



T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla İLIŞKAN

KARBOKSİMETİL SELÜLAZ, KSİLANAZ VE
LİKENAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE ENZİMLERİN KISMİ
KARAKTERİZASYONU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OSMANIYE – 2017

**T.C.
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KARBOKSİMETİL SELÜLAZ, KSİLANAZ VE
LİKENAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEEN BAKTERİ
İZOLASYONU VE ENZİMLERİN KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

Çağla İLİŞKAN

**BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**OSMANIYE
TEMMUZ-2017**

TEZ ONAYI

KARBOKSİMETİL SELÜLAZ, KSİLANAZ VE LİKENAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMLERİN KİSMİ KARAKTERİZASYONU

Çağla ILIŞKAN tarafından Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN danışmanlığında Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda hazırlanan bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Prof. Dr. Hüsnüye AKA SAĞLIKER
Biyoloji Anabilim Dalı, OKÜ

Üye: Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN
Su Ürünleri Anabilim Dalı, ÇÜ

Yukarıdaki jüri kararı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve /..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Coşkun ÖZALP
Enstitü Müdürü, **Fen Bilimleri Enstitüsü**

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, bu çalışma sonucunda elde edilmeyen her türlü bilgi ve ifade için ilgili kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını ve bu tezin Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Çağla İLİŞKAN



ÖZET

KARBOKSİMETİL SELÜLAZ, KSİLANAZ VE LİKENAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN BAKTERİ İZOLASYONU VE ENZİMLERİN KİSMİ KARAKTERİZASYONU

Çağla İLIŞKAN
Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

Temmuz 2017, 62 sayfa

Bu çalışmada, Adana ilinde bulunan bir seraya ait toprak numunelerinden karboksimetil selüla, ksilanaz ve likenaz enzimlerini üreten *Bacillus* sp. CS8 bakterisinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her üç enzim de optimum aktivitesini 40 °C'de göstermiştir. Diğer taraftan, CMCaz ve likenaz enzimleri optimum aktiviteyi 7.0 pH değerinde gösterirken, ksilanaz enzimi 6.0 pH değerinde göstermiştir. CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri 80 °C'de 15 dk ön inkübasyon sonrasında aktiviteyi sırasıyla %57, 83 ve 71 oranlarında korumuşlardır. 50-80 °C sıcaklık değerleri arasında her üç enzim de yine aynı sırayla %80.25, 87.0 ve 89.25 oranlarında ortalama kalan aktivite göstermişlerdir. İzolat en yüksek CMCaz ve ksilanaz aktiviteyi inokülasyon zamanından itibaren 36. saatte ulaşırken, en yüksek likenaz aktivitesine 48. saatte ulaşmıştır. Her üç enzim için de CaCl₂, MgCl₂ ve MnCl₂, ortak stimülatör olurken, HgCl₂ ve CuCl₂ ortak inhibitör olmuşlardır. ZnCl₂ CMCaz ve ksilanaz enzimlerini stimüle ederken, FeCl₃ CMCaz ve likenaz enzimlerini, EDTA ise ksilanaz ve likenaz enzimlerini stimüle etmiştir. Her üç enzim arasından en yüksek aktiviteye sahip ksilanazın aktivitesi %100 olarak kabul edildiğinde CMCaz ve likenaz enzimleri ksilanaz enzimine göre oransal olarak sırasıyla %89 ve 79 düzeylerinde aktiviteye sahip olmuşlardır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus* sp., karboksimetil selüla, ksilanaz, likenaz, karakterizasyon

ABSTRACT

ISOLATION OF CARBOXYMETHYL CELLULASE, XYLANASE AND LICHENASE ENZYMES PRODUCING BACTERIUM AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF THE ENZYMES

Çağla ILIŞKAN
M.Sc., Department of Biology
Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN

July 2017, 62 Pages

In the present study, carboxymethyl cellulase, xylanase, and lichenase producing bacterium *Bacillus* sp. CS8 was isolated from the soil samples collected from agricultural greenhouse located in Adana province. The optimum activities were observed at 40 °C for all three enzymes. On the other hand, optimum pH values were 7.0 for CMCCase and lichenase, whereas 6.0 for xylanase. CMCCase, xylanase and lichenase showed 57, 83, and 71% residual activity after pre-incubation at 80 °C for 15 min. The relative residual activities between 50-80 °C occurred as 80.25, 87.0, and 89.25%, in the same order. Maximum CMCCase and xylanase productions of the isolate were observed after 36 hours following the inoculation time, whereas 48 hours after for lichenase. All three enzyme activities were stimulated by CaCl₂, MgCl₂, and MnCl₂, whereas inhibited by HgCl₂ and CuCl₂. While ZnCl₂ stimulated the CMCCase and xylanase activities, FeCl₃ stimulated CMCCase and lichenase, and EDTA stimulated xylanase and lichenase activities. When xylanase activity was assumed as 100%, the activities of CMCCase and lichenase in comparison to the xylanase remained as 89 and 79%, respectively.

Key Words: *Bacillus* sp., carboxymethyl cellulase, xylanase, lichenase, characterization



SAYI

Çok kıymetli aileme...

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın yürütölmesinin her aőamasında desteğini sürekli yanımda hissettiğim, değerli bilgileri ile bana yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a öncelikle teőekkürü bir borç bilirim.

Çalıőmam boyunca maddi ve manevi tüm desteklerini benden esirgemeyen çok kıymetli aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bölümdeki çalıőmalarım süresince beni destekleyen bölümümüzün diğer öğretim elemanlarına da ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Selüloz ve Bakteriyel Selülazlar.....	1
1.2. Ksilan, Bakteriyel Ksilanazlar ve Uygulama Alanları.....	9
1.3. Likenan, Bakteriyel Likenazlar ve Uygulama Alanları.....	12
1.4. Amaç.....	14
1.5. Kapsam.....	14
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. Bakteri Materyali.....	24
3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler.....	24
3.1.3. Besi Ortamları.....	24
3.1.4. Alet ve Cihazlar.....	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu.....	25
3.2.2. İzolatlarda Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	27
3.2.3. Enzimlerin Spesifik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	30
3.2.4. Enzimatik Analizler.....	32
3.2.5. Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi.....	32
3.2.6. Enzimlerin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi.....	33
3.2.7. Enzimlerin Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi.....	34

3.2.8.	Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi	35
3.2.9.	Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	36
3.2.10.	Oransal Aktivite	36
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1.	Bulgular	37
4.1.1.	CMCaz, Ksilanaz ve Likenaz Enzimlerini Üreten Bakterilerin İzolasyonu	37
4.1.2.	<i>Bacillus</i> sp. CS8 Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu	38
4.2.	Tartışma	45
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	50
5.1.	Sonuçlar	50
5.2.	Öneriler	51
	KAYNAKLAR	52
	ÖZGEÇMİŞ	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Selüloz içeren bazı materyallerin kimyasal kompozisyonları	2
Çizelge 1.2. Selülozların uygulama alanları.....	4
Çizelge 1.3. Hemiselüloz ve selüloz aktivitelerine sahip bazı bakterilerin listesi.....	5
Çizelge 1.4. Bakteriyel selüloz enzim sistemleri	6
Çizelge 1.5. Anaerobik ve aerobik bakterilerce üretilen bazı selüloz enzimlerinin özellikleri	8
Çizelge 1.6. Bazı bakteriyel ksilanazlar ile aktivitelerine etki eden faktörler	11
Çizelge 1.7. Bazı ticari bakteriyel ksilanazlar ve uygulama alanları	12
Çizelge 4.1. İzolatlara ait bazı enzimlerin aktivite durumları	38
Çizelge 4.2. <i>Bacillus</i> sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri üzerinde bazı kimyasalların etkilerinin oransal değerleri	44

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Selüloz molekülünün şematik yapısı	2
Şekil 1.2. Ksilanın moleküler yapısı	9
Şekil 1.3. (a) Ksilanaz enzimlerinin ksilan molekülü üzerindeki aktivite bölgeleri (b) Ksilo-oligosakkaritlerin β -ksilosidaz enziminin hidrolizi.....	10
Şekil 1.4. Likenan molekülünün şematik modeli.....	13
Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü laboratuvarından bir görüntü.....	25
Şekil 3.2. Toprak numunelerinde bulunan vejetatif bakterilerin pastörizasyonu	27
Şekil 3.3. <i>Bacillus</i> sporlarının LB besiyerinde çimlendirilmesi.	27
Şekil 3.4. İzolatların CMC, ksilan ve likenan içeren LB-agar besiyerlerinde kolonileştirilmesi.	29
Şekil 3.5. CMC, ksilan ve likenan içeren besiyerlerin Kongo-kırmızısı ile boyanması.	29
Şekil 3.6. İzolatlardan gliserol stokların hazırlanması	30
Şekil 4.1. İzolatların farklı substratlar içeren besiyerlerinde aktivite durumları ..	37
Şekil 4.2. <i>Bacillus</i> sp. CS8 bakterisi tarafından sentezlenen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait optimum sıcaklık grafiği	38
Şekil 4.3. <i>Bacillus</i> sp. CS8 bakterisi tarafından sentezlenen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait optimum pH grafiği.....	39
Şekil 4.4. <i>Bacillus</i> sp. CS8 bakterisi tarafından sentezlenen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait sıcaklık stabilite grafiği	41
Şekil 4.5. <i>Bacillus</i> sp. CS8 enzimlerine ait zaman/aktivite grafiği.....	42
Şekil 4.6. CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerinin birbirlerine göre oransal aktivite seviyeleri.....	43
Şekil 4.7. Bazı kimyasal maddelerin <i>Bacillus</i> sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri üzerinde etkisi.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection	(-)
bç	Baz çifti	(-)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Temel Yerel Hizalama Arama Aracı)	(-)
BSA	Sığır serum albumini	(-)
CMC	Karboksimetil selüloz	(-)
CMCaz	Karboksimetil selülaz	(-)
dk	Dakika	(-)
DNS	Dinitrosalisilik asit	(-)
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit	(-)
g	Gram	(-)
IU/ml	İnternasyonal ünite/mililitre	(-)
kbç	Kilobaz çifti	(-)
kDa	Kilodalton	(-)
l	Litre	(-)
LB	Luria Bertani	(-)
M	Molar	(-)
mg	Miligram	(-)
ml	Mililitre	(-)
mM	milimolar	(-)
nm	Nanometre	(-)
OD	Optik yoğunluk	(-)
rDNA	Ribozomal DNA	(-)
rpm	Dakikada devir sayısı	(-)
rRNA	Ribozomal RNA	(-)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat	(-)
sn	Saniye	(-)
sp.	Tür	(-)
spp.	Türler	(-)
Tris	2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol	(-)
U/mg	Ünite/miligram	(-)

U/ml	Ünite/mililitre	(-)
v/v	Hacim/hacim	(-)
w/v	Ağırlık/hacim	(-)
µg	Mikrogram	(-)
µl	Mikrolitre	(-)



1. GİRİŞ

Enzimler, hücrelerde bulunan kalıtım materyali üzerindeki genlerce üretilen, kimyasal reaksiyonları katalizleyerek hücredeki metabolik faaliyetleri yöneten organik bileşiklerdir. Başta mikroorganizmalar olmak üzere canlı organizmalarca enzimlerin üretiminin ekonomik koşullarda gerçekleştirilmeleri, oluşturdukları atık miktarlarının az olması ve dolayısıyla çevre kirliliğine daha düşük düzeyde yol açması gibi avantajları, enzimlerin endüstriyel alanlarda kullanımlarını oldukça cazip hale getirmektedir. Ortamda bulunan enzim ve substratların miktarı, reaksiyon ortamının pH ve sıcaklık değerleri ve diğer bazı fiziksel etmenler enzimlerin katalitik etkileri üzerinde etki göstermektedirler. Günümüzde tanımlanan enzimlerin birçoğu 30-50 °C arasında aktivite göstermektedirler (Demirel ve Gürbüz, 1999).

Günümüzde endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin büyük çoğunluğu mikroorganizmalarca üretilmekle birlikte, çok az bir kısmı da hayvansal ve bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır. Bu enzimlerin birçoğu 60 °C'yi geçen sıcaklık değerlerinde aktivitelerini büyük ölçüde yitirmekte olup, ancak termostabil (sıcaklığa dirençli) enzimler yüksek sıcaklık değerlerinde aktivitelerini koruyabilmektedir. Yüksek aktivite ve stabiliteye sahip olmaları, daha az yan ürün oluşturmaları, üretimlerinin ekonomik olması, yüksek oran ve saflıkta üretilebilmeleri mikroorganizmaların enzim kaynağı olarak tercih edilmelerindeki en önemli nedenlerdendir (Wiseman, 1987; Horikoshi, 1999).

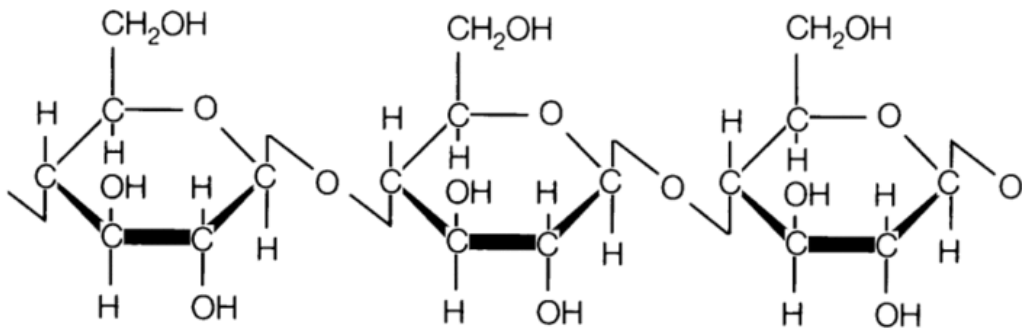
1.1. Selüloz ve Bakteriyel Selülazlar

Yüksek bitkilerde hücre duvarının ana bileşeni olan selülozlar bazı bakteri, alg, fungus, amip ve denizel hayvanlarca üretilmekte olup yeryüzünde en yaygın bulunan organik moleküldür (Lynd vd., 2002; Wada vd., 2008). Selüloz içeren bazı materyallerin kimyasal kompozisyonları Çizelge 1.1'de verilmiştir. Selüloz sadece tekstil ve ağaç endüstrisinin ana ham maddesi olmakla kalmaz, gıda kalitesinin artırılması, tarım ve biyoetanol üretiminde de önemli rol oynamaktadır (Wada vd., 2008). Selülozlar β -1,4-glukozidik bağlarla bağlanmış glukoz moleküllerinden

oluşan düz yapıllı polimerler olup, glukoz ünitelerinin sayısı moleküller arasında farklılık göstermektedir (Şekil 1.1).

Çizelge 1.1. Selüloz içeren bazı materyallerin kimyasal kompozisyonları (Gautam vd., 2010)

Kaynak	Kompozisyon (%)		
	Selüloz	Hemiselüloz	Lignin
Sert ağaç	43-47	25-35	16-24
Yumuşak ağaç	40-44	25-29	25-31
Küspe	40	30	20
Hindistan cevizi lifi	32-43	10-20	43-49
Mısır koçanı	45	35	15
Mısır sapı	35	25	35
Pamuk	95	2	1
Keten	71	21	2
Hintkeneviri	71	14	13
Buğday samanı	30	50	15
Kenevir	70	22	6
Heneguen	78	4-8	13
Kenaf	36	21	18



Şekil 1.1. Selüloz molekülünün şematik yapısı

Selülazlar fungus ve bakterileri kapsayan geniş bir mikroorganizma grubu tarafından sentezlenen enzimlerdir (Sang-Mok ve Koo, 2001). Selülaz enzimlerini üreten mikroorganizmalar aerobik veya anaerobik, mezofilik veya termofilik olabilmekte birlikte, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* ve *Aspergillus* türleri en fazla çalışılan selülaz üreticisi mikroorganizmalar olup (Sun ve Cheng, 2002; Sukumaran vd., 2005; Kuhad vd., 2010), son yıllarda *Bacillus* selülazlarının da yoğun bir şekilde çalışıldığı görülmektedir. Zira likenaz, maltaz, pektat liyaz, endoglukanaz ve ksilanaz gibi birçok selüloolitik ve hemiselüloolitik enzim üreten bakteri suşları izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Jones, 2010). Her ne kadar selülozun aerobik bakteriler ve aerobik funguslarca hidrolizinin mekanizması benzer olsa da anaerobik bakteriler farklı bir sistemle çalışmaktadır (Percival Zhang vd., 2006).

Birçok selüloolitik bakteri tarafından sentezlenerek pektin, selüloz ve hemiselülozu parçalayan selülaz enzimleri selülozomlar adı verilen multi-enzim kompleksleri şeklinde organize olmuşlardır (Bayer vd., 1994). Kâğıt, tekstil, deterjan, biyoyakıt üretimi, gıda, yem, meyve suyu ve tarım başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanım alanı bulması sebebiyle mikrobiyal selülazlar birçok akademik ve endüstriyel araştırma grupları için önemli bir araştırma materyali potansiyeli olmuştur (Kuhad vd., 2011). Selülaz enzimlerinin kullanım alanları Çizelge 1.2’de, hemiselülaz ve selülaz aktivitelerine sahip, farklı kaynaklardan izole edilmiş olan selüloolitik bakterilerin listesi ise Çizelge 1.3’de verilmiştir.

Selülaz endo-(1,4)- β -D-glukanaz (EC 3.2.1.4), ekzo-(1,4)- β -D-glukanaz (EC 3.2.1.91) ve β -glukosidaz (EC 3.2.1.21)’in dahil olduğu en az 3 grup enzimi içeren bir familyadır (Çizelge 1.4). Ekzoglukanaz selülazı uçlardan keserek β -sellobiyoz ünitelerini açığa çıkarırken, endoglukanaz enzimi molekülü içten rastgele noktalardan keserek farklı uzunluklara sahip glukan zincirlerini üretir. β -Glukosidaz enzimi ise β -sellobiyoz disakkaritini keserek son ürün olarak glukoz üretir (Percival Zhang vd., 2006). Hücre yüzeyinde bulunan selülozomlar anaerobik selülozik bakterinin substrata tutunmasına aracılık ederek çok moleküllü yeni bir organizasyon meydana getirir. Sonrasında ise selülozomal alt üniteler farklı hedef substratlarla interaksiyon yapmak üzere yeniden dağılırlar (Bayer vd., 2004).

Çizelge 1.2. Selülozların uygulama alanları (Sadhu ve Maiti, 2013)

Uygulama alanı	
Hücre duvarlarının uzaklaştırılması, ham lif	a) Hücre içeriklerinin serbest bırakılması Aroma verici maddeler, yağlar, baharatlar, polisakkaritler (agar), proteinler (tohum, yaprak)
	b) Kurutulmuş sebzelerin suyunu tekrar kazanma kabiliyetlerinin geliştirilmesi Çorba karışımları
	c) Yağlı tohum küspeleri Samanlar, arpa, masquite
	d) Bitki protoplastlarının üretimi Genetik mühendisliği
Glukoz üretimi, çözünen şekerler	a) Hayvan besleme Melas, besin değerinin artırılması, tek hücre proteini
	b) Endüstriyel ham madde Tutkallar, yapıştırıcılar, çözücüler (ethanol, büthanol, aseton vb)
	c) Fermentasyon endüstrisi için ham madde Antibiyotikler, asetik asit, sitrik asit vb.
Lignin üretimi	Yapıştırıcılar, reçineler, dolgu maddeleri, kimyasal ham materyaller
Muhtelif gıda uygulamaları	a) Hüresiz protein Yüksek verimlilik, yüksek kaliteli protein
	b) Miselyum ve hücre dışı proteinlerin ilavesi Ham lifin uzaklaştırılması, liflerin şekere dönüşümü, diğer istenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılması
	c) Proteaz üretimi
Çöplerin ve atıkların ayrıştırılması	a) Lağım suları

Çizelge 1.3. Hemiselülaz ve selülaz aktivitelerine sahip bazı bakterlerin listesi
(Jones, 2010, Yang vd., 2008)

Tür	Enzim aktivitesi	İzolasyon kaynağı
<i>B. subtilis</i>	Mannan endo-1,4- β -mannosidaz, Endo- β -1,4-mannanaz, Endo- α -1,5-arabinanaz, Endo-galaktanaz	Toprak
<i>C. thermocellum</i>	Selülaz	-
<i>St. marinus</i>	1,3- β -Glukan glukohidrolaz	Toprak
<i>B. macerans</i>	1,3-1,4- β -D-Glukan glukanohidrolaz	-
<i>Bacillus</i> sp.	1,3- β -D-Glukan glukanohidrolaz, β -1,3-1,4-glukanaz	-
<i>C. stercorearium</i>	Feruloyl esteraz, α L-arabinofuranosidaz	-
<i>B. pumilus</i>	Endo-1,4- β -ksilanaz	Toprak, ölü bitki
<i>B. brevis</i>	Endo-(1,3-1,4)- β -glukanaz (likenaz)	-
<i>B. licheniformis</i>	β -1,3-1,4-Glukanaz	-
<i>T. ethanolicus</i>	β -1,4-Ksilosidaz	-
<i>P. furiosus</i>	Ekzo- β -1,4-mannosidaz	-
<i>T. saccharolyticum</i>	α -Glukuronidaz	-
<i>E. coli</i>	α -Galaktosidaz	-
<i>B. polymyxa</i>	β -Glukosidaz	-
<i>F. succinogenes</i>	Asetil ksilan esteraz	Rumen
<i>B. fibrisolvens</i>	Ksilan 1,4- β -ksilosidaz, α -N-arabinofuranosidaz	Sığır rumeni
<i>C. cellulolyticum</i>	Selülaz, ksilan 1,4- β -ksilosidaz	Çürümüş çim
<i>C. cellulovorans</i>	Glukan 1,4- β -glukosidaz, asetil xsilanesteraz	Ağaç talaşı
<i>C. josui</i>	Selülaz	Kompost
<i>C. popyrosolvens</i>	Glukan 1,4- β -glukosidaz	Kâğıt fabrikası
<i>R. albus</i>	Selülaz, β -glukosidaz, α -N-arabinofuranosidaz	Rumen
<i>C. fimi</i>	Selülaz, endo-1,4- β -ksilanaz, glukan 1,4- β -glukosidaz, mannan endo-1,4- β -mannosidaz	Toprak
<i>C. flavigena</i>	Selülaz, endo-1,4- β -ksilanaz, β -mannosidaz	Toprak, yaprak örtüsü
<i>C. uda</i>	Endo-1,4- β -ksilanaz, ksilan 1,4- β -ksilosidaz, selüloz 1,4- β -sellobiyosidaz	Şeker kamışı tarlası
<i>C. gilvus</i>	β -Glukosidaz	Sığır dışkısı
<i>C. mixtus</i>	β -Mannosidaz, α -glukuronidaz	Toprak
<i>P. fluorescens</i>	L-Arabinoz 1-dehidrojenaz, galaktoz 1-dehidrojenaz	Toprak, su
<i>S. reticuli</i>	Selülaz	Toprak
<i>B. succinogenes</i>	1,3-1,4- β -D-Glukanaz (likenaz)	Rumen
<i>S. bovis</i>	β -(1,3-1,4)-Glukanaz (likenaz)	Rumen

Çizelge 1.4. Bakteriyel selüloz enzim sistemleri (Sadhu ve Maiti, 2013)

Enzim	E.C. numarası	Reaksiyon	Diğer isimleri	Familya
Endo-1,4 β-D-glukan-glukanohidrolaz	E.C.3.2.1.4	Değişik uzunluklarda oligosakkaritleri oluşturacak şekilde selüloz molekülünü içerden tesadüfi olarak keser. Enzim, selüloz, likenan ve tahıl β-D-glukanlarında bulunan endo-1,4-β-D-glukozidik bağlar üzerinde etkilidir.	Endoglukanaz Endo-1,4-β-glukanaz Karboksimetil selüloz β-1,4-Endoglukan hidrolaz Endoselüloz	5, 6, 7, 8, 10, 12, 44, 51, 61, 74
Ekzoglukanazlar veya 1,4-β-D-glukan sellobiyohidrolazlar (Sellobiyohidrolazlar)	E.C.3.2.1.91	Zincirlerdeki indirgen olmayan uçlardan sellobiyozu serbes bırakacak şekilde selüloz ve sellotetraozdaki 1,4-β-D-glukozidik bağların hidrolizi.	Ekzoglukanaz Ekzosellobiyohidrolaz 1,4-β-Sellobiyohidrolaz	5, 6, 7, 9, 10, 48
Ekzoglukanazlar veya 1,4-β-D-oligoglukan sellobiyohidrolazlar	E.C.3.2.1.74	Sellooligosakkaritlerden veya p-nitrofenil-β-D-sellobiyozdan sellobiyozun serbes bırakılması.	Sellodekstrinazlar	-
β-Glukosidazlar veya β-D-glukozid gluko-hidrolazlar	E.C.3.2.1.21	Terminal bölgelerdeki indirgen olmayan β-D-glukoz rezidülerinin hidrolize edilerek β-D-glukozun serbes bırakılması.	Gentabiaz Sellobiaz Amigdalaz	1, 3, 9
Sellobiyoz: Ortofosfat α-D-glukozil transferaz	E.C.2.4.1.49	Sellobiyozun dönüşümlü fosforolitik kırılmasının katalizi.	Sellobiyoz fosforilaz	-
1,4-β-D-Oligoglukan: Ortofosfat α-D-glukozil transferaz	E.C.2.4.1.20	Sellotriozdan seloheksozlara kadar değişen sellodektrinlerin dönüşümlü fosforolitik kırılmasının katalizi.	Sellodektrin fosforilaz	-
Sellobiyoz 2-epimeraz	E.C.5.1.3.11	Sellobiyozun 4-O-β-D-glukozil mannoza katalizi.	Sellobiyoz 2-epimeraz	-
Tam selüloz sistemi	-	Kristalin selülozun kapsamlı hidrolizinin katalizi.	Toplam selüloz	-

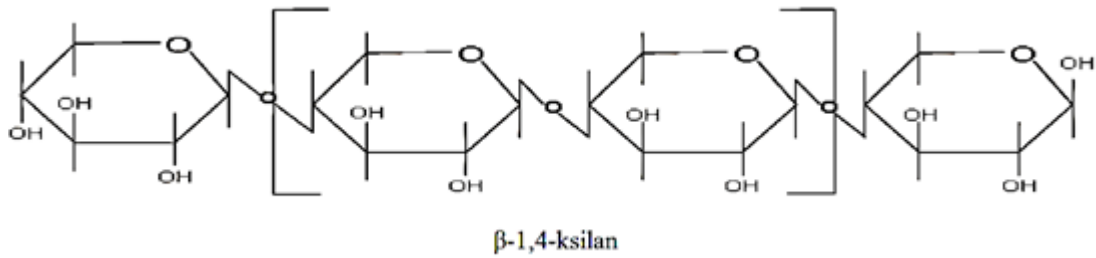
Selülaz ve hemiselülaz üreten pek çok fungus ve bakteri tanımlanmış ve kullanılmıştır. Bol miktarda selüloolitik enzim üretmeleri ve bu enzimlerin bakteriyel selülozlara göre daha az karmaşık olmaları ve ekstraksiyon-saflaştırma işlemlerinin daha kolay olması gibi sebeplerden dolayı yakın zamana kadar selülaz üretiminde funguslar bakterilere göre daha fazla tercih edilmişlerdir. Yine bu avantajlarından dolayı birçok fungal selülaz geni bakterilerde klonlanarak rekombinant enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Buna karşılık son dönemlerde bakterilerden selülaz enzimlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu oldukça yaygınlaşmıştır. Bakterilerin selülaz enzimlerinin üretiminde popüler hale gelmesinde; funguslara göre daha yüksek gelişim hızına sahip olmaları, daha yüksek miktarda rekombinant enzim üretim kabiliyetine sahip olması, yüksek fonksiyon ve sinerjili multi-enzim komplekslerine sahip olmaları, dünyada hemen her çevrede bulunmaları, termofilik, psikofilik, asidofilik, alkalifilik ve halofilik gibi her türlü ekstrem çevre şartlarına uyum sağlayabilecek şekilde özellik göstermeleri ve bu özelliklerinin endüstriyel kullanımlarda önemli bir avantaj sağlaması sayılabilir (Miranda vd., 2009). Bazı anaerobik ve aerobik selüloolitik bakterilerce üretilen selülaz enzimlerinin özellikleri Çizelge 1.5’de verilmiştir.

Çizelge 1.5. Anaerobik ve aerobik bakterilerce üretilen bazı selüloz enzimlerinin özellikleri (Sadhu ve Maiti, 2013)

Bakteriler	Enzim	Moleküler ağırlık (kDa)	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH
<i>B. licheniformis</i> 1	Endoglukanaz	-	55	6.1
<i>Bacillus</i> sp. 1139	Endoglukanaz	92	-	9.0
<i>Bacillus</i> sp. N4	Endoglukanaz cel A	54	-	5.0-11.0
	Endoglukanaz cel B	46	-	5.0-11.0
	Endoglukanaz cel C	100	-	9.0
<i>Bacillus</i> sp. KSM-522	Endoglukanaz	35	50	7.0-10.0
<i>B. subtilis</i>	Endoglukanaz	33	60	5.5
<i>B. subtilis</i> DLG	Endoglukanaz	35	55	4.8
<i>Cellulomonas uda</i>	Ekzosellobiyohidrolaz	81	45-50	5.5-6.5
<i>Cellvibrio gilvus</i> (ATCC13127)	Sellobiyoz fosforilaz	280	<40	7.6
<i>Microbispora bispora</i>	Endoglukanaz 1	44	-	5.5-7.2
	Endoglukanaz 2	57	-	5.5-7.2
	Ekzoglukanaz 1	75	-	5.9-7.2
	Ekzoglukanaz 2	95	-	5.9-7.2
	β-Glukosidaz	-	-	6.0
<i>Thermomonospora fusca</i> YX	Endoglukanaz 1	94	74	6.0
	Endoglukanaz 2	46	58	6.0
<i>Bacillus</i> sp. HSH-810	Endoglukanaz	80	40-70	10.0
<i>Thermomonospora</i> sp.	Endoglukanaz	38	50	5.0
<i>Cellulomonas</i> sp. YJ5	Endoglukanaz	43.7	60	7.0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Endoglukanaz	36	35	7.0
<i>B. subtilis</i> YJ1	Selüloz	32.5	60	6.0
<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> ATCC33288	Ekzoglukanaz C1	38	-	-
	Endoglukanaz C2	33	-	-
	Endoglukanaz C3	10.4	-	-
	β-Glukosidaz B1	81.0	-	-
<i>Alcaligenes faecalis</i>	β-Glukosidaz	100	-	-
<i>Bacteroides cellulosolvens</i> S-85	Endoglukanaz EG1	65	39	6.4
<i>Bacteroides succinogenes</i>	Endoglukanaz EG2	118	39	5.8
<i>Clostridium josui</i>	Endoglukanaz	45	60	6.8
<i>C. thermocellum</i> LQRI	Endoglukanaz I	94	62	5.2
<i>Ruminococcus albus</i> SY3	Endoglukanaz	30	-	-

1.2. Ksilan, Bakteriyel Ksilanazlar ve Uygulama Alanları

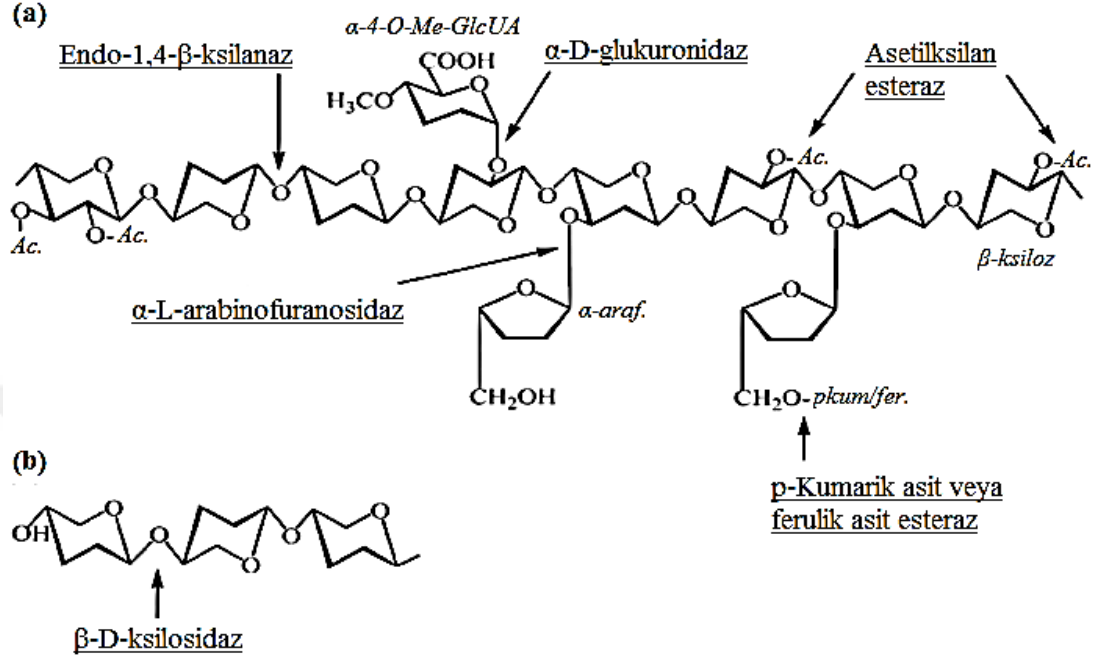
Yeryüzünde yenilenebilir organik karbonun yaklaşık üçte birini oluşturan ksilan doğada selülozdan sonra en fazla bulunan polisakkarit olup (Collins vd., 2005; Butt vd., 2008), ksilan, ksiloglukan (D-ksiloz + D-glukoz heteropolimeri), glukomannan (D-glukoz + D-mannoz heteropolimeri), galaktoglukomannan (D-galaktoz + D-glukoz + D-mannoz heteropolimeri) ve arabinogalaktan (D-galaktoz + arabinoz heteropolimeri) polimerik karbonların bir kompleksi olan hemiselülozun temel bileşenidir (Shallom ve Shoham, 2003). Ksilan polimeri β -1,4-bağlı ksilopiranozil rezidülerinden meydana gelmiş olup (Şekil 1.2), selüloz ve ligninle beraber bitki hücre duvarının temel polimerik bileşenidir (Kulkarni vd., 1999). Tahıl ksilanları bol miktarda L-arabinoz içermesi sebebiyle çoğunlukla arabinoksilan olarak da isimlendirilmektedir (Butt vd., 2008). Ksilanlarda polimerizasyon derecesi varyasyon göstermekte olup, sert odun dokularında 150-200, yumuşak odun dokularında ise 70-130 β -ksilopiranoz üniteleri bulunmaktadır (Kulkarni vd., 1999).



Şekil 1.2. Ksilanın moleküler yapısı (Butt vd., 2008)

Ksilanazlar glikosidazlar grubu enzimlerden olup, ksilan polimerlerindeki 1,4- β -D-ksilozidik bağların endohidrolizini katalizlemektedir (Collins, vd., 2005). Ksilanolitik enzim sistemi endoksilanaz (endo-1,4- β -ksilanaz, E.C.3.2.1.8), β -ksilosidaz (ksilan-1,4- β -ksilosidaz, E.C.3.2.1.37), α -glukuronidaz (α -glukosiduronaz, E.C.3.2.1.139), α -arabinofuranosidaz (α -L-arabinofuranosidaz, E.C.3.2.1.55) ve asetilksilan esteraz (E.C.3.2.1.72) enzimlerinin dâhil olduğu hidrolitik bir enzim sistemidir (Juturu ve Wu, 2011). Bu enzimler koordineli bir şekilde faaliyet göstererek ksilanı şeker ünitelerine hidroliz eder (Belancic vd., 1995). Tüm bu ksilanazlar içinde endoksilanazlar glikozidik bağları hidroliz ederek kısa

ksilooligosakkaritleri açığa çıkarması sebebiyle ayrı bir öneme sahiptir (Verma ve Satyanarayana, 2012). Ksilan polimerinin ksilanaz enzimlerince hidrolizi Şekil 1.3'de verilmiştir.



Şekil 1.3. (a) Ksilanaz enzimlerinin ksilan molekülü üzerindeki aktivite bölgeleri (Ac.: asetil grubu, α-araf.: α-arabinofuranoz, α-4-O-Me-GlcUA: α-4-O-metilglukuronik asit, pkum.: p-kumarik asit, fer.: ferulik asit). (b) Ksilooligosakkaritlerin β-ksilosidaz enziminin hidrolizi (Collins vd., 2005)

Belirli bir mikroorganizma grubu içinde bakteriler ve funguslar en önemli ksilanaz üreticileridir. Bakteri ve funguslara ilave olarak ayrıca maya, alg, protozoa, salyangoz, kabuklular, böcekler ve tohumlar gibi diğer bazı organizmalarca da üretildiği bilinmektedir (Polizeli vd. 2005). *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* ve *Rhodothermus* ksilanaz üreten bakteriler olarak rapor edilmişlerdir (Chakdar vd. 2016). Bazı bakteriyel ksilanazlar ile aktivitelerine etki eden faktörler Çizelge 1.6'da verilmiştir.

Çizelge 1.6. Bazı bakteriyel ksilanazlar ile aktivitelere etki eden faktörler (Chakdar vd., 2016)

Bakteriler	Substrat	Reaksiyon koşulları
<i>Actinomadura</i> sp. Cpt20	Yulaf kavuzu ksilanı & kayın ağacı ksilanı	80 °C, pH 10.0
<i>A. flavithermus</i> WL	Yulaf kavuzu ksilanı	65 °C, pH 7.0
<i>B. brevis</i>	Tarımsal atık (buğday samanı vb)	55 °C, pH 7.0
<i>B. halodurans</i>	Şeker kamışı melası	80 °C
<i>B. pumilus</i> SSP-34	Yulaf kavuzu ksilanı	50 °C, pH 6.0
<i>B. pumilus</i> SV-205	Buğday kepeği	60 °C, pH 10.0
<i>B. subtilis</i> BS05	Şeker kamışı küspesi	50 °C, pH 5.0
<i>Gracilibacillus</i> sp. TSCPVG	Huş ağacı odunu	pH 7.5
<i>J. denitrificans</i> BN-13	Huş ağacı odunu	50 °C, pH 7.0
<i>Kluyvera</i> sp. OM3	Huş ağacı odunu	70 °C, pH 8.0
<i>Paenibacillus</i> sp. NF1	Yulaf kavuzu ksilanı	60 °C, pH 6.0
<i>P. macerans</i> IIPSP3	Huş ağacı ksilanı	60 °C, pH 4.5
<i>Paenibacillus</i> sp. N1	Reese medyumunu	50 °C, pH 9.0
<i>Providencia</i> sp. XI	Buğday kepeği	60 °C, pH 9.0
<i>S. maltophilia</i>	Buğday kepeği	80 °C, pH 9.0
<i>T. calidifontis</i> sp. nov.	Yulaf kavuzu ksilanı	50-55°C, pH 7.0

Bakteriler arasında *Bacillus*'lar potansiyel ksilanaz üreticileri olup, *B. stearothermophilus*, *B. circulans*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. halodurans* ve *B. pumilus* öne çıkan ksilanolitik *Bacillus*'lardır.

Birçok bakteriyel ksilanazlar alkali ve/veya termostabil olup selüloz üzerine etkili değildirler. Bu özellikleri bakteriyel ksilanaz enzimlerini endüstriyel uygulamalar için ideal bir aday yapmaktadır (Chakdar vd., 2016). Ksilanazlar kâğıt hamuru ve kâğıt endüstrisi, atık kâğıtların mürekkepten arındırılması, hayvan yemleme, silajın iyileştirilmesi, fırıncılık endüstrisi (ekmek hacminin artırılması), biyoyakıt üretimi, ilaç endüstrisi, meyve sularının ve biranın berraklaştırılması, odunların ilk işleme esnasında kabuklarından arındırılması (pektinaz ile birlikte), atık sularda bulunan ksilan polimerlerinin ksiloz alt birimlere dönüştürülmesi ve moleküler biyolojide ksilanaz enzimlerini kodlayan genlerinin klonlanması gibi pek çok farklı endüstriyel

alanlarda kullanılmaktadır (Sharma ve Kumar, 2013). Ksilanazların endüstriyel alanlarda bu kadar yaygın kullanımı, bu enzimlerin ticari üretimlerinin de önünü açmıştır. Ticari olarak geliştirilen bazı bakteriyel ksilanaz enzimleri ve bu enzimlerin kullanım alanları Çizelge 1.7’de verilmiştir.

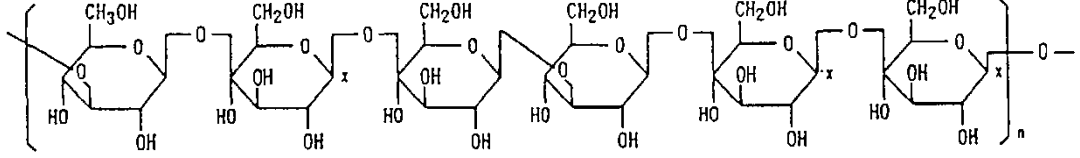
Çizelge 1.7. Bazı ticari bakteriyel ksilanazlar ve uygulama alanları (Chakdar vd., 2016)

Ürün	Şirket	Kaynak	Uygulama alanı
Propan BXC	Aumgene Biosciences, Hindistan	Bakteri	Fırıncılık
Bleachzyme F	Biocon India, Bangalore	-	Kâğıt hamurunun beyazlaştırılması
Pulpzyme HA, HB, HC	Novozymes, Danimarka	<i>Bacillus</i> sp.	Selüloz ve kâğıt endüstrisi
Panzea	Novozymes, Danimarka	<i>B. licheniformis</i>	Fırıncılık
Luminase	Verenium	Termal kaynaktan izole edilen bakteri	Kâğıt hamurunun beyazlaştırılması
Belfeed B1100	Agrimex, Belçika	Bakteri	Yem katkısı
Nuti Xylanase Enzyme	Ultra Biologics Inc., ABD	<i>B. subtilis</i>	Yem katkısı
Bacterial Xylanase XBK BX9	Leveking, Çin	Bakteri	Fırıncılık
Xylanase (bacterial)	Biovet JSC, Bulgaristan	<i>B. subtilis</i>	Fırıncılık, kâğıt ve kâğıt hamuru endüstrisi, yem katkısı
Cartazyme HS	Sandoz, Birleşik Krallık	<i>T. fusca</i>	-

1.3. Likenan, Bakteriyel Likenazlar ve Uygulama Alanları

β -1,3–1,4-Glukanlar (likenan), yulaf, pirinç, buğday, çavdar, arpa ve sorgum gibi tahılların endosperm hücre duvarında bulunan lineer yapıda polisakkarit olup (Şekil 1.4) (Kim vd., 2014), danelerin kuru ağırlığının %5.5’inden fazlasını meydana getirmekle birlikte (Yang vd., 2008), arpa endospermünde bulunan karbonhidrat içeriğinin de %75’ini oluşturmaktadır (McCleary, 1988). Tahılların hücre duvarı yapısında bulunan birçok β -1,3-1,4-glukan %30 oranında β -(1,3)- ve %70 oranında

β -(1,4)-glikozil bağı bileşimine sahiptir (Yoo vd., 2007). Arpa ve yulafın yapısında bulunan likenanın %15'inde ana zincirde bulunan çok sayıda β -1,4 bağı bir adet β -1,3 bağı izlerken, geriye kalan %85'inde ise ana zincirdeki iki veya üç adet β -1,4 bağı bir adet β -1,3 yan zinciri takip etmektedir (Classen ve Bedford, 1991).



Şekil 1.4. Likenan molekülünün şematik modeli

β -1,3-1,4-glukanların hidrolizinden sorumlu enzimler olan endoglukanazlar dört temel kategori altında toplanabilir: a) β -1,4-glikozidik bağları kuvvetli bir şekilde kırarak glikoz rezidülerini açığa çıkaran, buna karşılık β -1,4-glukanlara karşı etkisiz kalan ve gerçek likenazlar olarak da bilinen β -1,3-1,4-D-glukanazlar (β -1,3-1,4-D-glukan-4-glukanohidrolaz, likenaz, EC 3.2.1.73), b) β -1,4-glikozidik bağları hidroliz eden endo- β -1,4-D-glukanaz (endoselülaz, EC 3.2.1.4), c) β -1,3-1,4-D-glukan ile β -1,3-D-glukanlar üzerine etkili olan β -1,3(4)-D-glukanaz (EC 3.2.1.6), d) β -1,3-D-glukanaz (β -1,3-glukan-3-glukanohidrolaz, laminarinaz, EC 3.2.1.39). Bunların arasından β -1,3-1,4-glukanazlar bira üretimi ve hayvan yemi sektöründeki kullanımından dolayı ayrıca biyoteknolojik bir öneme sahiptir (Beckmann vd., 2006).

Likenazlar özellikle β -glukanın glukopiranoz ünitelerindeki β -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek çoğunlukla son ürün olarak sellobiyosiltroz ve sellotriosiltetraoz açığa çıkarırken (Anderson ve Stone, 1975), selülaz (EC 3.2.1.4), laminarinaz (EC 3.2.1.39) ve β -1,3(4)-glukanaz (EC 3.2.1.6) β -D-glukanlardaki sırasıyla 1,4-bağların, 1,3-bağların ve 1,3- veya 1,4-bağlarının endohidrolizini katalizlerler (Kim vd., 2014).

Bacillus'lar, rumen bakterileri ve bitkisel dokular tarafından sentezlenen birçok likenaz enzimi tanımlanmıştır. Ayrıca *Orpinomyces* sp., *Talaromyces emersonii*, *Cochliobolus carbonum*, *Aspergillus japonicus*, *Rhizopus microsporus* var.

microsporus ve *Trichoderma koningii*'nin de aralarında bulunduğu bazı funguslara ait ekstraselüler likenaz enzimleri de saflaştırılmıştır (Beckmann vd. 2006). *Bacillus* türlerinden *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. macerans*, *B. brevis*, *B. polymyxa*, *B. circulans*, *B. licheniformis* ve alkalifilik *Bacillus* sp. N137 bakterilerine ait likenaz genlerinin klonlanarak karakterize edildikleri bildirilmiştir (Aşan Özüsağlam, 2007).

Likenaz enzimleri bira üretiminde, yüksek moleküler ağırlığa sahip β -glukandan kaynaklanan viskozitenin ve bulanıklığın azaltılması için kullanılmaktadır (Planas, 2000). Bu işlem, amilaz enzimlerinin endosperm hücrelerinde bulunan nişastaya kolayca ulaşarak daha etkin bir hidrolizasyonun gerçekleşmesi açısından önemlidir (Gözükara, 2009). Diğer taraftan likenaz enzimleri özellikle kanatlı beslenmesinde arpa içeren yemlerin sindirilebilirliğinin artırılması için de kullanılmaktadır (Beckmann vd., 2006). Ayrıca kanatlı beslenmesinde likenaz enzimlerinin kullanımı yapışkan-dışkı (sticky dropping) sorununu azaltmaktadır (White vd., 1983). Son olarak likenazlar deterjan üretiminde β -glukan kaynaklı lekelerin uzaklaştırılması amacıyla da kullanılmaktadır (Chaari vd., 2012a).

1.4. Amaç

Çalışmanın amacı, selülozom kompleki içinde yer alan enzimleri üreten bakterilerin izolasyonu, enzimlerin kısmi karakterizasyonu ve hayvancılık sektöründe kullanılabilme potansiyellerinin belirlenmesidir.

1.5. Kapsam

Çalışmanın kapsamı aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Belirli bölgelerden toplanan toprak numunelerinin sterilize edilmiş kaplarda laboratuvara taşınması.
2. Toprak numunelerinin 80 °C'de 10 dk süreyle inkübe edilerek vejetatif hücrelerin öldürülmesi (pastörizasyon).

3. Pastörize edilmiş toprak numunelerinden bir miktar alınarak LB besiyerine aktarılması ve bakteri sporlarının aerobik ortamda çimlendirilmesi.
4. Çimlenme ile vejetatif forma dönüşmüş olan bakterilerin LB-agar plaklarında koloni oluşturmalarının sağlanması.
5. Bu bakterileri uygun substratlar (CMC, ksilan, likenan) içeren besi ortamlarında üreterek, CMCaz, ksilanaz ve likenaz aktivitelerine sahip izolatların belirlenmesi.
6. Bakterilerce üretilen enzimlerin laboratuvar ortamında kısmi karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Shikata vd. (1990), deterjan ürünlerinde kullanılabilir alkalik selüloz enzimlerini içeren üç adet alkalifilik *Bacillus* suşunu (KSM-19, KSM-64 ve KSM-520) izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar her üç enzimin de sürfaktanlar, şelat ajanları ve proteinaz gibi bazı deterjan katkı maddeleri ile metal iyonlarınca inhibe edilmediklerini, enzim preparasyonlarının 8.5-9.5 pH aralığı ile 50 °C sıcaklık değerinde CMC'ye karşı güçlü aktivite gösterdiklerini de bildirmişlerdir. Araştırmacılar son olarak KSM-19 ve KSM-64 suşlarının alkalik likenaz enzimleri ürettiklerini de bildirmişlerdir.

Flint vd. (1993), *Ruminococcus flavefaciens* 15 bakterisinin DNA'sında birbirine komşu iki bölgenin ksilanaz ve likenaz enzimlerini kodladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar sekansladıkları bu bölgelerin kodladığı enzimlerin aktivitelerinin 2.406 bç'nden oluşan tek bir gen tarafından şifrelendiğini de bildirmişlerdir.

Wolf vd. (1995), *B. subtilis* 168 kromozomal DNA'sından ksilanaz enzimini kodlayan geni (*xynA*) PCR ile amplifiye etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca aynı bakterinin genomundan endo-beta-1,4-glukanaz (*egls*) ve endo-beta-1,3-1,4-glukanaz (*bglS*) genlerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar son olarak *xynA* ve *egls* genlerinin *B. subtilis* PAP115 bakteri genomunda bulunan ksilanaz ve selüloz genleri ile identik olduklarını da bildirmişlerdir.

Tseng vd. (2002), *Bacillus firmus* bakterisinden jel-filtrasyon ve iyon-değişim kromatografi yöntemleriyle iki adet ksilanaz enzimini saflaştırmışlardır. Araştırmacılar enzimlerin moleküler ağırlıklarını 45 ve 23 kDa, her iki enzimin de 5.0-11.0 pH aralığında ve 37 °C'de aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzimlerin huş ağacı ksilanını hidroliz ederek ksiloz, ksilotrioz ve ksiloheksozu serbest bıraktıklarını bildirmişlerdir.

Ozcan vd. (2011), sıcak su kaynağından izole ettikleri alkalifil ve termofil *Bacillus* sp. DM-15 bakterisi tarafından 60-70 °C sıcaklık ve 6.5 pH koşullarında optimum aktivite gösteren, 95.6 kDa moleküler ağırlığına sahip, sıcaklığa dirençli bir ksilanaz

enzimi ürettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar izolatın en yüksek enzim üretim seviyesine $192.8 \mu\text{mol mg}^{-1}$ protein/dk değeri ile bakterinin inokülasyonundan itibaren 36. saatte ulaştığını, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15 dk ön inkübasyon ile tamamen stabil kaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzim aktivitesinin CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , MgCl_2 ve KCl ile stimüle edildiğini, buna karşılık EDTA, HgCl_2 , FeSO_4 , SDS, MnCl_2 ve Triton X-100 ile inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Bai vd. (2012), selüloz üreten 9 adet bakteriyi sığır dışkısından izole etmişler, bu bakterilerden bir tanesini ileri araştırmalar için tercih etmişlerdir. Araştırmacılar seçtikleri izolatı (CEL PTK1) 16S rDNA ve BLAST analizlerine göre *Bacillus subtilis* olarak tanımlamışlardır. CEL PTK1 izolatınca maksimum selüloz üretiminin inokülasyondan itibaren 72. saatte (30.33 U/ml), en yüksek selüloz aktivitesinin ise $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (32.48 U/ml) ve 7.0 pH 'da (31.87 U/ml) gerçekleştiği de bildirilmiştir.

Chaari vd. (2012a), *B. licheniformis* UEB CF bakterisinden sıcaklık ve alkali dirençli iki adet likenaz enzimini (EG1 ve EG2) saflaştırmışlardır. Araştırmacılar EG1 ve EG2 enzimlerinin moleküler ağırlıklarının sırasıyla 30 ve 55 kDa, optimum sıcaklık ve pH değerlerinin ise $70 \text{ }^\circ\text{C}$ ile 5.0, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ ile 7.0 olduğunu bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar her iki enzimin de arpa β -glukan ve likenanını hidrolize edebilirken CMC ve laminarin substratlarını hidrolize edemediğini, non-iyonik sürfaktanlara, oksitleyici ajanlara ve birçok ticari deterjanlara karşı dirençli olan enzimlerin bu özellikleri dolayısıyla deterjan endüstrisi için oldukça uygun olduklarını bildirmişlerdir.

Chaari vd. (2012b), Tunus'un güneyinden arpa unu içeren agar plağında Kongo-kırmızısı boyaması sonucunda büyük bir likenaz aktivite zonu veren ve 16S rDNA sekans verilerine göre *Bacillus licheniformis* olarak tanımladıkları UEB CF bakterisini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bakterinin kuru substrat üzerinde 280 U/g enzim ürettiğini de belirlemişlerdir.

Gözükara ve Arkan (2012), izole ettikleri termofilik *Bacillus* sp. suşlarına ait likenaz enzimlerinin optimum sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ve 6.0 olduğunu, enzimin 24 saat süresince $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de ve 3.0-6.0 pH aralığında ortalama %88 kalan

aktivite gösterdiğini ve son olarak enzimlerin bu özellikleri ile tavuk yemlerinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kamble ve Jadhav (2012), *Bacillus arseniciselenatis* DSM 15340 ile benzer olan ve ekstraselüler ksilanaz üreten termoalkalifilik bir *Bacillus* türünü çalışmışlardır. Araştırmacılar saflaştırdıkları ksilanazın moleküler ağırlığını 29.8 kDa olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık değerlerini sırasıyla 8.0 ve 50 °C olarak belirlemişlerdir. Son olarak araştırmacılar enzimin huş ağacı ksilanı üzerinde aktif olduğunu, *p*-nitrofenil ksilopiranosid üzerinde çok az aktif olduğunu, buna karşılık avisel, CMC, sellobiyoz ve nişasta üzerinde ise hiçbir etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir.

Kim vd. (2012), Güney Kore'nin Jeju adasında bulunan tarımsal alandan izole ettikleri yüzlerce selülitik bakteri arasından SL9-9, C5-16 ve S52-2 izolatlarını yüksek CMCaz üreticisi olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu izolatları fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal ve 16S rRNA gen analizlerine göre *Bacillus subtilis* olarak tanımlamışlardır. Son olarak araştırmacılar her üç izolatu da CMCaz, aviselaz, β -glukosidaz ve ksilanaz enzimlerini ürettiklerini bildirmişlerdir.

Verma vd. (2012), izole ettikleri termofilik *Bacillus* tarafından selülaz üretiminin en yüksek seviyesine inokülasyondan itibaren 48. saatte ve 45 °C'de ulaştığını, enzim aktivasyonu için optimum pH aralığının ise 6.5-7.5 olduğunu bildirmişlerdir.

Vijayaraghavan ve Vincent (2012), *Bacillus* sp. olarak tanımladıkları ve karboksimetil selülozu hidrolize eden bir mikroorganizmayı çeltik tarlasından izole etmişlerdir. Araştırmacılar bakterinin selülazı optimum olarak 6.5 pH değerinde, 37 °C'de ve 150 rpm çalkalama hızında ürettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar 14.5 kat saflaştırdıkları selülazın spesifik aktivitesinin 246 U/mg protein, moleküler ağırlığının 58 kDa, optimum aktivitesinin 50 °C, optimum pH değerininin 6.0 olduğunu, enzimin 5.0-7.0 pH aralığında ve 50 °C'de 30 dk inkübasyon sonucunda stabil kaldığını, Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^{2+} ve Ca^{2+} tarafından inhibe edildiğini de bildirmişlerdir.

Sadhu vd. (2013), inek dışkılarından izole ettikleri bakteriyi 16 rDNA analizine göre *Bacillus* olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar farklı tarımsal atıklar, kâğıt atıkları ve CMC içeren ortamlarda izolatu test ederek belirledikleri %8 CMCaz üretiminin, enzimin saflaştırılmasından sonra 8.5 kat artarak %68.1'e yükseldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar moleküler ağırlığını 97 kDa olarak belirledikleri enzimin aktivitesinin SDS, Tween-80, MnCl₂, ZnCl₂ ve EDTA tarafından azaldığını bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar enzimin 5.0-9.0 pH aralığı ile 20-70 °C sıcaklık aralığında stabil kaldığını, optimum üretim için ise sıcaklık ve pH değerlerinin sırasıyla 50 °C ve 7.0 olduğunu bildirmişlerdir.

Seo vd. (2013), selüloolitik ve hemiselüloolitik enzimleri üreten bakteriyi yerli Kore keçisinin rumeninden izole etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları biyokimyasal ve morfolojik karakteristikler ile 16S rDNA analizine göre *Bacillus licheniformis* olarak tanımladıkları bakteriyi *B. licheniformis* JK7 olarak isimlendirmişlerdir. Bakterinin endoglukanaz aktivitesinin β-glukosidaz ve ksilanaz aktivitelerinden tüm sıcaklık değerlerinde daha yüksek olduğu ve üç enzim içinde ksilanaz aktivitesinin en düşük olduğu da bildirilmiştir. Araştırmacılar optimum aktivite için sıcaklık değerlerinin endoglukanaz için 70 °C, β-glukosidaz ve ksilanaz için ise 50 °C olduğunu, her üç enzimin de 20-50 °C'ler arasında oldukça stabil kaldığını, optimum aktivite için pH değerinin her üç enzim için 5.0 ve yine her üç enzimin de 3.0-6.0 pH arasında stabil kaldıklarını bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar endoglukanaz aktivitesinin K⁺ ile artarken, β-glukosidaz aktivitesinin K⁺, Zn⁺ ve tween 20 tarafından arttığını bildirmişlerdir.

Singh vd. (2013), karboksimetil selülaz üreten, 16S rDNA ve Giraz A gen sekansı analizlerine göre *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tanımladıkları ve *Bacillus amyloliquefaciens* SS35 olarak isimlendirdikleri bakteriyi gergedan gübresinden izole etmişlerdir.

Ammoneh vd. (2014), izole ettikleri 15 adet ksilanolitik bakteriden 3 adet basili (SY30A, SY185C ve SY190E) yüksek ksilanaz aktivitelerini gözönünde bulundurarak ileri araştırmalar için belirlemişlerdir. Araştırmacılar 16S rDNA analizlerine göre SY30A'nın *Bacillus pumilus*, SY185C ve SY190E'nin ise *Bacillus*

subtilis'e yakın olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar son olarak ksilanaz aktiviteleri için optimum pH ve sıcaklık değerlerinin SY30A için 7.0 ve 55 °C, SY185C ve SY190E için 6.0 ve 60 °C olduğunu, spesifik aktivitelerinin ise SY30A, SY185C ve SY190E ksilanazları için sırasıyla 1157, 915 ve 794 U/g olduğunu bildirmişlerdir.

Behera vd. (2014), Hindistan'da Mahanadi nehri deltasında yetişen sakızağacı topraklarından selülaz enzimi üreten bakterilerin izolasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar izole ettikleri toplam 15 adet selüloolitik bakterinin maksimum karboksimetil selülaz aktivitelerinin (HC değeri) 1.18-2.5 cm arasında değiştiğini, enzim aktivitelerinin ise 2.471-98.253 U/ml/dk aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar morfolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda bakterilerin *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. ve *Brucella* spp. olduğunu da bildirmişlerdir.

Kim vd. (2014), toprak metagenomik kütüphanesinde bulunan ve likenaz enzimini kodlayan geni (mt-lic) tanımlamışlardır. Araştırmacılar enzimin aminoasit sekansının *B. circulans* WL-12 suşu genomunda bulunan *bgc* geninin kodladığı endo- β -1,3-1,4-glukanaz enziminin aminoasit sekansı ile yüksek homoloji benzerliği gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar *E. coli*'de klonladıkları genin bu konukçu bakteride yüksek ekspresyon seviyesi gösterdiğini, enzimin β -glukan ve likenanı hidroliz ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar son olarak enzimin maksimum aktivitesini 50 °C ve 6.0 pH'da gösterdiğini, aktivitenin Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} ve Fe^{2+} ile stimüle edildiğini, fakat Cu^{2+} ve Zn^{2+} ile inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Meng vd. (2014), selülaz aktivitesine sahip *Bacillus subtilis* BY-3 suşunu Tibet domuzu dışkısından izole etmişlerdir. Araştırmacılar bakterinin maksimum selülaz üretimini substrat olarak mısır koçanı kullanıldığında ve 24. saatte gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar optimum enzim aktivitesinin 5.5 pH ve 60 °C sıcaklık değerlerinde gerçekleştiğini, 60 °C'de 60 dk ön inkübasyon sonucunda en iyi stabiliteye sahip olduğunu, son olarak selülaz enziminin tarımsal atıkların biyoyakıt dönüşümünde ekonomik bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Gaur ve Tiwari (2015), sıcaklık ve solvante toleranslı selüloz üreten bakteri izolasyonu yapmışlardır. Araştırmacılar 16S rDNA analizine göre *Bacillus vallismortis* olarak belirledikleri bakteriyi *Bacillus vallismortis* RG-07 olarak isimlendirmişlerdir. Maksimum selüloz üretiminin, tarımsal atıkların karbon kaynağı olarak kullanıldığı durumlarda 4105 U ml⁻¹, moleküler ağırlığının ise SDS-PAGE ve aktivite jelde 80 kDa olarak belirlendiği bildirilmiştir. Araştırmacılar enzimin optimum aktivite gösterdiği pH ve sıcaklık değerlerinin 7.0 ve 65 °C olduğunu, 9.0 pH ve 95 °C sıcaklık koşullarında aktivitesini sırasıyla %75 ve 95 oranlarında koruduğunu bildirmişlerdir. Son olarak araştırmacılar enzimin %30 solvent (n-dodecane, iso-octane, n-decane, xylene, toluene, n-hexane, n-butanol ve cyclohexane) içeren ortamda 7 gün süreyle inkübe edildiğinde aktivitesinde yükselme meydana geldiğini, buna karşılık Ca²⁺, merkaptoethanol, Tween-60 ve sodyum hipoklorid tarafından stimüle edildiğini, Hg tarafından ise kuvvetli bir şekilde inhibe edildiğini bildirmişlerdir.

Ladeira vd. (2015), izole ettikleri *Bacillus* sp. tarafından maksimum aviselaz (0.83 U mL⁻¹) ve CMCaz (0.29 U mL⁻¹) aktivitelerine kültüre alınmalarından itibaren sırasıyla 120. ve 168. saatlerde ulaştıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar aviselaz ve CMCaz aktiviteleri için pH optimumunun sırasıyla 7.5 ve 8.0 olduğunu, optimum sıcaklık değerinin ise her iki enzim için de 70 °C olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca maksimum stabilitenin aviselaz ve CMCaz için sırasıyla 6.5-8.0 ve 7.0-9.0 pH aralıklarında gerçekleştiğini, her iki enzimin de 60 °C'de 1 saat inkübasyon sonucunda aktivitesini %100 koruduğunu bildirmişlerdir.

Lugani vd. (2015), yaptıkları çalışmada selüloz üreten 20 adet bakteri izole etmişler, bu izolatlar içinden en iyi enzim üreten suş olarak *Bacillus* sp. Y3'ü ileri çalışmalar için belirlemişlerdir. Araştırmacılar *Bacillus* sp. Y3 tarafından üretilen FPaz ve CMCaz enzimlerinin maksimum aktivite düzeylerinin %1 oranlarında CMC ve pepton içeren besi ortamında, 37 °C'de, 96 saat süreyle ve 120 rpm çalkalama hızında sırasıyla 6.84 ve 7.82 IU/mL olduğunu, bu değerlerin optimizasyondan önce ise yine aynı sırayla 1.97 ve 2.48 IU/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Maktouf vd. (2015), sıcaklığa oldukça dirençli ve alkalın karakterli likenaz enzimini izole ettikleri *Bacillus* sp. UEB-S bakterisinden izole etmişlerdir. 28 kDa moleküler ağırlığa sahip enzimin 6.0 pH ve 60 °C değerlerinde optimum aktivite gösterdiğini

bildiren araştışıcılar ilave olarak 90 °C’de 30 dk süreyle ön inkübasyona bırakılan enzimin %60 kalan aktivite gösterdiğini ve enzimin oldukça geniş bir pH ve sıcaklık stabilitesine sahip olduğunu, ilgili genin sekansı ile *B. subtilis* 168 suşuna ait likenaz geninin sekansının %98 oranında benzerlik gösterdiğini de bildirmişlerdir.

Padilha vd. (2015), termofilik bir suş olan *Bacillus* sp. C1AC5507 tarafından üretilen selüloz enziminin üretim ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. Araştışıcılar CMCaz enziminin moleküler ağırlığının 55 kDa olduğunu, spesifik aktivitesinin ise 0.14-0.37 IU mL⁻¹ arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Son olarak araştışıcılar enzim üretimi için optimum sıcaklık ve pH koşullarının sırasıyla 70 °C ve 7.0 olduğunu, enzimin Cu⁺² tarafından inhibe edilirken Co⁺², Mn⁺², Ca⁺² ve Fe⁺³ tarafından aktive edildiğini bildirmişlerdir.

Azadian vd. (2016), CMCaz enzimini üreten ve 16S rRNA analizine göre *B. licheniformis* olarak tanımladıkları AMF-07 suşunu Kerman sıcak su kaynağından izole etmişlerdir. Araştışıcılar enzimin moleküler ağırlığını SDS-PAGE’de 37 kDa olarak belirlemişlerdir. Ayrıca araştışıcılar enzimin 40-80 °C sıcaklık aralığı, 6.0-10.0 pH aralığı ve %10-25 NaCl konsantrasyon aralığında oldukça aktif ve stabil olduğunu, optimum aktivitenin ise 70 °C, pH 9.0 ve %20 NaCl koşullarında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Son olarak araştışıcılar enzimin sikloheksan (%134) ve kloroform (%120) varlığında yüksek aktivite gösterdiğini de bildirmişlerdir.

Kiio vd. (2016), Kenya’da Rift vadisinden topladıkları toprak örneklerinden selüloolitik bakterileri %1 CMC içeren minimal ortamda belirlemişlerdir. Araştışıcılar filogenetik analizler sonucunda izolatların *Bacillus licheniformis* olduğunu ve tüm izolatların CMC, avisel ve sellobiyozu hidrolize etme yeteneğinde olduklarını bildirmişlerdir. Araştışıcıların ileri araştışmalar için izolatlar içinden belirledikleri *B. licheniformis* vic suşunun sellobiyohidrolaz, avisel ve CMC hidrolazları için spesifik enzim aktivitelerinin sırasıyla 0.46878, 0.18784 ve 0.13571 U/mg olduğu bildirilmiştir. Araştışıcılar ayrıca optimum enzim aktivitesinin 60 °C sıcaklık ve 5.0 pH koşullarında gerçekleştiğini, bu özellikleri ile enzimin endüstriyel kullanım için oldukça cazip hale geldiğini de bildirmişlerdir.

Elgharbi vd. (2017), izolasyonunu gerçekleştirdikleri *B. pumilus* US570 bakterisinden β -1,3-1,4-glukanaz (GluUS570) enzimini saflaştırmışlardır. Araştırcılar geniş bir sıcaklık ve pH aralığına sahip olduğunu, 80 °C’de 30 dk ön inkübasyon sonucunda yüksek kararlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırcılar 732 bç uzunluğunda olan genin kodladığı enzimin 243 aminoasitten meydana geldiğini ve 75 kDa ağırlılığında olduğunu, *B. licheniformis* tarafından üretilen likenaz enzimi ile %97 oranında sekans benzerliği gösterdiğini de bildirmişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri Materyali

Bacillus sp. CS8 bakterisi, bu tez çalışması kapsamında, Adana ili Seyhan ilçesi sınırları içinde bulunan bir seraya ait toprak numunelerinden izole edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan tüm kimyasal ve diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Merck, Sigma-Aldrich, Fluka, Ambresco, Brand, Axygen, Eppendorf, İsolab ve Fırat Plastik'ten temin edilmiştir.

3.1.3. Besi Ortamları

Bakterinin üretilmesinde LB besiyeri (10 g/l tryptone, 5 g/l maya ekstraktı, 10 g/l NaCl, pH: 7.5) kullanılmıştır. Katı besiyeri için LB sıvı besiyerine 15 g/l agar ilave edilmiştir. Bakterilerin CMCaz, ksilanaz ve likenaz aktivitelerinin belirlenmesinde LB-agar besiyerine sırasıyla CMC (%0.1), ksilan (%0.1) ve likenan (%0.1) substrat olarak ilave edilmişlerdir. Bütün besiyerleri 121 °C'de 15 dk süreyle otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

3.1.4. Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar (inkübatör (Nüve), su banyosu (Memmert), santrifüj (Hettich), vorteks (Ika), manyetik karıştırıcı (Ika), otoklav (Hirayama), pH metre (Hanna), çalkalayıcı (Ika), saf su cihazı (Labor Şimşek), buzdolabı (Arçelik)) çalışmanın yapıldığı OKÜ Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda mevcut bulunmaktadır (Şekil 3.1). Spektrofotometre (Pharmacia) ise Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü

Hayvansal Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü laboratuvardan bir görüntü

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Bacillus sp. CS8 bakterisinin izolasyonu aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Adana ili sınırları içerisinde bulunan bir seradan alınan toprak numunesi steril kap içerisinde laboratuvara taşınmıştır.
2. 1 g tartılarak alınan toprak numunesi 10 ml hacmindeki steril saf su ile karıştırılmış ve böylece bakteri sporlarının suya geçmeleri sağlanmıştır.

3. Toprak tortusunun çökmesi için numune 20 dk dinlendirilmiştir. Dinlendirme sonrasında sıvı üstnkısından 200 µl alınmış ve 1.5 ml hacimli steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
4. Alınan numune, vejetatif formdaki bakterilerin ölmesi için 80 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dk bekletilmiştir (Şekil 3.2).
5. Pastörize edilen numune steril mikropipetlerle 25 ml hacimli LB sıvı besiyerine aktarılmış ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde orta çalkalama hızında ertesi güne kadar inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3).
6. Besi yerinde üremiş olan bakteri kültüründen 1'er ml alınarak seri sulandırma yapılmış ve 10^{-3} ile 10^{-4} oranlarında sulandırılmış örneklerden 100'er µl alınarak LB agar besiyerlerine cam çubukla yayma yöntemiyle ekilmişlerdir.
7. Bakterilerin ekimini takiben plaklar steril kabin içerisinde kapakları açık vaziyette 15 dk süreyle kurutulmuş ve sonrasında 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilmişlerdir.
8. Koloni gelişimi tamamlanan plaklardan farklı morfolojik özelliklere sahip koloniler belirlenerek steril kürdanlarla numaralandırılmış LB-agar plaklarına ekimleri yapılmış ve tekrar 37 °C'ye ayarlanmış inkübatöre kaldırılarak koloni oluşturmaları sağlanmıştır.
9. Plaklarda gelişen koloniler daha sonra enzim aktiviteleri belirlenmek üzere +4 °C'ye kaldırılmışlardır.



Şekil 3.2. Toprak numunelerinde bulunan vejetatif bakterilerin pastörizasyonu



Şekil 3.3. *Bacillus* sporlarının LB besiyerinde çimlendirilmesi

3.2.2. İzolatlarda Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

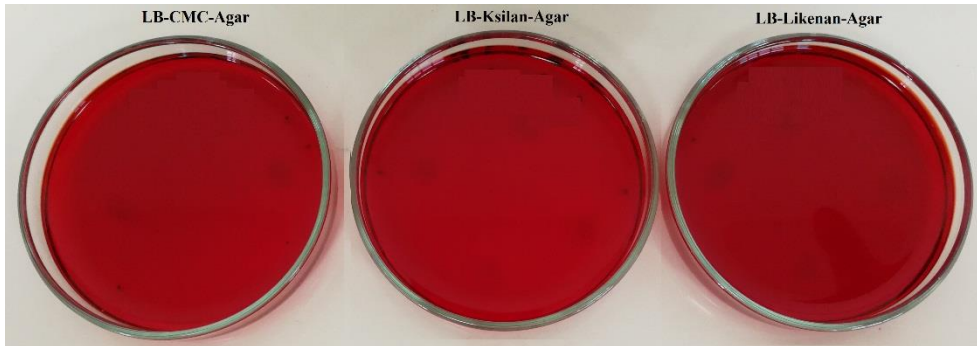
1. İzolatlar steril kürdanlarla alınarak ayrı ayrı olacak şekilde sırasıyla daha önce cam yazar kalemle numaralandırılmış CMC, ksilan ve likenan içeren LB agar besiyerlerine her biri ikişer kopya olacak şekilde ekilmişlerdir.

2. Ekimleri tamamlanan plaklar ters çevrilerek 37 °C’de 12 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır (Şekil 3.4).
3. Ertesi gün plaklardan birer tanesi alınarak boyama işlemine geçilmiştir. Diğer kopyalar ise seçilmiş izolatları kullanmak üzere +4 °C’ye kaldırılarak muhafaza altına alınmışlardır.
4. Boyanmak üzere alınan plakların üzerine bakteri kolonilerini tamamen örtecek şekilde Kongo-kırmızısı boyası (%0.2 w/v Kongo-kırmızısı) dökülerek 15 dk oda sıcaklığında bekletilmişlerdir (Şekil 3.5).
5. Süre sonunda plaklardan boya solüsyonu alınarak bu sefer bakterilerin üzerine fazla boyanın uzaklaştırılması amacıyla NaCl (1 M) solüsyonu eklenmiş ve tekrar oda sıcaklığında 15 dk süreyle bekletilmişlerdir.
6. Süre sonunda NaCl solüsyonu plaklardan uzaklaştırılmış ve plaklar negatoskop üzerine alınarak incelenmiştir.
7. Her üç plakta da (CMC, ksilan ve likenan içeren agar plakları) kırmızıya boyanmış zeminde etrafında sarımsı zon bulunan bakteriler sırasıyla CMCaz, ksilanaz ve likenaz pozitif bakteriler olarak belirlenmişlerdir.
8. CMCaz, ksilanaz ve likenaz pozitif olan izolatların plak numaraları belirlenerek, boyanmamış olan plaktan aynı numarayı taşıyan eşleri alınmış ve sıvı besiyerinde daha önce belirtildiği şekilde üretilmişlerdir.
9. Her bir izolatın steril öze yardımıyla sıvı besiyerinden LB-agar plaklarına ekimleri yapılarak 37 °C’de koloni oluşturmaları sağlanmıştır.
10. Koloni gelişimi tamamlanan plaklar etiketlenerek ileri çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza altına alınmışlardır.

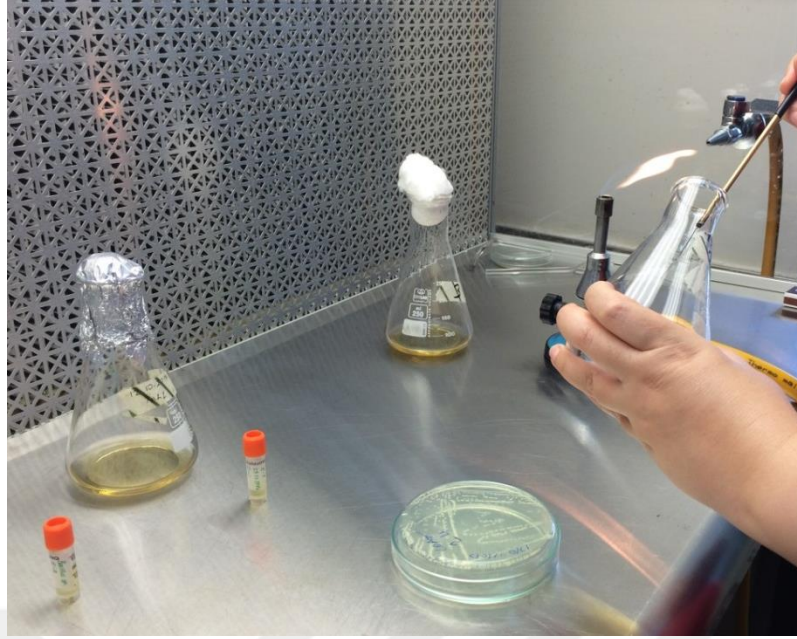
11. Bakterilerin gliserol stoklarını almak için vida kapaklı ve 2 ml hacimli cryo tüplere 200'er µl gliserol konmuş, ağzı kapatılan tüpler otoklavda 121 °C'de 15 dk süreyle sterilize edilmişlerdir.
12. Herbir izolat daha önce belirtildiği şekilde sıvı besiyerinde üretildikten sonra steril bir şekilde 800 µl alınmış ve daha önce sterilize edilmiş gliserollü tüplere aktarılmıştır (%20 gliserol, %80 bakteri kültürü) (Şekil 4.6).
13. Bakteri ve gliserol karışımı tüpler iyice vortekslendikten sonra etiketlenerek uzun süre muhafaza etmek üzere -20 °C'ye kaldırılmışlardır.



Şekil 3.4. İzolatların CMC, ksilan ve likenan içeren LB-agar besi ortamlarında kolonileştirilmesi



Şekil 3.5. CMC, ksilan ve likenan içeren besiyerlerin Kongo-kırmızısı ile boyanması



Şekil 3.6. İzolatlardan gliserol stokların hazırlanması

3.2.3. Enzimlerin Spesifik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Enzimlere ait spesifik aktiviteler Lowry vd. (1951)'de verilen protokol uyarınca yapılmıştır. Yöntemin esası fosfomolibdotungstik asitin tirozin aminoasiti ile reaksiyona girerek mavi renk oluşturmasına dayanmaktadır. Protein ile bakır arasında başlayan kompleks oluşum reaksiyonu, alkali çözeltide, oda sıcaklığında ve 10 dk içinde tamamlanır. Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde, stok sığır serum albümin (BSA, 10 mg/ml) çözeltisinden değişik konsantrasyonlarda (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg) hazırlanan çözeltiler standart olarak kullanılır. Analizde aşağıda verilen çözeltiler kullanılmıştır:

- ❖ Çözelti-A (0.15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /10 ml)
- ❖ Çözelti-B (0.337 g Na-tartarat veya K-tartarat/10 ml)
- ❖ Çözelti-C (1 g NaOH, 5 g Na_2CO_3 /250 ml)
- ❖ Çözelti-D (Çözelti-A (1 ml) + Çözelti-B (1 ml) + Çözelti-C (100 ml))
- ❖ Folin çözeltisi (Folin (1 ml) + H_2O (1 ml))
- ❖ BSA çözeltisi (10 mg/ml)

Protein analizleri aşağıda verilen protokole göre yapılmıştır:

1. LB sıvı besiyerinde 24 saat süreyle üremiş olan bakteri kültürü 4950 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek pelet haline getirilmiştir. Süpernatant kısmı (hücre dışı enzimleri içeren st faz) temiz bir kaba alınmış ve kullanım süresince buz üzerinde muhafaza edilmiştir.
2. İşaretlenmiş olan mikrosantrifüj tüplerine daha önce belirlenen miktarlarda (0, 20, 40, 60, 80 ve 100 μ l) BSA zltisi (standart eğrisi oluşturmak amacıyla) eklenmiştir. Yinde işaretlenmiş olan diğer mikrosantrifüj tüplere ise 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 μ l olacak şekilde bakteri süpernatantı eklenmiştir.
3. Herbir mikrosantrifüj tüpünün içine (gerek BSA gerekse bakteri süpernatantı içeren tüpler) son hacmi 100 μ l'ye tamamlayacak şekilde steril saf su eklenmiştir.
4. Herbir mikrosantrifüj tüpünün içine 1'er ml D zltisinden ilave edilmiş ve tüpler seri bir şekilde (en fazla 2-3 sn içinde) vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiştir.
5. Tüplere 100'er μ l folin zltisi eklenmiş, vortekslenerek ışık almayan bir ortamda 30 dk bekletilmiştir.
6. BSA ve bakteri süpernatantı bulunmayan tüplerdeki içerik standart (kr) olarak kullanılmış ve diğer örneklerin spektrofotometrede OD_{660} nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır.
7. BSA rneklerinin konsantrasyon değerlerinin absise (x ekseni), bu değerlerin okunması ile elde edilen absorbans değerlerinin ise ordinata (y ekseni) yerleştirilmesi ile standart eğri hazırlanmıştır.
8. Konsantrasyonu bilinmeyen enzim örneklerinin spektrofotometrede okunması ile elde edilen absorbans değerlerinin bu eğriyi kestikleri noktadan x eksenine indirilen bir dik yardımıyla örneklerin konsantrasyon değerleri bulunmuştur.
9. Protein analizinde her bir örnek 3 paralel olarak hazırlanmış ve bunlara ait ortalama değerler kullanılmıştır.

3.2.4. Enzimatik Analizler

Enzim analizlerinin gerçekleştirilmesinde aşağıda verilen çözeltiler kullanılmıştır:

1. Bakteri süpernatantı: LB besiyerinde 24 saat süreyle üretilmiş olan bakteri kültürünün 4950 rpm'de santrifüj edilmesiyle elde edilen sıvı üst faz.
2. Na-fosfat solüsyonu: 50 mM ve pH'sı 6.5 olacak şekilde hazırlanmıştır.
3. Substrat solüsyonları: %2 w/v CMC, %2 w/v ksilan, %2 w/v likenan (50 mM ve pH'sı 6.5 olan Na-fosfat solüsyonu kullanılarak hazırlanmıştır)
4. DNS solüsyonu: 10 g dinitro salisilik asit, 2 g fenol, 0.5 gr NaSO₃, 200 gr sodyum-potasyum tartarat, 500 ml %2'lik (w/v) NAOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 1000 ml'ye tamamlanır.
5. Na-asetat solüsyonları ve substratlar (pH analizleri için): 5.0 ve 6.0 pH değerlerinin herbiri için 50'şer mM olacak şekilde ayrı hazırlanmıştır. Herbir pH değerindeki solüsyonlar kullanılarak %2 w/v konsantrasyonlarında CMC, ksilan ve likenan substratları hazırlanmıştır.
6. Na-fosfat solüsyonları ve substratlar (pH analizleri için): 6.0, 7.0 ve 8.0 pH değerlerinin herbiri için 50'şer mM olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır. Herbir pH değerindeki solüsyonlar kullanılarak %2 w/v konsantrasyonlarında CMC, ksilan ve likenan substratları hazırlanmıştır.
7. Tris-baz solüsyonları ve substratlar (pH analizleri için): 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0 pH değerlerinin herbiri için 50'şer mM olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır. Herbir pH değerindeki solüsyonlar kullanılarak %2 w/v konsantrasyonlarında CMC, ksilan ve likenan substratları hazırlanmıştır.

3.2.5. Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesinde aşağıda verilen protokol kullanılmıştır (protokolde; ES: Enzim + Substrat, EK: Enzim kontrol, SK: Substrat kontrol, K: Kontrol):

1. 20 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı 1 ml substrat (50 mM ve pH'sı 6.5 olan Na-fosfat solüsyonu kullanılarak hazırlanan substratlar) ile karıştırılmıştır (ES, 5 paralel).
2. 20 ml hacimli cam tüplere 1 ml bakteri süpernatantı ve 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) eklenerek enzim kontrolü (EK) hazırlanmıştır (4 paralel)
3. 20 ml hacimli cam tüplere 1 ml substrat solüsyonu (50 mM ve pH'sı 6.5 olan Na-fosfat solüsyonu kullanılarak hazırlanan substratlar) ve 1 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) eklenerek substrat kontrolü (SK) hazırlanmıştır (4 paralel).
4. 20 ml hacimli cam tüplere 2 ml Na-fosfat bafır (50 mM, pH: 6.5) eklenerek hazırlanmıştır (Kontrol, 1 paralel).
5. Tüpler vortekslendikten hemen sonra 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle bekletilmiştir.
6. Süre bitiminde su banyosundan alınarak örneklerin tamamına 3'er ml DNS solüsyonu eklenmiş, tüpler vortekslendikten sonra kaynar su içine alınarak 5 dk bekletilmiştir.
7. Aynı işlemler yeni karışımlar hazırlanarak 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerlerinin herbiri için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.
8. Örnekler oda sıcaklığında birkaç saat soğutulduktan sonra kontrol grupları (K) kör olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.
9. ES ortalama değerlerinden EK ve SK'ya ait ortalama değerler çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.

3.2.6. Enzimlerin Optimum pH Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum pH değerlerinin belirlenmesinde aşağıda verilen protokol kullanılmıştır (protokolde; ES: Enzim + Substrat, EK: Enzim kontrol, SK: Substrat kontrol, K: Kontrol):

1. 20 ml hacimli cam tüpler içinde 1 ml bakteri süpernatantı 1 ml substrat (50 mM ve pH'sı 5.0 olan Na-asetat solüsyonu kullanılarak hazırlanan substratlar) ile karıştırılmıştır (ES, 5 paralel).

2. 20 ml hacimli cam tüplere 1 ml bakteri süpernatantı ve 1 ml Na-asetat bafır (50 mM, pH: 5.0) eklenerek enzim kontrolü (EK) hazırlanmıştır (4 paralel)
3. 20 ml hacimli cam tüplere 1 ml substrat solüsyonu (50 mM ve pH'sı 5.0 olan Na-asetat solüsyonu kullanılarak hazırlanan substratlar) ve 1 ml Na-asetat bafır (50 mM, pH: 5.0) eklenerek substrat kontrolü (SK) hazırlanmıştır (4 paralel).
4. 20 ml hacimli cam tüpler içinde 2 ml Na-asetat bafır (50 mM, pH: 5.0) hazırlanmıştır (Kontrol, 1 paralel).
5. Tüplerin tamamı vortekslenildikten sonra 40 °C'ye (enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri) ayarlanmış su banyosunda 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
6. Süre bitiminde su banyosundan alınarak örneklerin tamamına 3'er ml DNS solüsyonu eklenmiş, tüpler vortekslenildikten sonra kaynar su içine alınarak 5 dk bekletilmiştir.
7. Aynı işlemler diğer pH değerleri (Na-asetat, pH 6.0; Na-fosfat, pH 6.0, 7.0 ve 8.0; Tris, pH 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 ve 12.0) için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.
8. Örnekler oda sıcaklığında birkaç saat soğutulduktan sonra kontrol grupları (K) kör olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.
9. ES ortalama değerlerinden EK ve SK'ya ait ortalama değerler çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.

3.2.7. Enzimlerin Sıcaklık Stabilite Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin sıcaklık stabilite değerlerinin belirlenmesinde aşağıda verilen protokol kullanılmıştır (protokolde; ES: Enzim + Substrat, EK: Enzim kontrol, SK: Substrat kontrol, K: Kontrol):

1. Enzimleri içeren bakteri süpernatantından yetecek miktar hesaplanarak alınmış ve 40 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuştur.
2. Ön inkübasyonun tamamlanmasını takiben örneklere 3.2.5. başlığı altında verilen protokolün 2-6. maddelerindeki işlemler aynen uygulanmıştır.

3. Aynı işlemler 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C sıcaklık değerlerinde ön inkübasyona tabi tutulmuş bakteri süpernatantları için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.
4. Örnekler oda sıcaklığında birkaç saat soğutulduktan sonra kontrol grupları (K) kör olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.
5. ES ortalama değerlerinden EK ve SK'ya ait ortalama değerler çıkarılarak kalan enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.

3.2.8. Çeşitli Kimyasalların Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi

Bazı kimyasal maddelerin enzim aktiviteleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesinde aşağıda verilen protokol kullanılmıştır (protokolde; ES: Enzim + Substrat, EK: Enzim kontrol, SK: Substrat kontrol, K: Kontrol):

1. Yetecek kadar bakteri süpernatantı alındıktan sonra 9 kısma ayrılmış ve 1 tanesi kontrol grubu olarak ayrıldıktan sonra diğer 8 tanesine EDTA, HgCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, FeCl₃ kimyasalları ayrı ayrı ve son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüm örnekler 30 dk süreyle oda sıcaklığında ön inkübasyona tabi tutulduktan sonra deneyde kullanılmışlardır.
2. Ön inkübasyonun tamamlanmasını takiben örneklere 3.2.5. başlığı altında verilen protokolün 2-6. maddelerindeki işlemler aynen uygulanmıştır.
3. Aynı işlemler herbir kimyasal medde ile ön inkübasyona tabi tutulmuş herbir enzim için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.
4. Örnekler oda sıcaklığında birkaç saat soğutulduktan sonra kontrol grupları (K) kör olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.
5. ES ortalama değerlerinden EK ve SK'ya ait ortalama değerler çıkarılarak kalan enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.

3.2.9. Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesinde aşağıda verilen protokol kullanılmıştır (protokolde; ES: Enzim + Substrat, EK: Enzim kontrol, SK: Substrat kontrol, K: Kontrol):

1. LB sıvı besiyerinde gece boyunca üremiş olan bakteri kültüründen 100 ml hacimli sıvı besiyerlerine %1 olacak şekilde (1000 µl) inoküle edilmiş ve 37 °C'de orta çalkalama hızında üremeye bırakılmışlardır.
2. İnkübasyonun başlangıcından itibaren her 12 saatte bir (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72) yetecek miktarda numune alınarak santrifüj edilmiş (495 rpm, 10 dk) ve enzim içeren hücre dışı sıvı kısımlar (süpernatant) elde edilmiştir.
3. Örnekler 3.2.5. başlığı altında verilen protokolün 2-6. maddelerindeki işlemler aynen uygulanarak deneye alınmıştır.
4. Aynı işlemler herbir saat aralığında alınan bakteri supernatantları ve herbir enzim için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.
5. Örnekler oda sıcaklığında birkaç saat soğutulduktan sonra kontrol grupları (K) kör olarak kullanılmış ve diğer tüm örneklerin spektrofotometrede OD₅₄₀ nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.
6. ES ortalama değerlerinden EK ve SK'ya ait ortalama değerler çıkarılarak enzim aktivitelerinden kaynaklanan absorbans değerleri elde edilmiştir.

3.2.10. Oransal Aktivite

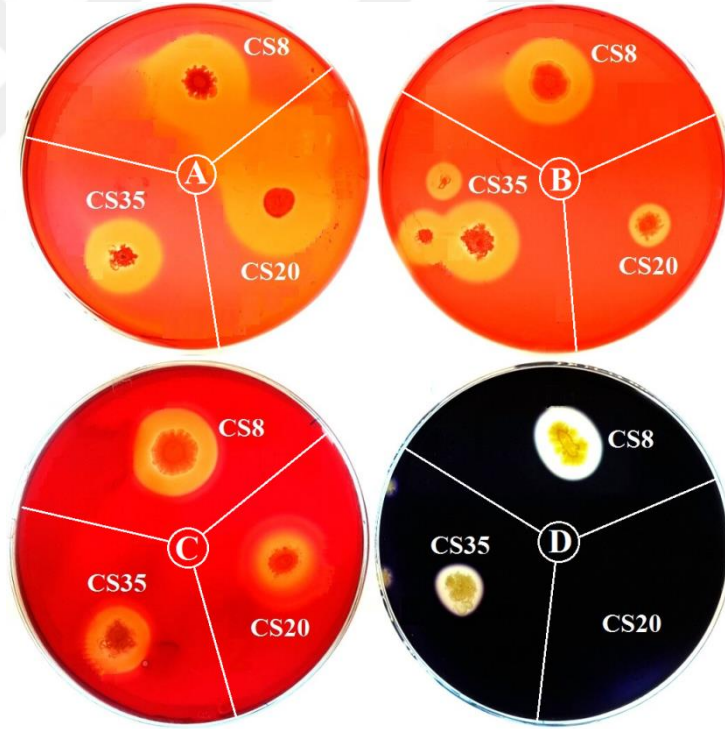
Her üç izolat LB besi ortamında 24 saat süreyle üretildikten sonra elde edilen süpernatant kısımlar her üç enzim ve substratları kullanılarak optimum sıcaklık ve pH koşullarında 30 dk süreyle reaksiyona sokulmuşlardır. Reaksiyonun sonlandırılmasını takiben 3'er ml DNS ilave edilen ve kaynar suda 5 dk bekletilen tüm örnekler 3.2.5. başlığı altında verilen protokolün 8-9. maddelerindeki işlemler aynen uygulanarak absorbans değerleri elde edilmiştir. En yüksek ortalama absorbans değerine sahip enzime ait değer %100 kabul edilmiş ve diğer iki enzimin ortalama absorbans değerleri buna göre orantılanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. CMCaz, Ksilanaz ve Likenaz Enzimlerini Üreten Bakterilerin İzolasyonu

Adana ili sınırları içerisinde bulunan özel bir seradan alınan toprak numunelerinden *Bacillus* sp. CS8, CS20 ve CS35 bakterilerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlar aerobik ortamda spor formlarından çimlendirilmeleri sebebiyle *Bacillus* sp. olarak tanımlanmışlardır. Her üç izolat da CMC, ksilan ve likenan içeren LB-agar plaklarında CMCaz, ksilanaz ve likenaz aktivitelerini göstermişlerdir (Şekil 4.1; Çizelge 4.1). Her üç enzime ait aktivite zonları görsel değerlendirmeye alınmış ve *Bacillus* sp. CS8 bakterisi ileri araştırmalar için tercih edilmiştir.



Şekil 4.1. İzolatların farklı substratlar içeren besi ortamlarında aktivite durumları (A: LB-Ksilan-Agar B: LB-CMC-Agar, C: LB-Likenan-Agar, D: LB-Nişasta-Agar)

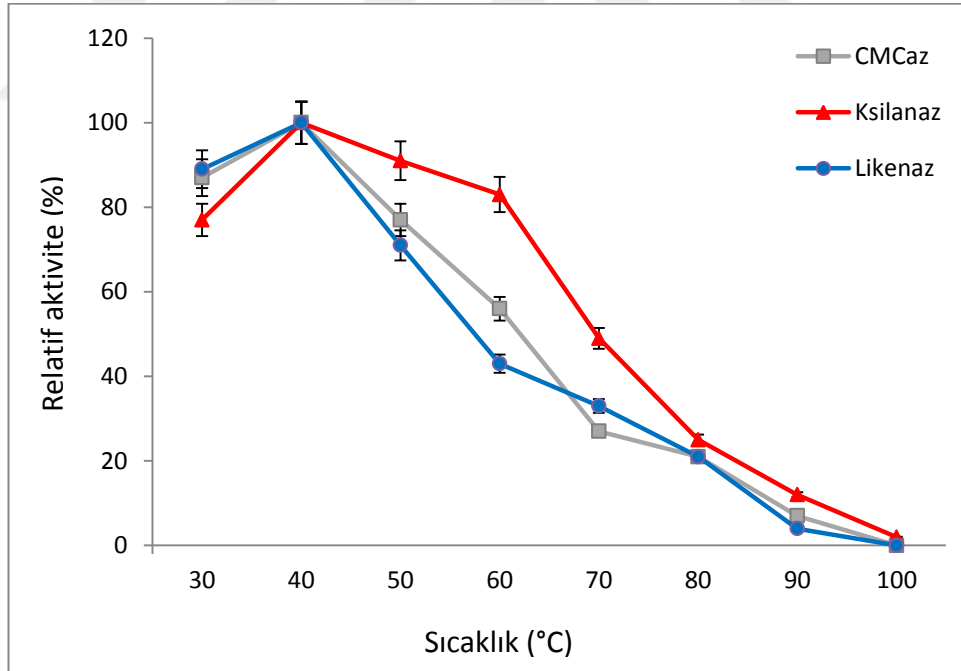
Çizelge 4.1. İzolatlara ait bazı enzimlerin aktivite durumları

İzolat	Enzim Aktivite Durumları			
	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz	α -Amilaz
<i>Bacillus</i> sp. CS8	+	+	+	+
<i>Bacillus</i> sp. CS20	+	+	+	-
<i>Bacillus</i> sp. CS35	+	+	+	+

4.1.2. *Bacillus* sp. CS8 Enzimlerinin Kısmi Karakterizasyonu

4.1.2.1. Enzimlerin Optimum Sıcaklık Değerleri

Bacillus sp. CS8 izolatu tarafından üretilen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait optimum sıcaklık değerleri her üç enzim için de 40 °C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2.).

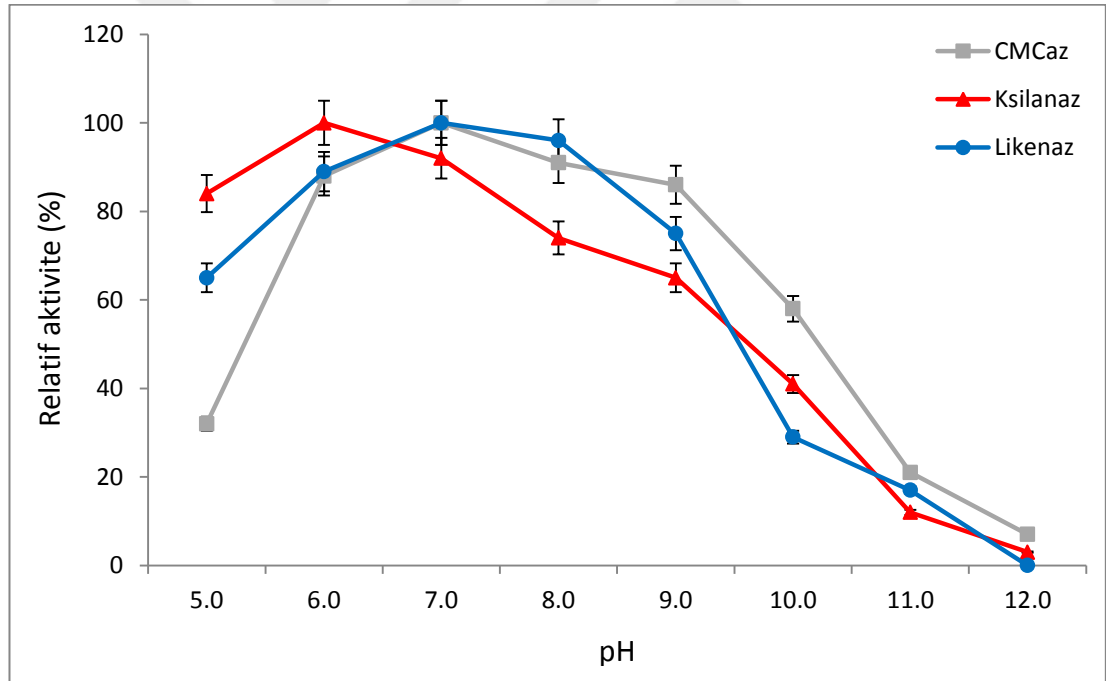


Şekil 4.2. *Bacillus* sp. CS8 bakterisi tarafından sentezlenen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait optimum sıcaklık grafiği

Bacillus sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri 30-40 °C sıcaklık değerlerinde sırasıyla %93.5, 88.5 ve 94.5 ortalama aktivite gösterirken, 50-80 °C sıcaklık değerleri arasında aynı sırayla %45, 62 ve 42 ortalama aktivite göstermişlerdir. Bu veriler her üç enzimin de daha çok mezofil bir karaktere sahip olduğunu, ksilanaz enziminin ise diğer iki enzime göre sıcaklığa biraz daha toleranslı olduğunu göstermektedir. Her üç enzim de 90 °C sıcaklık değerinde az miktarda aktivite gösterirken, 100 °C’de aktivitelerinin tamamını kaybetmişlerdir.

4.1.2.2. Enzimlerin Optimum pH Değerleri

Bacillus sp. CS8 izolatları tarafından sentezlenen CMCaz ve likenaz enzimlerinin optimum pH değerleri 7.0 olarak bulunurken, ksilanaz enziminin optimum pH değeri 6.0 olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Bacillus* sp. CS8 bakterisi tarafından sentezlenen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait optimum pH grafiği

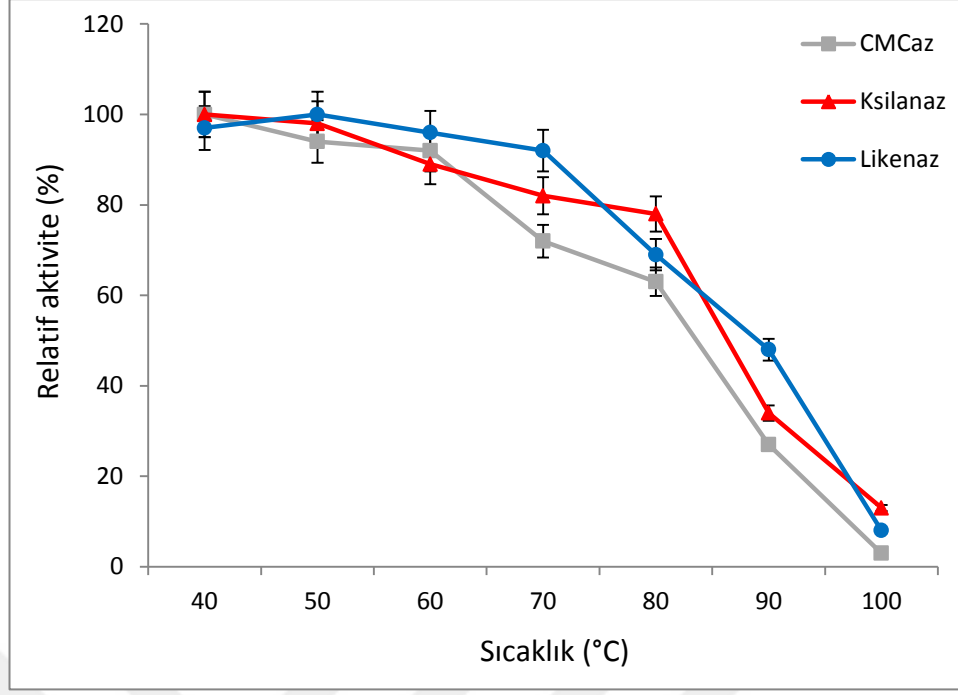
Bacillus sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenazı 5.0-7.0 pH aralığında sırasıyla %73, 92 ve 84.5 ortalama aktivite gösterirken, 7.0-9.0 pH aralığında aynı sırayla %92, 77

ve 90 oransal aktivite göstermişlerdir. Bu veriler CMCaz ve likenazın daha çok alkali karaktere, buna karşılık ksilanazın ise asidik karaktere sahip olduğunu göstermektedir. İzolat tarafından sentezlenen her üç enzim de geniş bir pH aralığında yüksek aktivite göstermiştir.

4.1.2.3. Enzimlerin Sıcaklık Stabiliteleri

Her üç izolata ait süpernatant kısımlar 40-100 °C aralığında her 10 °C'de (40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C) 15 dk süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuşlar ve sonrasında enzimatik aktivite seviyeleri belirlenmiştir.

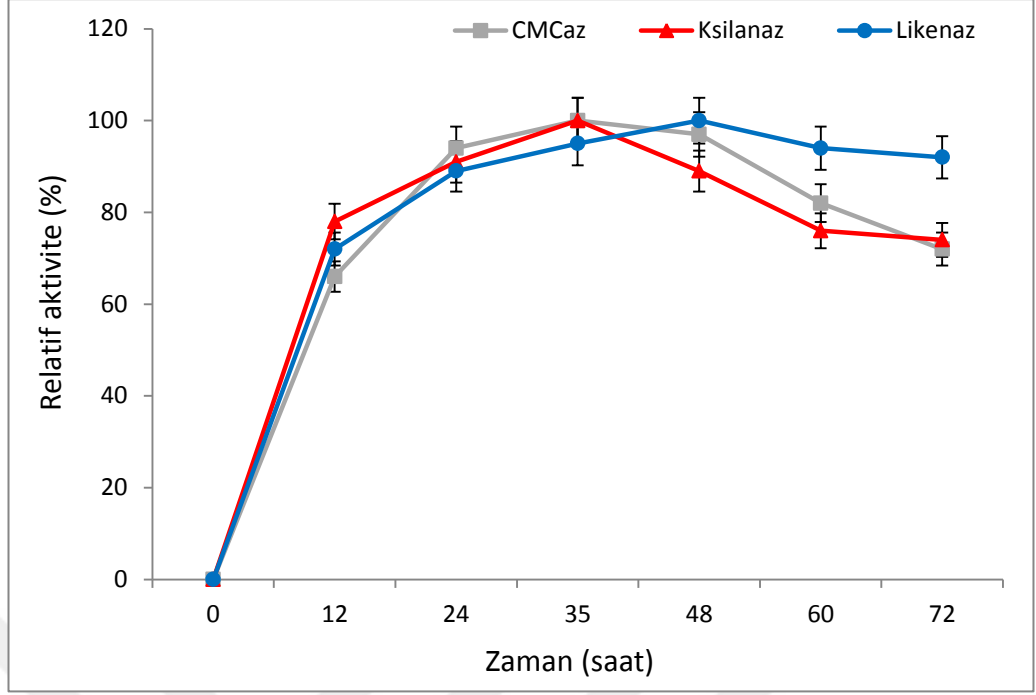
Bacillus sp. CS8 izolatu tarafından üretilen CMCaz ve ksilanaz enzimleri 40 °C'de ön inkübasyon sonrasında aktivitelerinin tamamını korurken, likenaz enzimi 50 °C'de ön inkübasyon sonrasında aktivitesinin tamamını korumuştur. CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri 70 °C'de 15 dk ön inkübasyon sonrasında relatif olarak sırasıyla %72, 82 ve 92 oranlarında kalan aktivite gösterirken, 90 °C'de ön inkübasyon sonrasında %27, 34 ve 48 oranlarında kalan aktivite göstermişlerdir. Her üç enzim de 100 °C'de ön inkübasyon sonrasında aktivitelerinin önemli bir kısmını kaybetmişlerdir (Şekil 4.4). CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri 60-90 °C sıcaklık değerleri arasında relatif olarak sırasıyla %63.5, 70.75 ve 76.25 ortalama relatif aktivite göstermişlerdir.



Şekil 4.4. *Bacillus* sp. CS8 bakterisi tarafından sentezlenen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerine ait sıcaklık stabilite grafiği

4.1.2.5. Zamana Göre Enzim Aktiviteleri

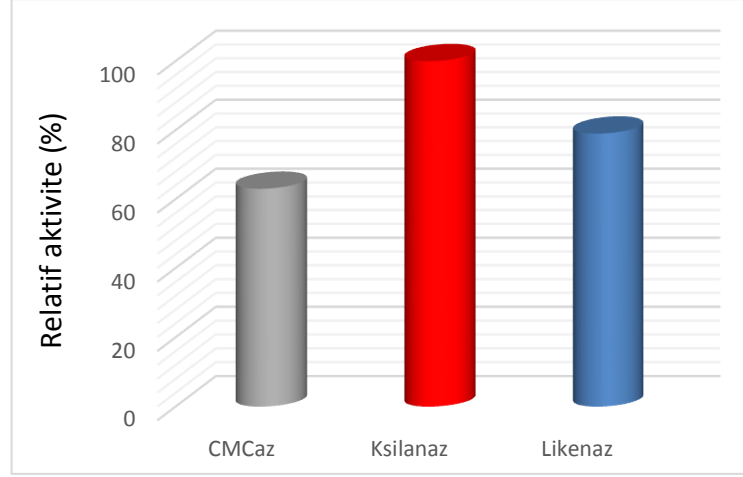
Bakterinin üreme periyodunun her 12 saat aralığında alınan enzim numuneleri kullanılarak yapılan analizlere göre *Bacillus* sp. CS8 bakterisine ait CMCaz ve ksilanaz enzimlerinin bakteri inokülasyonundan itibaren 36. saatte maksimum düzeyde üretildiği belirlenirken, likenaz enziminin 48. saatte üretildiği belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bakteri, inokülasyondan itibaren 72. saatte CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri için sırasıyla %72, 80 ve 92 oranlarında aktivite göstermiştir.



Şekil 4.5. *Bacillus* sp. CS8 enzimlerine ait zaman/aktivite grafiği

4.1.2.6. Enzimlerin Oransal ve Spesifik Aktiviteleri

Bacillus sp. CS8 izolatu tarafından sentezlenen enzimlerin aktivite düzeyleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda en yüksek aktiviteye sahip olan ksilanazın aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş, diğer iki enzime ait aktivite düzeyleri bu seviye üzerinden orantılanmıştır. Hesaplama sonucunda elde edilen verilere göre likenaz ve CMCaz enzimlerinin aktivite seviyeleri ksilanaz enziminin seviyesine göre sırasıyla %79 ve 63 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).



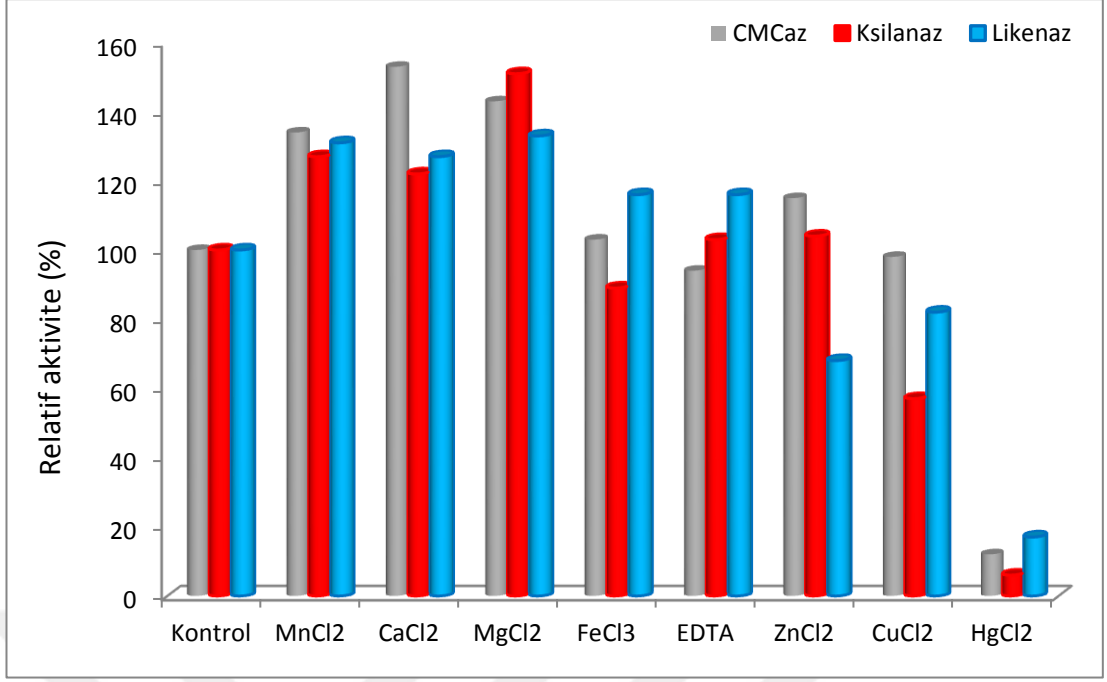
Şekil 4.6. CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimlerinin birbirlerine göre oransal aktivite seviyeleri

Bacillus sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenazı enzimleri için mg protein başına spesifik aktivite değerleri sırasıyla 17.6, 22.7 ve 13.1 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

4.1.2.7. Bazı Kimyasal Maddelerin Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi

MnCl₂, CaCl₂, MgCl₂, FeCl₃, ZnCl₂, CuCl₂, HgCl₂ ve EDTA son konsantrasyonları 1 mM olacak şekilde enzim örneklerine ilave edilerek enzim aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hiçbir kimyasalın ilave edilmediği kontrol grubunun aktivitesi %100 kabul edilerek kimyasal maddelerin etkisi sonucu ortaya çıkan aktivite düzeyleri bu değer ile karşılaştırılmıştır.

MnCl₂, CaCl₂ ve MgCl₂ *Bacillus* sp. CS8 tarafından üretilen her üç enzim için de aktivatör olmuştur. CMCaz enzimi üzerinde en fazla aktivatör etkisini %153'lük oran ile CaCl₂, ksilanaz ve likenaz üzerinde ise sırasıyla %151 ve %133'lük oranlar ile MgCl₂, göstermiştir. HgCl₂ her üç enzimi de kuvvetli bir şekilde inhibe ederken, CuCl₂ CMCaz ve likenaz üzerinde hafif inhibisyon etkisi göstermiştir. HgCl₂ CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri üzerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %88, 94 ve 83 oranlarında, CuCl₂ ise %2, 43 ve 18 oranlarında inhibisyon etkisi göstermişlerdir (Şekil 4.7, Çizelge 4.2).



Şekil 4.7. Bazı kimyasal maddelerin *Bacillus* sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri üzerinde etkisi

Çizelge 4.2. *Bacillus* sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri üzerinde bazı kimyasalların etkilerinin oransal değerleri

Metal iyonları (1 mM)	CMCaz	Ksilanaz	Likenaz
Kontrol	100	100	100
MnCl ₂	134	127	131
CaCl ₂	153	122	127
MgCl ₂	143	151	133
FeCl ₃	103	89	116
EDTA	94	103	116
ZnCl ₂	115	104	68
CuCl ₂	98	57	82
HgCl ₂	12	6	17

ZnCl₂ CMCaz ve ksilanaz enzimleri üzerinde aktivatör etkisi gösterirken, likenaz enzimi üzerinde inhibitör etkisi göstermiştir. FeCl₃ CMCaz ve likenaz enzimleri üzerine aktivatör etkisi gösterirken, ksilanaz üzerinde inhibitör etkisi göstermiştir. Son olarak, EDTA ksilanaz ve likenaz enzimleri üzerinde aktivatör etkisi gösterirken, CMCaz üzerinde inhibitör etkisi göstermiştir.

4.2. Tartışma

Bu çalışma ile CMCaz, likenaz ve ksilanaz aktivitelere sahip *Bacillus* sp. CS8 bakterisi izole edilmiştir. Benzer şekilde, selüloz ve hemiselüloz enzimlerini bir arada üreten *Bacillus* suşları rapor edilmiştir. Wolf vd. (1995) *Bacillus subtilis* 168 suşu genomundan ksilanaz, CMCaz ve likenaz enzimlerini kodlayan genleri izole etmişlerdir. Seo vd. (2013) ise Kore yerli keçi ırkının rumeninden izole ettikleri *Bacillus licheniformis* JK7 bakterisinin selüloolitik endoglukanaz ve β-glukosidaz enzimleri ile hemiselüloolitik ksilanaz enzimini karakterize etmişlerdir. Wolf vd. (1995) *B. subtilis* 168 bakterisi genomunda bulunan *bgIS* geninin kodladığı likenaz enziminin sadece kendi substratını (likenan) hidroliz ederken, *egIS* geninin kodladığı CMCaz enziminin CMC ve likenan (1,3-1,4-β-glukan) substratlarının her ikisini de hidroliz ettiğini bildirmiştir. Multifonksiyonellik sadece selüloz enzimlerinin kendi aralarında değil, selüloz ve hemiselülozu hidroliz eden enzimlerde karşılıklı olarak rastlanılan bir durumdur. Özcan ve Özcan (2001) *B. subtilis* RSKK243 suşuna ait CMCaz yan etkili bifonksiyonel ksilanaz enzimini kodlayan geni bakteri genomundan izole ederek *E. coli*, *B. subtilis* YB886, *B. subtilis* RSKK243 (yeniden), *B. subtilis* RSKK244 ve *B. subtilis* RSKK246 suşlarında klonlamışlardır. Bu durumda, bu çalışmada likenan substratının *Bacillus* sp. CS8 CMCaz enziminin mi hidroliz edildiği, yoksa kendi genomunda ayrıca bir likenaz geni mi bulunduğu sorusunu akla getirmektedir. Aynı soru, CMCaz ve ksilanaz genleri arasında da düşünülebilir. CMCaz ve likenaz enzimlerinin aynı sıcaklık ve pH optimum değerlerine sahip olmaları ve diğer sıcaklık ve pH değerlerinde de birbirlerine yakın oransal aktivite değerleri göstermeleri, aktivitelerin tek bir gen kaynağına dayanabileceği şüphesini güçlendirmektedir. Fakat CMCaz ve ksilanaz enzimlerinin enzimatik özellikleri arasında daha bariz farklar görülmektedir. Bu durumda CMCaz ve ksilanaz enzimleri arasında bifonksiyonellik daha uzak bir ihtimal olarak

düşünülmektedir. Bunu ortaya çıkarmak, ya enzimlerin aminoasit sekanslarının belirlenmesi veya CMCaz ve likenaz enziminden sorumlu genlerin izole edilerek CMCaz ve likenaz aktivitesi göstermeyen bir bakteride ayrı ayrı klonlanması ve karşılıklı substratlarda aktivite durumlarının gösterilmesi, hatta daha net bir karar verebilmek için bu genlere ait baz dizilerinin belirlenmesi ile mümkün olabilir.

pH analizleri *Bacillus* sp. CS8 CMCaz ve likenazlarının optimum pH değerinin 7.0, ksilanaz enziminin ise 6.0 olduğunu ortaya çıkarmıştır. Benzer pH optimum değerleri daha önce *Bacillus subtilis* K-18 bakterisince üretilen selülaz enzimi (Irfan vd., 2017), *Bacillus licheniformis* UEB CF bakterisince üretilen EG2 likenaz enzimi (Chaari vd. 2012a) ve *Paenibacillus* sp. NF1 bakterisince üretilen ksilanaz enzimi (Zheng vd. 2014) için de bildirilmiştir. *Bacillus*'larca sentezlenen CMCaz, likenaz ve ksilanaz enzimleri pH optimumları bakımından oldukça büyük varyasyonlar gösterebilmektedirler. *Bacillus subtilis* DLG endoglukanazı (Robson and Chambliss, 1984), *Paenibacillus macerans* IIPSP3 ksilanazı (Dheeran vd. 2012) ve *Bacillus* sp. likenazı (Gözükara ve Arıkan, 2012) sırasıyla 4.8, 4.5 ve 6.0 optimum pH değerleri ile asidik karakterli enzimler olarak rapor edilmişlerdir. Diğer taraftan *Bacillus* sp. HSH-810 endoglukanazı (Aygan vd. 2011) ve *B. pumilus* SV-205 ksilanazı (Nagar vd. 2012) için optimum pH değerleri 10.0 olarak bildirilmişlerdir. Tabernerо vd. (1994) ise optimum pH'sı 7.5 olan alkalifilik *Bacillus* (N137) likenazının 12.0 pH değerinde %80'in üzerinde oransal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Birçok endüstriyel işlemlerde kullanılan selülazların ekstrem pH değerlerinde aktivite gösteriyor olması özellikle diğer bakterilerce kontaminasyonun önlenmesi açısından önemli olduğu vurgulanmıştır (Dong vd. 2010). Diğer taraftan, asidik karakterli selülazların kullanımı fiberlerin düşük pH koşullarında daha etkili bir şekilde degradasyona uğraması sebebiyle endüstriyel işlemlerde de gerekli olduğu bildirilmiştir (Seo vd. 2013). Fakat özellikle deterjan sanayi gibi endüstriyel alanlarda yüksek derecede alkali selülazların kullanımı da gereklilik arz etmektedir. Bu çalışmada CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri 5.0-6.0 pH aralığında sırasıyla ortalama %60, 92 ve 77 oranlarında aktivite gösterirken, 8.0-9.0 pH aralığında %88.5, 69.5 ve 85.5 oranlarında ortalama aktivite göstermişlerdir. Bu veriler CMCaz ve likenaz enzimlerinin daha alkali bir karakter gösterirken, ksilanaz enziminin daha asidik bir karakter gösterdiğini ortaya koymaktadır. Daha çok nötral pH civarında

optimum aktiviteye sahip olmaları, CS8 enzimlerinin bazı endüstriyel alanlarda kullanımını kısıtlayabilir.

Her üç enzime ait sıcaklık optimumu 40 °C olarak belirlenmiştir. Optimum sıcaklık değerleri bakımından her üç enzim de mezofilik karakterlere yakın bir değer ortaya koymuşlardır. 50-70 °C sıcaklık değerleri arasında ortalama aktivite CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri için sırasıyla %53, 74 ve 49 olarak gerçekleşmiştir. Enzimler, 80 ve 90 °C sıcaklık değerlerinde ise ciddi aktivite kaybına uğramışlardır. CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri 80 °C'de 15 dk ön inkübasyon sonrasında aktivitelerini sırasıyla %57, 83 ve 71 oranlarında korumuşlardır. 50-80 °C sıcaklık değerleri arasında her üç enzim de yine aynı sırayla %80.25, 87.0 ve 89.25 oranlarında ortalama kalan aktivite göstermişlerdir. Daha önce *Bacillus subtilis* selüloz için 37 °C (Deka vd. 2011) ve *Bacillus thuringiensis* selüloz için 40 °C (Lin vd., 2012) optimum sıcaklık değerleri rapor edilmiştir. Endüstriyel uygulamalarda özellikle ısı işlem gerektiren proseslerde enzimlerin termo-stabilitesi oldukça önemlidir. *Bacillus* sp. CS8 enzimleri ısı işlem gerektiren endüstriyel proseslerde arzu edilen aktivite performanslarını gösteremeyebilir. Bu sorun, enzimlerin üretiminden sorumlu genlerin bakteri genomundan izole edilerek termofil bir bakteriye aktarılması ve böylece enzimlerin termo-stabiliteilerinin artırılması ile aşılabilir. Zira Aşan ve Özcan (2007) *Streptococcus bovis* β -(1,3-1,4)-glukanaz geninin termofilik bir bakteri olan *S. salivarius* subsp. *thermophilus* FI8976 bakterisinde klonlanması ile enzimin termo-stabilitesinin arttığını bildirmişlerdir. Böyle bir genetik modifikasyon enzimlerin termo-stabiliteilerini artırabileceği gibi, klonlandıkları plazmid DNA'ların konukçu organizmadaki kopya sayılarına bağlı olarak enzim üretim miktarlarında da kayda değer bir artış meydana gelebilir.

CaCl₂, MgCl₂ ve MnCl₂ her üç enzim için de aktivatör olmuşlardır. Ayrıca ZnCl₂ CMCaz ve ksilanaz, FeCl₃ CMCaz ve likenaz, EDTA ise ksilanaz ve likenaz enzimleri için aktivatör olmuşlardır. HgCl₂ ve CuCl₂ her üç enzimin de aktivitesini inhibe etmişlerdir.

Yin vd. (2010) farklı konsantrasyonlarda Ca²⁺, Mg²⁺ ve Mn²⁺ metal iyonlarının *B. subtilis* YJ1 selüloz enzimi üzerinde aktivatör etki gösterirken, Hg²⁺ iyonunun kuvvetli inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Shakoor vd (2013), Zn, Mg,

Mn ve Ca iyonlarının *B. megaterium* S3 selülaıı üzerinde aktivatör etkisi gösterdiğini, Gaur ve Tiwari (2015) *Bacillus vallismortis* RG-07 selülaıı üzerinde CaCl₂, FeSO₄ ve MgCl₂ metal iyonlarının aktivatör etki gösterirken, CuCl₂, HgCl₂, MnCl₂, ZnSO₄ metal iyonlarının inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Vijayaraghavan ve Vincent (2012) ise Ca²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺ ve Zn²⁺ iyonları *Bacillus* sp. CMCaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterirken, Mn²⁺'un aktivasyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ksilanazların daha önce Mn²⁺ (Sharma vd., 2013), MgCl₂ veya MgSO₄ (Khasin vd., 1993; Gessesse, 1998; Gaur vd., 2015; Annamalai vd., 2009), ZnSO₄ (Gaur vd., 2015), CaCl₂ (Gessesse, 1998; Annamalai vd., 2009; Gaur vd., 2015) tarafından stimölasyonları daha önce rapor edilmiştir. Yine HgCl₂ ve CuCl₂ tarafından ksilanaz enzimlerinin inhibisyonu da rapor edilmiştir (Annamalai vd., 2009; Ratanakhanokchai vd., 1999; Menon vd., 2010). Metal iyonlarının ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi konusunda yapılan çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Diğer çalışmalarda EDTA'nın ksilanaz enzimi üzerinde daha çok inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilirken, bu çalışmada çok hafif bir aktivasyon etkisi göstermiştir. Metal iyonlarının farklı kaynaklarca üretilen ksilanaz enzimleri üzerinde farklı etkiler göstermesinin, metal iyonlarının ksilanaz enzimlerinin sadece aktif bölgelerini değil, non-katalitik substrat bağlanma bölgelerini de etkilemelerinden kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (Ratanakhanokchai vd., 1999; Annamalai vd., 2009).

CMCaz ve ksilanaz enzimleri ile mukayese edildiğinde likenaz enzimi üreten bakterilerin izolasyonu ve likenaz enzimlerinin karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı sayıda kalmaktadır. Metal iyonlarının likenaz enzimleri üzerine olan etkilerini araştırmak üzere yapılan az sayıda çalışma içinde, Kim vd. (2014) toprak metagenomüğinden izole ettikleri ve *Bacillus circulans* WL-12 likenazı ile yüksek derecede aminoasit sekans homolojisi gösteren likenaz enziminin aktivitesinin MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂ ve EDTA varlığında arttığını, CuSO₄, ZnSO₄ ve FeCl₃ varlığında ise inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Yücel (2017) izole ettiğı *Bacillus* sp. HY3 bakterisi tarafından sentezlenen likenaz enziminin CaCl₂, MgCl₂, FeCl₃, MnCl₂ ve EDTA tarafından stimüle edilirken, ZnCl₂, CuCl₂ ve HgCl₂ tarafından inhibe edildiğini bildirmiştir. Bu her iki çalışmadan bildirilen sonuçlar

CS8 likenazı için elde edilen sonuçlar ile büyük benzerlik göstermektedir. Diğer taraftan Apiraksakorn vd. (2008) *B. subtilis* GN156 bakterisinde üretilen likenaz enziminin aktivitesi üzerinde etkilerinin araştırdıkları CuSO_4 , CaCl_2 , FeSO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 ve ZnSO_4 'ün tamamının değişik oranlarda inhibisyon etkisi gösterdiğini bildirmişlerdir. Metal iyonları substrat ve enzimler ile interaksiyonlar yaparak enzim aktiviteleri üzerinde bir etki gösterebildiği gibi, ayrıca enzime substrat bağlanma bölgesi dışında başka bir bölgeden bağlanarak da enzim aktivitesini etkileyebilmektedir (Riordan, 1977). Diğer taraftan metal iyonlarının enzim katlanmalarını etkileyebileceği ve böylece enzimin substrata olan ilgisinin değişebileceği de bildirilmiştir (Tejirian ve Xu, 2010). Bütün bu olası etkileşimler metal iyonlarının farklı likenaz enzimleri üzerinde farklı etkiler oluşturması ve enzimlerin aktivitelerinde pozitif veya negatif yönde etkiler göstermelerine sebep olabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Çalışmada CMCaz, ksilanaz ve likenaz aktivitelere sahip *Bacillus* sp. CS8 bakterisinin izolasyonu yapılmıştır.
2. İzolat tafından üretilen enzimlerin kısmi karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.
3. *Bacillus* sp. CS8 izolatına ait her üç enzimin de optimum sıcaklık değerleri 40 °C olarak bulunmuştur.
4. *Bacillus* sp. CS8 CMCaz ve likenaz enzimlerinin optimum pH değerleri 7.0 iken ksilanaz enziminin optimum pH değeri 6.0 olarak bulunmuştur.
5. Her iki izolata ait enzimlerin 80 °C'de 15 dk ön inkübasyonları sonrasında enzimler %63-78 arasında değişen oranlarda aktivitelerini korumuşlardır.
6. İzolatına ait CMCaz ve ksilanaz enzimleri en yüksek aktivite seviyelerine bakterinin besiyerine inokülasyonundan itibaren 36. saatte ulaşırken likenaz enzimi 48. saatte ulaşmıştır.
7. CaCl₂, MgCl₂ ve MnCl₂ *Bacillus* sp. CS8 izolatu tarafından üretilen CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri için genel aktivatör olurken, HgCl₂ ve CuCl₂ ise çalışılan tüm enzimler için kuvvetli bir inhibitör olmuştur.
8. *Bacillus* sp. CS8 CMCaz, ksilanaz ve likenaz enzimleri için spesifik aktivite değerleri sırasıyla 17.6, 22.7 ve 13.1 U/mg protein olarak belirlenmiştir.

9. *Bacillus* sp. CS8 enzimleri arasında ksilanaz enzimi en yüksek aktivite değerlerine sahip olurken, CMCaz ve likenaz enzimlerinin aktivite düzeyleri ksilanaz enziminin aktivitesine göre sırasıyla %79 ve 63 olarak belirlenmiştir.

5.2. neriler

Çalışma sonucunda öngörülen öneriler aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Sellolitik enzimler başta hayvan besleme olmak üzere birçok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu enzimlerin mutagenesis yöntemi ile enzim üretim seviyeleri artırılabilir.
2. Genler farklı bakterilerde klonlanarak daha bol, daha saf ve daha ucuz bir şekilde üretimleri hedeflenmelidir.
3. Enzimlerin üretiminden sorumlu genler *Bacillus* sp. CS8 genomundan izole edilerek termofilik bakterilerde klonlanabilir ve böylece enzimlerin termo-stabiliteleleri artırılarak endüstriyel kullanım için uygun hale getirilebilirler.

KAYNAKLAR

- Ammonah, H., Harba, M., Akeed, Y., Al-Halabi, M., Bakri, Y., Isolation and identification of local *Bacillus* isolates for xylanase biosynthesis, Iranian Journal of Microbiology, 6(2), 127-132, 2014.
- Anderson, M.A., Stone, B.A., A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases, FEBS Letters, 52, 202-207, 1975.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated form marine environment, Indian Journal of Biotechnology, 8, 291-297, 2009.
- Apiraksakorn, J., Nitisinprasert, S., Levin, R.E., 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, Applied Biochemistry and Biotechnology, 149(1), 53-66, 2008.
- Aşan Özusağlam, M., Yem değerini artırıcı enzim genlerinin probiyotik etkili laktik asit bakterilerinde klonlanarak üretimi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007.
- Aşan, M., Özcan, N., Expression of the β -(1,3-1,4)-Glucanase Gene in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 31(5), 319-324, 2007.
- Aygan, A., Karcioğlu, L., Arıkan, B., Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108, African Journal of Biotechnology, 10(5), 789-796, 2011.
- Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Hassanshahian, M., Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production, Molecular Biology Research Communications, 5(3), 143-155, 2016.
- Bai, S., Kumar, M.R., Kumar, D.J.M., Balashanmugam, P., Bala Kumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T., Cellulase production by *Bacillus subtilis* from cow dung, Archives of Applied Science Research, 4(1), 269-279, 2012.

- Bayer, E.A., Belaich, J.P., Shoham, Y., Lamed, R., The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides, *Annual Review of Microbiology*, 58, 521–554, 2004.
- Bayer, E.A., Morag, E., Lamed, R., The cellulosome — A treasure-trove for biotechnology, *Trends in Biotechnology*, 12(9), 379-386, 1994.
- Beckmann, L., Simon, O., Vahjen, W., Isolation and identification of mixed linked β -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4- β -glucanase activities, *Journal of Basic Microbiology*, 46, 175-185, 2006.
- Behera, B.C., Parida, S., Dutta, S.K., Thatoi, H.N., Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi river delta and their cellulase production ability, *American Journal of Microbiological Research*, 2(1), 41-46, 2014.
- Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J., Eyzayuirre J. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes, *Journal of Biotechnology*, 41, 71-79, 1995.
- Butt, M.S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., Sultan, M.T. Xylanases and their applications in baking industry, *Food Technol and Biotechnol.*, 46(1), 22-31, 2008.
- Chaari, F., Bhiri, F., Blibech, M., Maktouf, S., Ellouz-Chaabouni, S., Ellouz-Ghorbel, R., Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization, *Process Biochemistry*, 47(3), 509-516, 2012a.
- Chaari, F., Kamoun, A., Bhiri, F., Blibech, M., Ghorbel, R., Chaabouni-Ellouz, S., Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support, *Industrial Crops and Products*, 40(1), 192-198, 2012b.
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P.L., Srivastava, A.K. Bacterial xylanases: biology to biotechnology, *3 Biotech*, 6, 150, 2016.
- Classen, H.L., Bedford, M.R., The Use of Enzymes to Improve the Nutritive Value of Poultry Feeds, In *Recent Advances in Animal Nutrition*, Haresign, D.J.A., Cole, Butterworth-HeiNemann, 1991.

- Collins, T., Gerday, C., Feller, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 3-23, 2005.
- Deka, D., Bhargav, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., Goyal, A. Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates, *Enzyme Research*, volume 2011, Article ID: 151656, 8 pages, 2011.
- Demirel, R., Gürbüz, Y., Karma yemlerde enzim kullanımı. VIV Poultry Yutav '99. Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı, 3 – 6 Haziran 1999, Bildiriler Kitabı. s: 489 – 495, İstanbul, 1999.
- Dheeran, P., Nandhagopal, N., Kumar, S., Jaiswal, Y.K., Adhikari, D.K., A novel thermostable xylanase of *Paenibacillus macerans* IIPSP3 isolated from the termite gut, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(6), 851-860, 2012.
- Dong, J., Hong, Y., Shao, Z., Liu, Z., Molecular cloning, purification, and characterization of a novel, acidic, pH-stable endoglucanase from *Martelella mediterranea*, *Journal of Microbiology*, 48, 393-398, 2010.
- Elgharbi, F., Hlima, H.B., Ameri, R., Bejar, S., Hmida-sayari, A., A trimeric and thermostable lichenase from *B. pumilus* US570 strain: Biochemical and molecular characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 273-280, 2017.
- Flint, H.J., Martin, J., McPherson, C.A., Daniel, A.S., Zhang, J.X., A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta (1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*, *Journal of Bacteriology*, 175(10), 2943-2951, 1993.
- Gaur, R., Tiwari, S., Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07, *BMC Biotechnology*, 15:19, DOI 10.1186/s12896-015-0129-9, 2015.
- Gaur, R., Tiwari, S., Rai, P., Srivastava, V., Isolation, production, and characterization of thermotolerant xylanase from solvent tolerant *Bacillus vallismortis* RSPP-15, *International Journal of Polymer Science*, Article ID: 986324, 10 pages, 2015.

- Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Jamaluddin, Awasthi, M.K., Sarsaiya, S.,
A review on systematic study of cellulose, *Journal of Applied and Natural Science*, 2(2), 330-343, 2010.
- Gessesse, A., Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from
an alkaliphilic *Bacillus* sp, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9),
3533-3535, 1998.
- Gözükara, F., Termofil *Bacillus* sp. bakterisinden lichenaz (β -1,3 ve 1,4 glucanase)
enzimi üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik kullanılabilirliği, Yüksek
Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2009.
- Gözükara, F., Arıkan, B., Termofil *Bacillus* sp. bakterisinden lichenaz (β -1,3 ve 1,4
glucanase) enzimi üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik
kullanılabilirliği, *Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*,
27(5), 121-127, 2012.
- Horikoshi, K., Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology,
Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63 (4), 735-750, 1999.
- Irfan, M., Mushtaq, Q., Tabssum, F., Shakir, H.A., Qazi, J.I., Carboxymethyl
cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus*
subtilis K-18 for saccharification using response surface methodology, *AMB*
Express, 7:29, DOI: 10.1186/s13568-017-0331-3, 2017.
- Jones, S., Isolation of xylanolytic multi-enzyme complexes from *Bacillus subtilis*
SJ01, MsC Thesis, Rhodes University, South Africa, 2010.
- Juturu, V., Wu, J.C., Microbial xylanases: Engineering, production and industrial
applications, *Biotechnology Advances*, doi:10.1016/j.biotechadv.2011.11.006,
2011.
- Kamble, R.D., Jadhav, A.R., Isolation, purification, and characterization of xylanase
produced by a new species of *Bacillus* in solid state fermentation, *International
Journal of Microbiology*, Article ID 683193, 8 pages,
doi:10.1155/2012/683193, 2012.
- Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y., Purification and characterization of a
thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6, *Applied and
Environmental Microbiology*, 59(6), 1725-1730, 1993.
- Kiio, I.K., Jackim, M.F., Muniyali, W.B., Muge, E.K., Isolation and characterization
of a thermostable cellulase from *Bacillus licheniformis* strain vic isolated from

- geothermal wells in the Kenyan Rift valley, *The Open Biotechnology Journal*, 10, 198-207, 2016.
- Kim, S-Y., Oh, D-B., Kwon, O., Characterization of a lichenase isolated from soil metagenome, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 1699-1706, 2014.
- Kim, YK., Lee, S.C., Cho, Y.T., Oh, H.J., Ko, Y.H., Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments, *ISRN Microbiology*, Volume 2012, Article ID 650563, 9 pages, doi:10.5402/2012/650563, 2012.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Khasa, Y.P., Bioethanol production from lignocellulosic biomass: An overview, in *Wealth from Waste*, B. Lal, Ed., Teri Press, New Delhi, India, 2010.
- Kuhad, R.C., Gupta, R., Singh, A., Microbial cellulases and their industrial applications, *Enzyme Research*, Article ID: 280696, 10 pages, 2011.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 411-456, 1999.
- Ladeira, S.A., Cruz, E., Delatorre, A.B., Barbosa, J.B., Martins, M.L.L., Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility, *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(2), 110-115, 2015.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H., Wang, D., Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains, *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-1, 2012.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1951
- Lugani, Y., Singla, R., Sooch, B.S., Optimization of cellulase production from newly isolated *Bacillus* sp. Y3, *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 5, 264. doi:10.4172/2155-9821.1000264, 2015.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577, 2002.
- Maktouf, S., Moulis, C., Miled, N., Chaabouni, S.E., Simeon, M.R., A highly thermostable lichenase from *Bacillus* sp UEB-S: biochemical and molecular characterization, *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 115, 8-12, 2015.

- Mccleary, B.V., Purification of (1→3),(1→4)-beta-D-glucan from barley flour, *Methods in Enzymology*, 160, 511-514, 1988.
- Meng, F., Ma, L., Ji, S., Yang, W., Cao, B., Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass, *Letters in Applied Microbiology*, 59, 306-312, 2014.
- Menon, G., Mody, K., Keshri, J., Jha, B., Isolation, purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain, GESF-1, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 998-1005, 2010.
- Miranda, M., Kam, T.L., Wensheng, Q., The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass, *International Journal of Biological Sciences*, 5, 500-516, 2009.
- Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., Gupta, V.K., Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205, *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(2), 414-420, 2012.
- Ozcan, B.D., Coskun, A., Ozcan, N., Baylan, M., Some properties of a new thermostable xylanase from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. isolate DM-15, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(2), 138-143, 2011.
- Özcan, B.D., Özcan, N., *Bacillus subtilis* RSKK243'e ait bifonksiyonel ksilanaz geninin *E. coli* ve *B. subtilis*'te klonlanması ve enzimin karakterizasyonu, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 25, 881-885, 2001.
- Padilha, I.Q.M., Carvalho, L.C.T., Dias, P.V.S., Grisi, T.C.S.L., Honorato da Silva, F.L., Santos, S.F.M., Araújo, D.A.M., Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulase synthesized by *Bacillus* sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 35-42, 2015.
- Percival Zhang, Y.H., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies, *Biotechnology Advances*, 24(5), 452-481, 2006.
- Planas, A., Bacterial 1,3-1,4-β-glucanases: structure, function and protein engineering, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 361-382, 2000.

- Polizeli, M., Rizzatti, A., Monti, R., Terenzi, H., Jorge, J.A., Amorim, D., Xylanases from fungi: properties and industrial applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 577–591, 2005.
- Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., Tanticharoen, M., Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-I, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 694-697, 1999.
- Riordan, J.F., The role of metals in enzyme activity, *Annals of Clinical and Laboratory Sciences*, 7(2), 119-129, 1977.
- Robson, L.M., Chambliss, G.H., Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate, *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1039-1046, 1984.
- Sadhu, S., Maiti, T.K., Cellulase production by bacteria: A review, *British Microbiology Research Journal*, 3(3), 235-258, 2013.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S.K., Mayilraj, S., Maiti, T.K., Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung, *SpringerPlus*, 2, 10. doi: 10.1186/2193-1801-2-10, 2013.
- Sang-Mok, L., Koo, Y.M., Pilot-scale production of cellulase using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(2), 229–233, 2001.
- Seo, J.K., Park, T.S., Kwon, I.H., Piao, M.Y., Lee, C.H., Ha, J.K., Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 isolated from the rumen of a native Korean goat, *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 26(1), 50-58, 2013.
- Shakoor, S., Aftab, S., Rehman, A., Characterization of cellulose degrading bacterium, *Bacillus megaterium* S3, isolated from indigenous environment, *Pakistan Journal of Zoology*, 45(6), 1655-1662, 2013.
- Shallom, D., Shoham, Y., Microbial hemicellulases, *Current Opinion in Microbiology*, 6, 219-228, 2003.
- Sharma, M., Kumar, A., Xylanases: An overview, *British Biotechnology Journal*, 3(1), 1-28, 2013.

- Sharma, M., Mehta, S., Kumar, A., Purification and characterization of alkaline xylanase secreted from *Paenibacillus macquariensis*, *Advances In Microbiology*, 3, 32-41, 2013.
- Shikata, S., Saeki, K., Okoshi, H., Yoshimatsu, T., Ozaki, K., Kawai, S., Ito, S., Alkaline cellulases for laundry detergents: Production by alkalophilic strains of *Bacillus* and some properties of the crude enzymes, *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(1), 91-96, 1990.
- Singh, S., Moholkar, V.S., Goyal, A., Isolation, identification, and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from rhinoceros dung, *ISRN Microbiology*, vol. 2013, Article ID 728134, 7 pages, doi: 10.1155/202013/728134, 2013.
- Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Pandey, A., Microbial cellulases—production, applications and challenges, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64(11), 832–844, 2005.
- Sun, Y., Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11, 2002.
- Tabernero, C., Coll, P.M., Fernandez-Abalos, J.M., Perez, P., Santamaria, R.I., Cloning and DNA sequencing of *bgaA*, a gene encoding an endo- β -1,3-1,4-glucanase, from an alkalophilic *Bacillus* strain (N137), *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1213-1220, 1994.
- Tejirian, A., Xu, F., Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes, *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23), 7673-7682, 2010.
- Tseng, M-J., Yap, M-N., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., Chen, S-T., Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 590-595, 2002.
- Verma, D., Satyanarayana, T., Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases, *Bioresource Technology*, 17, 360–367, 2012.
- Verma, V., Verma, A., Kushwaha, A., Isolation & production of cellulase enzymes from bacteria isolated from agricultural fields in district Hardoi, Uttar Pradesh, India, *Advances in Applied Science Research*, 3(1), 171-174, 2012.

- Vijayaraghavan, P., Vincent, S.G., Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus* sp. isolated from a paddy field, *Polish Journal of Microbiology*, 61(1), 51-55, 2012.
- Wada, M., Nishiyama, Y., Chanzy, H., Forsyth, T., Langan, P., The structure of celluloses, *International Centre for Diffraction Data*, ISSN 1097-0002, p, 138-144, 2008.
- White, W.B., Sunde, M.L., Bird, H.R., Marlett, J.A., Prentice, N.A., Burger, W.C., Viscosity of β -glucan as a factor in the enzymatic improvement of barley for chicks, *Poultry Science*, 62, 853-862, 1983.
- Wiseman, A., *Handbook of enzyme biotechnology*. Second Edition, Chapter 3, The application of enzymes in industry, p, 274-373, 1987.
- Wolf, M., Geczi, A., Simon, O., Borriss, R., Genes encoding xylan and beta-glucan hydrolysing enzymes in *Bacillus subtilis*: characterization, mapping and construction of strains deficient in lichenase, cellulase and xylanase, *Microbiology*, 141(2), 281-290, 1995.
- Yang, S., Qiaojuan, Y., Jiang, Z., Fan, G., Wang, L., Biochemical characterization of a novel thermostable β -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Paecilomyces thermophila*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5345-5351, 2008.
- Yin, L-J., Lin, H-H., Xiao, Z-R., Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1, *Journal of Marine Science and Technology*, 18(3), 466-471, 2010.
- Yoo, D.H., Lee, B.H., Chang, P.S., Lee, H.G., Yoo, S.H., Improved quantitative analysis of oligosaccharides from lichenase-hydrolyzed water-soluble barley β -glucans by highperformance anion-exchange chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1656-1662, 2007.
- Yücel, H., Yem katkısı likenaz enzimi üreten bakteri izolasyonu ve enzimin kısmi karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye, 2017.
- Zheng, H.C., Sun, M.Z., Meng, L.C., Pei, H.S., Zhang, X.Q., Yan, Z., Zeng, W.H., Zhang, J.S., Hu, J.R., Lu, F.P., Sun, J.S., Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its application in

xylooligosaccharides production, Journal of Microbiology and Biotechnology,
24(4), 489-496, 2014.



ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Çağla ILIŞKAN

2. Doğum Tarihi : 23.09.1990

3. Ünvanı : Biyolog

4. Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lisans	Biyoloji Bölümü	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Biyoloji Anabilim Dalı	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi	2017

5. Akademik Ünvanlar:

Görevi	Bölümü	Kurumu	Yıl

6. İş Tecrübesi:

7. Yayınlar:

8. Yazılan uluslar arası kitaplar veya kitaplarda bölümler:

9. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

10. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

11. Diğer yayınlar:

12. Projeler:

13. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

14. Ödüller: