyum-Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.2 M Na_2HPO_4 (53.65 g/L)	0.2M NaH_2PO_4 (27.8 g/L)	Distile su	Toplam hacim
6.0	15.0 ml	85.0 ml	100ml	200ml
7.0	61.0 ml	39.0 ml	100ml	200ml
8.0	5.3 ml	94.7 ml	100ml	200ml

3.1.2.8. Glisin-NaOH tamponu

Enzimlerin pH 9.0-11.0 aralığındaki aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. 0.2M Glisin ve 0.2 M NaOH uygun miktarlarda karıştırılarak distile su ile istenilen hacme tamamlanır. Karışım oranlarını belirlemek için çizelge 3.4 kullanılır (Temizkan ve Arda, 2004).

Çizelge 3. 4.Glisin-NaOH Tampon Çözeltilerinin Hazırlanması

pH	0.2M Glisin (15.01 g/L)	0.2M NaOH (8 g/L)	Distile su	Toplam Hacim
9.0	50ml	8.8 ml	141.2 ml	200ml
10.0	50ml	32 ml	118 ml	200ml

3.1.2.9. Borax-NaOH tamponu

Enzimlerin pH 11.0-13.0 aralığındaki aktivitelerini ölçmek için kullanılmıştır. 0.05 M Borax (19.05 g/l) tamponu hazırlandıktan sonra, istenilen pH'da tamponu elde etmek için stok çözeltiden 50ml alınır ve pH'sı NaOH ile istenilen değere ayarlanır. Yüksek pH değerleri için 2N NaOH kullanılırken düşük pH değerlerinin ayarlanması için 0.2M NaOH'den yararlanılır. Elde edilen karışıma toplam hacim 200ml olacak şekilde distile su ilave edilir (Temizkan ve Arda, 2004).

3.1.2.10. Dinitro Salisilik Asit (DNS)

CMCaz aktivitesi sonucunda açığa çıkan indirgen şeker miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır. 1g DNS 50 ml suda çözüldükten sonra üzerine 30 g Potasyum Sodyum Tartarat ilave edilir. Karışıma 20 ml 2N NaOH eklendikten sonra son hacim 100ml'ye tamamlanır (Miller, 1951).

3.1.3.Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar**3.1.3.1. Solüsyon A (Akrilamid Solüsyonu)**

29.2 gr Akrilamid ve 0.8g bisakrilamid bir miktar suda çözülür ve son hacim 100ml olacak şekilde distile su ile tamamlanır. Koyu renkli bir şişede buz dolabında saklanır (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.2. Solüsyon B (4X)

pH'sı 8.8 olan 2M Tris-HCl (75 ml), %10'luk SDS (4ml) ve 21 ml distile su karışımından meydana gelir (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.3. Solüsyon C (4X)

1M Tris-HCl (pH 6.8)'den 50ml, %10'luk SDS'den 4 ml alınır, karışıma 46 ml distile su ilave edilir (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.4. Amonyum Persülfat (AMPS) %10

0.5g AMPS 5ml distile su içerisinde çözülür (Bollag ve ark, 1996)

3.1.3.5.Yürütme Tamponu

3g Tris, 14.4g Glisin ve 1g SDS bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000ml'ye tamamlanır (Peterson ve ark, 2009).

3.1.3.6. Örnek Yükleme Tamponu

Örneklerin jelde oluşturulan kuyucuklara yüklenmesi sırasında, örneklerle ¼ oranında karıştırılarak kullanılır. Çizelge 3.5 kullanılarak hazırlanır.

Çizelge 3. 5.Örnek Yükleme Tamponunun Hazırlanması

Kullanılacak çözelti	Alınması gereken miktar
1M Tris-HCl (pH 6.8)	0,6 ml
Gliserol (%50)	5ml
SDS (%10)	2ml
β -merkaptoetanol	0.5ml
%1 bromfenol mavisi	1ml
Distile su	0.9ml

3.1.3.7. SDS Jel Boyama (Staining) Solüsyonu

SDS-PAGE sonunda protein bantlarının görünür hale getirilmesi için kullanılmıştır. 1g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450ml metanol içerisinde çözülüp filtre kağıdıyla süzülür. Üzerine 100ml asetik asit ve 450ml distile su ilave edilir (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.8. SDS Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu

SDS-PAGE’de boyama işlemi sonrasında jeldeki boyanın geri alınması işlemi için kullanılır. 100ml metanol, 100ml asetik asit ve 800ml distile su karışımından elde edilir (Bollag ve ark, 1996).

3.1.3.9.SDS-PAGE’de Zimogram Analizi İçin Renatürasyon Solüsyonları

Renatürasyon solüsyonu-A: %40 isopropanol eklenmiş, (pH7.2) sodyum fosfat tamponu şeklinde istenilen miktarda hazırlanır.

Renatürasyon solüsyonu-B : pH’sı 7.2 olarak ayarlanmış sodyum fosfat tamponundan istenilen miktarda hazırlanır.

Renatürasyon solüsyonu-C: 1mM EDTA ve 1mM β -merkaptoetanol içeren pH7.2 sodyum fosfat tamponu olarak istenilen miktarda hazırlanır(Coral ve ark, 2002).

3.1.4.İnce Tabaka Kromatografisi Solüsyonları**3.1.4.1. Kloroform-Asetik Asit-Distile Su Çözeltisi**

CMCaz enzimlerine ait hidroliz ürünlerinin belirlenmesi için hareketli faz olarak kullanılmıştır. Kloroform-asetik asit-distile su (6:7:1) karışımından oluşur (Singh ve ark, 2004).

3.1.4.2. Anilin-Difenilamin-Ortofosforik Asit Çözeltisi

İnce tabaka kromatografisinde, son ürünlerin görünür hale getirilmesi amacıyla TLC plaklarına püskürtülerek kromatografi lekelerinin belirginleştirilmesi için kullanılmıştır. %1 anilin ve %1 difenilamin aseton içerisinde çözülür, karışım üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ortofosforik asit ilave edilir (Singh ve ark, 2004).

3.1.4.3. D-glukoz Çözeltisi

%1 (w/v) konsantrasyonda hazırlanır. Son ürünlerin tanımlanması amacıyla standart olarak kullanılır.

3.1.4.4. Maltoz çözeltisi

İnce tabaka kromatografisinde son ürünlerin tanımlanması amacıyla %1(w/v) konsantrasyonda hazırlanır.

3.1.4.5. Maltotrioz Çözeltisi

Son ürünlerin tanımlanması için kullanılır. %1 (w/v) konsantrasyonda hazırlanır.

3.2. Metod

3.2.1. Topraktan *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu

Adana’da çeşitli bölgelerden alınan toprak ve kompost örnekleri 1’er gram tartıldıktan sonra pH’sı sırasıyla pH 5.0, pH7.0 ve pH 9.0 olarak ayarlanmış N1 besiyerlerine inoküle edilip 24 saat süreyle, 55°C’deki çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda 80°C’de 10dk sıcaklık uygulaması gerçekleştirilmiştir (Hamilton, 1999, Arıkan, 2008). Ön işlem sonrasında tek koloni elde etmek amacıyla aynı pH’da hazırlanmış N1 agar besiyerine azaltma ekim yapılmıştır. 24 saat inkübasyonun ardından oluşan kolonilerden karakteristik *Bacillus sp.* görünümünde olanlar seçilerek N1 agara çizgi şeklinde ekilmiş ve 55°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen koloniler sonraki analizlerde kullanılmak üzere N1 agarda stok şeklinde saklanmışlardır.

3.2.2. Bakterilerin teşhisi

Seçilen bakteri örneklerinin teşhisi için Gram boyama, spor oluşumu, hareketlilik gibi mikroskopik testler ve kültür morfolojisinin incelenmesi gibi değerlendirmeler yapılmıştır (Ratanakhanokchai ve ark, 1999).

3.2.3. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Katı besiyerinde CMCaz Aktivitesinin Belirlenmesi

İzole edilen suşlar, izolasyon pH’larına uygun olarak pH5.0, pH7.0 ve pH9.0 şeklinde hazırlanmış CMC-agar besiyerine çizgi şeklinde ekilmiş ve 55°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petri kutusuna %0.1 Kongo kırmızısı çözeltisi dökülerek örnekler 15 dakika süreyle boyanmıştır.

Boyama süresi sonunda, petri içerisindeki boya dökülüp boyayı geri almak üzere petriye 1M NaCl çözeltisi koyulmuştur. 15 dakikalık boya giderme işleminden

sonra NaCl çözeltisi uzaklaştırılmış, sonuçlar değerlendirilmiştir. Boyama ve boya giderme işlemleri sonunda etrafında sarı zon görülen suşlar CMCaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Teather and Wood, 1982).

3.2.3.2. Bakterilerin Katı Besiyerinde Ürettiği, Enzim Sentezlerinin Gerçekleştiği pH ve Sıcaklık Aralığının Saptanması

Alkali CMCaz üreten bakterilerin ürettiği ve enzim sentezlerinin gerçekleştiği pH aralığının saptanması için, pH'sı; pH 8.0, pH 9.0, pH 10.0, pH 11.0, pH 12.0 ve pH 13.0 olarak ayarlanmış CMC-agar, nötral CMCaz enzim üreticileri için pH'sı pH 6.0, pH7.0 ve pH8.0 olarak ayarlanmış CMC-agar, asidik CMCaz enzim üreticileri için pH 4.0, pH5.0 ve pH6.0 değerine sahip CMC-agar besiyerlerine seçilen suşlar çizgi şeklinde ekilerek 30, 40, 50 ve 60°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

En iyi üreme ve enzim aktivitesinin gerçekleştiği pH ve sıcaklık değeri, koloni çapı ve aktivite zon çapının ölçülmesiyle belirlenmiştir. (Voget ve ark, 2006).

3.2.3.3. Sıvı kültürde CMCaz Enzimi üretimi ve Saflaştırılması

Seçilen suşların optimum ürettiği ve enzim ürettiği pH değerlerinin belirlenmesinden sonra asidik CMCaz enzimi üreticisi olarak SC61 suşu pH'sı 4.0 olan sıvı CMC besiyerine inoküle edilmiştir. 10ml olarak hazırlanan başlangıç kültürü 50°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 1000ml'lik enzim üretimi besiyerine aktarılmıştır. 50°C'de 200 rpm'de 24 saat üretim gerçekleştirilmiştir.

Nötral CMCaz enzimi üreticisi olan SC6 suşu pH'sı 6.0 olarak hazırlanmış 10ml sıvı CMC besiyerine inoküle edilmiş, 50°C'de 200 rpm'de 24 saat inkübe edilerek başlangıç kültürü hazırlanmıştır. Hazırlanan bu kültür 1000ml'lik enzim üretimi besiyerine aktararak 50°C'de 200rpm'de üretime devam edilmiştir.

Alkali CMCaz enziminin üretilmesi için seçilen SC41 suşu başlangıç kültürü için 10ml sıvı CMC besiyerine inoküle edilmiş pH10.0'da, 50°C'de 24 saat inkübe

edilmiştir. Elde edilen bu kültür aynı koşullardaki 1000ml miktarda enzim üretim besiyerine aktararak üretime 24 saat daha devam edilmiştir.

Enzimlerin saflaştırılması için elde edilen kültürler +4°C’de 8000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş, süpernatantın steril bir kapta toplanmasıyla hücreler ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant üzerine orijinal hacmin %70’i kadar %96 soğuk etanol ilave edilmiştir. Karışım alt-üst edilerek homojen hale getirildikten sonra -33°C’de 1 gece bekletilmiştir.

Presipite olan örnekler +4°C’de 10000rpm’de 20 dk santrifüj edilerek örnekler toplanmıştır. Çökelti pH’sı 7.0 olan 0.1 M sodyum fosfat tamponunda homojenize edildikten sonra buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3.4. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Aralığının Belirlenmesi

Kısmi saflaştırma ile elde edilmiş asidik karakterdeki CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerini saptamak için %1 substrat içeren KCl-HCl (pH 1-2), Na-Sitrat (pH 3.0-5.0) ve Na-fosfat (pH 6.0-8.0), tamponları kullanılarak analiz edilmiştir. Aktivite tayini için 0.5 ml enzim ve her pH değerindeki substrat çözeltisinden 0.5 ml substrat alınarak tüplerde karıştırılmıştır. Hazırlanan enzim substrat karışımları enzimin üretildiği sıcaklıkta su banyosunda 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda her bir örnek tüpüne eşit miktarda DNS ayırıcı konularak (1ml enzim+substrat, 1 ml DNS) 5 dakika kaynatılmıştır. Tüpler soğutulduktan sonra 540 nm’de köre karşı okuma işlemi yapılmıştır. Kör, eşit hacimde substrat ve DNS koyularak hazırlanmıştır. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranlanmış ve relatif enzim aktivitesi saptanmıştır.

Elde edilmiş olan nötral özellikteki enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için sitrat-fosfat (pH 3-5) ve sodyum fosfat (pH 6-8) tamponları ile hazırlanmış, %1 CMC içeren substrat çözeltileri kullanılmıştır. Deney tüplerine her pH değerindeki substrat çözeltisinden 0.5 ml koyulup üzerlerine 0.5 ml enzim ilave edildikten sonra karışım enzimin üretildiği sıcaklıktaki su banyosunda 60 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda en yüksek absorbans değerinin

elde edildiği pH değerinde belirlenen aktivite değeri 100 kabul edilerek diğer pH değerleri bu değere göre oranlanmış ve diğer pH'lardaki relatif enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda her bir örnek tüpüne eşit miktarda DNS ayırıcı konularak (1 ml enzim+substrat, 1 ml DNS) 5 dakika kaynatma yapılmıştır. Tüpler soğutulduktan sonra 540 nm'de, köre karşı okuma işlemi yapılmıştır. Kör, eşit hacimde substrat ve DNS ayırıcı kullanılarak hazırlanmıştır.

Alkali karakterdeki CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için sodyum fosfat (pH 6-8), glisin-NaOH (pH 9-10) ve Borax-NaOH(11-13) tamponları ile hazırlanmış, %1 CMC içeren substrat çözeltileri kullanılmıştır. Deney tüplerine her pH değerindeki substrat çözeltisinden 0,5 ml koyulup üzerlerine 0,5 ml enzim ilave edildikten sonra karışım enzimin üretildiği sıcaklıktaki su banyosunda 60 dakika süreyle inkübe edilmiş ve standart aktivite tayini yapılmıştır.

İnkübasyon sonunda en yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değerinde belirlenen aktivite 100 kabul edilerek diğer pH değerleri buna göre oranlanmış ve relatif enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.2.3.5.Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum aktivite sıcaklığı belirlenirken optimum aktivite gösterdikleri pH değerinde substrat çözeltileri hazırlanarak aktivite tayinlerinde kullanılmıştır. Bu amaçla SC61 suşundan elde edilen asidik CMCaz enzimi için pH 4.0 (sitrat tamponu), nötral karakterdeki SC6 suşundan elde edilen enzim için pH 6.0 (sodyum fosfat tamponu) ve alkali CMCaz için pH'sı 12.0 (borax-NaOH tamponu) olarak hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılmıştır.

0.5 ml enzim optimum pH'da hazırlanmış 0.5 ml substrat ile karıştırıldıktan sonra 30°C, 40°C, 50°C 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C'de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitiminde tüplere eşit hacimde DNS ayırıcı ilave edilmiş ve kaynar suda 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Kaynatma işlemini takiben

tüpler soğutulmuş ve 540nm’de spektrofotometrede okunmuştur. En yüksek aktivitenin görüldüğü sıcaklıktaki absorbans değeri 100 kabul edilerek rölatif aktivite hesaplanmıştır.

3.2.3.6. Enzimlerin Sıcaklık Stabilitelerinin Belirlenmesi

Kısmi saflaştırma ile elde edilmiş olan enzimlerin sıcaklık stabilitelerinin belirlenmesi için her enzimden 0.5 ml tüplere konulmuştur. Enzim örnekleri üzerine substrat eklenmeksizin 30°C, 40°C, 50°C 60°C, 70°C, 80°C, 90°C ve 100°C’de 1saat süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Ön inkübasyonu takiben tüplere 0.5 ml optimum pH’da hazırlanmış substrat ilave edilmiş ve optimum aktivitenin gerçekleştiği sıcaklık değerinde 1 saat inkübe edilmiştir. Kalan aktivitenin belirlenebilmesi için 0.5 ml optimum pH’da hazırlanmış substrat ve 0.5 ml enzim koyulan tüp optimum sıcaklıkta, ön işleme tabi tutulmadan, 1 saat inkübe edilmesiyle kontrol değeri elde edilmiştir. Aktivite süresinin bitiminde tüplere 1’er ml DNS ayırıcı ilave edilmiş, benmaride 5 dakika kaynatıldıktan sonra 540nm’de köre karşı okunmuştur. Kör, 1ml substrat ve 1ml DNS ayırıcı koyularak hazırlanmıştır. Kontrol tüpüne ait absorbans değeri 100 kabul edilmiş ve diğer değerler buna göre oranlanarak rölatif kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3.7. Enzimlerin pH Stabilitelerinin Belirlenmesi

Kısmi saflaştırma ile elde edilen CMCaz enzimlerinin pH stabilitesinin belirlenmesi için, enzimden tüplere 2’şer ml dağıtılmış, 10000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üst faz atılmış dipte kalan enzim uygun pH’da ayarlanmış substratsız tamponlar ile resüspanse edilmiştir. Asidik CMCaz enzimi için pH 2.0-6.0 aralığında hazırlanmış tamponlar kullanılırken, nötral CMCaz için pH 4.0-8.0 aralığında hazırlanmış pH tamponları , alkali CMCaz için pH 9.0-13.0 aralığında tamponlar kullanılmıştır. Uygun pH tamponlarıyla resüspanse edilen enzimler 55°C’de 24 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur.

Ön inkübasyon süresi sonunda 0.5ml enzim 0.5 ml optimum pH'da hazırlanmış substrat ile karıştırılmış ve optimum aktivite sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere eşit miktarda DNS ayırıcı ilave edilmiş benmaride 5 dakika süreyle kaynatılmıştır. Soğutulan tüpler 540 nm'de okunmuştur.

Optimum pH'da hazırlanmış ön işlemde geçmemiş 0.5ml enzimle 0.5 ml substratın aktiviteye koyulmasından elde edilen kontrol değeri 100 kabul edilmiş ve diğer değerler buna göre oranlanarak rölatif kalan aktivite hesaplanmıştır.

3.2.3.8. Enzimlerin Aktivitelerine NaCl'ün Etkisinin Belirlenmesi

NaCl'ün enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için, enzimlerden 2'şer ml tüplere koyulduktan sonra 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra dipte kalan enzim %3, %5, %7,5, %10, %15 ve %20 konsantrasyondaki tuz çözeltilerinde, resüspanse edilmiş ve 55°C'de 1 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyonun ardından standart aktivite tayini yapılmıştır. Ön işlemde geçmeyen enzimden 0.5ml alınmış, optimum pH'daki 0.5ml substratla resüspanse edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 1'er ml DNS ilave edilmiş ve benmaride 5 dakika kaynatma işlemi yapılmıştır. Soğutulan tüpler 540nm'de köre karşı okunmuştur. Kontrol değeri 100 kabul edilmiş ve diğer değerler buna göre oranlanarak kalan aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.2.3.9. İnhibitörlerin Enzim Aktivitesine Etkisi

İnhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkisinin belirlenmesi için, enzim tüplere 2'şer ml miktarda koyulup 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra dipte kalan enzim 8mM üre, 5mM MnCl₂, 5mM MgCl₂, 5mM ZnCl₂, 5mM CaCl₂, 5mM BaCl₂, 5mM EDTA, 5mM 1-10 phenonhroline ve % 1 Triton x-100, % 1 Tween-20, % 1 Tween-80, % 1 PMSF, % 1 β-merkaptotanol, %1 SDS ile resüspanse edilmiştir. Enzim inhibitör karışımları 55°C'de 1 saat ön inkübasyona bırakıldıktan sonra her bir örnekten 0.5ml alınıp 0.5ml substratla

karıştırılmış ve optimum sıcaklıkta 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 1 ml DNS ilave edilmiş ve 5 dakika kaynatılmıştır. Soğutulan tüpler spektrofotometrede 540 nm’de okunmuştur. Kontrol değerinin belirlenebilmesi için ön işleminden geçmeyen enzimden 0.5ml alınmış 0.5ml substratla karıştırıldıktan sonra 1 saat inkübe edilmiştir. DNS ilave edilip kaynatılan kontrol tüpünün değeri 100 kabul edilmiş ve diğer değerler bu değere göre oranlanarak rölatif kalan aktivite değeri hesaplanmıştır.

3.2.4. Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) ile Moleküler Ağırlık ve Zimogram Analizi

Enzimlerin molekül ağırlıkları ve enzime ait aktivitenin analizi için SDS-PAGE jel sistemi kullanılmıştır. Jel sistemi %10’luk konsantrasyonda hazırlanmıştır. (Laemmli, 1970).

3.2.4.1. SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması

%10 Konsantrasyondaki ayırıcı jelin hazırlanması amacıyla Sol A (6,5 ml), Sol B (5,0 ml), Distile Su (7,1 ml) ve %3 CMC içeren optimum pH’da hazırlanmış substrat çözeltisi (1,3 ml) karıştırılmış, hazırlanan solüsyondaki moleküler oksijenin uzaklaştırılması için 5 dakika degaz işlemi yapılmıştır. Jel karışımına polimerizasyonun gerçekleşmesi için, 66 µl AMPS ve 13 µl TEMED ilave edildikten sonra cam plakalar arasına dökülmüştür. Jelin üzeri saf suyla kapatılmış ve polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından jelin üst yüzeyindeki distile su dökülmüştür.

Dengeleyici üst jelin hazırlanması için Sol A (1,5 ml), Sol C (2,25 ml), Distile su(5,25 ml) karışımı hazırlanmış, moleküler oksijenin uzaklaştırılması amacıyla 5 dakika degaz işlemi yapılmıştır. Degaz işlemi takiben polimerizasyonun gerçekleştirilmesi için ortama AMPS (30 µl) ve TEMED (7,5 µl) ilave edildikten hemen sonra cam plakalar arasına, ayırıcı jel üzerine dökülmüştür. Bu aşamadan sonra, protein örneklerin yüklenebilmesi için kuyu oluşturulması

amacıyla kullanılan tarak, cam plakalar arasına hiç hava kalmayacak şekilde yerleştirilmiş ve polimerizasyona bırakılmıştır.

3.2.4.2. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

SDS-PAGE zimogram analizi için enzimler yürütme tamponuyla $\frac{1}{4}$ oranında karıştırıldıktan sonra, jel içerisinde oluşturulmuş olan kuyulara, uygun miktarlarda yüklenmiştir. Örneklerin moleküler ağırlıklarının belirlenebilmesi için kuyulardan birine standart protein örneği yüklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra jele 26 mA akım verilmiş, örneklerin ayırıcı jele geçtikleri noktada ise akım şiddeti 13'e düşürülmüştür. Elektroforez işlemi öncü moleküller olarak kullanılan bromfenol mavisi jelin sonuna 2 cm yaklaştığında sonlandırılmıştır.

3.2.4.3. SDS-PAGE Jelinin Boyanması ve Zimogram Analizi

Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra, marker'ın bulunduğu kısım kesilerek jelden ayrılmıştır (Aygan ve Arıkan, 2008; Saul ve ark, 1990). Marker'ın boyanması için Coomassie Brilliant Blue R-250 boyasında 2 saat boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Boyanın giderilmesi işlemi için, boyadan geri alma solüsyonunda 1 gece bırakılmıştır. Jelin enzimleri bulunduran kısmı zimogram analizi için kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle renatürasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Jel Renatürasyon Solüsyonu 1'de 1 saat, Renatürasyon Solüsyonu 2'de 1 saat ve Renatürasyon Solüsyonu 3'de 1 gece bekletilmiştir. Renatürasyon tamamlandıktan sonra jel cam plaka üzerine alınmış, plastik bir kaba yerleştirilerek kapağı kapatıldıktan sonra uygun sıcaklıkta (Jelin kurumadığı durumlarda optimum aktivite sıcaklığında) 24 saat inkübe edilmiştir (Coral ve Ark, 2002).

İnkübasyon süresinin sonunda, jeldeki aktivite bantlarının görünür hale getirilebilmesi için jel %0.1'lik Kongo kırmızısıyla 15 dakika boyanmış ve sonrasında 1M NaCl kullanılarak 15 dakika boya giderimi yapılmıştır. Kırmızı boyanmış jel üzerindeki sarı zonlar aktivitenin görüldüğü bölgelerdir.

3.2.5. Enzim Substrat Reaksiyonuna Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi

Enzim-substrat reaksiyonları sonucunda açığa çıkan son ürünlerin belirlenmesi için Merck TLC Silica Gel F₂₅₄ ince tabaka kromatografisi plakalarından yararlanılmıştır.

3.2.5.1. Enzimlere Ait Son Ürünlerin Saptanması

Reaksiyon sonucu açığa çıkan ürünlerin belirlenebilmesi için enzimin optimum pH'sında hazırlanmış %1 CMC içeren (pH 4.0, pH 6.0 ve pH 12.0'da hazırlanmış) substrat çözeltileri enzim örnekleriyle 1:4 oranında karıştırılmış, optimum aktivite sıcaklığında 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Son ürünlerin belirlenebilmesi için standart olarak %1 konsantrasyonda hazırlanmış glikoz, maltoz ve maltotrioz çözeltileri kullanılmıştır.

TLC plakaları işlemiden önce 100°C'de 30 dakika aktive edilmiştir. Bir süre soğutulduktan sonra 30-50 µl miktarlarda örnekler, plakalara yüklenmiş ve havada kuruması için bir süre bekletilmiştir. Plakalar hazırlandıktan sonra moleküllerin silika jelde göç edebilmeleri için bir yürütücü çözeltisi (kloroform-asetik asit-distile su) içerisine daldırılmıştır (Singh ve Ark, 2004). Göç etme işleminin tamamlanabilmesi için işlem 5-7 saat devam ettirilmiştir.

Analizi yapılan ürünlerin görünür hale getirilebilmesi için plaka üzerine asetonda hazırlanmış anilin:difenilamin:ortofosforik asit çözeltisi püskürtülmüştür (Singh ve Ark, 2004). Bu uygulamanın hemen ardından plakalara 120°C'de 45 dakika kurutma işlemi yapılarak kromatografi lekeleri görünür hale getirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Bacillus sp.* Suşlarının İzolasyonu

Adana’da çeşitli bölgelerden toprak ve kompost örnekleri toplanmış, sıvı besiyerinde 55°C’de 24 saat inkübasyon sonunda laboratuarda ön işlemden (80°C’de 10dk) geçirilen örnekler pH’sı 5.0, 7.0 ve 9.0 olarak hazırlanmış N1 besiyerine yayma ekim yapılmıştır. Katı besiyerinde 55°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra karakteristik *Bacillus* görünümünde 248 suş seçilmiş, CMC hidroliz yeteneklerinin, üreme sıcaklıklarının ve üreme pH aralığının belirlenebilmesi için izolasyon pH’sındaki N1 besiyerine çizgi şeklinde ekilip stok olarak buz dolabında saklanmıştır.

Stok olarak seçilmiş 248 suşun 28’i (%11,2) CMCaz aktivitesi göstermiştir. CMCaz aktivitesine sahip suşlar optimum enzim ürettikleri sıcaklık ve pH’nın belirlenmesi ve enzim üretimi için kullanılmıştır. Asidik CMCaz üretimi için pH 4.0’de optimum üreme gösteren SC61 suşu, nötral CMCaz üretimi için pH 6.0’da optimum üreme gösteren SC6 suşu ve alkali karakterde CMCaz üretimi için pH 10.0’da optimum üreme gösteren SC41 suşu seçilmiştir.

4.2. Bakterilerin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Enzim üretimi ve karakterizasyonu için seçilen suşlar, geniş beyaz renkli, dalgalı kenarlı ve mukuslu kolonilere sahiptir. Gram boyama ve mikroskopik incelemeler sonucunda, suşların gram pozitif karakterde, sporlu ve çomak şekilli oldukları görülmüştür. Suşlar, aerob, hareketli, katalaz pozitif özellik taşımakta ve glikozu asit oluşturarak parçalamaktadır. Bu özelliklere göre seçilen suşlar, *Bacillus sp.* olarak tanımlanmıştır.

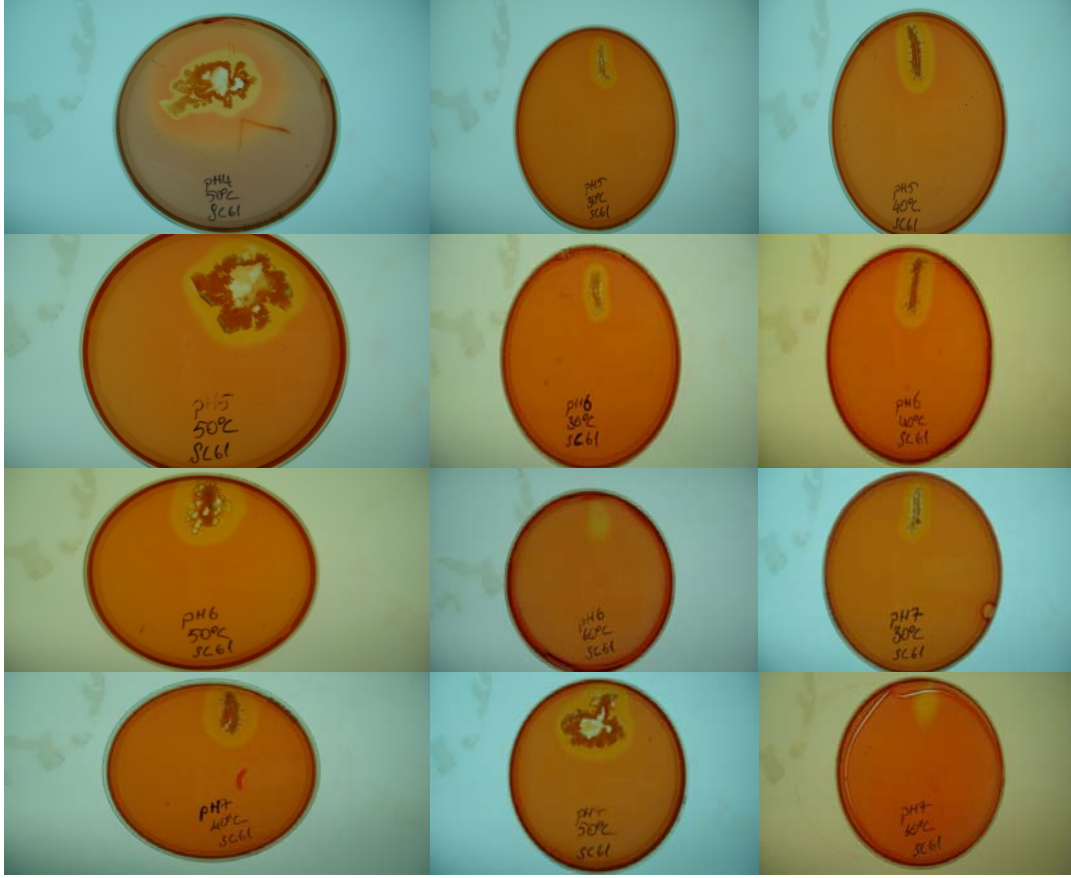
4.3. Suşların Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretme Özellikleri

4.3.1. SC61 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretme Özellikleri

SC61 suşunun üreme ve enzim üretme yeteneğinin belirlenmesi için pH 4.0-7.0 aralığındaki besiyerlerinde, 30-60°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Enzim sentezinin pH 4.0-7.0 aralığında ve 30-50°C'de gerçekleştiği görülmüştür. 60°C'de üreme ve enzim üretimi gözlenmemiştir. Bununla beraber optimum enzim sentezi pH 4.0'de ve 50°C'de gerçekleşmiştir. SC61 suşu pH 4.0'de 50°C'de 23.0 mm koloni çapına sahipken aktivite zonunun çapı 45.0 mm'ye ulaşmıştır. Bu sonuçlar enzim üretimi için seçilen SC61 suşunun asidofil bir bakteri olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1.SC61 Suşunun pH 4.0-7.0 aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim üretme sonuçları.

	30°C		40°C		50°C		60°C	
	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç
pH 4.0	1.0	4.0	1.0	4.0	23.0	45.0	-	-
pH 5.0	5.0	11.0	6.0	15.0	20.0	25.0	-	-
pH 6.0	4.0	9.0	5.0	9.0	12.0	22.0	-	-
pH 7.0	4.0	12.0	7.0	15.0	18.0	25.0	-	-



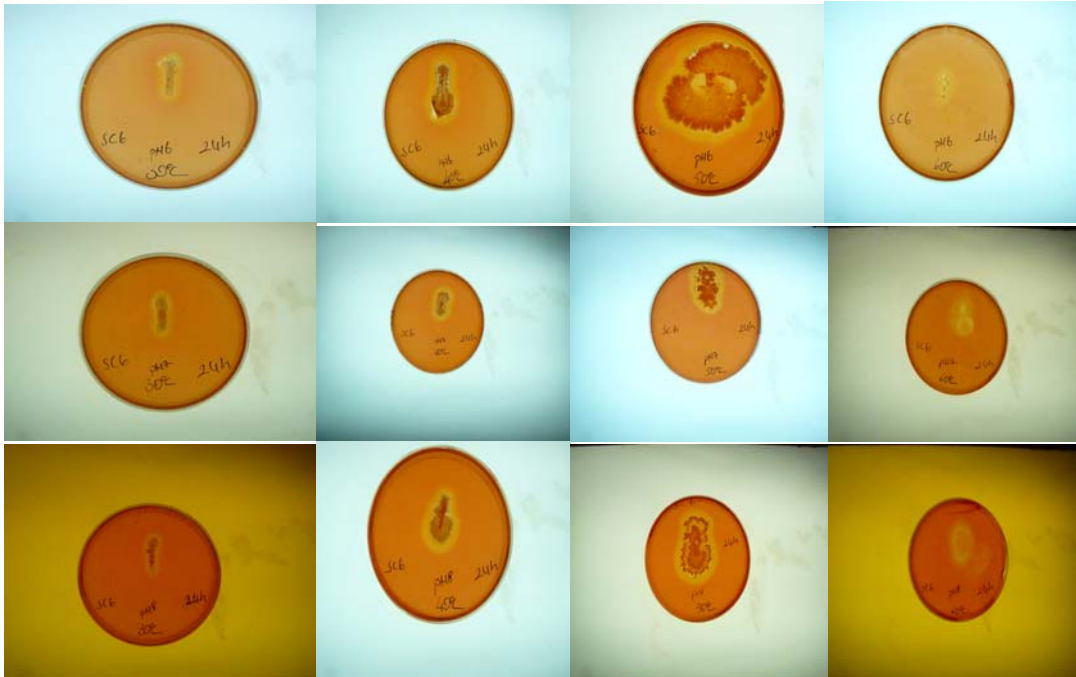
Şekil 4. 1. *Bacillus sp.*SC61 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretimi Analizi

4.3.2. SC6 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretme Özellikleri

SC6 suşunun optimum ürettiği ve enzim ürettiği pH ve sıcaklık değerinin belirlenmesi için pH 5.0-8.0 aralığındaki besiyerlerine ekim yapılmış ve 30-60°C aralığında 24 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda suşun pH 6.0-8.0 aralığında ve 30-50°C’de üreyebildiği gözlenmiştir. *Bacillus sp.* SC6 suşu, pH 5.0’de üreme göstermemiştir. Petri kapları Kongo kırmızısıyla boyandıktan ve boya giderimi yapıldıktan sonra, bakterilerin koloni çapları ve sarı renkli aktivite zonlarının çapları ölçülerek net aktivite zonu belirlenmiştir. Optimum üremenin gerçekleştiği pH ve sıcaklık değeri pH 6.0 ve 50°C olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 2. SC6 Suşunun pH 5.0-8.0 aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim üretme sonuçları.

	30°C		40°C		50°C		60°C	
	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç
pH 5.0	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 6.0	4.0	6.0	10.0	16.0	40.0	46.0	-	-
pH 7.0	5.0	6.0	11.0	17.0	15.0	23.0	14.0	18.0
pH 8.0	4.0	5.0	10.0	14.0	19.0	26.0	15.0	18.0



Şekil 4. 2. *Bacillus sp.* SC6 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretme Analizi

Wang ve ark 2009, yılında yaptıkları çalışmada, selüloz aktivitesine sahip *Salinivibrio* NTU-05 suşunun optimum sıcaklığının 35°C olduğu, optimum üreme pH'sının 7.5 olduğu, bunun yanında pH 5.0-9.0 aralığında üreme yeteneğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Brevibacillus sp. JXL suşuyla yapılan çalışmada, katı besiyerinde üreme özellikleri değerlendirilen JXL suşunun optimum üremesini 57°C ve pH 7.0'de gerçekleştirdiği ve bu koşullar altında, CMC, kristalin selüloz ve ksilanı hidroliz edebildiği belirtilmiştir (Liang ve ark., 2009).

Literatür verileri ve SC6 suşuna ait koloni ve zon çapları göz önüne alındığında SC6 suşunun nötral karakterde olduğu anlaşılmaktadır.

4.3.3. SC41 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretimi Sonuçları

SC41 suşu, en iyi ürediği pH değerinin belirlenebilmesi için pH 8.0-13.0 aralığındaki besiyerlerine ekilmiş ve optimum üreme sıcaklığının belirlenebilmesi için 30-60°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresi sonunda SC41 suşunun pH 13.0'de 60°C'de üreme göstermediği görülmüştür. Petri kapları Kongo kırmızısıyla boyanıp, boyası geri alındıktan sonra koloni çapları ve sarı renkli aktivite zon çapları ölçülerek net aktivite zonları belirlenmiştir. Optimum üremenin ve enzim üretiminin gerçekleştiği pH değeri 10.0 sıcaklık değeri 50°C bulunmuştur

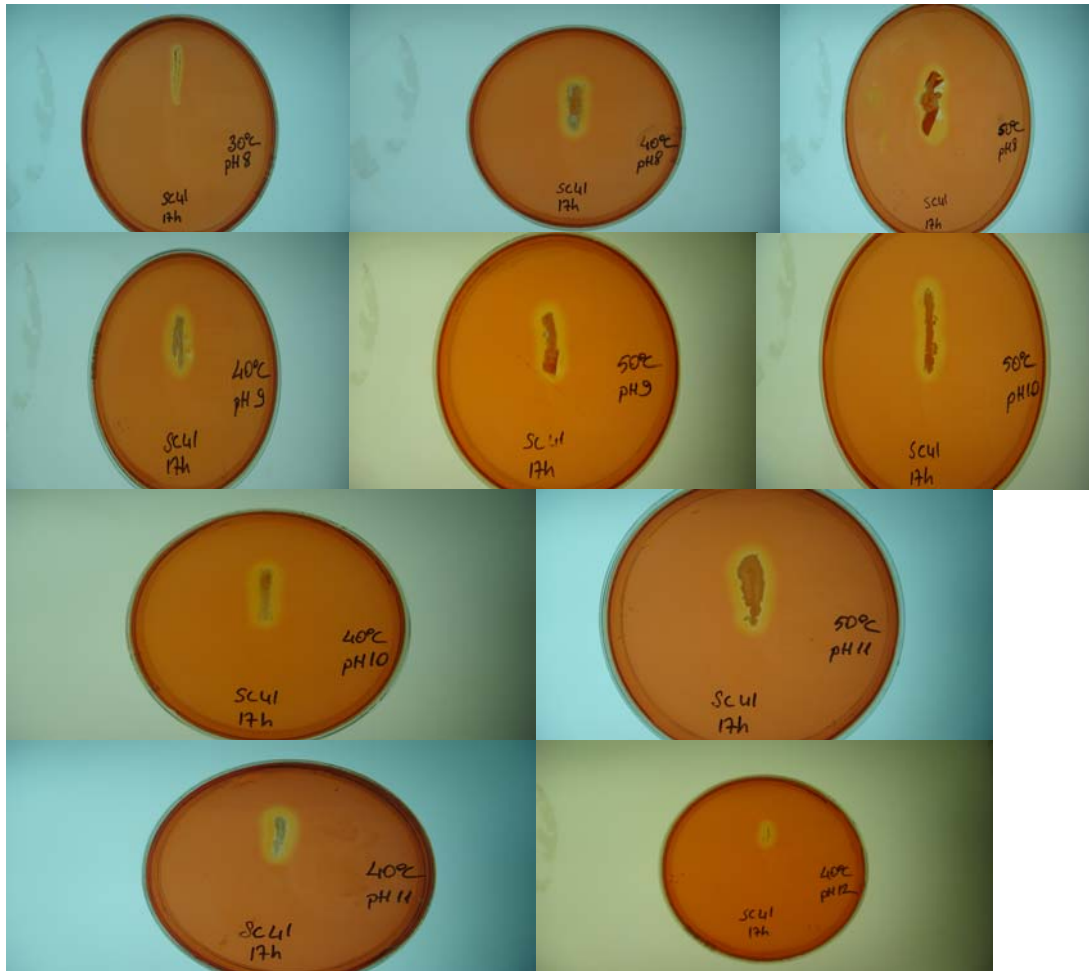
Literatüre bakıldığında *Bacillus sp.* C14 suşunun optimum enzim üretimini gerçekleştirdiği en geniş aktivite zonunu gösterdiği pH değerinin pH 9.0 olduğu bildirilmiştir (Aygan ve Arıkan, 2008).

Singh ve ark, 2004 yılında toprak örneklerinden elde ettikleri bakterilerden en iyi enzim üretimi gerçekleştiren suşu belirlemek için Kongo kırmızısı ile boyama yöntemini kullanmışlar en geniş zon çapına sahip *Bacillus sphaericus* JS1 suşunu enzim üretimi için seçmişlerdir. JS-1 suşunun pH 6.8-11.0 ve 30-55°C aralığında üreme ve enzim üretimi gerçekleştirdiğini bildirmişlerdir.

SC41 suşunun pH 10.0'da en geniş aktivite zonuna sahip olması ve pH 8.0-12.0 aralığında üreme göstermesi suşun alkalifilik özellikte olduğunu gösterir niteliktedir.

Çizelge 4. 3. SC41 Suşunun pH 8.0-13.0 aralığında katı besiyerinde üreme ve enzim üretme sonuçları.

	30°C		40°C		50°C		60°C	
	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç	K.Ç	Z.Ç
pH 8.0	3.0	4.0	5.0	11.0	10.0	14.0	1.0	1.0
pH 9.0	3.0	4.0	5.0	11.0	6.0	12.0	1.0	-
pH 10.0	3.0	4.0	4.0	9.0	5.0	12.0	1.0	-
pH 11.0	-	2.0	4.0	9.0	9.0	13.0	1.0	-
pH 12.0	-	1.0	2.0	6.0	2.0	5.0	-	-
pH 13.0	-	-	-	-	-	-	-	-

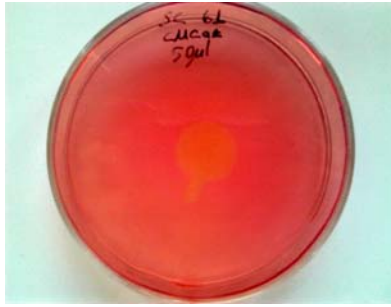


Şekil 4. 3. *Bacillus sp.* SC41 Suşunun Katı Besiyerinde Üreme ve Enzim Üretimi Analizi

4.4. SC61 CMCaz Enziminin Karakterizasyonu

4.4.1. SC61 CMCaz Enziminin Katı Besiyerindeki Aktivitesi

Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim CMC-agar'a 50µl miktarda damlatılmış, 55°C'de 24 saat bırakılmıştır. Enzimin katı besiyerinde aktivite gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4. 4.SC61 CMCaz Enziminin CMCagar Üzerindeki Aktivite Zonu.

4.4.2. SC61 CMCaz Enziminin Optimum pH Aralığı

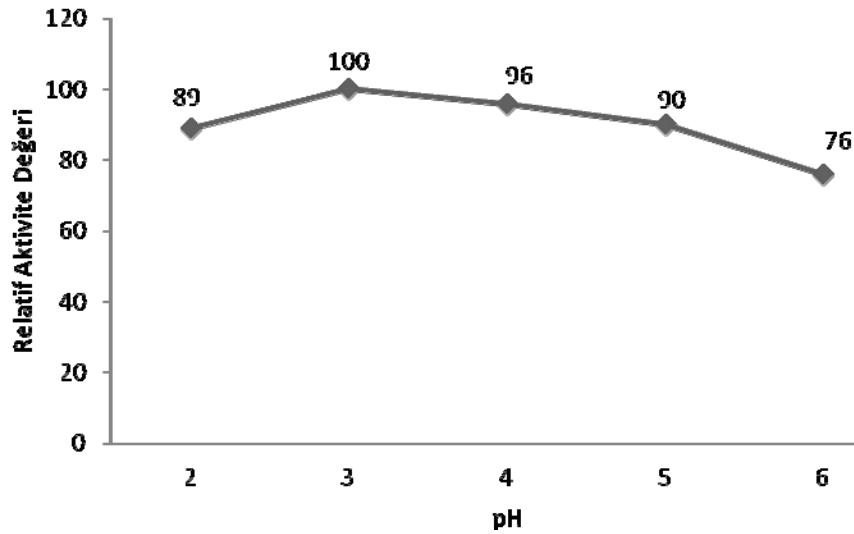
Alkol presipitasyonu ile kısmi saflaştırılması yapılmış olan enzim, optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerini saptamak için %1 substrat içeren KCl-HCl (pH 1.0-2.0), Na-Sitrat (pH 3.0-5.0) ve Na-fosfat (pH 6.0-8.0), tamponları kullanılarak analiz edilmiştir. SC61 CMCaz enzimi pH 2.0-6.0 aralığında tüm pH değerlerinde yüksek aktiviteye sahip olmakla beraber, optimum aktivite gösterdiği pH değerinin pH 3.0 olduğu belirlenmiştir.

Enzim aktivitesi pH 6.0'da belirgin şekilde düşüş göstermiştir (%76). Enzim pH 2.0 değerinde yaklaşık %89 aktivite gösterirken, pH 2.0-5.0 aralığında ortalama %80, pH 2.0-4.0 aralığında ortalama %95 aktivite elde edilmiştir. Enzim, aktivitesinin pH 4.0'de %96'sını ve pH 5.0'de %90'ını korumaktadır. SC61 CMCaz enziminin asidik pH değerlerinde yüksek aktiviteye sahipken pH değerinin nötrale yaklaştırılmasıyla aktivitede düşüş olduğunun gözlenmesi, optimum pH'sının 3.0 olarak belirlenmesi, pH 2.0 gibi ekstrem bir asitlik değerinde aktivitesini koruması

SC61 CMCaz enziminin asidik bir enzim olduğunu ve aktivite pH'sının geniş bir aralıkta olduğunu göstermektedir.

Çok sayıda araştırmacı, çoğunluğu mantarlar ve mayalar üzerinde olmak üzere farklı organizmalarda asidik karakterde selüloz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Li ve Ark (2006), *Bacillus sp.* AC-1 suşundan CMCaz izole etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada pH 4.5 ve 6.5'da olmak üzere iki pike sahip olduğunu belirledikleri enzimi termoasidofil olarak tanımlamışlardır. Enzim pH 3.5-7.5 aralığında %90 aktiviteye sahiptir (Li ve ark, 2006).

Rastogi ve ark (2010), komposttan izole ettikleri *Geobacillus sp.* WSUCF1 ve altın madeninden izole ettikleri *Bacillus sp.* DUSELR13 suşlarından selüloz enzimi izole etmişlerdir. Elde edilen enzimlerin pH 3.0-6.0 aralığında yüksek aktiviteye sahip oldukları belirlenmiş, optimum aktivite gösterdikleri pH değeri her iki enzim için de pH 5.0 olarak bulunmuştur (Rastogi ve ark, 2010).



Şekil 4. 5. SC61 CMCaz Enziminin Optimum pH Grafiği.

Rastogi ve ark (2010), South Dakota'da bir altın madeninde izole ettikleri CMCaz aktivitesine sahip DUSELG12 (*Brevibacillus sp.*) ve DUSELR7(*Geobacillus sp.*) suşlarından izole edilen enzimleri karakterize etmişlerdir. Mezofil karakterdeki DUSELG12 suşu maksimum aktivitesini pH 5.5'de gösterirken, termofil karakterdeki DUSELR7 suşu maksimum aktivitesini pH 5.0'da göstermiştir. Her iki

enzim de pH 3-10 aralığında aktivite göstermiş, ancak pH 6.0'dan sonra aktiviteleri düşüşe geçmiştir (Rastogi ve ark, 2009).

Cryptococcus sp. S-2 suşundan elde edilen CMCaz enziminin optimum pH'sı 3.5 olarak bulunmuş, enzimin pH 2.0-6.0 aralığında aktif olduğu belirlenmiştir (Thongekkaew ve ark, 2008). *Penicillium citrinum*'dan elde edilmiş olan CMCaz biri pH 5.5'de diğeri pH 8.0'da olmak üzere iki optimum aktivite pikine sahiptir (Dutta ve ark., 2008). Grigorevski-Lima ve ark. *Aspergillus fumigatus*'dan elde ettikleri CMCaz enzimini karakterize etmiş ve optimum pH'sını 2.0 olarak belirlemişlerdir (Grigorevski-Lima ve ark, 2009). Coral ve ark, yaptıkları araştırmada *Aspergillus niger* Z10 suşundan CMCaz enzimi üretmiş ve bu enzimi karakterize etmişlerdir. *A.niger* Z10'a ait enzimin aktivite aralığı pH 3.0-9.0 olarak belirlenirken pH 4.5 ve pH 7.5'de iki optimum aktivite piki belirlemişlerdir (Coral ve ark, 2002).

Görüldüğü gibi *Bacillus sp.* SC61 suşundan elde edilen CMCaz enzimi pH 2.0-6.0 aralığında aktivite göstermesi ile bakteriyal kaynaklı diğer asidik CMCaz'larla benzerlik göstermektedir. SC61 suşunun optimum pH'sı 3.0 olarak belirlenmiştir, literatürde bu değere en yakın sonuç Bai ve ark (2010)'nın *Alicyclobacillus sp.* A4 suşundan elde etmiş oldukları optimum aktivite pH'sı 2.6 olarak belirlenmiş olan ekstrem asidik β -1,4-Glukanaz enzimidir (Bai ve ark, 2010).

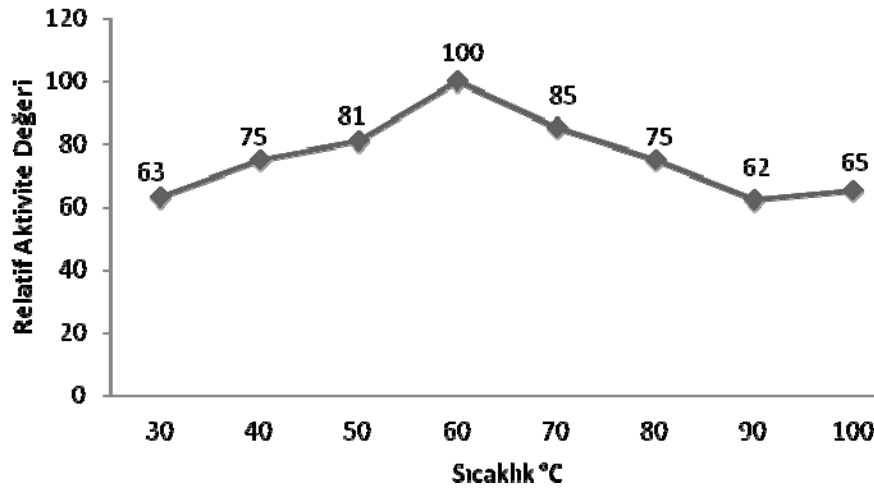
Rastogi ve ark., 2010 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus* ve *Geobacillus* suşlarından elde ettikleri ve optimum aktivite pH'sı 5.0 olan enzimleri asidofilik olarak tanımlamışlardır. Literatür verilerine göre *Bacillus sp.* SC61 suşuna ait enzim *Bacillus sp.* suşlarından elde edilmiş CMCazlar arasında en düşük optimum aktivite pH'sına sahip asidik CMCaz enzimidir.

4.4.3. SC61 CMCaz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklığı

Enzim aktivitesinin optimum gerçekleştiği sıcaklığın bulunabilmesi için enzim, optimum aktivitenin gerçekleştiği pH değerinde (pH 3.0) hazırlanmış %1 CMC içeren substrat çözeltisi kullanılarak 30-100°C aralığında analiz edilmiştir. SC61 CMCaz enziminin, 30°C'de %63 aktivite gösterirken 100 °C de yaklaşık %65 aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Enzim 50-80 °C aralığında ortalama %89, 60-

80 aralığında %87 ve bütün sıcaklıklar dikkate alındığında %76 relatif aktivite göstermiştir. 80°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda sıcaklık artışının enzim aktivitesi üzerine önemli bir etkisi olmadığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre SC61 enzimi termofil karakterde bir enzimdir. 100°C'de aktivitesini %65 koruyabilmesi yüksek sıcaklıkta stabil olduğunu gösterir niteliktedir.

Li ve ark (2006)'nın *Bacillus sp.* AC-1 suşundan elde ettikleri termoasidofilik endoglukanaz enzimi optimum aktivitesini 70°C'de göstermiş ancak sıcaklık 80°C'ye yükseltildiğinde aktivitenin %48'e düştüğü görülmüştür. SC61 CMCaz enzimi 80°C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesinin %75'ini koruyabilmiştir



Şekil 4. 6 SC61 CMCaz Enziminin Optimum Sıcaklık Grafîği.

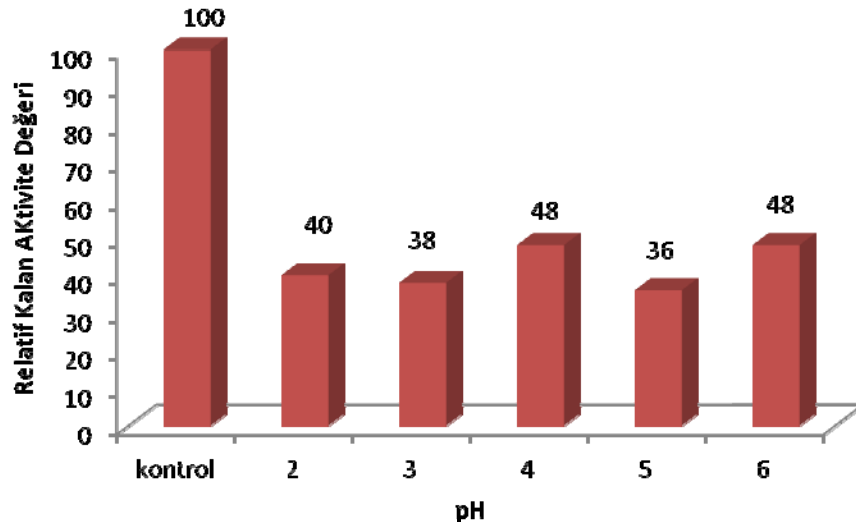
Literatür verilerinde asidik CMCaz için optimum aktivite sıcaklığı Rastogi ve ark (2010)'nın *Bacillus* ve *Geobacillus* suşları üzerinde yaptığı çalışmada 70-75°C olarak belirlenmiştir. Rastogi ve ark. (2010) *Geobacillus* ve *Brevibacillus* suşlarından elde ettikleri asidik CMCaz enziminin optimum aktivite sıcaklığını 55°C ve 75°C bulmuşlardır. *Alicyclobacillus sp.* ile yapılan bir çalışmada izole edilen ekstrem asidik β -1,4- glukanaz enziminin optimum sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir (Bai ve ark, 2010). Thongekkaew ve ark (2008)'nın *Cryptococcus sp.* S-2 suşu ile yaptıkları çalışmada ise optimum aktivite sıcaklığı 40-50°C olan CMCaz enzimi

izole edilmiştir. *Aspergillus fumigatus* Z5 suşundan elde edilen CMCaz enzimi için optimum sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir (Liu ve ark, 2011).

Bacillus sp. SC61 asidik CMCaz enziminin 30-100°C’de yaklaşık olarak ortalama %76 relatif aktivite göstermesi mezofilden termofile uzanan bir aralıktaki sıcaklık değerlerinde güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Bununla beraber optimum sıcaklık değeri elde edilen literatür verileriyle uyum gösterirken aynı zamanda enzimin termofilik karakterde olduğunu da kanıtlar niteliktedir.

4.4.4. SC61 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi

SC61 CMCaz enziminin pH stabilitesi, pH 2.0-6.0 aralığında 55°C’de 24 saatlik ön inkübasyon sonunda, standart aktivite analizi yapılarak belirlenmiştir. Enzim tüm pH değerlerinde, ortalama %42 kalan aktivite göstermiştir. Enzim pH 2.0 gibi ekstrem asidik pH değerinde, 24 saat sonunda %40 stabil kalmıştır. pH 2.0-4.0 aralığında ise ortalama stabilitesi %42’dir. Bu değerler enzimin düşük pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıklarda bile aktivitesini koruduğunu, asidostabil karakterde bir enzim olduğunu kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4. 7.SC61 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi Grafiği

Liu ve ark 2011 yılında yaptıkları çalışmada, *Aspergillus fumigatus* Z5'den elde ettikleri CMCaz enzimi, aktivitesine pH stabilitesinin etkisinin belirlenebilmesi için pH 3.0-11.0 aralığındaki pH değerlerinde, 50°C'de 5-10-15 ve 20 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Buna göre enzimin pH 4.0-7.0 aralığında, 20 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesinin %80'ini korurken artan pH değerinin kalan aktivitede düşüşe yol açtığı belirtilmiştir.

Wang ve ark 2007 yılında yaptıkları çalışmada, *Trichoderma koningii* ZJU-T suşundan asidik β -glukanaz enziminin pH stabilitesini belirlemek için, β -glukanaz enzimini pH 2.0-8.0 aralığında, 24 saat 4°C'de inkübe etmişlerdir. Enzim pH 2.0'de %100 üzerinde aktivite gösterirken, pH 3.0'de %10 ve pH 8.0'e doğru giderek azalan aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

2009 yılında yapılan bir çalışmada elde edilen endoglukanaz enziminin pH stabilitesi değişen pH değerlerinde 16 saatlik ön inkübasyon sonunda belirlenmiştir. Enzimin pH 7.0-9.0 aralığında oldukça stabil (≥ 90) olduğu ancak pH'daki düşüşün enzimin aktivitesinde de düşüşe yol açtığı belirtilmiştir (Ng ve ark, 2009).

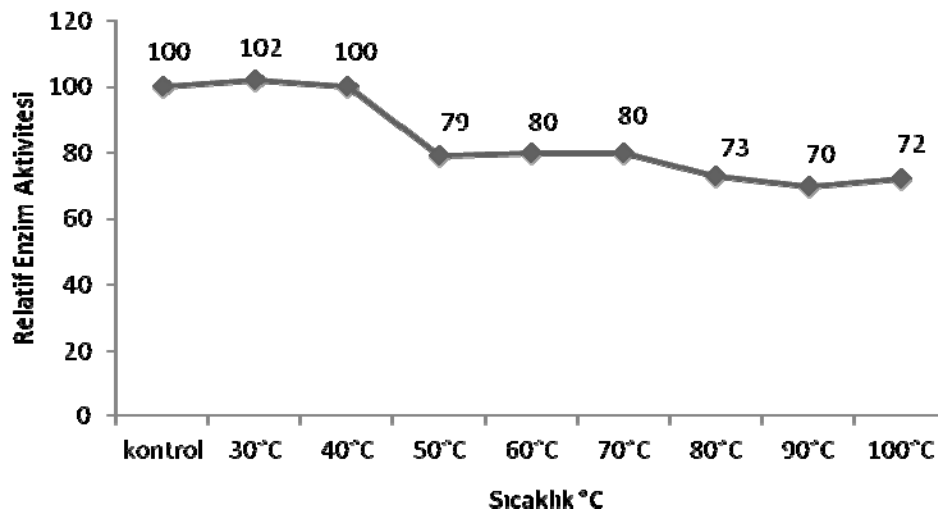
Cryptococcus sp. S-2 ile yapılan bir çalışmada, izole edilen CMCaz enziminin pH stabilitesi pH 3.5-8.5 aralığındaki değerlerde, 15 dakikalık ön inkübasyona tabi tutularak belirlenmiştir. Enzimin pH 7.0'de %100 aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. pH 4.5'de %40 kalan aktiviteye sahip olan enzimin stabilitesi pH nötrale yaklaştıkça artış göstermiş alkali pH'da ise kalan aktivitede önemli düşüş görüldüğü belirtilmiştir. Enzimin pH 8.5'de yaklaşık %30 relatif aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Thongekkaew ve ark, 2008).

Literatür verileriyle kıyaslandığı zaman SC61 CMCaz enziminin 55°C'de, 24 saat sonunda özellikle asidik pH değerlerinde ortalama %42 aktivite gösterebilmesi enzimin asit stabil bir enzim olduğunu gösterir niteliktedir.

4.4.5. SC61 CMCaz Enziminin Termal Stabilitesi

SC61 suşuna ait CMCaz enzimi 30-100°C'de 1 saat ön inkübasyona bırakılmış, bu süre sonunda yapılan standart aktivite tayini ile sıcaklık stabilitesi belirlenmiştir. SC61 asidik CMCaz enzimi 30 ve 40°C'lerde aktivitesini hiç

kaybetmemiştir. Enzimin, 30-100°C aralığında ortalama %82 stabil olduğu görülmektedir. 30-70°C aralığında aktivitesini %88 korumuş, 70-100°C aralığında ortalama %74 oranında stabil kaldığı görülmüştür. Termofil karakterdeki enzimin izolasyon sıcaklığı olan 50°C ile 100°C aralığındaki ortalama stabilitesi %76 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre enzimin termostabil bir karakterde olduğu söylenebilmektedir.



Şekil 4. 8.SC61 CMCase Enziminin Termal Stabilite Grafiği

Literatür verilerine bakıldığında, *Bacillus sp.* DUSELR13 suşuna ait CMCase enzimi 50°C’de 1 gün sonunda hiç aktivitesini kaybetmemiş, 60°C ve 70°C ’de 1 gün sonunda aktivitesini sırasıyla %97 ve %78 koruyabilmiş, 80°C’de 1 günün sonunda aktivitesini %90 kaybetmiştir (Rastogi ve ark, 2010). Bununla beraber sıcaklık 90 ve 100°C’ye çıkarıldığında 1 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini tamamen kaybetmiştir. *Bacillus sp.* SC61 suşu 90°C’de bir saat sonunda aktivitesini %70 ve 100°C’de 1 saat sonunda aktivitesini %72 korumuştur.

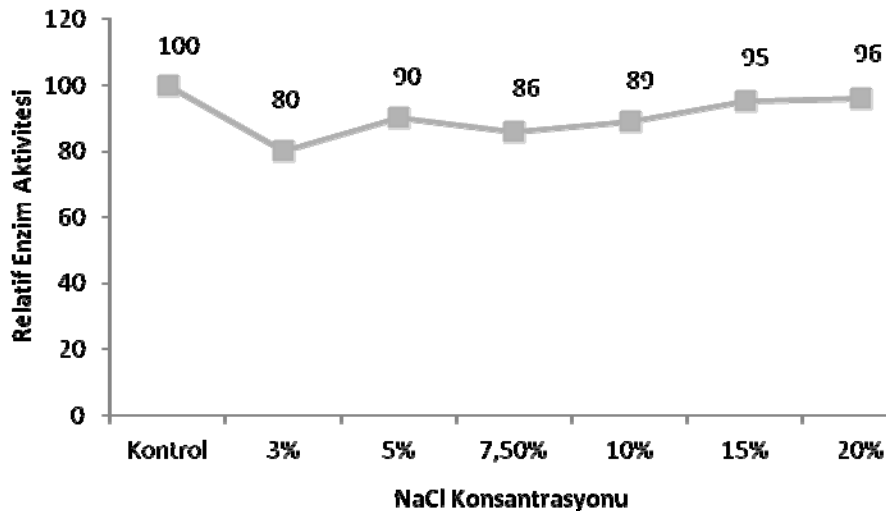
Bacillus sp. AC-1 suşunun 30°C’de stabilitesini koruduğu ve 50°C’de 1 saat inkübasyon sonunda %80 stabil kaldığı bulunmuştur (Li ve ark, 2006). SC61 CMCase enzimi 50°C’de %79 stabildir. Başka bir çalışmada *Alicyclobacillus sp.* A4’den elde edilen ekstrem asidik β -1,4-Glukanaz enziminin 60°C’de 1 saat inkübasyon sonunda %85’in üzerinde aktiviteye sahip olduğu bununla beraber 65°C’de 1 saat sonunda tüm aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir (Bai ve ark, 2010). Liu ve ark (2008), *Bacillus sp.* suşlarıyla yaptıkları çalışmada elde ettikleri β -

glukanaz enzimlerinin 50°C’de %80’den fazla stabil olduklarını ancak artan sıcaklığın enzimin stabilitesinde düşüşe yol açtığını belirtmişlerdir. *Brevibacillus sp.* DUSELG12’den elde edilen CMCaz enzimi 50°C’de 1 saat inkübe edildiğinde aktivitesinde düşüş görülmemiştir. Bununla beraber sıcaklık 70°C’nin üzerine çıkarıldığında aktivitesinin %98’ini ilk 5 dakikada, sıcaklık daha da artırıldığında (80°C, 90°C ve 100°C) ilk 2 dakikada aktivitesinin %98’ini kaybettiği görülmüştür (Rastogi ve ark, 2010).

SC61 CMCaz enziminin termal stabilitesi literatürdeki benzer enzimlerle kıyaslandığında, özellikle yüksek sıcaklıklar (80, 90 ve 100°C) göz önüne alındığı zaman, daha yüksek ve geniş bir sıcaklık alanında stabil olduğu görülmektedir.

4.4.6. SC61 CMCaz Enziminin Aktivitesine NaCl’ün Etkisi

%3-%20 NaCl içeren ortamda 55°C 60 dakika ön inkübasyon sonunda, standart aktivite tayini ile enzimin kalan aktivitesi belirlenmiştir. Buna göre enzim, %3, %5, %7,5, %10, %15 ve %20 konsantrasyonlarda; %80, %90, %86, %89, %95 ve %96 kalan aktiviteye sahiptir. En yüksek aktivite değeri %20 tuz konsantrasyonunda elde edilirken bütün konsantrasyonlar için ortalama %89.3 kalan aktivite belirlenmiştir. Bu sonuç enzimin yüksek düzeyde halostabil özellikte olduğunu göstermektedir.

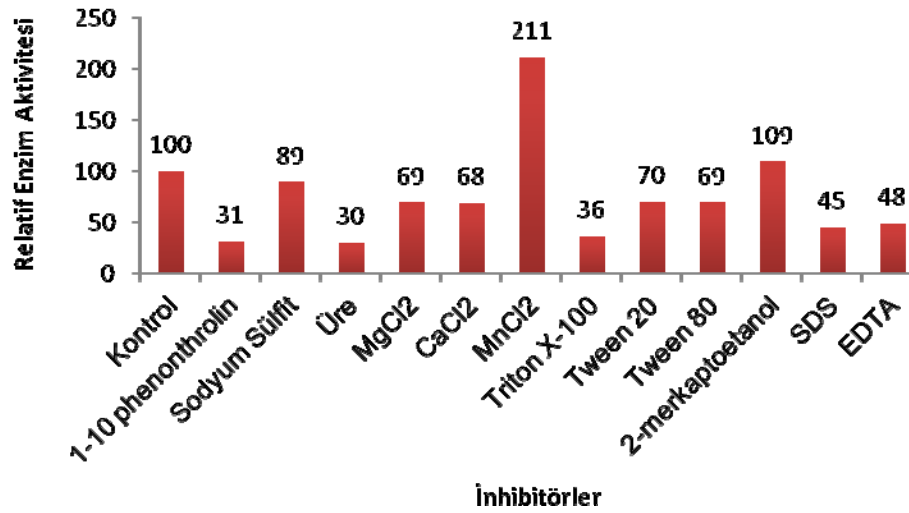


Şekil 4. 9.SC61 CMCaz Enzimi Üzerine NaCl’ün Etkisi

Bacillus licheniformis AU01'den izole edilen CMCaz enzimi 35°C'de ve %0-30 NaCl konsantrasyonunda 1 saat ön inkübasyona bırakılmış daha sonra standart aktivite tayini yapılmıştır. Enzim %15 NaCl konsantrasyonunda aktivitesini %75 korumuştur. Konsantrasyon %20-%30'a çıkarıldığında ise aktivitede düşüş gözlenmiştir (Annamalai ve ark, 2011). *Bacillus sp.* C-14 suşundan elde edilen CMCaz enziminin %20 NaCl konsantrasyonunda %133, %30 NaCl konsantrasyonunda %95 aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu enzimin %12,5-%25 NaCl konsantrasyonlarında ortalama %128 aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Aygan, 2008). 2009 yılında Wang ve ark. Tarafından yapılan bir araştırmada *Salinivibrio sp.* strain NTU-05 suşundan elde edilen halostabil karakterdeki selüloz enziminin 1mM NaCl varlığında %157 relatif aktivite gösterdiği, aynı zamanda optimal aktivitesini %5 NaCl varlığında gösterdiği ve NaCl bulunmayan ortamda aktivitesinin %90'a düştüğü belirlenmiştir. Bunun yanında NaCl konsantrasyonunun %15-25 aralığında olduğu durumlarda enzim aktivitesinin azaldığı, %25 NaCl bulunan ortamda 4 saat sonunda kalan aktivitesinin %24'e kadar düştüğü görülmektedir (Wang ve ark, 2009).

4.4.7. SC61 CMCaz Aktivitesine Şelatör İnhibitör ve Metal İyonlarının Etkisi

Çeşitli metal iyonları şelatör ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için enzim, 1mM, 5mM ve % 0,1 konsantrasyonlardaki kimyasallarla 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon işleminden sonra standart enzim aktivitesi testi ile kalan aktivite saptanmıştır. Enzim aktivitesi β -merkaptotanol (%108) ve $MnCl_2$ (%211) ile indüklenmiştir. Phenantrolin (%31), üre (%30) ve triton-X100 (%36) ile önemli düzeyde inhibe olmuştur. Sodyum sülfid (%89), $CaCl_2$ (%68), $MgCl_2$ (%69), Tween-20 (%70) ve Tween-80 (%69)'e oldukça dayanıklı özellik göstermektedir. SDS (%45) ve EDTA (%48) ile kısmen inhibe olmuştur. Bu özellikler enzimin okside edici ajanlar ve SDS gibi deterjanlara dirençli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 10.SC61 CMCaz Enzime Şelatör, Metal İyonları ve İnhibitör Etkisi.

Selüloz enzimleri üzerine EDTA'nın etkisi çeşitli yönlerde olabilmektedir bazı araştırmacılar elde ettikleri CMCaz enziminin EDTA ile indüklendiğini belirtirken (Kim ve ark, 2009), çok sayıda araştırmada enzim aktivitesinin hiç etkilenmediği ya da relatif aktivitenin %90-95 aralığında olduğu belirtilmiştir (Aygan ve Arıkan 2008, Bai ve ark, 2010). Bunların yanında Lee ve ark, (2008), yaptıkları çalışmada elde ettikleri selüloz enziminin 5mM EDTA ile 50°C'de 60 dakika ön inkübasyonu sonunda enzim aktivitesinin %24,5±4,8'e düştüğünü bulmuşlardır. SC61 suşundan elde edilen CMCaz enzimi 5mM EDTA ile %52 inhibe olarak, %48 relatif aktivite göstermiştir. Enzimin PMSF ile tamamen inhibe olduğu belirlenmiştir.

CMCaz enzimi 5mM CaCl₂ varlığında %68 relatif aktivite göstermiştir. Literatür verilerine bakıldığında selüloz enzimlerinin CaCl₂ varlığında aktivitelerini tamamen kaybetmedikleri görülmektedir. CaCl₂'ün bazı çalışmalarda selüloz enziminde indükleyici bir etkisi olmakla beraber (Aygan ve Arıkan, 2008, Lee ve ark, 2008, Annamalai ve ark, 2011, Ng ve ark, 2009) aktivitede düşüşe neden olduğu çalışmalar da bildirilmiştir (Apiraksakorn ve ark, 2008, Wang ve ark, 2007, Bai ve ark, 2010).

SC61 asidik CMCaz enzimi MgCl₂ ile muamele edildiğinde aktivitesinin %69'a düştüğü belirlenmiştir. Diğer bir deyişle enzim %31 oranında inhibe olmuştur. Bazı araştırmacılar elde ettikleri endoglukanaz aktivitesine sahip enzimlerin MgCl₂'den

etkilenmeyip aktivitelerini koruduklarını göstermişlerse de (Liu ve ark., 2008) selüloz enzimlerinin $MgCl_2$ varlığında farklı oranlarda inhibe olduğu çalışmalar da bulunmaktadır (Huang ve Monk, 2004, Dutta ve ark, 2008). Kim ve ark, (2005) *Bacillus sp.* HSH-810 suşundan elde ettikleri selüloz enziminin (1mM) $MgCl_2$ varlığında %31 oranında inhibe olduğunu göstermişlerdir. Bu veri elde ettiğimiz enzimin özellikleriyle benzerlik göstermektedir.

SC61 suşuna ait CMCaz enzimi $MnCl_2$ ile oldukça yüksek oranda indüklenerek %211 aktivite göstermiştir. Literatür verilerine bakıldığında *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53 suşundan elde edilen CMCaz enziminin 5mM $MnCl_2$ ile muamele edilmesinden sonra indüklenerek %103,5 aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kim ve ark, 2009). Ayrıca, Bai ve ark. (2010) asidik β -1,4-endoglukanaz enziminin $MnCl_2$ ile indüklendiğini ve ön inkübasyon sonunda %134,9 aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

CMCaz enzimi Tween-20, Tween-80 ve Triton x-100 deterjanlarıyla ön işleme tabi tutulmuş ve relatif aktivitelerinin sırasıyla %70, %69 ve %36 olduğu belirlenmiştir. Tween-20 ve Tween-80 ile muamele edildiğinde aktivitede bir düşüş olduğu ancak enzimin tamamen inhibe olmadığı 1 saat sonunda yaklaşık %70 aktif olduğu görülmektedir. Mawadza ve ark (2000), *Bacillus sp.* suşlarından elde ettikleri selüloz enzimlerinin %1 Tween-80 ile muamele edildiklerinde aktivitelerinin tamamen inhibe olduğunu göstermişlerdir. Singh ve ark (2001), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* VG-1 suşundan elde edilen CMCaz enziminin %0,5 Tween-20, Tween-80 ve Triton x-100 ile ön işleme tabi tutulduğunda relatif aktivitesinin sırasıyla %90,%80 ve %86 'ya düştüğünü belirlemişlerdir.

Agaricus brasiliensis'den izole edilen endo β -1,3- glukanaz enzimi, denatüran bir ajan olan üre varlığında yüksek oranda inhibe olarak aktivitesini %75 kaybetmiştir (Shu ve ark, 2006). Benzer şekilde SC61 asidik CMCaz enzimi 8M üre varlığında inhibe olarak aktivitesini %70 kaybetmiştir.

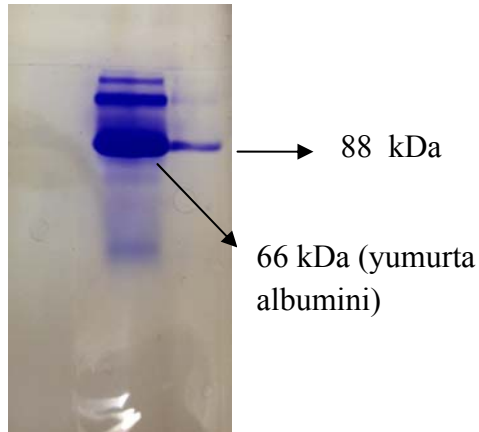
Bai ve ark (2010), *Alicyclobacillus sp.* A4 suşundan elde ettikleri endoglukanaz enziminin 1mM ve 10mM β Merkaptotetanol ile indüklenerek sırasıyla %117 ve %174,5 aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. SC61 asidik CMCaz enzimi ise %1 β Merkaptotetanol ile indüklenerek %108 aktivite göstermiştir.

Farklı araştırmacılar SDS'nin selüloz enzimi aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi olduğunu belirlemişlerse de bazı enzimler bu deterjanın varlığında indüklenerek aktivitelerini artırmışlardır. Bai ve ark, (2010) asidik β -1,4-glukanaz enziminin 10 mM SDS ile tamamen inhibe olduğunu 1mM SDS ile %13,2 relatif aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. SC61 CMCaz enzimi SDS ile %55 inhibe olarak %45 aktivite göstermiştir.

4.4.8. SC61 CMCaz Enziminin SDS-PAGE ile Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

SC61 asidik CMCaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 88 kDa'luk tek bir bant olarak belirlenmiştir. Apiraksakorn ve ark (2008), yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* GN156'dan izole ettikleri *J1* ve *pJ2* β -1,3-1,4-D-glukanaz enzimlerinden *J1*'in moleküler ağırlığının 25 kDa ve *pJ2*'nin moleküler ağırlığının ise 90 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Literatürdeki asidik bir endoglukanaz enzimine ait bu değer SC61 CMCaz enzimiyle benzerlik göstermektedir.

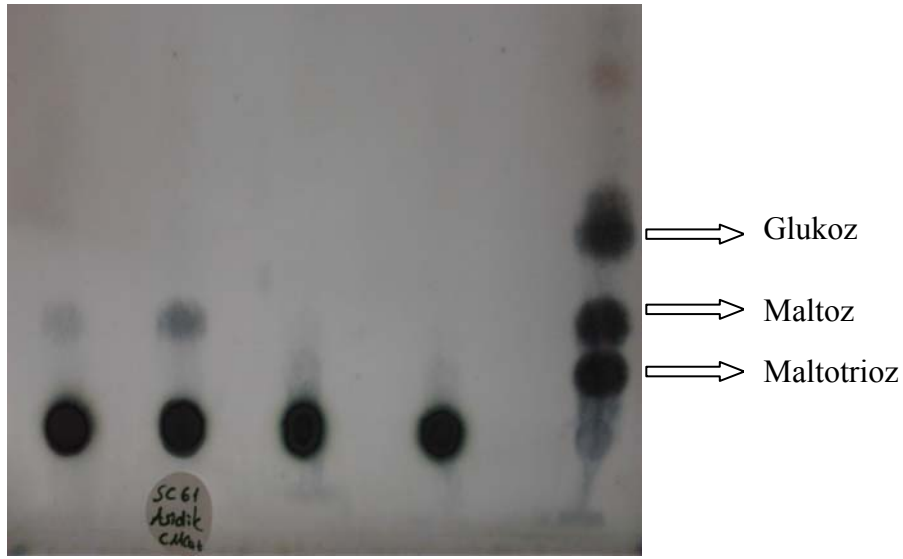
Çin'deki bir soda gölünden elde edilen *Bacillus sp.* III-3 suşundan farklı özelliklerde iki endoglukanaz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. III-3-A'nın moleküler ağırlığı 45 kDa olarak belirlenirken III-3-B'nin moleküler ağırlığının 85 kDa olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark, 2008)



Şekil 4. 11.SC61 CMCaz enziminin SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Analizi

4.4.9. SC61 CMCaz Enziminin TLC Analizi

SC61 suşunun CMC'yi hidroliz etmesi sonucu elde edilen son ürünün belirlenmesi amacıyla ince tabaka kromatografisi kullanılmıştır. Analiz sonucunda reaksiyona ait son ürünün maltoz olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 12.TLC Yöntemiyle SC61 CMCaz Enzimine Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi

Ueda ve ark (2010), selülaz enzimi üzerine yaptıkları çalışmada elde ettikleri enzimin 3, 6 ve 24 saatlik inkübasyonu sonucundaki hidroliz ürünlerinin belirlenmesi için TLC metodunu kullanmışlar ve enzimin son ürünlerini glukoz, sellobioz, sellotrioz, sellotetraoz ve selooligosakkaritler olduğunu belirlemişlerdir. Aygan ve ark (2011), *Bacillus licheniformis* C-108 suşu ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri endoglukanaz enziminin son ürünün az miktarda glukoz, yoğunluklu olarak sellobioz ve daha uzun zincirli oligosakkaritler olduğunu bildirmişlerdir.

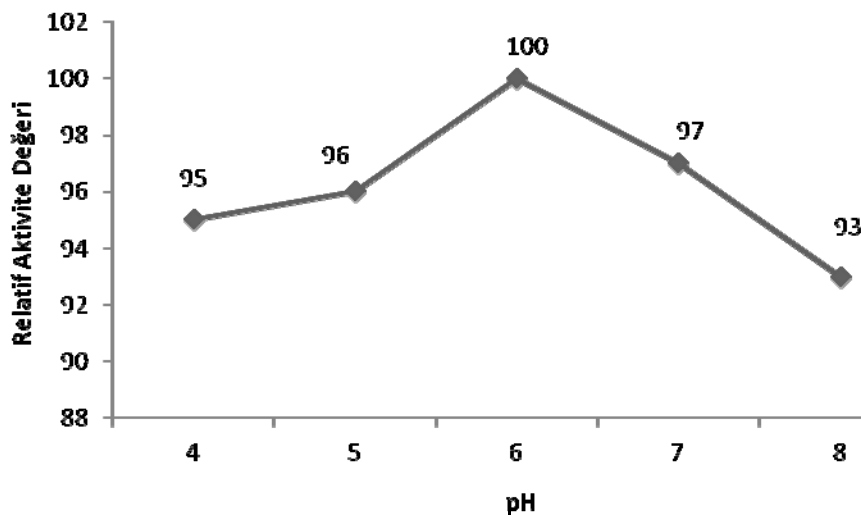
4.5. SC6 CMCaz Enziminin Karakterizasyonu

4.5.1. SC6 CMCaz Enziminin Katı Besiyerindeki Aktivitesi

Kısmi saflaştırma ile elde edilen SC6 CMCaz enzimi CMC-agar'a 50µl miktarda damlatılmış, 55°C'de 24 saat bırakılmıştır. Enzimin katı besiyerinde aktivite gösterdiği görülmüştür.

4.5.2. SC6 CMCaz Enziminin Optimum pH Aralığı

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için Na-sitrat (pH 3.0-5.0) ve Sodyum- fosfat (pH6.0-8.0) tamponları içerisine %1 CMC koyularak hazırlanan substrat çözeltileri kullanılmıştır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.0 olarak saptanmıştır. CMCaz enzimi, pH 4.0'de %95 aktivite göstermekte, pH 4-8 aralığında ortalama %96 aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bununla beraber pH 8.0'de enzim aktivitesi %93'e düşmektedir. Ortam pH'sının yükselmesiyle aktivitede düşüşün gözlenmesi ve optimum aktivitenin pH 6.0'da görülmesi elde edilen enzimin nötral karakterde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 13.SC6 CMCaz Enziminin Optimum pH Grafiği.

Bischoff ve ark 2006 yılında *Bacillus licheniformis*'den izole edilen endoglukanaz enziminin pH 4.5-10.0 aralığında geniş bir aktivite aralığına sahip olduğunu bulmuşlar ancak maksimal aktivitesinin pH 6.0'da görüldüğünü belirtmişlerdir. Enzimin , geniş bir pH aralığında aktivite gösterdiği, pH 4.5'de %75, pH 10.0'da %40 aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

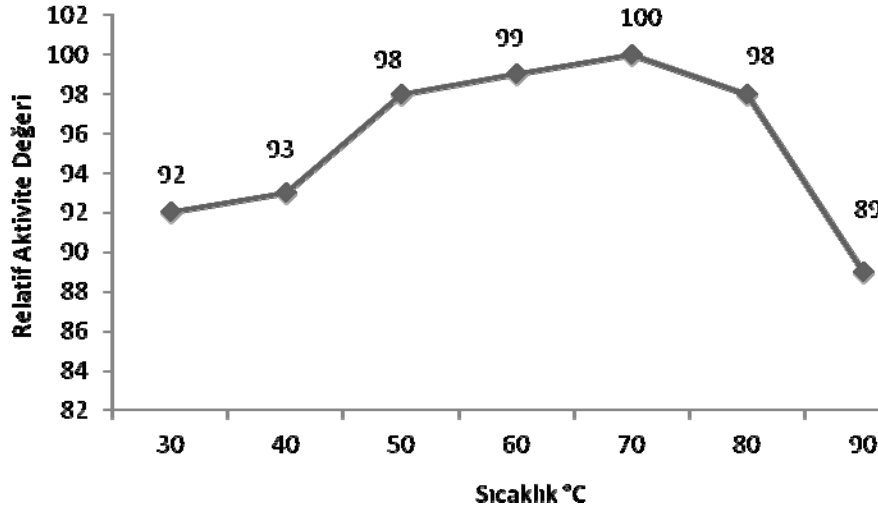
Liu ve ark (2008), *Bacillus* izolatlarından elde ettikleri β -glucanase III-3-A nötral enziminin optimum aktivite pH'sının 7.0 olduğunu belirlemişlerdir. Kim ve ark.'nın 2009 yılında yaptıkları çalışma sonucunda elde ettikleri CMCaz enziminin optimum aktivite pH'sını 6.5 olarak belirlemiş, pH 5.0-7.5 aralığında aktivitesini %40'dan fazla koruduğunu bulmuşlardır. Mawadza ve ark (2000), *Bacillus sp.* CH43 selülaz enziminin optimum aktivite pH'ının 6.5 ve optimum aktivite sıcaklığının 70°C olduğunu bildirmişlerdir. CH43 enziminin pH 4.0'de %40, pH 9.0'da %50 aktiviteye sahipken, pH 10.0'da aktivitesini tamamen kaybettiği belirtilmiştir. 2008 yılında Lee ve ark, *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 suşundan selülaz enzimi izole etmişler ve enzimin optimum aktivite pH'sını 7.0 olarak belirlemişlerdir. Enzimin pH 4.0-9.0 aralığında aktivitesini %60 koruduğunu bulmuşlardır.

Bacillus sp. SC6 suşundan elde edilen nötral CMCaz enziminin aktivite gösterdiği pH aralığı literatür verileriyle benzerlik göstermektedir. pH 4.0-8.0 aralığında ortalama %96 aktiviteye sahip olmasının yanında alkali bir pH değeri olan pH 8.0'de aktivitesini %93 gibi yüksek oranda koruması ve benzer şekilde pH 4.0'de %95 aktiviteye sahip olması SC6 CMCaz enziminin hem alkali hem de asidik ortamlarda yüksek relatif aktivite değerine sahip olduğunu göstermektedir.

4.5.3. SC6 CMCaz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklığı

Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla, enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinde (pH 6.0) hazırlanmış substrat kullanılmış, 30-90°C aralığında standart aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 70°C'dir. Tüm sıcaklık değerlerinde, ortalama %97, 50-80°C aralığında yaklaşık olarak %99 ve 60°C-90°C sıcaklık aralığında %96 kalan aktiviteye sahip olması bu enzimin termofil özellikte bir enzim olduğunu gösterir

niteliktedir. 30-80°C aralığında ortalama aktivite değeri yaklaşık olarak %97'dir bu değer SC6 CMCaz enziminin geniş bir sıcaklık aralığında yüksek oranda aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 14.SC6 CMCaz Enziminin Optimum Sıcaklık Grafiği.

Bischoff ve ark (2006), optimum pH'sını 6.0 olarak belirledikleri endoglukanaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 65°C olduğunu bulmuşlardır.

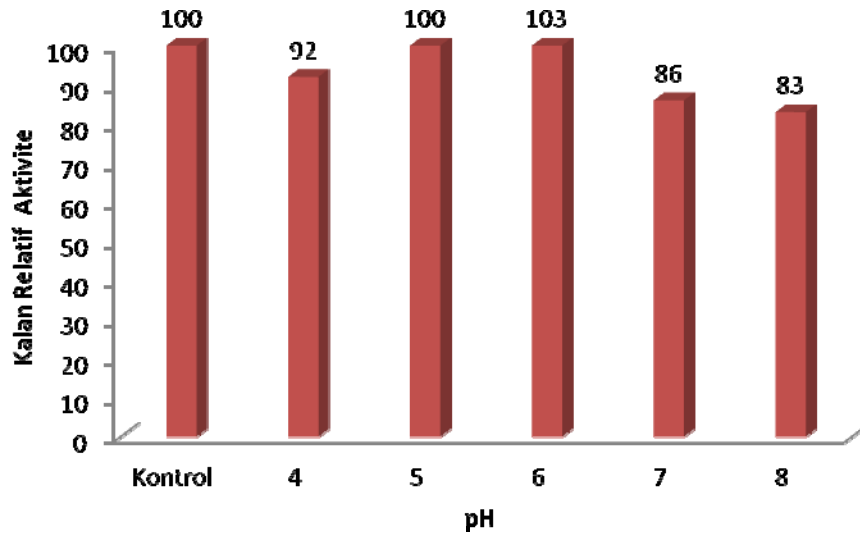
Li ve ark 2006, yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* AC-1 suşundan elde ettikleri, optimum aktivite pH'sını 4.5 ve 6.5 olarak belirledikleri *Ba*-EGA endoglukanaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 70°C olduğunu bildirmişlerdir. Sıcaklığın 80°C'ye yükseltilmesiyle aktivitenin azalmaya başladığı ve %48'e kadar düştüğü belirlenmiştir. SC6 CMCaz enzimi 80°C'deki 1 saatlik inkübasyon sırasında aktivitesini %98 korumuştur. Benzer özellikte olmalarına rağmen SC6 enziminin yüksek sıcaklıklardaki aktivitesinin *Ba*-EGA enzimine göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

60-80°C aralığında optimum aktiviteye sahip enzimler termofil enzimler olarak tanımlanmıştır ve termofil karakterdeki bu enzimlere proteazlar, glikozil hidrolazlar (amilaz, pullulanaz, glikoamilaz, glukozidazlar, selülozlar, xylanazlar), kitinaz, lipaz ve esterazlar örnek verilmiştir (Kumar ve ark, 2011; Van den Burg, 2003). SC6 CMCaz enzimi 70°C'lik optimum aktivite sıcaklığına sahip olmasıyla

termofil karakterde bir enzimdir ve literatürdeki nötral ve termofil karakterdeki selülaz enzimlerine ait sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

4.5.4. SC6 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi

SC6 CMCaz enziminin pH stabilitesi pH 4.0-8.0 aralığında ve 55°C’de 24 saatlik inkübasyon sonunda belirlenmiştir. Enzimin tüm pH değerlerinde %93 kalan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında SC6 CMCaz enzimi pH 5.0 ve pH 6.0’da aktivitesini tamamen korumuştur. pH stabilitesi alkali değerlere doğru gidildikçe düşüş gösterse de %80’ini altına inmediği, bununla beraber pH 4.0 ve pH 5.0’de sırasıyla %92 ve %100 stabil olduğu bulunmuştur. SC6 CMCaz enziminin pH 5.0 ve 6.0 aralığında ve 55°C’de aktivitesini hiç kaybetmemesi pH stabil ve termostabil karakterde bir enzim olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 15.SC6 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi Grafiği.

Bacillus sp. A8-8 suşundan izole edilmiş olan optimum pH’sını pH 6.0’da göstren β -1,3-1,4 glukanaz enziminin, pH 2-10 arasında ortalama %60 stabil olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, enzimin pH 5.0’de %100 stabilken artan pH’yla beraber stabilitede düşüş olduğu belirtilmiştir. Enzim optimum aktivite gösterdiği pH değerinde yaklaşık %70 stabilite göstermiştir (Jung ve ark, 2007).

Shu ve ark (2006), yaptıkları çalışmada, optimum aktivitesini pH 4.5’de gösteren endo- β -1,3 glukanaz enziminin pH stabilitesini 50°C’de 30 dakikalık ön inkübasyon sonunda belirlenmiş, pH 3.0-6.0 arasında yüksek pH stabilitesine sahip olduğu bildirilmiştir.

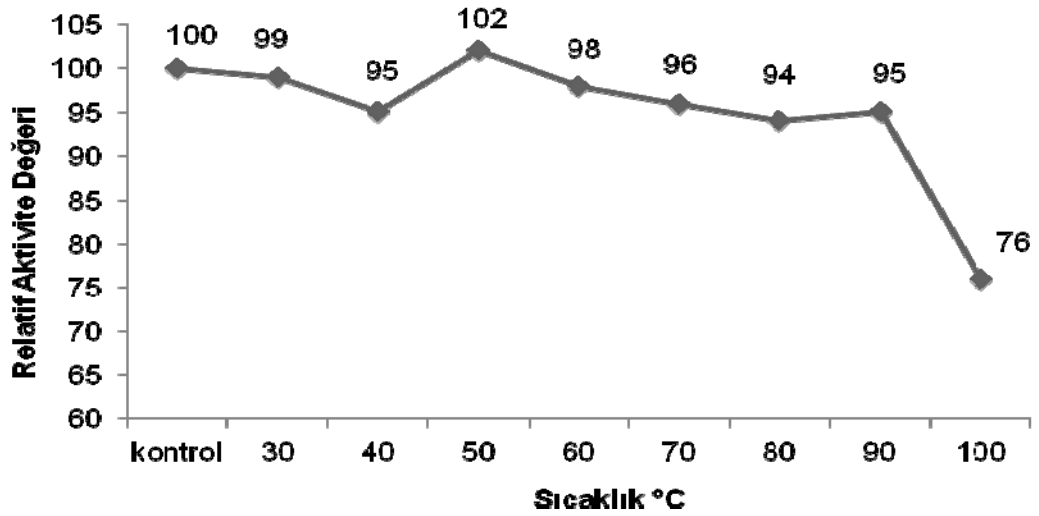
Bacillus sp. L1 suşundan izole edilen organik solvent tolerant selüloz enziminin pH stabilitesi 30°’deki 24 saatlik inkübasyon sonunda belirlenmiştir. Enzimin, pH 7.0-9.0 aralığında aktivitesinin tamamına yakını koruduğu bununla beraber, pH 6.0’da ve pH 10.0’da aktivitenin sırasıyla %70 ve %50’ye düştüğünü belirtmişlerdir (Li ve Yu, 2012).

Bacillus sp. AC-1 suşundan elde edilen *Ba*-EGA enziminin pH 2.0-13.0 aralığında 30°C’de 2 saat süreyle ön inkübasyonu sonunda kalan aktivitesi belirlenmiştir. Enzimin, pH 8-10 aralığında aktivitesini yüksek oranda koruduğu ancak, optimum pH değeri olan pH6.0’da stabilitesinin yaklaşık %70 olduğu bildirilmiştir (Li ve ark, 2006).

Literatür verileriyle kıyaslandığı zaman SC6 CMCaz enziminin geniş pH aralığında yüksek stabiliteye sahip olduğu görülmektedir.

4.5.5. SC6 CMCaz Enziminin Termal Stabilitesi

SC6 suşuna ait CMCaz enziminin 30-100°C’de ön inkübasyona bırakılmış, bu süre sonunda yapılan standart aktivite tayini ile sıcaklık stabilitesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzim, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80° ve 90°C sıcaklıklarda sırasıyla %99, %95, %102, %98, %96, %94 ve %95 kalan aktiviteye sahiptir. Enzim, 50°C’de indüklenerek %102 aktivite göstermektedir. Tüm sıcaklık değerlerinde ortalama %97 ve 60°C-90°C sıcaklık aralığında %96 kalan aktiviteye sahiptir.



Şekil 4. 16. SC6 CMCaz Enziminin Termal Stabilite Grafiği.

Literatür verilerine bakıldığında, Liu ve ark, 2008 yılında yaptıkları çalışmada elde ettikleri, optimum aktivitesini 50°C’de gösteren nötral β -glukanaz enziminin, 30-80°C aralığında 10 dakikalık inkübasyon sonunda stabilitesinin 50°C’ye kadar ortalama %85 olduğunu belirtmişlerdir. Bu sıcaklığın üzerine çıkıldığında enzim aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir .

Li ve ark (2006), yaptıkları çalışmada elde ettikleri termoasidofil karakterdeki endoglukanaz enziminin optimum sıcaklığını 70°C olarak belirlemişler; termal stabiliteyi belirlemek için enzimi 20-70°C aralığında 1 saat ön inkübasyona tabi tutmuşlardır. Enzimin 50°C’de %80’den fazla aktivitesini koruyabildiğini belirtmişlerdir.

2000 yılında yapılmış bir çalışmada *Bacillus sp.* HR68 ve CH43 suşlarından elde edilen selüloz enzimlerinin sıcaklık stabiliteleri değerlendirildiğinde, enzimlerin 50°C’ye kadar stabil olduğu ancak 50°C’nin üzerine çıkıldığında enzim aktivitesinin düştüğü belirtilmiştir. CH43 selüloz enziminin 10 dakikalık ön inkübasyon sonunda 70-80°C aralığında, 1 saat ön inkübasyon sonunda 60°C’de aktivitesini tamamen kaybettiği ancak 50°C’de 24 saat sonunda %100 aktivitesini koruduğu belirtilmiştir(Mawadza ve ark, 2000).

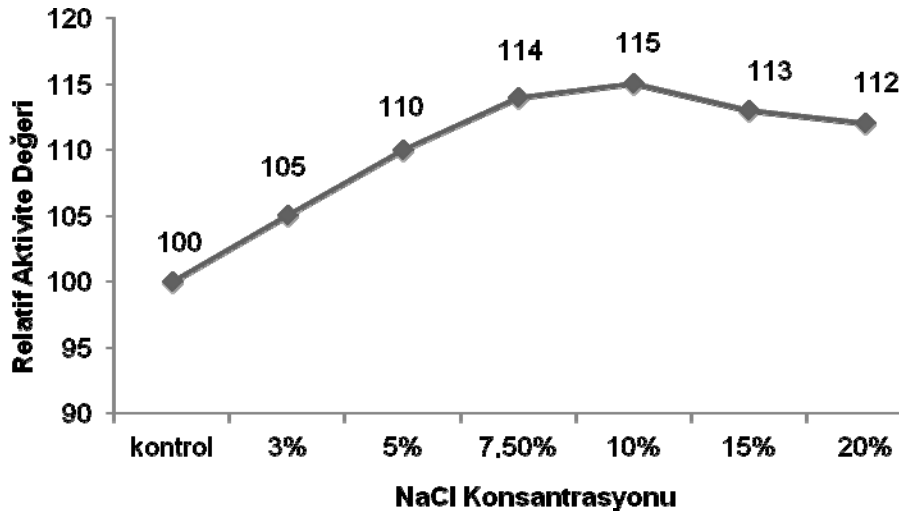
Bacillus subtilis subsp. subtilis A-53 suşundan saflaştırılan CMCaz enziminin termal stabilitesi 20-90°C aralığında sıcaklık değerlerinde 24 saat ön inkübasyon

sonucunda belirlenmiştir. Enzimin 50°C'ye kadar ortalama %70, 50°C üzerindeki sıcaklık değerlerinde ise ortalama %30 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Kim ve ark, 2009).

30-60°C aralığında yaklaşık %99, 50-90°C aralığında ortalama %97 aktiviteye sahip olması elde ettiğimiz enzimin termofil ve termostabil özellikte bir enzim olduğunu gösterir niteliktedir. SC6 CMCaz enzimi, 50°C'de %102 stabilite göstermesi, 90°C'de %95 stabil olması nedeniyle literatürdeki benzer özellikli enzimlere oranla yüksek termal stabiliteye sahiptir.

4.5.6. SC6 CMCaz enziminin aktivitesine NaCl'ün etkisi

%3-%20 NaCl içeren ortamda 55°C'de 60 dakika ön inkübasyon sonunda, standart aktivite tayini ile enzimin kalan aktivitesi belirlenmiştir. SC6 *Bacillus sp.* suşundan elde edilen selülaz enzimi %3, %5, %7,5, %10, %15 ve %20 konsantrasyonlarında sırasıyla %105, %110, %114, %115, %113 ve %112 relatif aktivite göstermiştir. Enzim %7,5, %10 ve %15 konsantrasyonlarda ortalama %114 aktivite göstermektedir. Bu durum analiz edilen enzimin halofil özellikte olduğunu göstermektedir.



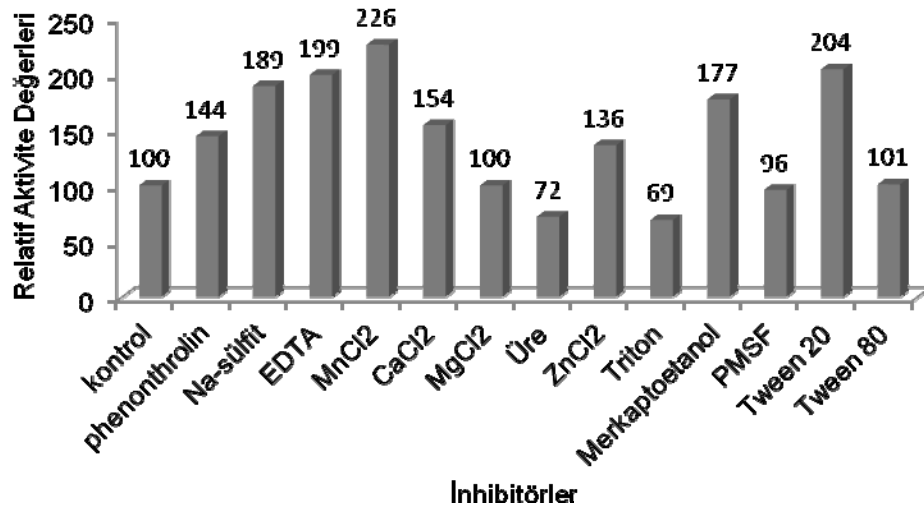
Şekil 4. 17.SC6 CMCaz Enzimi Aktivitesine NaCl'ün Etkisi

Bacillus licheniformis AU01 suşuna ait CMCaz enziminin optimum aktivitesini %10 NaCl konsantrasyonunda gösterdiği belirlenmiştir. NaCl konsantrasyonu %20'ye çıktığında enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiş ve relatif aktivitenin %30 olduğu bulunmuştur. %30 konsantrasyonda ise bu değer %34 olmuştur (Annamalai ve ark, 2011). Hirasawa ve ark (2006), yaptıkları bir çalışmada NaCl'ün ve diğer bazı tuzların (0,5 M NaBr, Na₂SO₄, CH₃COONa ve KCl, 0,2M NH₄Cl, 50mM LiCl ve NH₄NO₃, 5mM (NH₃)₂SO₄) izole ettikleri endoglukanaz enziminin aktivitesini 4 kat arttırdığını belirlemişlerdir. Buna göre enzim 0,2M – 1.5M (yaklaşık olarak %1,16-%8,76 NaCl konsantrasyonu) NaCl varlığında aktivitesini 4 kat artırmıştır.

Literatürle kıyaslandığı zaman çeşitli endoglukanaz ve selüloz enzimleri NaCl varlığında indüklenmiş ya da stabiliteelerini korumuş olsa da SC6 CMCaz enzimi %20 NaCl varlığında %112 aktivite göstermesi ve %3-%20 NaCl varlığında indüklenmesiyle NaCl'ye karşı diğer selüloz enzimlerinden daha stabil bir özellik göstermektedir.

4.5.7. SC6 CMCaz Aktivitesine Şelatör İnhibitör ve Metal İyonlarının Etkisi

Çeşitli metal iyonları şelatör ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için enzim, 1mM, 5mM ve %0,1 konsantrasyonlardaki kimyasallarla 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon işleminden sonra standart enzim aktivitesi testi ile kalan aktivite saptanmıştır. Enzim aktivitesi, 1,10 phenanthroline (%44), Na-sülfid (%89), EDTA (%99), MnCl₂ (%126), CaCl₂ (%54), ZnCl₂ (%36), Merkaptotanol (%77) ve Tween-20 (%104) varlığında indüklenirken, PMSF (%4) düşük düzeyde, Triton X-100 (%31) ve Üre (%28) önemli oranda enzim aktivitesini inhibe etmiştir. Bununla beraber SC6 *Bacillus sp.* Suşundan elde edilen CMCaz enzimi MgCl₂ (%100) ve Tween-80 (%101) ile orijinal aktivitesini tamamen korumuştur.



Şekil 4. 18.SC6 CMCaz Enzimine Şelatör, Metal İyonları ve İnhibitör Etkisi

Triton x-100 SC6 nötral CMCaz enziminin aktivitesini %31 oranında inhibe etmiş ve aktivite %69'a düşmüştür. Bazı kaynaklarda (Trivedi ve ark, 2011) selülaaz enziminin Triton x-100 varlığında indüklenerek aktivitesini artırdığı gösterilmişse de, Triton x-100 varlığında inhibe olarak aktivitesini kaybeden enzimler de belirtilmiştir. *Bacillus sp.* VG1 suşundan elde edilen CMCaz enzimi Triton x-100 varlığında aktivitesini %86'ya düşürmüştür (Huang ve Monk, 2004, Singh ve ark., 2001).

Tween 20 *Bacillus agaradhaerens*'den elde edilmiş olan NaCl varlığında indüklenebilir bir endoglukanaz enziminin aktivitesini %10 luk bir artışla %110'a çıkarmıştır (Hirasawa ve ark, 2006). Benzer şekilde SC6 enzimi Tween 20 varlığında indüklenerek %204 aktivite göstermiştir. Literatür verilerine bakıldığında SC6 CMCaz enzimi Tween 20 varlığında aktivitesinin 2 kat artmasıyla diğer CMCaz enzimlerinden ayrılmaktadır.

Trivedi ve ark 2011 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus aquimaris*'den elde ettikleri organik solvent stabil selülaaz enziminin Tween-80 varlığında %103 aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Literatürdeki bu değer SC6 enziminin Tween-80 varlığında gösterdiği %101 relatif aktivite değeriyle oldukça benzerdir.

SC6 CMCaz enzimi MnCl₂ varlığında indüklenerek %226 aktivite göstermiştir *Bacillus licheniformis* AU01 suşundan elde edilen termostabil ve halostabil karakterdeki CMCaz enziminin MnSO₄'ın 0.1mM konsantrasyonunda indüklenerek

aktivitesi %107.66, 1mM konsantrasyonda ise %145'e yükseldiği görülmüştür (Annamalai ve ark, 2011).

SC6 CMCaz enzimi β -merkaptotanol ile indüklenmiş aktivitesini %77 oranında artırmıştır. *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov.'den elde edilen CMCaz enzimi son konsantrasyonu 8.4 mM olan β -merkaptotanol ile muamele edildiği zaman aktivitesinin %88.7'ye düştüğü belirlenmiştir (Huang ve Monk, 2004). Bununla beraber, *Alicyclobacillus* sp. A4'den izole edilen β -glukanaz enziminin artan β -merkaptotanol konsantrasyonunda (1mM konsantrasyonda %117, 10mM konsantrasyonda %174.5) aktivitesinin indüklenerek arttığı belirlenmiştir (Bai ve ark, 2010). *Bacillus* sp. SC6 suşundan elde edilen nötral karakterdeki CMCaz enziminin β -merkaptotanol ile indüklenmesi literatür verileriyle de benzerlik göstermektedir.

1996 yılında yapılan bir çalışmada *Bacillus* sp.'den elde edilen selüloz enziminin, ortamda EDTA varlığında aktivitesinde değişiklik olmadığı görülmüştür (Horani, 1996). *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53 suşundan elde edilen CMCaz enzimi, 5mM konsantrasyondaki EDTA ile 50°C'de 1 saat inkübe edilmiş, enzimin indüklenerek %187 aktivite gösterdiği bulunmuştur (Kim ve ark, 2009). SC6 CMCaz enziminin EDTA ile ön işleme tabi tutulmasının ardından %199 aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuç literatür verileriyle benzerlik göstermektedir.

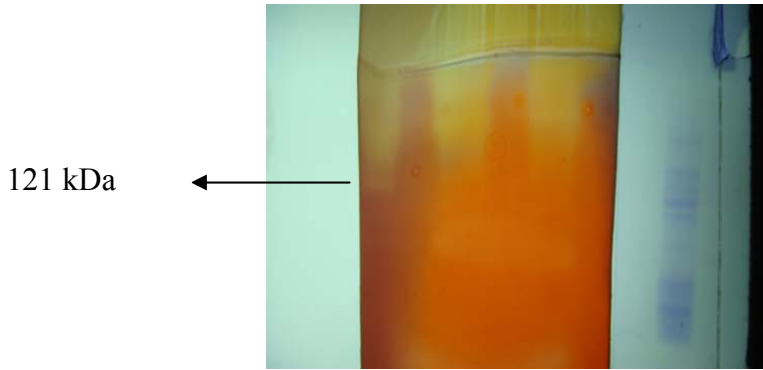
Aygan ve Arıkan (2008), yaptıkları çalışmada *Bacillus* sp. C-14 suşundan elde ettikleri endoglukanaz enziminin CaCl_2 ile indüklenerek aktivitesinin %132 olduğunu belirtmişlerdir. *Bacillus licheniformis* AU01'den elde edilen CMCaz enziminin 0.1mM konsantrasyondaki CaCl_2 ile %23 indüklenerek %123, 1mM konsantrasyondaki CaCl_2 ile %46 indüklenerek %146 aktivite göstermiştir (Annamalai ve ark, 2011). Peng ve ark 2011, yılında yaptıkları çalışmada *Clostridium thermocellum*'dan elde ettikleri termostabil selüloz enziminin 1mM Ca^{+2} varlığında indüklenerek aktivitesinin 2 katın üzerinde indüklendiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu sonuçtan yola çıkarak, artan Ca^{+2} konsantrasyonlarında enzim aktivitesini değerlendirmişler, 0.75mM Ca^{+2} konsantrasyonda aktivitesinin %115 olduğunu, artan Ca^{+2} konsantrasyonun enzim aktivitesinde önemli artışa sebep olmadığını belirtmişlerdir (Peng ve ark, 2011). *Bacillus* sp. SC6 suşundan elde

edilen nötral karakterdeki CMCaz enzimi 5mM CaCl₂ ile %54 indüklenerek %154 aktivite göstermiştir.

Bacillus sp.'den izole edilen endoglukanaz III-3-A ve III-3-B enzimlerinin Mg⁺² varlığında aktivitelerinin etkilenmediği belirtilmiştir (Liu ve ark, 2008). Termofilik *Geobacillus sp.* 70PC53'den elde edilen endoglukanaz enziminin Mg⁺² varlığında aktivitesinin etkilenmediği belirlenmiştir (Ng ve ark, 2009). Literatür verilerine benzer şekilde SC6 CMCaz enzimi MgCl₂ ile muamele edildiğinde aktivitesinde herhangi bir değişiklik olmamıştır.

4.5.8. SC6 CMCaz Enziminin SDS-PAGE Zimogram Analizi

SC6 nötral CMCaz enziminin optimum aktivite pH'sında (pH 6.0) hazırlanmış substrat içeren %10'luk SDS-PAGE kullanılarak zimogram analizi yapılmış, moleküler ağırlığı 121 kDa olan tek bir aktivite bandı belirlenmiştir.

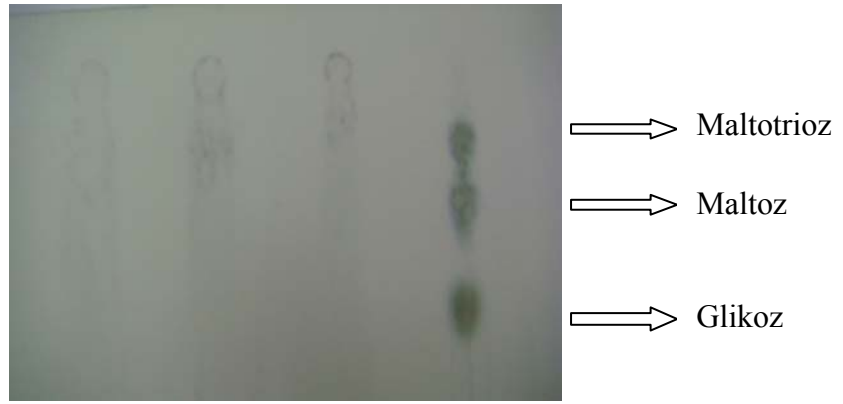


Şekil 4. 19.SC6 CMCaz Enziminin Zimogram Analizi Sonucu.

Bacillus sphaericus JS1 suşundan izole edilen selülaz enziminin moleküler ağırlığı native jel elektroforeziyle 183 kDa olarak bulunmuş, SDS-PAGE ile 42 kDa ağırlığında tek bant bulunmuş bu durumun da enzimin 4 homojen alt birimden oluşmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (Singh ve ark, 2004). Eckert ve Schneider, (2003) yaptıkları çalışmada *Alicyclobacillus acidocaldarius* suşundan elde ettikleri endoglukanaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE ile 100 kDa bulmuşlardır.

4.5.9. SC6 CMCaz Enziminin TLC Analizi

CMCaz enziminin CMC'yi hidrolizi sonucunda açığa çıkan son ürünler ince tabaka kromatografisi (Thin Layer Chromotography) metoduyla maltotrioz olarak belirlenmiştir. Aygan ve ark (2011), yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis* C108 suşundan elde ettikleri endoglukanaz enziminin CMC'yi sellobiyoz ve daha uzun zincirli oligoskkaritlere hidroliz ettiğini bildirmişlerdir.



Şekil 4. 20.TLC Yöntemiyle SC6 CMCaz Enzimine Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi.

4.6. SC41 CMCaz Enziminin Karakterizasyonu

4.6.1. SC41 CMCaz enziminin Katı besiyerindeki aktivitesi

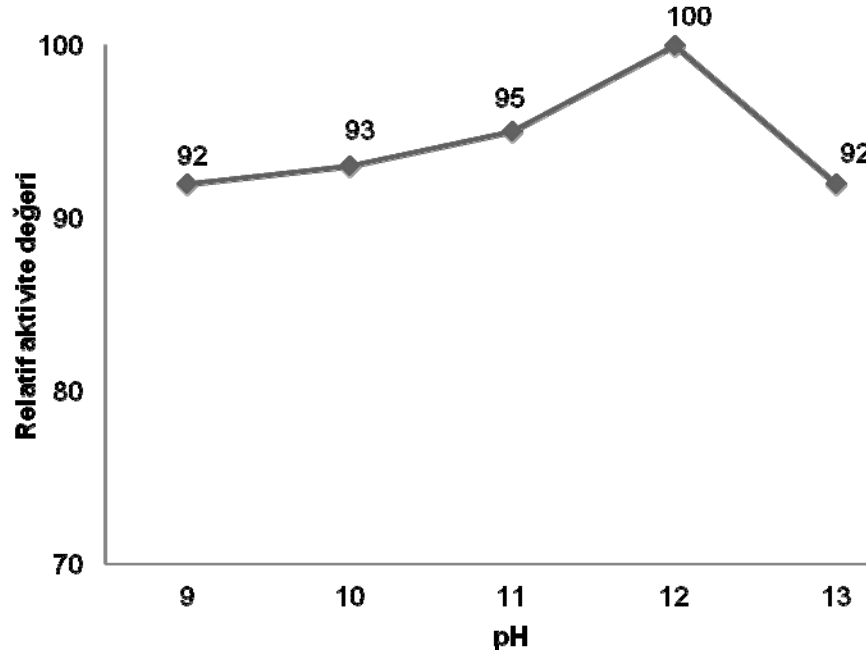
Kısmi saflaştırma ile elde edilen enzim CMC-agar'a 50µl miktarda damlatılmış, 55°C'de 24 saat bırakılmıştır. Enzimin katı besiyerinde aktivite gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4. 21.SC41 CMCaz Enziminin CMCagar Üzerindeki Aktivite Sonucu.

4.6.2. SC41 CMCaz Enziminin Optimum pH Aralığı

Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin belirlenmesi için %1 CMC içeren sodyum fosfat (pH 6.0-8.0), glisin-NaOH (pH 9.0-10.0) ve Borax-NaOH(11.0-13.0) tamponları ile hazırlanmış substrat çözeltileri kullanılmıştır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 12.0 olarak saptanmıştır. Enzim tüm pH değerlerinde ortalama %94 aktiviteye sahiptir. pH 11.0-13.0 aralığında ise %96 aktivite değeri elde edilmiştir. Optimum aktivite pH değerinin 12.0 olması, pH 9.0-11.0 aralığında ortalama %93 aktivite göstermesi ve pH 13.0'de %92 katalitik aktivite değerinin elde edilmesi *Bacillus sp.* SC41suşuna ait enzimin alkali karaktere sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 22.SC41 CMCaz Enziminin Optimum pH Grafiği.

2011 yılında yapılan bir çalışmada Aygan ve ark, *Bacillus licheniformis* C108 suşundan elde ettikleri termostabil ve halofil karakterdeki endoglukanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 10.0 olduğunu belirtmişlerdir.

Aygan ve Arıkan (2008), yaptıkları bir çalışmada *Bacillus sp.* C14 suşundan elde ettikleri endoglukanaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerini 9.0

bulmuşlar ve bu enzimi alkali bir enzim olarak tanımlamışlardır. 2004 yılında Kim ve ark., *Bacillus sp.* HSH-810 suşundan alkali karakterde selüloz enzimi izole etmişler ve optimum pH'sını 10.0 olarak belirlemişlerdir.

Trivedi ve ark (2011), yaptıkları çalışmada, bozulmaya uğramış deniz yosunundan izole ettikleri organik solvent tolerant *Bacillus aquimaris* suşundan, organik solvent stabil selüloz enzimi üretmiş ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Enzimin optimum pH'sının 11.0 olduğu ancak pH 12'de oldukça stabil (%85) olduğu belirtilmiştir.

Annamalai ve ark (2011)'nin yaptığı çalışmada deniz sedimetntlerinden izole ettikleri *Bacillus licheniformis* AU01suşundan CMCaz enzimi izole etmişler ve karakterizasyonunu yapmışlardır. Elde ettikleri enzimin optimum aktivite gösterdiği pH'değerinin 9.0-10.0 olduğunu ancak pH 12.0'de stabilitesinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

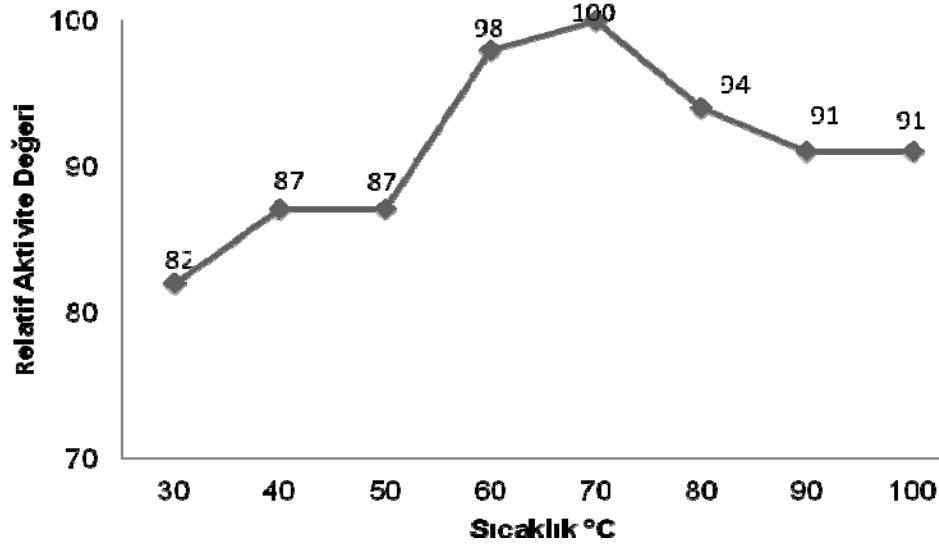
Shanmughapriya ve ark (2010), yılında yayınladıkları çalışmalarında *Marinobacter sp.* MSI032 suşundan saflaştırdıkları mezofilik alkalın selüloz enziminin karakterizasyonunu gerçekleştirmişler ve optimum aktivite pH'sının pH 9.0 olduğunu belirtmişlerdir ancak enzimin pH 12.0'de yüksek aktivite (%65) gösterdiğini bulmuşlardır.

Literatür verileriyle kıyaslandığında *Bacillus sp.*SC41 suşundan elde edilen CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin (12.0) diğer *Bacillus sp.*'den izole edilmiş selüloz enzimlerinden daha yüksek alkali pH değerine sahip olduğu görülmektedir.

4.6.3. SC41 CMCaz Enziminin Optimum Aktivite Sıcaklığı

Optimum sıcaklık değerinin bulunabilmesi için enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinde hazırlanmış substrat kullanılmış, 30-100°C aralığında standart aktivite tayini yapılmıştır. Enzimin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 70°C olarak belirlenmiştir. Enzim 30°C'de %82 aktivite gösterirken 100°C'deki aktivitesi %91 bulunmuştur. Bütün sıcaklıklar dikkate alındığında SC41 CMCaz enzimi ortalama %91 relatif aktivite göstermektedir. 60°C-100°C aralığında

ortalama %95 relatif aktiviteye sahip olması enzimin termofil karakterde olduğunu gösterir niteliktedir.



Şekil 4. 23.SC41 CMCaz Enziminin Optimum Sıcaklık Grafiği.

Annamalai ve ark (2011), izole ettikleri *Bacillus licheniformis* AU01 suşundan elde edilen termostabil CMCaz enziminin optimum aktivite sıcaklığının 60-70°C olduğunu bulmuşlardır. Enzime ait relatif aktivite grafiğine bakıldığında 80°C’de aktivitenin %60’a 90°C’de ise %40’a düştüğü görülmektedir.

Singh ve ark (2001), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* VG1’den izole ettikleri termostabil selüloz enziminin karakterizasyonunu yapmışlar ve optimum aktivite sıcaklığının 65°C olduğunu bulmuşlardır bununla beraber sıcaklık arttıkça aktivitede belirgin bir düşüş olduğu, 70°C’de relatif aktivitenin %80’in altına düştüğü ve 90°C’de %20 olduğu belirlenmiştir .

Şeker kamışı küspesinden izole edilen *Aspergillus fumigatus*’dan elde edilen selüloz enzimi karakterize edilmiş optimum sıcaklığı 65°C olan enzim termofil olarak tanımlanmıştır. Enzimin relatif aktivitesine bakıldığında 65°C’nin üzerine çıkıldığında aktivitede önemli bir düşüş olduğu görülmektedir (Grigorevski-Lima ve ark, 2008).

SC41 alkali CMCaz enzimi 70°C’de optimum aktivite göstermekte, 30-90°C aralığında aktivitesini önemli oranda (ortalama %91) korumakta ve 90°C’de %91 relatif aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Literatür verilerine bakıldığında SC41

enzimi termofil karakterdeki diğer enzimlerle yakın optimum sıcaklık değerine sahip olmasının yanında yüksek sıcaklıklardaki aktivitesinin belirgin şekilde daha avantajlı olduğu görülmektedir.

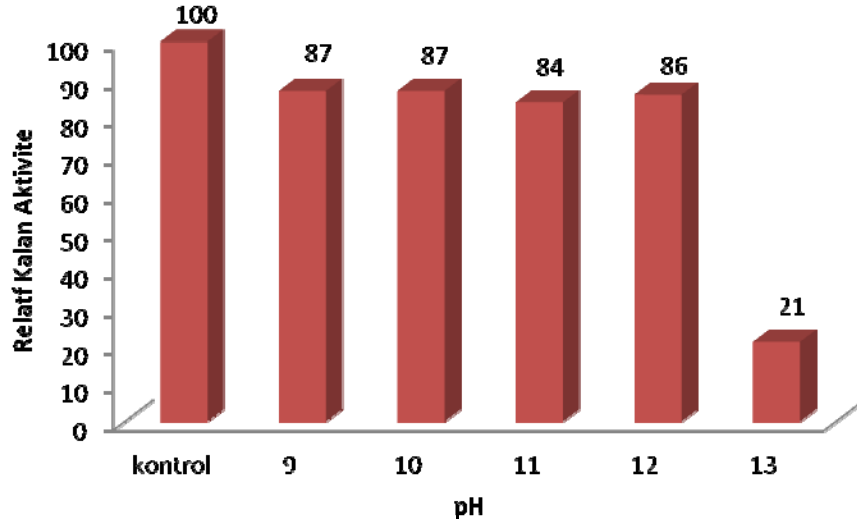
4.6.4. SC41 CMCaz Enziminin pH Stabilitesi

SC41 CMCaz enziminin pH stabilitesini belirleyebilmek için enzim pH 9.0-13.0 aralığındaki pH değerlerinde oda sıcaklığında 24 saat ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Enzimin, pH 9.0-12.0 aralığında stabilitesini ortalama %86 korurken, pH 13.0'de kalan aktivitesinin %21'e düştüğü bulunmuştur. SC41 CMCaz enziminin optimum aktivitesini gösterdiği pH 12.0 değerinde %86 relatif kalan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Literatür verilerine bakıldığında, 1999 yılında Christakopoulos ve ark. Yaptıkları çalışmada optimum pH'sını 8.0'de gösteren endo-1,4- β -glukanaz enziminin pH stabilitesini pH 6.0-13.0 aralığında değerlendirmişlerdir. Enzimin pH 6.0-9.0 aralığında aktivitesini tamamen koruduğu, 30°C'de 20 saat inkübasyonu sonunda pH 12.0'deki aktivitesinin %50'sini koruduğu belirlenmiştir.

Aygan ve ark, 2011 yılında *Bacillus licheniformis* C108 suşundan elde ettikleri alkalın endoglukanaz enziminin pH stabilitesini pH 6.0-12.0 aralığında 30°C'de 24 saat inkübasyon sonunda belirlemişlerdir. Enzimin en yüksek stabiliteyi pH 7.0'de (%70) gösterdiği pH 11.0'de ise stabilitenin %30'a kadar düştüğü bildirilmiştir.

Bacillus sp. ile yapılan bir çalışmada elde edilen optimum aktivitesini pH 9.0'da gösterdiği belirlenen III-3-B alkalın β -glukanaz enziminin stabilitesinin belirlenmesi için enzim 30°C'de 30 dakikalık ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Enzimin, pH 5.0-11.0 gibi geniş bir pH aralığında stabilitesini yüksek oranda koruduğu ancak pH 12.0'de aktivitesinde önemli oranda düşüş olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark, 2008).



Şekil 4. 24.SC41 CMCaz enziminin pH Stabilesi Grafiği.

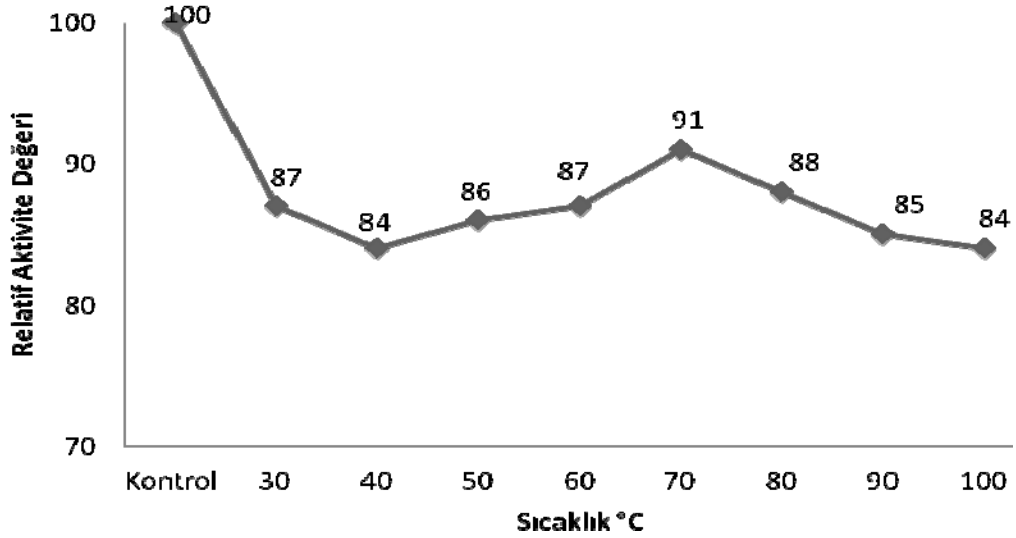
Bacillus sp. HSH-810 suşundan elde edilen alkalın selüloz enziminin 5°C'deki 24 saatlik inkübasyonu sonunda stabilesini önemli düzeyde koruduğu belirlenmiştir. Enzim, pH 8.0'de aktivitesini hiç kaybetmezken artan pH'nın aktivitede düşüşe yol açtığı bildirilmiştir (Kim ve ark, 2005).

Literatür verileriyle kıyaslandığında SC41 CMCaz enziminin oda sıcaklığındaki pH stabilesinin pH 9.0-12.0 aralığında oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen stabilite değerleri literatür verileriyle benzerlik gösterse de pH 12.0'de %86 stabil kalması SC41 CMCaz'ı diğer alkalın selüloz enzimlerinden ayırır niteliktedir.

4.6.5. SC41 CMCaz Enziminin Termal Stabilesi

SC41 suşuna ait CMCaz enzimim 30-100°C'de ön inkübasyona bırakılmış, bu süre sonunda yapılan standart aktivite tayini ile sıcaklık stabilesi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre enzim orijinal aktivitesini 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°, 90°C ve 100°C sıcaklıklarda sırasıyla; %87, %84, %86, %87, %91, %88, %85 ve %84 oranında korumuştur. Bütün sıcaklıklar birlikte değerlendirildiği zaman ortalama kalan enzim aktivitesi %87'dir. Enzim 70°C'de aktivitesini %91 korurken 70°C-100°C aralığında ortalama %87 kalan aktivite değerine sahiptir. Bu sonuçlar

SC41 suşundan elde edilen alkali, termofil CMCase enziminin termostabil olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4. 25.SC41 CMCase Enziminin Termal Stabilite Grafiği.

Aygan ve Arıkan (2008), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* C14 suşundan izole ettikleri endoglukanaz enziminin termal stabilitesini 15, 30 ve 60 dakika ön inkübasyon yaparak değerlendirmişler; 20-90°C’de 15 dakika sonunda ortalama %71, 30 dakika sonunda ortalama %60 ve 60 dakika sonunda ortalama %36 kalan aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. C14 endoglukanaz enzimi 90°C’de 60 dakika sonunda tamamen inhibe olmuştur.

2001 yılında Singh ve ark’nın *Bacillus sp.* VG1 suşuyla yaptıkları çalışmada elde ettikleri CMCase enzimi 60°C’de 720dk, 70°C’de 420dk, 80°C’de 180dk, 90°C’de 70dk ve 100°C’de 12dk yarılanma ömrüne sahiptir.

Rastogi ve ark (2010), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* DUSELR13 suşundan izole edilen termofil CMCase enziminin 60°C’de 1gün inkübasyon sonunda %97 ve 40 gün sonunda %5, 70°C’de 1 gün sonunda %78 kalan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanında enzimin , 80°C’de 1 gün inkübasyon sonunda %90, 90 ve 100°C’de 60 dakika sonunda aktivitesini %100 kaybettiği belirtilmiştir.

2012 yılında yapılan bir çalışmada halotolerant bir suş olan *Bacillus sp.* L1 suşundan elde edilen selüloz enziminin optimum sıcaklığının 60°C olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık stabilitesine bakıldığı zaman enzimin 20-60°C aralığında stabilitesinin oldukça yüksek olduğu (%90-%100 aralığında) sıcaklığın yükselmesiyle beraber kalan aktivitede düşüş olduğu gösterilmiştir. 90°C’de aktivitenin tamamen kaybolduğu bildirilmiştir (Li ve Yu, 2012).

Literatür verilerine bakıldığı zaman termofil-termostabil selüloz enzimlerinin 90°C’de ön inkübasyon işlemlerinde aktivitelerini tamamen kaybettikleri görülmektedir. *Bacillus sp.* SC41 suşundan elde ettiğimiz alkali CMCaz enzimi 90°C’de 1 saatlik öninkübasyon sonunda %85, 100°C’de ise %84 aktivitesini korumaktadır. Bu değerler enzimin yüksek sıcaklıkta diğer (Li ve yu, 2012; Rastogi ve ark, 2010; Aygan ve Arıkan, 2008) bazı selüloz enzimlerinden daha stabil karakterde olduğunu göstermektedir. Bunun yanında enzimin 30-100°C aralığındaki sıcaklıkta sahip olduğu kalan relatif aktivite değerlerinin birbirlerine yakın olması geniş sıcaklık aralığına sahip endüstriyel uygulamalarda diğer bir çok enzime göre daha verimli olabileceğini göstermektedir.

4.6.6. SC41 CMCaz Enziminin Aktivitesine NaCl’ün Etkisi

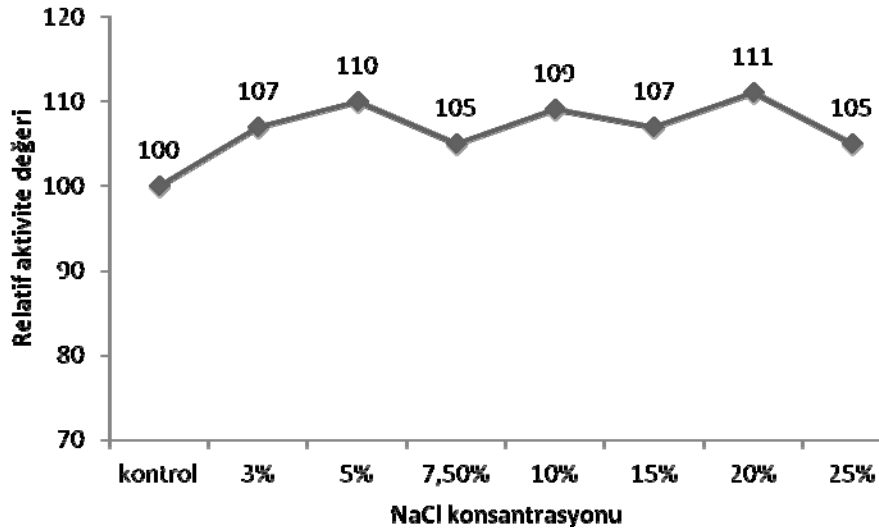
%3-%20 NaCl içeren ortamda 55°C’de 60 dakika ön inkübasyon sonunda, standart aktivite tayini ile enzimin kalan aktivitesi belirlenmiştir. SC41 *Bacillus sp.* suşundan elde edilen selüloz enzimi %3, %5, %7,5, %10, %15 ve %20 konsantrasyonlarında sırasıyla %107, %110, %105, %109, %107, %111 ve %105 relatif aktivite göstermiştir. %3-%25 tuz konsantrasyonu aralığında ortalama %108 relatif aktivite göstermiştir. SC41 enziminin en yüksek aktiviteyi %20 NaCl konsantrasyonunda gösterdiği görülmektedir ancak %5 NaCl konsantrasyonunda da oldukça yakın (%110) bir aktivite değerine sahiptir.

Annamalai ve ark, 2011 yılında yaptıkları çalışmada deniz bakterisi olan *Bacillus licheniformis* AU01 suşundan termostabil ve halostabil karakterde bir karboksimetil selüloz enzimi izole etmişlerdir. Enzimin %15 NaCl konsantrasyonunda 1 saat ön inkübasyon sonunda aktivitesini %75 koruduğu, fakat

NaCl konsantrasyonu %20'den %30'a yükseltildiğinde, %30 NaCl konsantrasyonunda 12 saat inkübasyon sonunda orijinal aktivitesinin %34'ünü koruduğu belirtilmiştir.

Li ve Yu 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri halotolerant karakterdeki *Bacillus sp.* L1 suşundan elde ettikleri organik solvent tolerant selüloz enziminin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, NaCl stabilitesinin belirlenebilmesi için enzim 30°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve aktivite analizi yapılmış; %7.50 NaCl konsantrasyonunda %100 aktiviteye sahip olduğu , %20 NaCl konsantrasyonunda aktivitenin %40'a kadar düştüğü belirtilmiştir.

2012 yılında yapılan bir çalışmada, *Paenibacillus barcinonensis* suşundan elde edilen termofilik selüloz enziminin 10mM NaCl varlığında %93,75 kalan aktiviteye sahip olduğu görülmektedir (Asha ve ark, 2012).



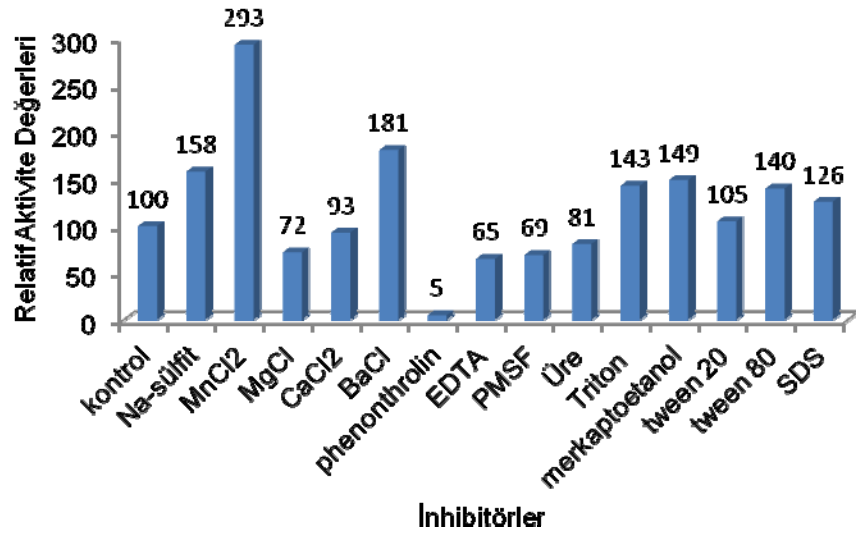
Şekil 4. 26.SC41 CMCase Enzimi Aktivitesine NaCl'ün Etkisi Grafiği

Literatür verilerine bakıldığı zaman SC41 CMCase enziminin NaCl ile olan etkileşimine benzer sonuçlar olmakla beraber (Aygan ve ark, 2011), SC41 enzimi diğer selüloz enzimlerine göre artan NaCl konsantrasyonlarında indüklenebilir ve daha stabil bir sonuç göstermektedir.

4.6.7. SC41 CMCaz Aktivitesine Şelatör İnhibitör ve Metal İyonlarının Etkisi

Çeşitli metal iyonları şelatör ve inhibitörlerin enzim aktivitesine etkisinin belirlenmesi için enzim, 8mM (üre), 5mM (Na-sülfat $MnCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$, EDTA, 1-10 phenonhtroline) ve % 1 (Triton x-100, Tween-20, Tween-80, PMSF, β -merkaptotanol) konsantrasyonda kimyasallar ile 60 dakika ön inkübasyona bırakılmıştır. Ön inkübasyon işleminden sonra standart aktivite tayini yapılarak kalan aktivite değerleri bulunmuştur. Ön inkübasyondan geçmemiş enzimin aktivite değeri 100 kabul edilerek relatif aktivite değerleri hesaplanmıştır.

Alkali termofil ve halofil özellikteki selüloz enziminin aktivitesi 5mM Na-sülfat(%158), 5mM $MnCl_2$ (%293), 5mM $BaCl_2$ (%181), % 1 Tween-20 (%105), %1 Tween-80 (%140), %1 Triton x-100 (%143), SDS(%126) ve %1 merkaptotanol (%149) varlığında indüklenmektedir. 1-10 phenonhtroline (%5) aktivitesini önemli düzeyde inhibe ederken, 5mM $MgCl_2$ (%72), EDTA (%65), PMSF (%69), 5mM $CaCl_2$ (%93) ve 8M üre (%81) aktivitesinde düşüşe yol açmıştır.



Şekil 4. 27.SC41 CMCaz Enzimine İnhibitör, Metal İyonları ve İnhibitör Etkisi

Bacillus sp. SC41 suşundan elde edilen alkali CMCaz enzimi 5mM $MnCl_2$ ile ön inkübasyon sonunda indüklenmiş ve aktivitesi %293 olmuştur.

Peng ve ark.,2011 yılında yaptıkları bir çalışmada *Clostridium thermocellum* ‘dan elde ettikleri termostabil selüloz enziminin 1mM Mn^{+2} varlığında 10 dakikalık inkübasyon sonunda önemli düzeyde indüklendiğini bildirmişlerdir.

Termofilik *Geobacillus sp.* 70PC53 suşundan elde edilen endoglukanaz enziminin 2mM ve 5mM $MnSO_4$ varlığında 65°C’de 15 dakika inkübasyon sonrasında aktivitenin %100 indüklendiği belirtilmiştir (Ng ve ark, 2009). Li ve Yu 2012 yılında, halotolerant bir izolat olan *Bacillus sp.* L1 suşundan elde ettikleri organik solvent tolerant selüloz enziminin 5mM $MnCl_2$ ile 24 saat 30°C’de ön inkübasyonu sonunda %92.4 kalan aktiviteye sahiptir.

SC41 alkali CMCaz enzimi $MgCl_2$ ile ön inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitesi değerlendirilmiş ve kalan aktivitesinin %72 olduğu belirlenmiştir.

Literatüre bakıldığı zaman Dutta ve ark, 2008 yılında yaptıkları çalışmada ekstremofilik karakterdeki *Penicillium citrinum*’dan selüloz izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlar, enzimin 3mM ve 6mM $MgCl_2$ varlığında sırasıyla %87 ve %78 kalan aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Wang ve ark 2007 yılında yaptıkları çalışmada, *Trichoderma koningii* ZJU-T’den izole edilen β -glukanaz enziminin 0.5mM ve 1mM $MgCl_2$ varlığında sırasıyla %78.65 $\pm$ 8.50 ve %83.25 $\pm$ 16.27 kalan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Bacillus sp. AC-1 suşundan elde edilen termoasidofilik endoglukanaz enziminin 5mM $MgCl_2$ varlığında %94 aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Li ve ark, 2006).

SC41 CMCaz enziminin $MgCl_2$ varlığındaki kalan aktivite değeri literatür verileriyle oldukça benzerdir.

2012 yılında Li ve Yu yaptıkları çalışmada, halotolerant bir suş olan *Bacillus sp.*L1 suşundan elde edilen organik solvent tolerant selüloz enziminin, 5mM Ca^{+2} ile 30°C’de 24 saat inkübasyona bırakılarak kalan aktivitesi değerlendirilmiştir. Araştırmacılar enzimin Ca^{+2} varlığında aktivitesinin %98.9 $\pm$ 1.1 ’a düştüğünü belirtmişlerdir.

Li ve ark (2006), yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* AC-1 suşundan elde edilen endoglukanaz Ba-EGA enziminin 5mM $CaCl_2$ varlığında 30°C’de 30 dakika ön inkübasyon sonunda %92 kalan aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Bacillus sp. SC41 alkali CMCaz enzimi, CaCl_2 ile ön inkübasyon sonunda aktivitesini %7 kaybetmiş, %93 kalan aktivite göstermiştir.

SC41 CMCaz enzimi, SDS varlığında %26 indüklenerek %126 aktivite göstermiştir. 2008 yılında yapılan bir çalışmada Dutta ve ark. (2008) *Penicillium citrinum*'dan elde ettikleri selüloz enziminin 3mM ve 6mM SDS varlığında aktivitesi değerlendirilmiş, enzimin indüklenerek sırasıyla %104 ve %118 aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Trivedi ve ark, 2011 yılında solvent tolerant deniz bakterisi olan *Bacillus aquimaris* suşundan elde edilen organik solvent stabil alkali selüloz enzimiyle yaptıkları çalışmada 5mM SDS'nin selüloz enzimini indükleyerek aktivitesini %136'ya yükselttiğini bildirmişlerdir.

2009 yılında Ng ve ark. 'nın termofilik *Geobacillus sp.* 70PC53 suşundan elde ettikleri endoglukanaz enziminin 2mM, 5mM ve 10mM β -merkaptotanol ile 65°C'de 15 dakika ön inkübasyon sonunda indüklendiği, artan konsantrasyonda enzim aktivitesinin yükseldiği belirtilmiştir.

SC41 enzimi, literatürdeki enzimlerle benzerlik gösteren şekilde β -merkaptotanol ile indüklenerek %149 aktivite göstermiştir.

Clostridium thermocellum'dan izole edilen termostabil selüloz enziminin 1mM EDTA varlığında 10 dakikalık ön inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin %50'sini kaybettiği belirtilmiştir (Peng ve ark, 2011).

Bacillus licheniformis AU01'den izole edilen termostabil ve halostabil CMCaz enziminin 0.1 mM ve 1mM EDTA varlığında sırasıyla 82.33 ± 0.88 ve 63 ± 1.15 kalan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Enzimin artan EDTA konsantrasyonunda aktivitesinin düştüğü görülmüştür (Annamalai ve ark, 2011) .

SC41 CMCaz enzimi, EDTA ile 60 dk inkübasyon sonunda aktivitesini %31 kaybetmiştir. Bu değer literatür verileriyle benzerlik göstermektedir.

SC41 alkali CMCaz enzimi triton x-100 , Tween 20 ve Tween 80 ile indüklenerek sırasıyla %143, %105 ve %140 aktivite göstermiştir.

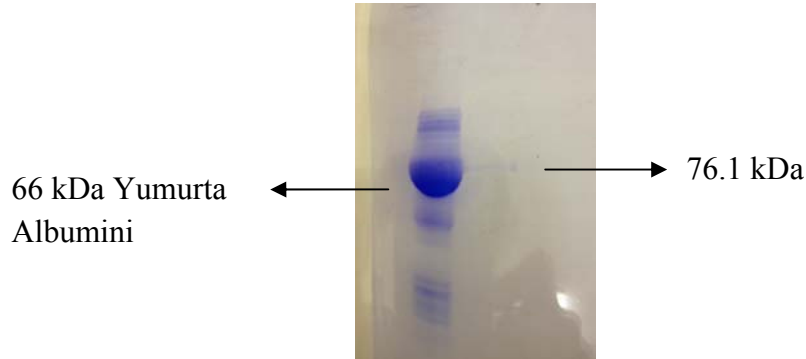
Li ve Yu 'nun *Bacillus sp.*L1 suşundan elde ettikleri selüloz enzimi 10mM Triton x-100, Tween 20 ve Tween 80 ile birbirine çok yakın sonuçlar göstermiş

sırasıyla 91.2 ± 1.3 , 91.5 ± 1.5 ve 91.3 ± 1.3 aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Li ve Yu, 2012).

Bacillus aquimaris'den üretilen organik solvent stabil alkali selüloz enziminin Triton x-100, Tween-20 ve Tween-80 ile indüklenerek sırasıyla %124, %109 ve %103 aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Trivedi ve ark, 2011).

4.6.8. SC41 CMCaz Enziminin SDS-PAGE Zimogram Analizi

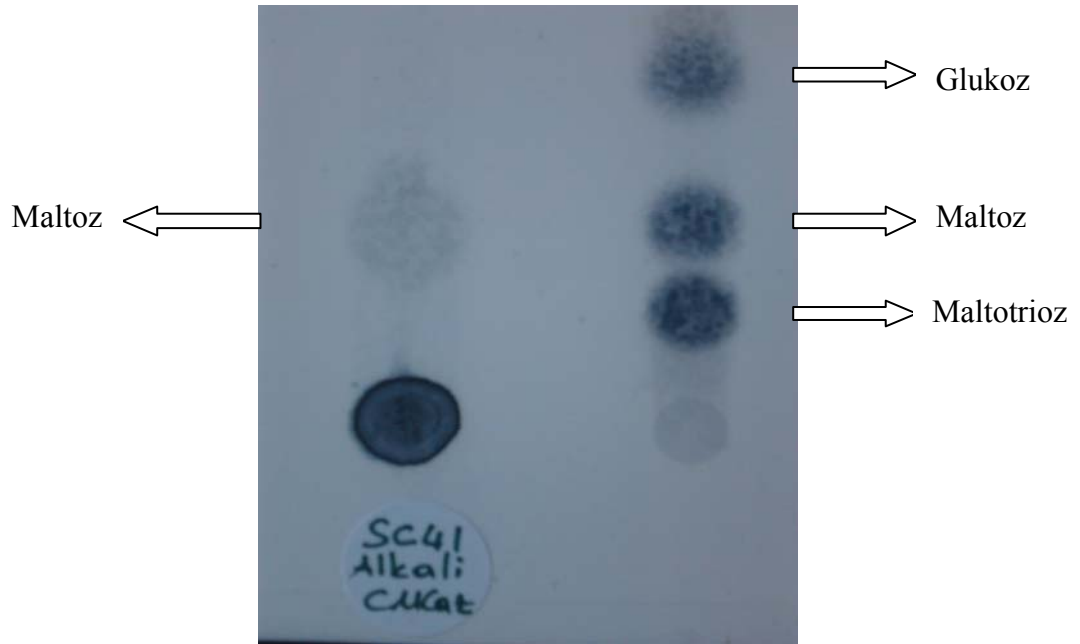
SC41 CMCaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE yöntemi kullanılarak 76.1 kDa olarak belirlenmiştir. 2001 yılında *Bacillus* suşundan izole edilmiş bir alkalın selüloz enziminin moleküler ağırlığı 45 kDa olarak belirlenmiştir. Aygan ve Arıkan, 2008 yılında *Bacillus sp.* C14 suşundan izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirdikleri alkalın endoglukanaz enziminin moleküler ağırlığını 61 kDa olarak belirlemişlerdir.



Şekil 4. 28.SC41 CMCaz enziminin SDS-PAGE ile Moleküler Ağırlık Analizi

4.6.9. SC41 CMCaz Enziminin TLC Analizi

SC41 suşuna ait CMCaz enziminin CMC hidrolizi sonucunda açığa çıkan son ürünün, ince tabaka kromatografisi kullanılarak maltoz olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 29.TLC Yöntemiyle SC41 CMCase Enzimine Ait Son Ürünlerin Belirlenmesi

Gupta ve ark (2012), *Anabeana laxa*'dan izole ettikleri iki endoglukanaz enziminin hidroliz sonucu açığa çıkardıkları son ürünleri TLC ile belirlemişlerdir. End1 enziminin son ürünlerinin sellobiyoz ve sellotetraoz olduğunu bildirmişlerdir. End2 enzimi End1'den farklı olarak sellobiozu glukoz, sellotetraozu glukoz, sellobiyoz ve sellotrioz hidroliz ettiği belirtilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enzimler, kimyasal reaksiyonları, mükemmel spesifite ve yüksek hızda katalizleyebilmektedir. Bu reaksiyonlar, tüm canlı organizmaların metabolizmalarının temelini oluşturur ve endüstri için hassas, verimli ve ekonomik biyokatalitik dönüşümler gerçekleştirmek için muazzam özellikler sağlarlar (Godfrey ve West, 1996; van Beilen ve Li, 2002). Enzimler, ‘doğanın araçları’dır ve doğanın kendi teknolojisini çok sayıdaki avantajıyla modern endüstride kullanırlar. Bu nedenle enzimlerden, endüstriyel ürünleri ve prosesleri temizlemek için başlıca katkı olarak yararlanılmaktadır. Kimyasallarla kıyaslandığı zaman enzimler, spesifik bir etkiye sahiptir ve ılımlı koşullarda aktivite gösterir. Enzimler, genellikle geleneksel kimyasal yöntemlerle mümkün olmayan reaksiyonlar gerçekleştirir ve bu sayede yeni faydalar sağlar. Çevreyle uyumludurlar, yenilenebilir kaynaklardan üretilirler ve tamamen doğada parçalanabilirler, enzim üretiminde aşırı biyomas oluşsa bile, toprağa transfer edilerek toprakta havalandırma amaçlı ve gübre olarak yeniden değerlendirilebilir. Çoğu endüstri, çevreye ve ekipmanlara zararlı etkisi olan kimyasalların kullanıldığı eski yöntemleri, biyolojik parçalanabilirliği olan enzimlerin kullanıldığı yeni proseslerle değiştirmiştir (Schäfer ve ark, 2007).

Enzim uygulamaları, endüstriyel proseslerden, farmasötik araştırma ve geliştirmelere kadar uzanan bir yelpazeye sahiptir. Aynı zamanda, genetik mühendisliğindeki artan gelişmeler, yüksek üretim miktarı ve diğer kurulu veya yardımcı teknolojiler, mevcut proseslerin ekonomisini geliştirir ve yeni uygulama alanları yaratır(van Beilen ve Li, 2002).

Yiyecek, hayvan yemi, tarım, kağıt, deri ve tekstil endüstrileri, enzim teknolojisi için en uygun endüstrilerdir çünkü, ürünlerin yanı sıra, enzimatik prosesle üretilen, parçalanmış ya da değiştirilen yan ürünler de birer biyomoleküldür. Kağıt ve kağıt hamuru endüstrilerinde enzimler artan oranlarda temizleme prosesleri için kullanılmış bu durum, 1994 yılında ABD’de ve Avrupa’da 25 milyon dolarlık enzim satışıyla sonuçlanmıştır. Ucuz ve temiz enzimatik veya biyolojik uygulamaların, kimyasal prosedürlere alternatif olmaları teknolojik gelişmelerin artışıyla güçlü bir şekilde tetiklenmektedir. Enzimler tekstil endüstrisinde de benzer role sahiptir,

ağartma işlemlerinde lakkazın veya hidrojen peroksidin uzaklaştırılması için katalazın kullanılması daha az hammadde kullanılmasını ve kirliliğin azaltılmasını sağlamaktadır (Godfrey ve West, 1996). Enzimler, tarım alanında da geniş kullanıma sahiptir, enzim destekli silaj fermentasyonu, ekinlerin ve ekin artıklarının biyoprosesleri, lif/ip üretimi, yem verimini artırmak için yem katkılarının üretilmesi gibi. Tarımsal artık biyomas, enzimler aracılığıyla kimyasalların ve yakıtların üretilmesi için bir kaynağa dönüştürülebilir. Biyolojik yenilenebilir kaynaklar, düşük CO₂ üretimi, uyumluluk ve kendi kendine yetebilir olması gibi avantajlara sahiptir (van Beilen ve Li, 2002).

Endüstriyel işlemlerde ekstremofilik enzimlerin kullanılması, özellikle yüksek sıcaklık, bakteriyel ve viral kontaminasyon riskini de azaltmış olur (Güven, 2011).

Endüstriyel enzimlerin %75'ini hidrolazlar oluştururken ikinci büyük grup karbohidrolazlardır (Bhat, 2000). Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbonhidratazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır (Wiseman, 1987). Bu enzimlerin kullanım alanlarına göre dağılımına bakıldığında, %29'unun gıda endüstrisinde, %15'inin hayvan yemi sektöründe ve %56'sının ise genel amaçlı teknik alanlarda yer aldığı görülmektedir (Outtrup ve Jorgensen, 2002).

Selülazlar, mikroorganizmaların selülozik materyaller üzerinde üremeleri sırasında sentezledikleri indüklenebilir enzimlerdir (Lee ve Koo, 2001; Lee ve ark., 2008). Selülazlar, selülozdaki β -1,4 bağları hidrolizleyen enzimlerdir. Bu enzimler, selülozun hidrolizinde sinerjik etkiye sahip endoglukanaz (EC 3.2.1.4), sellobiyohidrolaz (EC 3.2.1.91) ve sellobiazdan (β -glukozidaz EC 3.2.1.21) oluşan bir multikomponent enzim sistemidir. İlk iki enzim doğrudan selüloza etki ederken, reaksiyon ürünü olarak sellobiyoz ve glikoz açığa çıkarır. Sellobiyoz ise sellobiyaz enzimiyle glukoz indirgenir (Cao ve Tan, 2002). Selülaz enzimleri, nişasta prosesi, hayvan yemi üretimi, tahıldan alkol fermentasyonu, malt yapımı ve biracılıkta, meyve sebze suyu ekstraksiyonunda, kağıt ve kağıt hamuru üretiminde ve tekstil endüstrisinde çok sayıda kullanım alanına sahiptir (Asha ve ark, 2012). Çok sayıda farklı selülazlar kuru temizleme deterjanı olarak kullanılmaktadır. Selülazlar,

temizleme performansını artırmasının yanında, kumaş kalitesine de fayda sağlar. Temizleme performansı selülozik moleküler fragmentlerin, (polimerik glukanolar, renkli lekelerin selülozik kumaş üzerine bağlanmasını artırır) uzaklaştırılmasıyla geliştirilmektedir. Kumaş bakımı ve iyileştirmesi etkisi, daha büyük selüloz fiber fragmentlerin yani, kumaş üzerinde gözle görülür büyüklükte, kumaşın renk tonunu etkileyebilecek ve kumaşta tüy veya tiftiklenme gibi görülebilecek büyüklükteki fragmentlerin uzaklaştırılmasına dayanır. Bu fiber fragmentler kumaşa eski ve yıpranmış bir görüntü verir ve bunların uzaklaştırılması bir ‘rejuvenation’ ‘gençleştirme etkisi’ ile sonuçlanır. Bugün selülazlar bu özellikteki kumaşlara gençleştirme ve yenileme yapabilen yegane enzimlerdir.

Selülaz enzimleri, amilazlar ve lipazlarla beraber gazete kağıtları ve atık kağıtlarda mürekkebin uzaklaştırılmasında yüzey temizleyici ajan olarak kullanılırlar. Selülaz enzimleri mürekkebin bağlandığı fibrillere etki ederek renklendiricinin uzaklaşmasına yardımcı olur (Schäfer ve ark., 2007)..

Aerobik ve anaerobik bakteriler ve mantarların selülaz sistemlerinin biyokimyasal özellikleri son 20 yılda karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. *Bacillus sp.*, *Cellulomonas fimi*, *Pseudomonas fluorescens* gibi termofilik aerobik bakteriler ve *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Fibrobacter succinogenes* gibi termofilik anaerobik bakteriler ve bazı actinomisetlerin yüksek oranda selülaz aktivitesi bulunduğu belirlenmiştir (Das ve ark, 2010).

Bakteriyal selülaz enzimleri ticari proseslerin gelişmesi için potansiyel kaynaklar olarak önem kazanmaktadır. Bunun sebebi, bakterilerin üreme hızının yüksek olması, geniş genetik çeşitliliğe sahip olmaları, adaptasyon yeteneklerinin olması ve genetik manipulasyona yatkın olmalarıdır (Asha ve ark, 2012).

Bacillus cinsi bakteriler, aerobik veya fakültatif aerobik sporlu bakterilerdir. Çomak şekilli, düz veya kıvrık olabilirler, tek yaşayabildikleri gibi gruplar halinde de bulunabilirler, çift veya zincir oluşturmuş halde görülürler (Zemek ve ark, 1981). Bakteriler arasında, *Bacillus* cinsi, üreme hızı, ekstraselüler sekresyonu ve biyolojik olarak güvenli olması nedeniyle endüstriyel olarak cazip bir organizmadır (Schallmey ve ark, 2004; Aygan ve ark, 2011). *Bacillus*’lar polisakkarit hidrolazlar,

α -amilaz ve likenazlar için önemli üreticilerdir ve başlıca *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.mesentericus*, *B. Stearothermophilus*, *B.amyloliquefaciens* türlerinde çeşitli enzimlerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir (Zemek ve ark, 1981).

Ekstremofiller, normal olmayan çevre koşullarında canlılığını devam ettirebilen organizmalardır. Bu organizmalar, sadece bu olağandışı koşulları tolere etmez aynı zamanda yaşamak için bu koşullara ihtiyaç duyarlar. Bu organizmalar için yaşam koşulları, -12°C-100°C , pH 0-13.0, 1400 atm hidrostatik basınç ve doygun tuzluluktur. Doğal ortamların yanı sıra, seralar, buharla ısıtılan yapılar ve asit maden gölleri gibi insan yapımı ortamlar da bu organizmalar için yaşam ortamıdır (Satyanarayana ve ark, 2005).

Termofiller, genel olarak ılımlı termofiller (optimum üremesini 50-60°C), ekstrem termofiller (optimum üreme 60-80°C) ve hipertermofiller (optimum üreme 80-110°C) olarak sınıflandırılırlar. Ekstrem termofiller, *Bacillus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Thermus*, *Fervidobacterium*, *Rhodothermus*, *Thermotoga* ve *Aquifex* cinslerine dağılım göstermiştir. Yüksek sıcaklıklarda, bir kısmı polimerik substratlar olan çoğu reaksiyon bileşeninin çözünürlüğü önemli oranda artar. Kontaminasyon ve istenmeyen komplikasyon riskleri yüksek sıcaklıkla beraber azalır (Kumar ve ark, 2011).

Ekstrem pH'larda yaşayabilen mikroorganizmalara ait enzimler, yüksek asitlikte veya yüksek alkali ortam koşullarındaki reaksiyonlarda örneğin deterjan üretimi uygulamalarında kullanılabilirler. Bununla beraber, asidofilik ve alkalifilik mikroorganizmaların ilgi çekici bir başka özelliği başlangıçta nötral pH değerlerinde enzim üretebilmeleridir, dolayısıyla bu mikroorganizmalara ait enzimler ekstrem üreme koşullarına adapte olmaya ihtiyaç duymazlar. Termoalkalifiller ve alkalifiller, selülozlar, ksilanazlar, amilazlar, proteazlar, lipazlar, pektinazlar, kitinazlar, katalaz, peroksidaz ve oksidoredüktazlar gibi alkalifilik enzimlerin kaynağıdır (Horikoshi, 1999). Termoalkalifil enzimler yüksek pH ve sıcaklıkta aktivite gösterebilen enzimlerdir.

Alkalifilik bakteriler, alkali koşullarda üreyebilirler ve benzerleriyle kıyaslandığında zorlu koşullara uygun ve aktivitesi yüksek, farklı enzimler üretirler (Aygan ve ark, 2011). Asidofiller, pH 4.0'ün altında pH değerlerindeki asidik

ortamda üreyebilen organizmalardır. Bu canlı grubu, arkea, bakteria, fungi, alg ve protozoaları içeren bir çeşitliliğe sahiptir. Asidofillerden elde edilmiş çok sayıda(endoglukanazlar, β -glukanaz, α -glukanaz, proteazlar, amilazlar esterazlar...) enzim bildirilmiştir. Bazı termoasidofilik proteinler biyo-yakıt üretiminde potansiyel uygulamalara sahiptir. Termoasidofillerden elde edilen, düşük pH ve yüksek sıcaklıkta aktif olan enzimler, tekstil endüstrisi ve meyve suyu üretim prosesleri gibi uygulamalarda kullanım imkanına sahiptir. Termoasidofilik enzimler lignoselülozik biyomastan biyoetanol üretiminde ve polimer degradasyonunda kullanım alanı bulmuştur (Sharma ve ark, 2012).

Bu çalışma için, doğal kompost ve toprak örneklerinden izole edilen toplam 248 suştan, 28'i karakteristik *Bacillus sp.* görünümüne sahip ve CMCaz pozitifdir. Elde edilen suşlardan SC61 ve SC6 suşları komposttan, SC41 suşu ise topraktan izole edilmiştir. Organizmalar izolasyon aşamasından sonra enzim aktiviteleri değerlendirilmek üzere katı besiyerine ekilmiş ve buzdolabında stok olarak saklanmıştır.

Bacillus sp. SC61 suşu pH 4.0-7.0 ve 30-50°C aralığında üreme yeteneğine sahiptir. Suşun aynı pH ve sıcaklık aralığında CMC hidroliz yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Asidik pH değerlerinde ve 50°C'ye kadar artan sıcaklıklarda üreme yeteneğine sahip suşun 60°C'de üreme ve enzim sentezi yeteneği olmadığı belirlenmiştir. *Bacillus sp.* SC61'in pH 4.0'de 30°C'de 1.0 mm koloni çapı ve 4.0 mm zon çapı, 40°C'de 1.0 mm koloni çapı ve 4.0 mm zon çapı gösterdiği belirlenmiştir, bununla beraber suşun 50°C'de 23.0 mm koloni çapına sahipken 45.0 mm zon çapına sahip olduğu, net olarak 22.0 mm hidroliz zonu gösterdiği bulunmuştur.

Katı besiyerinde gerçekleştirilen bu üreme ve enzim üretimi değerlendirmelerinden elde edilen sonuçlar, *Bacillus sp.* SC61 suşunun asidik ve termofil karakterde olduğunu gösterir niteliktedir.

Selüloz enzimi üretimi için seçilen diğer bir suş olan *Bacillus sp.* SC6 suşu en iyi ürettiği ve enzim ürettiği pH ve sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacıyla pH 5.0-8.0 aralığında katı besiyerlerinde 30-60°C'de değerlendirilmiştir. Suşun pH 5.0'de hiçbir sıcaklık değerinde koloni ve zon çapına sahip olmadığı, pH 6.0'da

60°C’de üreme göstermediği belirlenmiştir. Bakterinin pH 6.0’da 50°C’de 40mm koloni çapı, 46 mm zon çapına sahip olduğu benzer şekilde pH 7.0’de 50°C’de 15mm koloni çapı ve 23.0 mm zon çapına sahip olduğu saptanmıştır. SC6 suşunun 60°C sıcaklık değerinde pH 7.0’de üreme ve enzim sentezleme yeteneğine sahip olmadığı belirlenmiştir.

CMC içeren katı besiyerinde yapılan bu çalışmaların sonuçlarına göre *Bacillus sp.* SC6 suşu nötral ve termofil karakterde bir suştur.

Katı besiyerinde üreme ve enzim üretiminin belirlenmesi için *Bacillus sp.* SC41 suşu pH 8.0-13.0 ve 30-60°C aralığında değerlendirilmiştir. Suş pH 13.0’de hiçbir sıcaklık değerinde üreme ve enzim sentezi gösterememiştir. Bakterinin 60°C’de pH 9.0- 11.0 aralığında üreme gösterdiği ancak enzim aktivitesi göstermediği bununla beraber, pH 8.0’de 1.0 mm koloni çapı ve 1.0 mm zon çapına sahip olduğu görülmüştür. Optimum üreme ve enzim üretiminin 50°C’de pH 10.0’da gerçekleştiği koloni çapının 5.0 mm aktivite zon çapının 12.0 mm olduğu saptanmıştır. SC41 suşunun pH 12.0’de 50°C’de 2.0mm koloni ve 5.0 mm zon çapına sahip olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bu değerler, *Bacillus sp.* SC41 suşunun termofil ve alkali karakterde bir bakteri olduğunu göstermektedir.

Optimum üreme ve enzim üretimi pH ve sıcaklıkları belirlenen suşlar, asidik (SC61), nötral (SC6) ve alkali (SC41) CMCaz enzimlerinin üretimi için kullanılmıştır. Üretilen enzimlerin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bacillus sp. SC61 suşu optimum üremesini pH 4.0’de ve 50°C’de göstermiştir. SC61 suşundan elde edilen enzimin optimum aktivite pH’sının pH 3.0 olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 2.0’de %89 relatif aktiviteye sahip olduğu ve tüm pH değerlerinde ortalama %91 oranında koruduğu bulunmuştur. Enzim aktivitesinin ekstrem asidik bir pH değeri olan pH 2.0’de %89 aktivite göstermesi, buna rağmen pH’nın nötrale yaklaşmasıyla aktivitenin %76’ya düşmesi SC61 CMCaz enziminin asidik karakterde olduğunu gösterir niteliktedir.

Rawat ve Tewari, *Bacillus subtilis strain* LFS3’den izole edilen selüloz enziminin optimum aktivite pH’sının pH 4.0 olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin pH

3.0-12.0 aralığındaki değerlerde aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. pH 3.0'te %85 relatif aktivite gösterdiği belirtilmektedir, araştırmacılar enzimin pH 2.0'deki aktivitesini ise belirtmemişlerdir (Rawat ve Tewari, 2012).

Devi D ve Hemashenpagam, *Aspergillus niger* ile yaptıkları bir çalışmada izole ettikleri selüloz enziminin karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada enzimin optimum aktivite değerinin pH 5.0 olduğunu belirtmişlerdir. pH değerinin düşmesiyle aktivitede belirgin düşüş olduğu da bildirilmiştir (Devi D ve Hemashenpagam, 2010).

Aspergillus fumigatus Z5'den izole edilen selüloz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değeri 5.0 olarak bulunmuştur, yapılan çalışmada pH değeri pH 3.0'ün altına indirilmemiş ve pH 3.0'de ise relatif aktivite değeri yaklaşık olarak %50'ye kadar düşmüştür (Liu ve ark, 2011).

Shu ve ark, 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada *Agaricus brasiliensis*'den endo- β -1,3-glukanaz enzimi izole etmiş ve optimum pH'sını 4.5 olarak belirlemişlerdir. pH'nın düşürülmesiyle aktivitede düşüş gözlenmiş, pH 3.0'de yaklaşık olarak %65, pH 3.5'da ise yaklaşık %80 aktivite belirlenmiştir. pH'nın alkaliye yaklaştırılmasıyla aktivitede düşüş olduğu bildirilmiştir.

Elde edilen bu literatür verileriyle kıyaslandığında optimum aktivitesini pH 3.0'de gösteren SC61 CMC az enzimi asidik karakterde bir enzim olmakla beraber farklı asidik pH değerlerinde yüksek aktivite gösterebilme yeteneğindedir.

SC61 enziminin optimum aktivitesini 60°C'de gösterdiği belirlenmiştir. Artan sıcaklığın enzim aktivitesinde düşüşe yol açtığı, 70°C'de aktivitesinin %85'ini koruduğu, 80°C'de %75 aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. 90 ve 100°C gibi bir çok enzimin aktivitesini koruyamadığı yüksek sıcaklıklarda ortalama %64 aktivite göstermiştir. Bunun yanında 30-50°C aralığında aktivitesini ortalama %73 koruduğu bulunmuştur.

Heidorne ve ark, 2006 yılında yaptıkları araştırmada, *Ceriporiopsis subvermispora*'dan elde ettikleri selüloz ve hemiselülozların karakterizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Optimum aktivitesini pH 4.0 ve 5.0'de gerçekleştiren enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklığın da 60°C olduğunu belirtmişlerdir.

Penicillium citrinum'dan elde edilen endoglukanaz enziminin optimum aktivitesini pH 5.5'da gösterdiği belirlenmiş, termofil karakterdeki enzimin, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin ise 60°C olduğu bildirilmiştir. Sıcaklığın 80°C'ye yükseltilmesiyle enzim aktivitesinin %30'un altına kadar düştüğü bulunmuştur (Dutta ve ark, 2008).

Mayende ve ark.(2006) yaptıkları çalışmada komposttan izole ettikleri ve 60°C'de optimum aktivite gösteren selüloz enzimini termofilik olarak tanımlamışlardır.

Yapılan araştırmalar sonucunda SC61 asidik CMCaz enziminin termofil karakterde bir enzim olduğu görülmektedir. Enzimin artan sıcaklıklarda aktivitesini koruyabilmesi ve 30°C gibi mezofil bir sıcaklık değerinde de yüksek aktiviteye sahip olması, farklı sıcaklık aralığındaki çok sayıda endüstriyel uygulamalarda ve aynı proseste değişken sıcaklık skalasına sahip uygulamalarda güvenle kullanılabileceğini de göstermektedir.

SC61 CMCaz enzimi 55°C'deki 24 saatlik inkübasyon sonunda pH 2.0'de %40, pH 3.0'de %38, pH 4.0'de %48, pH 5.0'de %36 ve pH 6.0'da %48 relatif kalan aktiviteye sahiptir. Enzimin asidik pH değerlerinde ve yüksek sıcaklıkta stabilitesini koruyabilmesi asidostabil karakterde olduğunu göstermekte bununla beraber pH 2.0-6.0 aralığında asidikten nötrale uzanan bir aralıkta oldukça stabil olduğunu da kanıtlamaktadır.

Bacillus subtilis strain LFS3'den elde edilen optimum aktivitesinin pH 4.0 ve 60°C'de gösteren asidotermofilik selüloz enziminin pH stabilitesinin belirlenebilmesi için enzim oda sıcaklığında 1 saat ön inkübasyona bırakılmıştır. Enzimin pH 3.0-8.0 aralığında, maksimum aktivitesinin %75'ini koruyabildiği bildirilmiştir. enzim en yüksek stabilitesini pH 4.0'de gösterirken pH7.0'ın üzerine çıkıldığı zaman stabilitede düşüş gözlenmektedir (Rawat ve Tewari, 2012).

Alicyclobacillus sp. A4'den elde edilen glukanaaz CelA4 enziminin pH stabilitesinin belirlenmesi için pH 1.2 – 12.0 aralığında 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda enzimin, pH 1.8- 6.6 aralığında %80'in üzerinde stabilitesini koruduğu bildirilmiştir (Bai ve ark, 2010).

Li ve ark'nın 2006 yılındaki çalışmalarında *Bacillus sp.* AC-1 suşundan Ba-EGA enzimi izole edilmiştir. Asidik karakterdeki bu enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi için, 30°C'de 2 saat ön inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Enzimin pH 2.0'de ve 12.0'deki ön inkübasyonu sonunda aktivitesini tamamen kaybettiği belirtilmiştir. Enzimin, pH 4.0'de %40, pH 6.0'da yaklaşık %80 kalan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. pH 7.0-10.0 aralığında ise aktivitesini %90'ın üzerinde koruduğu belirtilmiştir.

Yapılan çalışmalarla kıyaslandığında SC61 CMCaz enziminin asidik ortamda oldukça stabil olduğu görülmektedir. 55°C'de 24 saatlik inkübasyon asidik karakterdeki selüloz enzimlerinin pH stabilitelerinde daha önce denenmemiş bir sıcaklık değeri ve inkübasyon süresidir. SC61 CMCaz enziminin 24 saat süreyle özellikle asidik pH değerlerinde stabil kalması enzimin uzun süreli proseslerde kullanılabilir bir özellikte olduğunu gösterir özellik taşımaktadır.

Termofil karakterdeki CMCaz enzimi substrat bulunmayan ortamda sıcaklık ön işlemine tabi tutulmuştur. 30 ve 40°C'de aktivitesini hiç kaybetmezken sıcaklığın 50°C'ye yükselmesiyle aktivitenin %79'a kadar düştüğü gözlenmiştir. Bununla birlikte enzimin optimum aktivite sıcaklık değeri de olan 60°C ve 70°C'ye yükselen sıcaklıklarda %80 aktivitesini korumaya devam etmiş, 80, 90 ve 100°C'de ortalama kalan aktivite değerinin %71 olduğu görülmüştür.

Aspergillus awamori VTCC-F099'den elde edilen endoglukanaz enziminin 40°C'ye kadar stabil olduğu, bunun yanında 30-40°C'de 36 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesinin %80'ini koruduğu bildirilmiştir (Nguyen ve Quyen, 2010).

El-Zawahry ve ark, (2010) *Trichoderma sp.* ile yaptıkları çalışmada iki farklı CMCaz enzimi (I ve II) izole etmişlerdir. Optimum pH'sı 5.0 olarak belirlenen bu enzimlerin 50°C'de 60 dakikalık ön inkünasyon sonunda aktivitelerini tamamen korudukları bildirilmiştir. Sıcaklığın 70°C'ye çıkarılmasıyla 90 dakikalık inkübasyon sonunda CMCaz I enziminin aktivitesi %14, CMCaz II enziminin aktivitesi ise %26.5'e düşmüştür.

Elde edilen veriler lüteratür verileriyle kıyaslandığında SC61 enziminin termostabil bir enzim olduğu görülmektedir.

SC61 CMCaz enzimi NaCl'ün değişik konsantrasyonlarında ön inkübasyona tabi tutulmuş ve relatif aktivitesi değerlendirilmiştir. %3-%20 NaCl konsantrasyonunda ortalama yaklaşık %90 aktivite göstermiştir. Artan NaCl konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerinde belirgin bir artış ya da inhibisyona neden olmadığı belirlenmiştir.

Trichoderma sp.'den elde edilen, CMCase I enziminin NaCl varlığında enzim aktivitesi yaklaşık %80'e düştüğü, CMCase II enziminin ise aktivitesini koruduğu bildirilmiştir (El-Zawahry ve ark, 2010).

Li ve ark (2012), halofilik özellikteki *Thalassobacillus* suşuyla yaptıkları çalışmada organik- solvent tolerant selülaz enzimini izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Optimum aktivitesini 60°C'de gösteren enzimin optimum aktivitesinin %10 NaCl varlığında gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Elde edilen enzim %3-20 NaCl konsantrasyonu ile ön işleme tabi tutulmuştur. 24 saatlik inkübasyon sonunda %5-%17,5 NaCl konsantrasyonu aralığında enzim aktivitesinin %80'ini koruduğu belirlenmiştir. %3 ve %20 konsantrasyonda aktivitenin %80'in altında olduğu bildirilmiştir.

NaCl ile ön işleme tutulan SC61 CMCaz enziminin, kalan relatif aktivitesinin %80-%96 aralığında olması halostabil bir enzim olduğunu gösterir niteliktedir.

SC61 asidik CMCaz enzimi phenonthrolin (%31), üre (%30), Triton X-100 (%36), SDS (%45) ve EDTA (%48) ile önemli oranda inhibe olmuştur. Sodyum sülfat (%89) ile aktivitesinin büyük kısmını korumuştur. MgCl₂ ve CaCl₂ ile %31 ve %32 inhibe olurken MnCl₂ aktivitesini önemli oranda (%111) artırmıştır. β-merkaptoetanolün enzim aktivitesini %9 indüklediği belirlenmiştir. Tween 20 ve Tween 80'in enzim aktivitesini %30 ve %31 oranında inhibe ettiği bulunmuştur.

Farklı araştırmacılar izole ettikleri enzimler üzerine EDTA'nın etkisini araştırmışlardır. EDTA şelatör ajan olarak metalloenzimlerin metal kısımlarına bağlanarak enzimlerde inaktivasyona neden olur (Dutta ve ark, 2008). Dutta ve ark (2008) *Penicillium citrinum*'dan selülaz enzimi izolasyon ve karakterizasyonu yapmışlardır. Enzimin EDTA varlığında aktivitesinin hiç etkilenmediği bunun enzimin yapısında metal bulunmamasından kaynaklandığı bildirilmiştir. SC61 enzimi EDTA ile %52 inhibe olmuştur. Bu durum enzimin metalloenzim yapısından

kaynaklanmaktadır. *Bacillus sp.* A8-8 'den elde edilen termostabil β -1,3-1,4 glukanaaz enzimi 10mM EDTA ile SC61 CMCaz enzimine benzer şekilde %52 oranında inhibe olarak %48 relatif aktivite göstermiştir (Jung ve ark., 2007).

1,10 phenanthrolinin SC61 asidik enzimini %69 oranında inhibe ederek aktivitesini %31'e kadar düşürmesi enzimin metalloenzim yapısında olduğunu desteklemektedir. Felber ve ark yaptıkları bir çalışmada 1,10 phenanthrolinin metalloenzim yapısındaki enzimlerin aktivitelerini, enzimde metalin bağlanacağı bölgeye bağlanarak veya enzime bağlanması beklenen metal iyonu ile bağ yaparak inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Felber ve ark, 1962).

Kiran ve Chandra'nın (2008) *Bacillus sp.*'den elde ettikleri TSCVKK enzimi 8M üre ile denatüre olmuştur. Benzer şekilde SC61 CMCaz enzimi 8M üre varlığında aktivitesini %70 kaybetmiştir. Bu durum enzimin aktif bölgesinde hidrofobik aminoasitlerin bulunmasından kaynaklanıyor olabilir (Kiran ve Chandra, 2008).

SC61 CMCaz enziminin aktivitesi PMSF ile tamamen inhibe olmuştur. Katel ve ark, (2006) PMSF'nin serin yapıları ve metalloenzimler için inhibitör özellik taşıdığını bildirmişlerdir. Buna göre SC61 CMCaz enzimi aktif bölgesinde serin rezidüsü taşıyor olabilir. Bu sonuç enzimin metalloenzim olduğunu da desteklemektedir.

Dutta ve ark., 2008 yılında yaptıkları çalışmada ortamda β -merkaptotanol varlığında enzim aktivitesinde artış olmasının enzimde sistein rezidüleri bulunabileceğinin kanıtı olduğunu bildirmişlerdir. SC61 enzimi β -merkaptotanol ile %9 oranında indüklenerek %109 relatif aktivite göstermiştir.

SC61 CMCaz enziminin moleküler ağırlığının 88kDa olduğu belirlenmiştir. Kim ve ark., 2005 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus sp.* HSH-810 suşundan izole ettikleri selülaz enziminin moleküler ağırlığını SDS-PAGE yöntemiyle 80 kDa olarak belirlemişlerdir. Bu değer SC61 CMCaz emzimin moleküler ağırlığının literatürle benzer olduğunu göstermektedir.

SC61 CMCaz enziminin CMCazı hidrolizi sonucu açığa çıkan son ürünlerin belirlenmesi amacıyla, SC61 CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinde hazırlanmış substrat (pH 3.0 CMCaz) optimum aktivitenin gerçekleştiği

sıcaklık değerinde (60°C) 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi uygulaması sonunda enzimin hidrolizi sonucu açığa çıkan son ürünün maltoz olduğu belirlenmiştir.

SC61 enzimi için elde edilen sonuçlar ve literatürdeki benzer çalışmalara ait değerler incelendiğinde SC61 CMC az enzimi; optimum aktivitesini pH 4.0'de göstermesi nedeniyle asidik, optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 60°C olması nedeniyle termofil, 30-100°C aralığında ortalama %82 relatif aktiviteye sahip olmasıyla termostabil, %3-%20 NaCl konsantrasyonlarında ortalama %90 relatif aktivite göstermesiyle de halostabil karakterde bir enzimdir. Enzimin, optimum aktivite sıcaklığı ve pH'sında CMC'yi hidrolizi sonucu açığa çıkan son ürünü maltozdur.

SC6 CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin pH 6.0 olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber enzimin pH 4.0'de %95 aktiviteye sahip olduğu ve benzer şekilde pH 8.0'deki aktivitesinin %93 olduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 4.0-8.0 aralığında ortalama %96 aktivite gösterdiği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara bakıldığında enzimin asidikten alkaliye uzanan bir pH aralığında yüksek oranda relatif aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Literatür verilerine bakıldığında: Asha ve ark (2012), *Paenibacillus barcinonensis* ile yaptıkları çalışmada termofilik selüloz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 6.0 olduğunu belirlemişlerdir. pH'nın asidiğe yaklaşmasıyla enzim aktivitesinde %50'den fazla bir düşüş olduğu görülmektedir. Benzer şekilde alkali pH'ya yaklaşıldıkça da enzim aktivitesinde düşüş görülmektedir.

2009 yılında yapılan bir çalışmada, *Brevibacillus* sp. strain JXL'den selüloz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimin optimum pH'sının belirlenmesi için pH 5.0-10.0 arasındaki değerler seçilmiş, en yüksek aktivitenin 6.0-8.0 aralığında bir birine çok yakın değerlerle elde edildiği bildirilmiştir. Enzime ait sonraki çalışmalar için ise pH 8.0 seçilerek optimum aktivite pH sı olarak bu değer belirlenmiştir (Liang ve ark, 2009).

Gupta ve ark, 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada *Anabaena laxa*'dan elde ettikleri iki antifungal endoglukanaz enzimin karakterizasyonunu gerçekleştirmiş ve optimum aktivite gösterdikleri pH değerinin 6.0 olduğunu belirlemişlerdir.

SC6 enziminin optimum aktivite pH sı olan pH 6.0 literatürdeki bir çok enzimle benzerlik göstermekte, ancak geniş bir pH aralığında yüksek aktiviteye sahip olması nedeniyle bu enzimlerden ayrılmaktadır.

SC6 CMCaz enzimi optimum aktivitesini 70°C'de göstermiştir. 50-80°C aralığındaki sıcaklıklarda aktivitesini maksimum %2 oranında kayıp etmiş, belirtilen sıcaklıklarda ortalama yaklaşık %99 aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Termofilik ve selülitik *Brevibacillus sp.* strain JXL suşundan elde edilen selülaz enziminin optimum aktivitesini 50°C'de gösterdiği bildirilmiştir (Liang ve ark., 2009). Asha ve ark, 2012 yılında yaptıkları çalışmada *Paenibacillus barcinonensis*'den izole ettikleri optimum aktivite pH'sını 6.0 olarak belirledikleri selülaz enziminin optimum aktivite gösterdiği sıcaklığın 65°C olduğunu belirlemişler ve enzimi termofilik bir enzim olarak tanımlamışlardır.

Literatür verilerinde az sayıda olsa da benzer optimum sıcaklık koşullarını sağlayan selülaz enzimleri bulunmaktadır. Tekstil proseslerinde kullanılmak üzere, *Melanocarpus albomyces*'den nötral pH'da aktivite gösteren 3 selülaz enzimi izole edilmiştir. Moleküler ağırlıklarına göre 20 kDa endoglukanaz, 50 kDa endoglukanaz ve 50 kDa sellobiyohidrolaz olarak sınıflandırılan enzimlerinden 20 ve 50 kDa'luk endoglukanaz enzimlerinin optimum aktivite sıcaklıkları sırasıyla 70°C ve 65-70°C aralığında olduğu bildirilmiştir (Miettinen-Oinonen ve ark, 2004).

Yapılan deneylerden elde edilen sonuçlara bakıldığında ve literatür verileriyle kıyaslandığında SC6 selülaz enziminin termofilik karakterde bir enzim olduğu görülmektedir.

SC6 CMCaz enziminin pH stabilitesi 55°C'de 24 saat ön inkübasyona bırakılmasıyla belirlenmiştir. Enzim, optimum aktivitesini gösterdiği pH 6.0'da aktivitesini hiç kaybetmemiştir. Enzimin pH 4.0'de %92 stabil kaldığı ve pH 5.0'de ise aktivitesini tamamen koruduğu belirlenmiştir. Enzimin pH 7.0 ve pH 8.0'de ortalama %85 stabil kaldığı bulunmuştur.

Liu ve ark, 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada *Bacillus* izolatlarından elde edilen β -glukanaz enziminin 30°C’de 30 dakika inkübasyon sonrasında pH 5.0-9.0 aralığında stabil olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin pH 4.0 ve 10.0’de aktivitesinin yaklaşık %90’ını kaybettiği belirtilmiştir.

Kim ve ark, (2009) *Bacillus subtilis subsp. subtilis* A-53 suşundan izole ettikleri CMCaz enziminin 50°C’de 12 saat inkübasyon sonunda ve pH 6.5-8.0 aralığında optimal aktivitesinin %40’dan fazlasını koruduğunu bildirmişlerdir.

Apiraksakorn ve ark, 2008 yılında *Bacillus subtilis* GN156 suşundan izole edilen J1 ve pJ2 enzimlerinin pH stabilitelerini 4°C’de 2 saat sonunda belirlemişlerdir. Optimum aktivitesini pH 6.0’da gösteren J1 enziminin, en yüksek stabilitesini pH 7.0 ve 8.0’de gösterdiği, pJ2 enziminin ise pH 6.0-8.0 aralığında stabilitesini %50’nin üzerinde koruduğu bildirilmiştir.

Mawadza ve ark’nın 2000 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus* suşlarından selüloz izolasyonu ve karakterizasyonu yapmışlardır. Optimum aktivitesini pH 6.5’de gösteren HR68 ve CH43 enzimlerinin pH stabiliteleri 50°C’de 1 saat inkübe edildikten sonra, pH 9.0’da %50 stabil olduğu ancak pH 11.0’de ve 4.0’de aktivitesinin tamamen kaybettiği bildirilmiştir.

Literatür verileri göz önünde bulundurulduğunda SC6 CMCaz enziminin geniş bir pH aralığında 55°C’de stabilitesini koruyabildiği, bu nedenle yüksek sıcaklık ve değişen pH değerlerinin bulunduğu endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir özellik taşıdığı görülmektedir. SC6 CMCaz enzimi pH stabil bir enzimdir.

SC6 enziminin termal stabilitesine ait sonuçlara bakıldığında tüm sıcaklıklarda enzim aktivitesinde 1 saat sonunda aktivitedeki en yüksek düşüş %5’dir. Maksimal aktivite kaybının 90°C’de olduğu görülmektedir. 50-90°C aralığındaki aktivitesi ortalama %97’dir. Termofil bir sıcaklık aralığı olan bu değerlerde ortalama %3 aktivite kaybı olduğu görülmüştür. Bu değerler enzimin yüksek ve geniş bir sıcaklık aralığında, uzun bekleme sürelerini içeren proseslerde kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Aspergillus fumigatus Z5 suşundan selüloz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen selüloz enziminin optimum

aktivitesinin pH 5.0'de ve 50°C'de gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Enzimin 40-60°C aralığında 20 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini %80'in üzerinde koruduğu bildirilmiştir. Bununla beraber enzimin 80 ve 90°C'lerde aktivitesinin %10'a düştüğü belirlenmiştir (Liu ve ark, 2011).

Yang ve ark, (2010)'nın yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* I15 'den elde ettikleri selülaz enziminin 65°C'de 2 saatlik inkübasyon sonunda aktivitesini %90 koruduğu bildirilmiştir.

Hakamada ve ark, 1997 yılında yaptıkları çalışmada termostabil alkalın selülaz enzimi izole etmişlerdir. Termal stabilitenin değerlendirilmesi için enzim, çeşitli sıcaklıklarda CaCl₂ ilave edilerek ve edilmeden 10 dakika inkübe edilmiştir. Enzimin CaCl₂ bulunmayan ortamda 45°C'ye kadar stabil olduğu ancak bu değer in üzerine çıkıldığında aktivitede düşüş olduğu belirtilmiştir. 5 mM CaCl₂ bulunan ortamda stabilitenin yükseldiği, 65°C'de bir artış gösterdiği görülmüştür. CaCl₂ varlığında 100°C'de 10 dakikalık inkübasyon sonunda %30 stabilitesini korduğu bildirilmiştir.

Jung ve ark'nın 2007 yılında *Bacillus sp.* A8-8 suşundan izole ettikleri optimum pH'sı 6.0 ve optimum sıcaklığı 60°C olan, termostabil β -1,3-1,4 glukanaz enziminin 80°C'de 2 saatlik ön inkübasyon sonunda aktivitesini %80 oranında koruduğu bildirilmiştir.

Enzimin sahip olduğu termal stabilite özellikleri ve literatür verileri değerlendirildiğinde SC6 CMCaz enziminin termostabil karakterde bir enzim olduğu görülmektedir.

SC6 CMCaz enziminin %3-%20 NaCl konsantrasyonlarında ortalama %112 kalan aktivite göstermiş olduğu görülmektedir. Enzimin tüm NaCl konsantrasyonlarında indüklenerek yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur. Aktivitesi %10 NaCl konsantrasyonuna kadar artış göstermiş, %15-20 NaCl konsantrasyonlarında aktivitenin artan konsantrasyondan önemli oranda etkilenmediği belirlenmiştir.

Salinivibrio sp. NTU-05 suşundan elde edilen halostabil selülaz enzimi NaCl bulunmayan ortamda %90 aktivite gösterirken optimal aktivitesini %5 NaCl konsantrasyonunda göstermektedir. NaCl konsantrasyonun %15-25 olmasıyla

aktivitede düşüş gözlenirken %25 NaCl varlığında 4 saat sonunda aktivitenin %24 olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark, 2009).

SC6 nötral CMCaz enzimi pehanonthrolin (%44), sodyum sülfid (%89), EDTA (%99), $MnCl_2$ (%126), $CaCl_2$ (%54), $ZnCl_2$ (%36), β -merkaptotanol (%77) Tween 20 (%104) ile yüksek oranda indüklenmiştir. Enzimin $MgCl_2$ (%100), PMSF (%96) Tween 80(%101) ile önemli düzeyde etkilenmediği belirlenmiştir. Üre ile %28 inhibe olurken triton x-100 ile de %31 inhibe olmuştur.

SC6 nötral CMCaz enzimi β -merkaptotanol ile %77 indüklenerek %177 relatif aktivite göstermiştir. β -merkaptotanol gibi ajanların ortamdaki varlığında aktivitenin yüksek oranda artması, sülfidril gruplarının oksidasyonunun engelleniyor olmasıyla açıklanabilir. Enzim aktivitesinin bu disülfid bağları (disülfide-reducing) indirgeyici ajanlarla stimüle olması enzimin katalitik bölgesinin yapısında sistein rezidülerinin bulunabileceğine işaret eder (Damaso ve ark, 2002; Dutta ve ark, 2008).

Sıddıqı ve ark,1997 yılında *Aspergillus niger* ve *Cellulomonas biazotea* ‘ya ait saflaştırılmış CMCaz enzimi aktivitesine Mn^{+2} iyonlarının değişen konsantrasyonlarındaki etkisini belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, düşük konsantrasyonda Mn^{+2} varlığında enzim aktivitesinde artış gözlemlendiğini ancak, Mn^{+2} konsantrasyonundaki artışın enzim aktivitesinde düşüşe yol açtığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu durumun Manganın substrat ve enzime ait karboksil grupları arasında köprü kurarak bağlanmalarını sağlamasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar mangan iyonlarının enzimin aktif bölgesi dışında bir bölgeye bağlandığını daha sonra enzim-substrat etkileşimi sırasında aktif bölgeye hareket ettiğini, artan Mn^{+2} konsantrasyonun bir enzime birden fazla Mn^{+2} bağlanmasına yol açtığı için aktivitede düşüşe neden olduğunu belirtmişlerdir. SC6 CMC az enziminin 5mM konsantrasyonda $MnCl_2$ varlığında aktivitesinin indüklenmesi literatürdeki bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Paenibacillus barcinonensis’den saflaştırılan termofilik selüloz enziminin Triton x-100 ve Tween-20 gibi noniyonik deterjanlar ve SDS gibi iyonik deterjan varlığında enzim aktivitesi artırmıştır. Benzer şekilde SC6 CMCaz enziminin aktivitesi Tween 20 varlığında indüklenerek %204 aktivite göstermiştir. Enzimin Tween 80 varlığında aktivitesinde değişiklik olmadığı (%101) belirlenmiştir. Triton

x-100 ise enzim aktivitesini %31 inhibe etmiştir. Genellikle, noniyonik surfaktanlar, hidroliz sırasında substrata ait yüzey özelliklerini değiştirerek selülozın geri dönüşümsüz inaktivasyonunu minimuma indirir (Asha ve ark, 2012).

Castanon ve Wilke gazete kağıtlarının enzimatik hidrolizi için surfaktan olarak Tween 80 kullanıldığı zaman aktivite hızının %33 arttığını bildirmişlerdir(Castanon ve Wilke, 1981).

1997 yılında yapılan bir çalışmada Ca^{+2} 'un KSM S237 enzimini 45-65°C aralığında termal inaktivasyondan koruduğu bu sıcaklığın üzerinde etkisini kaybettiği bildirilmiştir (Hakamada ve ark, 1997). SC6 nötral CMCaz enzimi, $CaCl_2$ ile %54, $ZnCl_2$ ile %36 indüklenmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında, *Bacillus* sp. C-14'den elde edilen endoglukanaz ile yapılan çalışmalarda Ca^{+2} (%132), Na^{+1} ve Zn^{+2} (%77) gibi metal iyonlarının enzimi termal stabiliteye karşı koruduğu ve enzimin yüksek sıcaklıklarda aktif yapısını korumasını sağladığı belirtilmektedir (Donagy&McKay, 1993; Aygan ve Arıkan, 2008).

SC6 CMCaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE zimogram analizinde 121 kDa'luk tek bir aktivite bandı şeklinde belirlenmiştir.

Aspergillus niger Z10 suşundan elde edilen CMCaz enziminin moleküler ağırlığı benzer bir metod uygulanarak 83 ve 50 kDa'luk iki aktivite bandı şeklinde belirlenmiştir (Coral ve ark, 2002).

Bacillus subtilis subsp. *subtilis* A-53 suşundan elde edilmiş olan optimum pH'sı 6.5 ve optimum sıcaklığı 50°C olarak belirlenen CMCaz enziminin moleküler ağırlığı SDS-PAGE ile 56 kDa olarak belirlenmiştir (Kim ve ark, 2009).

SC6 CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'da hazırlanmış substratla optimum aktivite sıcaklığında 24 saatlik inkübasyonu sonucunda açığa çıkan son ürünün maltotrioz olduğu belirlenmiştir.

SC6 CMCaz enzimi optimum aktivitesini pH 6.0'da göstermesi nedeniyle nötral, 70°C'de optimum aktiviteye sahip olmasıyla termofil, 50-80°C aralığında ortalama %99 aktivite göstermesi nedeniyle termostabil, NaCl'ün artan konsantrasyonlarıyla aktivitede artış gözlenmesi ve bu artışla aktivitenin indüklenerek %115 (%20 NaCl konsantrasyonu)'e kadar yükselmesi nedeniyle halofil-halostabil bir enzim özelliğindedir.

SC41 CMCaz enziminin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin pH 12.0 olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber enzimin pH 9.0'daki relatif aktivite değeri %92, benzer şekilde pH 13.0'deki relatif aktivite değeri %92'dir. Tüm pH değerlerindeki ortalama relatif aktivite değerinin yaklaşık olarak %94 olduğu bulunmuştur. SC41 enzimi alkali karakterde bir enzimdir.

Li ve ark 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada halofilik karakterdeki *Thalassobacillus* suşundan organik solvent tolerant selüloz enzimi izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 8.0 olduğunu belirlemişler ve bu enzimi alkalik selüloz olarak tanımlamışlardır.

2010 yılında yapılan bir çalışmada, termofilik *Actinomyces*'den termoaktif selüloz izolasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları yapılmış optimum pH'sı 8.0 olarak belirlenen enzimin alkali bir selüloz enzimi olduğu belirtilmiştir (Aboul-Enein ve ark, 2010).

Endo ve ark 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada alkalifilik bir *Bacillus* izolatından endoglukanaz enzimi izole etmişlerdir. Elde edilen enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerini pH 10.0 olarak belirlemişlerdir.

Kumar ve ark, 2011 yılında ekstreozimler üzerine yaptıkları bir çalışmada, farklı araştırmacıların pH 9.0'dan yüksek değerlerde optimal aktivite gösteren enzimleri alkalifiller olarak tanımladıklarını ve bu enzimlere başlıca örnek olarak proteaz ve selülozların verildiğini anlatmışlardır (Kumar ve ark., 2011; Van den Burg, 2003).

Alkalik özellikteki SC41 CMCaz enzimi optimum aktivitesini 70°C'de göstermiştir. Elde edilen relatif aktivite değerlerine bakıldığında enzimin 80-90 ve 100°C'lerde sıcaklık artışından neredeyse hiç etkilenmeyerek ortalama %93 aktivite gösterdiği görülmektedir. Değişen sıcaklık değerlerinde sahip olduğu yüksek relatif aktivite enzimin hem yüksek sıcaklık değerlerinde güvenle kullanılabileceğini hem de geniş bir sıcaklık yelpazesinde aktivitesini koruyabileceğini kanıtlar niteliktedir.

Endo ve ark'nın 2001 yılında *Bacillus*'dan elde etmiş oldukları optimum aktivitesini pH 10.0'da gösteren alkali selüloz enziminin optimum aktiviteye sahip olduğu sıcaklık değerinin 55°C olduğu bildirilmiştir. Enzimin 55°C'den sonra

aktivitesinde keskin bir düşüş görülmekte ve 60°C'nin üzerine çıkıldığında ise enzimin aktivitesini tamamen kaybettiği anlaşılmaktadır.

Mayende ve ark (2006), komposttan izole edilen *Bacillus spp.* suşlarının selüloz ve polifenol oksidaz aktivitelerini değerlendirmişlerdir. İzolasyonu ve karakterizasyonları yapılan selüloz enzimlerinden LM01 ve LM04 optimum aktivitesini 60°C'de göstermiştir. LM02 ve LM03'e ait selüloz enzimleri optimum aktivitesini 70°C'de gösterirken, LM03 enziminin 80°C'de yüksek aktiviteye sahip olduğu belirtilmiş, bu özelliği nedeniyle ekstrem termofilik bir enzim olarak tanımlanmıştır.

Caldibacillus cellulovorans gen. nov., sp. nov. 'den CMCaz enziminin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. Elde edilen CMCaz enziminin optimum aktivitesini 80°C'de gösterdiği bildirilmiştir. Artan sıcaklıkla beraber enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. 90°C'deki aktivitesinin %20, 100°C'de ise %10'a kadar düştüğü bildirilmiştir (Huang ve Monk, 2004).

SC41 CMCaz enziminin pH 9.0-12.0 aralığında, oda sıcaklığında %86 stabil olduğu belirlenmiştir.

Aygan ve Arıkan (2008), *Bacillus sp.* C14 suşundan izole ettikleri alkali karakterdeki endoglukanaz enziminin pH 6-12 aralığında stabilitesini yaklaşık %65 koruduğunu, artan pH değerinin stabilitede önemli bir değişikliğe yol açmadığını belirlemişlerdir.

Marinobacter sp. MSI032 suşundan elde edilen alkalın selüloz enziminin 4°C'deki 1 saatlik inkübasyonu sonunda, en yüksek stabiliteyi pH 9.0-10.0 aralığında gösterdiğini ve pH 11.0-12.0 aralığında aktivitesini %80'den fazla koruduğu belirlenmiştir. pH'nın aside doğru yönelmesi halinde ise stabilitede önemli düşüşler olduğu (Örn: pH 4.0'de %60) bildirilmiştir (Shanmughapriya ve ark., 2010).

Li ve ark, (2012) *Thalassobacillus*'dan izolasyonunu gerçekleştirdikleri solvent tolerant alkalın selüloz enziminin, çeşitli pH değerlerinde 30°C'de 24 saat ön inkübasyonu sonunda pH 7.0-10.0 aralığında aktivitesini kaybetmediğini, pH 11.0'de ise aktivitenin %70'e kadar düştüğünü bildirmişlerdir.

SC41 CMCaz enzimi için elde ettiğimiz değerler, literatür verileriyle kıyaslandığında SC41 enziminin pH stabilitesinin diğer selüloz enzimleriyle önemli

oaranda benzerlik gösterdiği görülmektedir. SC41 enzimi pH 9.0-12.0 aralığında ortalama %86 stabilitesiyle alkali-stabil bir enzim özelliği taşımaktadır.

SC41 CMCaz enzimi 30-100°C’de ortalama %87 stabiliteye sahiptir. enzim en yüksek stabiliteyi optimum sıcaklığı olan 70°C’de göstermiştir. Bunun yanı sıra, 100°C’de %84 stabil kalması çoğu selüloz enziminde bulunmayan bir özelliktir.

Cryptococcus sp. S-2’den elde edilen termostabil CMCaz enziminin optimum aktivitesini 40-50°C’de gösterdiği belirtilmiştir. Enzimin 90°C’de 1 saat sonunda aktivitesini yaklaşık olarak %60 koruduğu, 50°C’de 3 saate kadar stabilitesini koruduğu, 60-70 ve 80°C’lerde ise aktivitenin ikinci saatin sonunda düşüşe geçtiği bildirilmiştir (Thongekkaew ve ark, 2008).

Aygan ve Arıkan 2008 yılındaki çalışmalarında, *Bacillus sp. C14* suşundan izole edilen halo-alkalofil karakterdeki endoglukanaz enziminin termal stabilitesini belirlemek amacıyla değişen sıcaklıklarda 15, 30 ve 60 dakikalık ön inkübasyon gerçekleştirmişlerdir. Enzimin, 60°C’ye kadarki sıcaklıklarda 15 dakikalık ön inkübasyon süresi sonunda aktivitesini yaklaşık %90 koruduğu belirtilmiştir. İnkübasyon süresinin uzatılmasıyla enzimin aktivitesinde de düşüş gözlenmiştir. Bununla beraber, 70°C’de 15 dakikalık inkübasyonda yaklaşık %70, 30 dakikalık inkübasyonda yaklaşık %60 ve 1 saatlik inkübasyon sonunda %10 aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Enzimin 80°C’de 1 saatlik inkübasyon sonunda %10 aktivite gösterdiği, 90°C’de ise 1 saat sonunda aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir.

Apiraksakorn ve ark 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada *Bacillus subtilis* GN156 suşundan β -1,3-1,4-D-glukanaz enzimlerinin izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. J1 ve pJ2 enzimlerinin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerinin 60°C olduğu bildirilmiştir. Enzimlerin termal stabilitesi 20-70°C aralığında 30 dakikalık ön inkübasyonla değerlendirildiğinde, J1 enziminin 30-50°C aralığında yaklaşık %50 stabilite gösterdiği, artan sıcaklıkla stabilitenin azaldığı 60-70°C’lerde %40’a düştüğü bildirilmiştir. pJ2 enziminin ise, 20-40°C aralığında yaklaşık %20 stabil olduğu, 50°C’de oldukça zayıf aktivite gösterirken 60 ve 70°C’lerde aktivitesini tamamen kaybettiği bildirilmiştir.

SC41 enziminin sıcaklık stabilitesine ait değerler göz önünde bulundurulduğunda alkali ve termofil karakterdeki enzimin termostabil özellikte olduğu görülmektedir.

SC41 CMCaz enzimi NaCl varlığında indüklenen bir enzimdir. Artan NaCl konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerinde önemli bir değişiklik yaratmadığı belirlenmiştir. %3-%25 NaCl konsantrasyonları aralığında %105-%111 arasında aktivite gösterebilen CMCaz enzimi halofil-halostabil bir enzimdir.

Aygan ve ark (2011), *Bacillus licheniformis* C108 suşundan elde ettikleri enzimi termofil ve halofil endoglukanaz olarak tanımlamışlardır. Enzimin %3-%5 NaCl konsantrasyonunda yaklaşık %80 kalan aktiviteye sahip olduğu, %7 NaCl konsantrasyonundan etkilenmediği ve %10 konsantrasyonda az miktarda indüklendiği maksimum aktivitenin %106,4 ile bu konsantrasyonda gerçekleştiği bildirilmiştir. NaCl konsantrasyonunun yükseltilmesiyle enzim aktivitesinde tekrar düşüş gözlemlendiği belirtilmiştir (Aygan ve Ark, 2011).

Enzimin 1,10 phenanthroline ile %95 oranında inhibe olması enzimin aktif bölgesinde metal iyonu içeren bir metalloenzim olduğunu göstermektedir. Enzimin bir şelatör ajan olan EDTA ile %35 oranında inhibe olması da bu sonucu destekler niteliktedir (Dutta ve ark, 2008).

SC41 CMCaz enzimi, Tween 20 ile %5, Tween 80 ile %40 ve Triton x-100 ile %43 indüklenmiştir. Li ve ark., *Bacillus sp.* AC-1'den izole edilen *Ba*-EGA enziminin Tween 20 ile %24 ve Triton X-100 ile %27 oranında indüklendiğini bildirmişlerdir. Selülozun hidrolizi temel olarak 3 aşamadan meydana gelir selülaz enzimlerinin selüloz yüzeyine tutunması (adsorbsiyon), selülozun fermente edilebilir şekerlere dönüştürülmesi, selülaz enziminin serbest kalması (desorbsiyon). Bu bağlanmaların bir kısmı geri dönüşümsüz gerçekleşir ve reaksiyon süresince aktivitede düşüşe neden olur. Tween 20, Tween 80 ve Triton x-100 gibi non iyonik surfaktanların enzimi aktive etmeleri, hidroliz boyunca selülozun yüzey yapısında bir dereceye kadar değişikliğe yol açmaları ve bu sayede geri dönüşümsüz bağlanmaları en aza indirmesi olabilir (Li ve ark, 2006).

Kim ve ark, noniyonik sürfaktanların gazete kağıtlarının geridönüşüm hidrolizleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında Tween 20 ve Tween 80'in

etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada Tween 80'in Tween 20'ye göre %7 daha yüksek hidrolize yol açtığı bildirilmiştir (Kim ve ark, 2007).

SC41 alkali CMCaz enzimi PMSF ile %31 oranında inhibe olmuş ve %69 relatif aktivite göstermiştir. C-14 endoglukanaz enzimi 5mM PMSF ile %57 inhibe olmuştur. 1-2 mM PMSF ile neredeyse tamamen inhibe olan enzimlerin aktif bölgelerinde serin rezidüsü ya da thiol bulundurdıkları bildirilmiştir (Kamburova ve ark, 2003; Aygan ve Arıkan, 2008).

SC41 CMCaz enziminin moleküler ağırlığı 76.1 kDa olarak hesaplanmıştır. Literatür verilerine bakıldığında selüloz enzimlerinin molekül ağırlıklarının çok geniş aralıklarda olduğu belirlenmiştir. *Bacillus subtilis* LFS3 suşundan elde edilen asidotermofilik selüloz enziminin moleküler ağırlığı 185 kDa olarak belirlenirken (Rawat ve Tevari, 2012), *Bacillus agaradhaerens*'den elde edilen endoglukanaz enziminin moleküler ağırlığı 38 kDa olarak bildirilmiştir (Hirasawa ve ark, 2006). Görüldüğü gibi SC41 CMCaz enziminin moleküler ağırlığı literatürle benzerlik göstermektedir.

SC41 alkalın selüloz enziminin CMC'yi hidrolizi sonucu açığa çıkan son ürün TLC yöntemiyle maltoz olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak,

1. Evlerde kullanılan çamaşır temizleme deterjanları ülkelere ve kullanım alışkanlıklarına göre değişiklik göstermektedir. Sıvı deterjanlar çoğunlukla nötral veya nötrale yakın pH değerinde, ağartıcı içermeyen düşük oranda tuz bulunduran deterjanlardır. Ilımlı alkali pH'da aktif deterjanlar genelde, toz deterjanlardır ve aktivite pH'sı 9.0 civarındadır. Alkalın pH'da aktif, toz deterjanlar, sodyum sülfat veya sodyum karbonat içerirler. Ev kullanımına uygun bu deterjan özellikleri ve yıkama koşullarındaki geniş sıcaklık aralıkları göz önüne alındığı zaman nötral karakterdeki SC6 CMCaz enzimi son zamanlarda gittikçe artan ilgiye sahip sıvı deterjanlarda, SC41 enzimi ise alkalın özellikteki toz deterjanlarda kullanılabilir özelliktedir.
2. Pamuklu kumaşlarda, kumaş yüzeyinden dışarıya uzanan küçük (mikro) lif yapıları bulunmaktadır. Bu mikro yapılar kumaşın işlenmesi sürecinde

tiftiklenmiş, eskimiş, bir görüntü meydana getirir. Bu görünümün kumaştaki pürüzlü yapıların giderilmesi yoluyla yenileştirilmesi, diğer bir deyişle eski görünümlü kumaşın gençleştirilmesi, biyo-finishing (depilling) olarak isimlendirilir. Bu uygulama selüloz enzimlerinden yararlanılarak gerçekleştirilmektedir. Biyofinishing işlemi sonunda kumaş; daha parlak, daha yumuşak ve pürüzsüz bir yapı kazanırken aynı zamanda pamuklanmaya karşı dirençli bir hal alır.

Bio-finishing uygulamaları, pH 5.0-8.0 aralığında, 30-60°C'de değişen sıcaklıklarda 30-60 dakika süreyle gerçekleştirilmektedir. Optimum aktivitesini pH 6.0'da gösteren SC6 enzimi ve optimum aktivitesini pH 4.0'de ve 60°C'de gösteren SC61 CMCaz enzimlerinin bu amaçla kullanılması mümkündür.

Tekstil endüstrisinde, denim kumaşlarının 'eskitleme' görünümü kazanmasını sağlayan biyo-stoning adı verilen biyolojik taşlama işlemi de selüloz enzimlerinden yararlanılarak yapılmaktadır. Enzimatik olmayan yollarla yapıldığı zaman ponza taşıyla gerçekleştirilen bu yöntem, hem kumaşta hem de kullanılan makine ve ekipmanlarda hasara yol açarken aynı zamanda kumaş üzerinde ponza taşının aşınmasından kaynaklanan tozlar meydana getirmektedir.

Alternatif olarak kullanılan selüloz enzimleri, kumaş üzerindeki indigo boyalara bağlanarak bir kısmının uzaklaştırılmasını sağlar, bio-finishing prosesine benzer şekilde, biostoning uygulamaları da pH 5.0-8.0'de ve 30-60°C aralığında gerçekleştirilmektedir.

SC6 ve SC61 CMCaz enzimleri biofinishing uygulamalarıyla beraber denim kumaşların biyolojik taşlanması işlemlerinde de kullanılabilir özelliktedir.

3. Kağıt endüstrisinde, artık kağıtların geri dönüşümü işlemlerinde selüloz enzimleri noniyonik sürfaktanlarla beraber kullanılmaktadır. Ortam pH'sının asidik olarak ayarlandığı bu işlemlerde sıcaklık ise 50°C olarak uygulanmaktadır. Kağıtlardaki selülozun glukoza dönüştürülmesinin amaçlandığı bu geri dönüşüm işlemleri için son ürünü maltoz olan SC61

CMCaz enzimi güvenle kullanılabilir niteliktedir. Çeşitli proseslerde kağıttaki mürekkebin geri alınması ve yumuşatma işlemleri için ortama koyulan non iyonik sürfaktanlara (Tween-20 ve Tween 80) karşı %70 stabil olan SC61 CMCaz enzimi, optimum aktivite pH'sı ve optimum sıcaklık gibi özellikleriyle de bu işlem için oldukça uygun bir enzimdir.

Atık kağıtların geri dönüşümünün yüksek alkali koşullarda gerçekleştirildiği durumlar için optimum aktivite pH'sı 12.0 olan ve non iyonik sürfaktanlarla indüklenen SC41 CMCaz enziminden son derece etkili bir şekilde faydalanılabilir. Optimum aktivite sıcaklığı 70°C olan ve süfaktanlarla indüklenen SC41 termoalkalifil CMCaz enziminin kağıdın enzimatik deinking ve geri dönüşümü uygulamalarında kullanılması, işlemlerin daha yüksek sıcaklıklarda ve kısa sürede gerçekleşmesini sağlayabilir özellikler taşımaktadır.

4. Biyoetanol üretimi sırasında, selülozik ve lignoselülozik materyalin ön işlemleri sırasında enzimatik hidrolizden yararlanılır. Bu amaçla selülaz ve ksilanaz enzimleri sık kullanılan enzimler arasında yer alır. Enzimatik hidroliz tek başına kullanılabileceği gibi başka bir ön hidroliz işlemlerinden biriyle beraber de kullanılabilmektedir. Asidik ön işlemler genelde korozyona yol açtığından, bu yöntem yerine asidik pH'da aktivite gösteren selülaz enzimlerinden yararlanılabilir. Biyoetanol üretimi için ön işlem prosesleri çok sayıda ve farklı koşullarda gerçekleşen uygulamalardır bu sebeple, asidik, nötral ve alkali karakterdeki CMCaz enzimleri özellikle termofilik olma özellikleriyle biyoetanol üretimi sırasında hammadenin ön hidrolizi uygulamalarında ucuz ve pratik bir yol olarak tercih edilebilir.
5. Meyve suyu üretimi sırasında açığa çıkan bir takım zorlukları aşmak için diğer bir çok enzimle beraber selülaz enzimlerinden de yararlanılmaktadır. Genel olarak bu enzimler 'macerating enzymes' yumuşatıcı enzimler olarak isimlendirilirler. Özellikle asidik karakterdeki SC61 ve nötral özellik gösteren SC6 CMCaz enzimlerinin bu uygulamalarda, enzimleri

sıvılaştırma işleminin süresinin kısaltılmasının yanında meyve suyunun tadının olgunlaşmasında da yardımcı olarak görev yaparlar.

6. *Bacillus sp.* 'den elde edilen CMCaz enzimleri son ürün olarak maltoz ve maltotrioz açığa çıkarmakta ve yüksek termal stabilite göstermektedir. Selülaz enzimlerinin endüstriyel kullanımları sırasında açığa çıkan önemli problemlerden biri ise son ürün inhibisyonudur. Selülaz enzimleri selülozu glikoza hidrolizledikleri zaman ortamda artan glikoz konsantrasyonu enzimin inhibe olmasına neden olmaktadır. Bu durum maltoz, maltotrioz ve sellobiyoz gibi son ürünlerde gerçekleşen bir durum değildir. Bu sebeple izole ettiğimiz CMCaz enzimleri endüstriyel uygulamalarda hem termal stabiliteleriyle hem de son ürün inhibisyonu ile karşılaşmayacak olmalarıyla uzun süreli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilir özelliktedir.

KAYNAKLAR

- ABOUL-ENEIN, A., ABOU ELALLA, F., SEROUR, E., HUSSEIN, T., 2010. Purification and Characterization of a Novel Thermoactive Cellulase from Thermophilic *Actinomyces* Isolated from Soil Sample of Egypt. International Journal of Academic Research, Vol. 2. No.1.
- AEHLE, W., 2007. Enzymes in Industry Production and Applications. Third, Completely Revised Edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA. Germany, 99-262p.
- ANNAMALAI, N., THAVASI, R., VIJAYALAKSHMI, S., BALASUBRAMANIAN, T., 2011. A novel thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01. World J Microbiol Biotechnol, 27:2111-2115.
- ANONYMOUS, 1978. Microbiologischen Handbuch. Meckel, Darmstadt.
- ANTRANIKIAN, G., VORGIAS, C. E., and BERTOLDO, C., 2005. Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 96:219–262
- APIRAKSAKORN, J., NITISINPRASERT, S., ROBERT, E. L., 2008. Grass Degrading β -1,3-1,4-D-glucanases from *Bacillus subtilis* GN156: Purification and Characterization of Glucanase J1 and pJ2 Possessing Extremely Acidic pI. Appl Biochem Biotechnol, 149:53-66.
- ARIKAN, B., 2008. Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. Bioresource Technology 99: 3071–3076
- ASHA, MALINI, B., REVATHI, M., YADAV, A., and SAKTHIVEL, N., 2012. Purification and Characterization of a Thermophilic Cellulase from a Novel Cellulolytic Strain, *Paenibacillus barcinonensis*. J. Microbiol. Biotechnol., 22(11):1501-1509.
- AYGAN, A. and ARIKAN, B., 2008. A New Halo-alkaliphilic, Thermostable Endoglucanase from Moderately Halophilic *Bacillus* sp. C14 Isolated from Van Soda Lake. Int. J. Agri. Biol., 10: 369-74.

- AYGAN, A., 2008. Haloalkalofil *Bacillus* sp.izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- AYGAN, A., KARCIOGLU, L., and ARIKAN, B., 2011. Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology*, 10(5): 789-796.
- BAI, Y., WANG, J., ZHANG, Z., SHI, P., LUO, H., HUANG, H., FENG, Y., YAO, B., 2010. Extremely Acidic β -1,4-Glucanase, CelA4, from Thermoacidophilic *Alicyclobacillus* sp. A4 with High Protease Resistance bacteria and Their Enzyme Systems. *Prokaryotes*. 2: 578-617.
- BAYER, E. A., MORAG, E., and LAMED, R., 1994. The cellulosome-a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 12:378–386.
- BAYER, E. A., SHOHAM, Y., and LAMED, R., 2006. Cellulose-Decomposing Bacteria and Their Enzyme Systems. *Prokaryotes*. 2: 578-617
- BHAT, M. K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18: 355:383.
- BISCHOFF, K. M., ROONEY, A. P., LI, X. L., LIU, S., HUGHES, S. R., 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett.*, 28: 1761-1765.
- BOLLAG, D. M., ROZYCKI, M. D., EDELSTEIN, S. J., 1996. *Protein Methods* (2nd Edt). Viley-Liss Press, USA. 414s.
- BOUZAS, T., M., BARROS-VELÁZQUEZ, J., and VILLA, T., G., 2006. Industrial Applications of Hyperthermophilic Enzymes: A Review. *Protein & Peptide Letters*. 13: 645-651.
- CAO, Y., TAN, H., 2002. Effects of cellulase on the modification of cellulose. *Carbohydrate Research* 337: 1291–1296.
- CASTANON, M., WILKE, C. R., 1981. Effects of surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. *Biotechnol Bioeng* 23:1365-1372.

- CHRISTAKOPOULOS, P., HATZINIKOLAOU, D. G., FOUNTOUKIDIS, G., KEKOS, D., CLAEYSSSENS, M., and MACRIS, B. J., 1999. Purification and Mode of Action of an Alkali-Resistant Endo-1,4-b-glucanase from *Bacillus pumilus*. Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol. 364. 1: 61-66.
- CORAL, G., ARIKAN, B., ÜNALDI, M. N., GÜVENMEZ, H., 2002. Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain. Turk J Biol, 209-213.
- DANSON, M. J., and HOUGH, D. W., 1997. The structural basis of protein halophilicity. Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol., 117: 307-312.
- DAMASO, M. C. T., ANDRADE, C. M. M. C., PEREIRA, N., 2002. Production and properties of cellulase free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. Braz J Microbiol 33:333–338.
- DAS, A., BHATTACHARYA, S., and MURALI, L., 2010. Production of Cellulase from a Thermophilic *Bacillus sp.* Isolated from Cow Dung. American-Eurasian J. Agric & Environ. Sci., 8(6):685-691.
- DEMIRIÖR, D. C., MORIS-VARAS, F., and CASSIDY, C. S., 2001. Enzymes from extremophiles. Curr. Opin. Chem. Biol. 5: 144-151.
- DEVİ D, K., and HEMASHENPAGAM, N., 2010. Isolation and Characterization of Cellulase Enzyme from *Aspergillus sps.*. The IUP Journal of Biotechnology Vol. IV, No. 1.
- DONAGY, J. A., and MCKAY, A. M., 1993. Production and properties of an alkaline protease by *Aureobasidium pullulans*. J. Appl. Bacteriol., 74: 662–6
- DUTTA, T., SAHOO R., SENGUPTA, R., RAY, S.S., BHATTACHARJEE, A., GHOSH, S., 2008. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. J Ind Microbiol Biotechnol, 35:275–282.
- ECKERT, K., and SCHNEIDER, E., 2003. A thermoacidophilic endoglucanase (CelB) from *Alicyclobacillus acidocaldarius* displays high sequence similarity to arabinofuranosidases belonging to family 51 of glycoside hydrolases. Eur. J. Biochem., 270: 3593-3602.

- EDİZ, N., BEYATLI, Y., 2005. *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. Cilt:03, 5: 1-22.
- EL-ZAWAHRY, Y A., EL-MOUGİTH, A. A., EL SAADANI, M. A., HAFEZ, E. E., and SOLIMAN, S. A., 2010. Partial Purification and Characterization of Two Endo- β -1, 4-glucanase from *Trichoderma* sp. (Shmosa tri). Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(10): 4559-4586.
- ENDO, K., HAKAMA, Y., TAKIZAWA, S., KUBOTA, H., SUMITOMO, N., KOBAYASHI, T., ITO, 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.
- FELBER, J. P., COOMBS, T. L., and VALEE, B. L., 1962. The Mechanism of Inhibition of Carboxypeptidase A by 1,10-Phenanthroline. . Inhibition of Carboxypeptidase a. Vol.1, No. 2.
- FUKUMORI, F., KUDO, T., and HORIKOSHI, K., 1985. Purification and Properties of a Cellulase from Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139. Journal of General Microbiology. 131: 3339-3345
- GAO, J., WENG, H., ZHU, D., YUAN, M., GUAN, F., XI, YU., 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. Bioresource Technology 99: 7623-7629.
- GODFREY, T., WEST, S. (eds), 1996. Industrial Enzymology. London: Macmillan Press Ltd.
- GODFREY, T, WEST, S. I., : Introduction to industrial enzymology. In Industrial Enzymology, edn 2. Edited by Godfrey T, West S. London: Macmillan Press; 1996:1-8.
- GORDON, R. E., 1981. One hundred and seven years of the genus *Bacillus*. R. C. Berkeley, and M. Goodfellow (ed.) The aerobic endosporeforming bacteria. Academic Press. London

- GRIGOREVSKI-LIMA, A. L., DA VINHA, F. N. M., SOUZA, D. T., BISPO, A. S. R., BON, E. P. S., COELHO, R. R. R., NASCIMENTO, R. P., 2009. *Aspergillus fumigatus* Thermophilic and Acidophilic Endoglucanases, Appl Biochem Biotechnol, 155:321–329.
- GUPTA, V., PRASANNA, R., CHAUDHARY, V., NAIN, L., 2012. Biochemical, structural and functional characterization of two novel antifungal endoglucanases from *Anabaena laxa*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 1: 338:347.
- GÜRAY, M. Z., 2009. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Thermophilic *Bacillus* sp. İzmir Institute of Technology. Master Thesis.
- GÜVEN, R. G., 2011. Termofilik Bakteriler ve Biyoteknolojik Açıdan Önemli Bazı Enzimleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR. 09(1): 1-10.
- HARA, T., and UEDA, S., 1982. Regulation of polyglutamate in *Bacillus subtilis* (natto): Transformation of high PGA productivity. Agric. Biol. Chem. 46: 2275–2281.
- HAKAMADA, Y., KOIKE, K., YOSHIMATSU, T., MORI, H., KOBAYASHI, T., ITO, S., 1997. Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. Extremophiles, 1:151-156.
- HAKAMADA, Y., ENDO, K., TAKIZAWA, S., KOBAYASHI, T., SHIRAI, T., YAMANE, T., ITO, S., 2002. Enzymatic properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. Biochimica et Biophysica Acta. 1570: 174-180.
- HAMILTON, L.M., KELLY, C.T., FOGARTY, W.M., 1999. Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. Process Biochemistry 35, 27–31.
- HEIDORNE, F. O., MAGALHAES, P. O., FERRAZ, A. L., MİLAGRES, A. M. F., 2006. Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. Enzyme and Microbial Technology, 38: 436-442.

- HIRASAWA, K., UCHIMURA, K., KASHIWA, M., GRANT, W., D., ITO, S., KOBAYASHI, T., and HORIKOSHI, K., 2006. Salt-activated endoglucanase of a strain of alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89: 211-219.
- HORIKOSHI, K., 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for Biotechnology. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63: 3925-3931.
- HOUGH, D. W., and DANSON, M. J., 1999. Extremozymes. *Current Opinion in Chemical Biology*. 3: 39-46.
- HUANG, X. P., and MONK, C., 2004. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20: 85-92.
- ITO, S., SHIKATA, S., OZAKI, K., KAWAI, S., OKAMOTO, K., INOUE, S., TAKEI, A., OHTA, Y., I., and SATOH, T., 1989. Alkaline Cellulase for Laundry Detergents: Production by *Bacillus* sp. KSM-635 and Enzymatic Properties. *Agric. Biol. Chem.*, 53(5):1275-1281.
- ITO, S., KOBAYASHI, T., ARA, K., OZAKI, K., KAWAI, S., HATADA, Y., 1998. Alkaline detergent enzymes from alkaliphiles: Enzymatic properties, genetics, and structures. *Extremophiles*. 2: 185-190.
- JUNG, Y. J., YOO, J. S., LEE, Y. S., PARK, I. H., KIM, S. H., LEE, S. C., YASUDA, M., CHUNG, S. Y., and CHOI, Y. L., 2007. Purification and Characterization of Thermostable β -1,3-1,4 Glucanase from *Bacillus* sp. A8-8. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12: 265-270.
- KAMBUROVA, M., KRILOVA, N., MANDEVA, R., and DEREKOVA, A., 2003. Purification and properties of a thermostable endoglucanase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. *J. Mol. Catal.*, 22: 307-13.
- KATEL, R. P., DODIA, M. S., JOSHI, R. H., SINGH, S. P., 2006. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochemistry* 41: 2002-2009.

- KHYAMI-HORANI H., 1996. Partial purification and some properties of an alkaline cellulase from an alkalophilic *Bacillus sp.* World Journal of Microbiology 8 Biotechnology, 12:525-529.
- KIM, B.K., LEE, B. H., LEE, Y. J., JIN, H. I., CHUNG, C. H., LEE, J. W., 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. Enzyme and Microbial Technology 44:411-416.
- KIM, H. J., KIM, S. B., and KIM, C. J., 2007. The Effects of Nonionic Surfactants on the Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Recycled Newspaper. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 12: 147-151.
- KIM, J. Y., HUR, S. H. & HONG, J. H., 2005. Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus sp.* HSH-810. Biotechnology Letters, 27: 313-316.
- KIRAN, K. K., CHANDRA, T. S., 2008. Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus sp.* Strain TSCVKK. Appl Microbiol Biotechnol, 77: 1023-1031.
- KIRAN, Ö. E., ÇÖMLEKÇİOĞLU, U., DOSTBİL, N., 2006. Bazı Mikrobiyal Enzimler ve Endüstrideki Kullanım Alanları. KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi. 9(1): 12-19.
- KORPOLE, S., SHARMA, R., VERMA, D., 2011. Characterization and Phylogenetic Diversity of Carboxymethyl Cellulase Producing *Bacillus* Species from a Landfill Ecosystem. Indian J Microbiol.
- KUMAR, G. S., CHANDRA, M. S., SUMANTH, M., VISHNUPRIYA, A., REDDY, B. R., and CHOI, Y. L., 2009. Cellulolytic Enzymes Production from Submerged Fermentation of Different Substrates by Newly Isolated *Bacillus spp.* FME. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 52(1): 17-21.
- KUMAR, L., AWASTHI, G., and SINGH, B., 2011. Extremophiles: A Novel Source of Industrially Important Enzymes. 2011. Biotechnology, 10(2): 121-135.
- LEE, S. M., KOO, Y. M., 2001. Pilot-scale production of cellulose using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode. J. Microbiol. Biotechnol. 11: 229–233.

- LEE, Y. J., KIM, B. K., LEE, B. H., JO, K. I., LEE, N. K., CHUNG, C. H., LEE, Y. C., LEE, J. W., 2008. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99:378-386.
- LERNER, K. L., and LERNER B. W., 2003. *World of microbiology and immunology*. America, 1-359.
- LI, Y. H., DING, M., WANG, J., XU, G.J., ZHAO, F., 2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus sp.* AC-1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 70: 430-436.
- LI, X., WANG, H. L., LI, T., YU, H. Y., 2012. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant alkaline cellulase from a halophilic isolate of *Thalassobacillus*. *Biotechnol Lett*, 34: 1531-1536.
- LI, X., YU, H. Y., 2012. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant cellulase from a halotolerant isolate, *Bacillus sp.* L1. *J Ind Microbiol Biotechnol*
- LIANG, Y., YESUF, J., SCHMITT, S., BENDER, K., BOZOLLA, J., 2009. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus sp.* strain JXL. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36:961-970.
- LIU, D., ZHANG, R., YANG, X., WU, H., XU, D., TANG, Z., SHEN, Q., 2011. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 717-725.
- LIU, S. L., CHEN, W. Z., WANG, Y., LIU, G., YU, S. W., XING, M., 2008. Purification and characterization of a novel neutral b-glucanase and an alkaline b-glucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. *World J Microbiol Biotechnol*, 24:149–155.
- LUO, H., YANG, J., YANG, P., LI, J., HUANG, H., SHI, P., BAI, Y., WANG, Y., FAN, Y., YAO, B., 2010. Gene cloning and expression of a new acidic family 7 endo- β -1,3-1,4-glucanase from the acidophilic fungus *Bispora sp.* MEY-1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 85: 1015-1023.

- MA, Y., XUE, W. D., GRANT, N. C., COLLINS, A. W., DUCKWORTH, A. W., van STEENBERGEN, and JONES, B. E., 2004. *Alkalimonas amylolytica* gen. nov. sp. nov. and *Alkalimonas delamerensis* gen. nov. sp. nov. novel alkaliphilic bacteria from soda lakes in China and East Africa. *Extremophiles*. 8: 193-200.
- MADERN, D., EBEL, C., and ZACCAI, G., 2000. Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*. 4: 91-98.
- MAUGERI, T. L., C. GUGLIANDOLO, D., CACCAMO, and E. STACKEBRANDT. 2001. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from shallow, marine vents. *Syst Appl Microbiol* 24 (4):572-87.
- MAWADZA, C., HATTI-KAUL, R., ZVAUYA, R., MATTIASSON, B., 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology* 83: 177-187.
- MAYENDE, L., WILHELMİ, B. S., PLETSCHKE, B.I., 2006. Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus spp.* isolated from compost. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2963-2966.
- McCOY, M., 2000. Novozymes emerges. *Chem Eng News*. 19:23-25.
- MIETTINEN-OINONEN, A., LONDESBOROUGH, J., JOUTSJOKI, V., LANTTO, R., VEHEMAANPERÄ, PRIMALCO LTD. BIOTEC, 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 332-341.
- MILLER, G.L., 1951. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 426-428.
- MOROZKINA, E. V., SLUTSKAYA, E. S., FEDOROVA, T. V., TUGAY, T. I., GOLUBEVA, L. I., and KOROLEVA, O. V., 2010. Extremophilic Microorganisms: Biochemical Adaptation and Biotechnological Application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 46: 1-14
- NG, I. S., LI, C. W., YEH, Y. F., CHEN, P. T., CHIR, J. L., MA, C. H., YU, S. M., HO, T. D., TONG, C. G., 2009. A novel endo-glucanase from the thermophilic bacterium *Geobacillus sp.* 70PC53 with high activity and stability over a broad range of temperatures. *Extremophiles*, 13: 425-435.

- NGUYEN, V. T., QUYEN, D. T., 2010. Purification and Properties of a Novel Thermoactive Endoglucanase from *Aspergillus awamori* VTCC-F099. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 4(12):6211-6216.
- OGAWA, J., and SHIMIZU, S., 1999. Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. Tibtech. Vol 17: 13-20.
- OUTTRUP, H and JORGENSEN, S.T., 2002. The Importance of *Bacillus* species in the production of industrial enzymes. (R.Berkley editor) Applications and systems of *Bacillus* and relatives. Blackwell Science Inc., Malden, Mass., 206- 218
- OZAKI, K., and ITO, S., 1991. Purification and properties of an acid endo- 1,4-P-glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. Journal of General Microbiology. 137: 41-48.
- PALLARDY, S. G., 2008. Physiology of woody plants. Third edition. America. 199-215p.
- PENG, J., WANG, W., JIANG, Y., LIU, M., ZHANG, H., SHAO, W., 2011. Enhanced Soluble Expression of a Thermostable Cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Escherichia coli*. Curr Microbiol. QUAX, W. J., 2006. Bacterial Enzymes. Prokaryotes, 1:777-796.
- PETERSON R, GRINYER J, JOSS J, KHAN A, NEVALAINEN H., 2009. Fungal proteins with mannanase activity identified directly from a Congo Red stained zymogram by mass spectrometry. Journal of Mikrobiological Methods 79:374-377.
- QUAX, W. J., 2006. Bacterial Enzymes. Prokaryotes. 1: 777:796
- RASTOGI, G., BHALLA, A., ADHIKARI, A., BISCHOFF, K. M., HUGHES, S. R., CHRISTOPER, L. P., SANI, R. K., 2010. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. Bioresource Technology. 101: 8798-8806.
- RATANAKHANOKCHAI, K., KYU, K.L., TANTICHAROEN, M., 1999. Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. Appl. Environ. Microbiol., 65:694-697.

- RAWAT, R., and TEWARI, L., 2012. Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by *Bacillus subtilis* strain LFS3. *Extremophiles*, 16: 637-644.
- RÖHM, O. 1915. Verfahren zum Reinigen von Wäschestücken aller Art. Patent DE 283923.
- SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- SATYANARAYANA, T., RAGHUKUMAR, C., and SHIVAJI, S., 2005. Extremophilic Microbes: Diversity and Perspectives. *Current Science*. 89(1): 78-90.
- SAUL, D. J., WILLIAMS, L. C., GRAYLING, R. A., CHAMLEY, L. W., Love, d. R., and BERGQUIST, P. L., 1990. *ceiB*, a Gene Coding for a Bifunctional Cellulase from the Extreme Thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3117–24.
- SCHÄFER, T., BORCHERT, T. W., NIELSEN, V. S., SKAGERLIND, P., GIBSON, K., WENGER, K., HATZACK, F., NILSSON, SALMON, S., PEDERSEN, S., HELDT-HANSEN, H. P., POULSEN, P. B., LUND, H., OXENBØLL, K. M., WU, G. F., PEDERSEN, H. H., XU, H., 2007. *Industrial Enzymes. Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 105: 59-131.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A., and WARD, O. P., 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiol.* 50: 1–17
- SHANMUGHAPRIYA, S., KIRAN, G. S., SELVIN, J., THOMAS, T. A., RANI, C., 2010. Optimization, Purification, and Characterization of Extracellular Mesophilic Alkaline Cellulase from Sponge-Associated *Marinobacter sp.* MSI032. *Appl Biochem Biotechnol.* 162:625-640.
- SHARMA, A., KAWARABAYASI, Y., SATYANARAYANA, 2012. Acidophilic bacteria and archaea: acid stable biocatalysts and their potential applications. *Extremophiles*. 16:1-19.

- SHIRAI, T., ISHIDA, H., NODA, J. I., YAMANE, T., OZAKI, K., HAKAMADA, Y., and ITO, S., 2001. Crystal Structure of Alkaline Cellulase K: Insight into the Alkaline Adaptation of an Industrial Enzyme. *J. Mol. Biol.* 310: 1079-1087.
- SHU, C. H., XU, C. J., LIN, E. S., 2006. Production, purification and partial characterization of a novel endo-b-1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, 41:1229-1233.
- SIDDIQUI, K. S., AZHAR, M. J., RASHID, M. H., GHURI, T. M., and RAJOKA, M. I., 1997. Purification and the Effect of Manganese Ions on the Activity of Carboxymethylcellulases from *Aspergillus niger* and *Cellulomonas biazotea*. *Folia Microbiol*, 42(4): 303-311.
- 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 & Biotechnology*, 17:761-765.
- SINGH, J., BATRA, N., SOBTI, R. C., 2004. Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 31:51-56.
- SLEPECKY, R. A., and HEMPHILL, E., 2006. The Genus *Bacillus*-Nonmedical. *Prokaryotes*. 4: 530-562.
- SLONEKER, J. H., 1971. Determination of cellulose and apparent hemicellulose in plant tissue by gas-liquid chromatography. *Anal Biochem.* 43:539-46.
- SMITH, J. E., 2004. *Biotechnology*. Fourth Edition. Cambridge University Press.
- SOMERVILLE, C., 2006. The billion-ton biofuels vision. *Science* 312, 1277.
- STRIGEL, M. F., HILL, J., 1996. *Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis*. The Getty Conservation Institute. Los Angeles
- SUKUMARAN, R. K., SINHANIA, R. R., and PANDEY, A., 2005. Microbial cellulases – Production applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 64: 832-844.
- 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.

- TEMİZKAN, G., ARDA, N., 2004. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Nobel Tıp Kitapevleri.
- THONGEKKAEW, J., IKEDA, H., MASAKI, K., IEFUJI, H., 2008. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus sp.* S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. 60: 140-146.
- TRIVEDI, N., GUPTA, V., KUMAR, M., KUMARI, P., REDDY, C. R. K., JHA, B., 2011. Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase. Chemosphere 83: 706-712.
- UEDA, M., GOTO, T., NAKZAWA, M., MIYATEKE, K., SAKAGUCHI, M., INOUE, K., 2010. A novel cold-adapted cellulase complex from *Eisenia foetida*: Characterization of a multienzyme complex with carboxymethylcellulase, β -lucosidase, β -1,3 glucanase, and β -xylosidase. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 157:26-32.
- VAN BEILEN, J. B., and LI ZHI, 2002. Enzyme technology: an overview. Current Opinion in Biotechnology. 13: 338-344.
- VAN DEN BURG, B., 2003. Extremophiles as a Source for Novel Enzymes. Curr. Opin. Microbiol., 6:213-218.
- VIEILLE, C., and ZEIKUS, G. J., (2001). Hypertermophilic enzyme: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 1-43.
- VOGET, S., STEELE, H.L., STREIT, W.R., 2006. Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. J Biotechnol 126:26-36.
- VYAS, S., LACHKE, A., 2003. Biodeinking of mixed office waste paper by alkaline active cellulases from alkalotolerant *Fusarium sp.* Enzyme and Microbial Technology.32: 236-245.
- WANG, C. Y., HSIEH, Y. R., NG, C. C., CHAN, H., LIN, H. T., TZENG, W. S., SHYU, Y. T., 2009. Purification and characterization of a novel halostable cellulase from *Salinivibrio sp.* strain NTU-05. Enzyme and Microbial Technology, 44:373-379.

- WANG, J. L., RUAN, H., ZHANG, H. F., ZHANG, Q., ZHANG, H. B., HE, G. Q., and SHEN, S. R., 2007. Characterization of a Thermostable and Acidic-Tolerable β -Glucanase from Aerobic Fungi *Trichoderma koningii* ZJU-T. C:Food Chemistry and Toxicology, 72:452-456.
- WISEMAN, A., 1987. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, p.274-373.
- WU, J., JU, L. K., 1998. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. Biotechnol Prog 14:649–652.
- YANG, D., WENG, H., WANG, M., XU, W., LI, Y., YANG, H., 2010. Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15. Mol Biol Rep, 37: 1923-1929.
- ZEMEK, J., AUGUSTIN, J., BORRISS, R., KUNIAK, L., ŠVÁBOVÁ, M., and PÁČOVÁ, Z., 1981. Polysaccharide-Hydrolyzing Enzymes in the Genus *Bacillus*. Folia Microbiol. 26: 403-407.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana’da tamamladı. Lisans eğitimini 2003-2007 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladı. 2007 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Lisans üzeri Eğitimini Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Lisans Üzerine Doktora Programı’nda devam etti