

**T.C.  
OSMANİYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEM KATKISI SELÜLAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN  
TERMOFİLİK *Bacillus* SUŞLARININ İZOLASYONU ve  
ENZİMLERİN KISMİ KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Harun Reşit KILIÇER**

**BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**OSMANİYE  
ARALIK – 2014**



T.C.  
OSMANIYE KORKUT ATA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEM KATKISI SELÜLAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN  
TERMOFİLİK *Bacillus* SUŞLARININ İZOLASYONU ve  
ENZİMLERİN KİSMİ KARAKTERİZASYONU

Harun Reşit KILIÇER

BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

OSMANIYE  
ARALIK-2014

Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı "12YLBYL004" No'lu öğrencisi "Harun Reşit KILIÇER" tarafından "Yrd.Doç.Dr. Bahri Devrim ÖZCAN" danışmanlığında hazırlanan "Yem Katkısı Selüloz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu" başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN (Danışman)

.....

Doç. Dr. Hüsniye AKA SAĞLIKER

.....

Yrd. Doç. Dr. Makbule BAYLAN

.....

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

Doç. Dr. A. Ali GÜRTEN

Enstitü Müdürü

*Bu çalışma Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından OKÜBAP-2013-PT3-0012 nolu proje ile desteklenmiştir.*

*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.

Harun Reşit KILIÇER

**Üniversitesi** : **Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi**  
**Enstitüsü** : **Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Anabilim Dalı** : **Biyoloji Anabilim Dalı**  
**Tez Danışmanı** : **Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN**  
**Tez Türü** : **Yüksek Lisans**  
**Tarihi** : **Aralık - 2014**

**Harun Reşit KILIÇER**

**YEM KATKISI SELÜLAZ ENZİMLERİNİ ÜRETEN TERMOFİLİK  
*Bacillus* SUŞLARININ İZOLASYONU VE ENZİMLERİN KISMİ  
KARAKTERİZASYONU**

**ÖZET**

Bu çalışmada, Düziçi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcasından toplanan toprak numunelerinden üç adet termofilik *Bacillus* sp. izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolatlar sırasıyla *Bacillus* sp HR-1, HR-2 ve HR-3 olarak isimlendirilmişlerdir. Selülaз üretimi, üreme periyodunun başlangıcından itibaren HR-1 ve HR-2 izolatları için 72. saatte, HR-3 izolatu için ise 24. saatte maksimum düzeye çıkmıştır. HR-1 ve HR-2 selülaзları optimum aktivitelerini 60 °C’de gösterirken, HR-3 selülaзı 70 °C’de göstermiştir. Bununla birlikte HR-1 ve HR-3 selülaзları optimum aktivitelerini pH 5.0’de gösterirken, HR-2 selülaзı pH 4.0’de göstermiştir. Her üç enzim de 60 °C’de 30 dakika muhafaza edildiklerinde aktivitelerinin tamamını korurken, daha yüksek sıcaklık değerlerinde 30 dakika inkübasyon sonucunda aktivitelerini kaybetmeye başlamışlardır. HR-1, HR-2 ve HR-3 bakterilerinin enzimlerine ait spesifik aktiviteler 55 °C’de sırasıyla 34.1, 67.8 ve 112.3 U/mg olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus* sp.,  $\beta$ -1,4-glukanaz, selülaз, izolasyon, karakterizasyon

**University** : Osmaniye Korkut Ata University  
**Institute** : Institute of Natural and Applied Sciences  
**Science Programme** : Department of Biology  
**Supervisor** : Assist. Prof. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN  
**Degree Awarded** : M.Sc.  
**Date** : December – 2014

**Harun Reşit KILIÇER**

**ISOLATION OF FEED ADDITIVE CELLULASE PRODUCING  
THERMOPHILIC *Bacillus* STRAINS AND PARTIAL  
CHARACTERIZATION OF THE ENZYMES**

**ABSTRACT**

In the present study, three thermophilic *Bacillus* strains were isolated from the soil samples collected from the Haruniye Thermal Spring located in Düziçi. The isolates were entitled as *Bacillus* sp. HR-1, HR-2, and HR-3, respectively. The maximum productions of cellulases were revealed at 72<sup>nd</sup> hour of incubation period for HR-1 and HR-2 strains, and at 24<sup>th</sup> hour of incubation period for HR-3 strain, respectively. The optimum enzyme activity was observed at 70 °C for HR-3 cellulase, whereas at 60 °C for HR-1 and HR-2 cellulases. On the other hand, optimum pH value for HR-2 cellulase was 4.0, whereas 5.0 for HR-1 and HR-3 cellulases. All enzymes protected their activities after pre-incubation at 60 °C for 30 min, but they begin to decrease after pre-incubation at higher temperature values. The specific activities of HR-1, HR-2, and HR-3 bacterial cellulases were 34.1, 67.8 and 112.3 U/mg at 55 °C, respectively.

**Key Words:** *Bacillus* sp.,  $\beta$ -1,4-glucanase, cellulase, isolation, characterization

*Çok Kıymetli Aileme...*

## TEŞEKKÜR

Bu alıŐma, Osmaniye Korkut Ata Üniwersitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle Yüksek Lisans tez çalıŐmamın yürütülmesinde bana büyük emekleri geçen ve beni her konuda yönlendiren ve hiçbir yardımı esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahri Devrim ÖZCAN'a;

Ayrıca çalıŐmalarım süresince beraber huzur ve uyum içinde alıŐtıĐım Ziraat Mühendisi Celal TÜRKER'e, Yüksek lisans öğrencisi Murat PİŐKİN'e ve tüm mesai arkadaşlarıma;

Hayatım boyunca her türlü kararım ve çalıŐmamda bana koŐsulsuz destek olan annem, babam ve kardeŐlerime;

Destegi ni hep arkamda hissettiğim sevgili eŐim Bahar KILIÇER'e ve aramıza katılmasıyla yaŐamımıza renk katan, mutluluk kaynağım biricik kızım Gülfer İrem'ime;

En içten saygı ve teŐekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
TEZ BİLDİRİMİ	
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İTHAF SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Selüloz ve Selülazlar .....	1
1.1.1. Selülazların Bazı Uygulama Alanları .....	3
1.1.1.1. Gıda Endüstrisinde Selülazlar .....	4
1.1.1.2. İçecek ve Şarap Endüstrisinde Kullanımı .....	5
1.1.1.3. Hayvan Yemi Endüstrisinde Kullanımı .....	5
1.1.1.4. Tekstil Endüstrisinde Kullanımı .....	5
1.1.1.5. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı.....	6
1.1.1.6. Kâğıt Endüstrisinde Kullanımı .....	6
1.1.1.7. Diğer Alanlarda Kullanımı .....	7
1.2. Termofilik Bakteriler ve <i>Bacillus</i> Cinsi .....	7
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	10
3. MATERYAL ve METOT .....	17
3.1. Materyal .....	17
3.1.1. Bakteriler .....	17
3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler .....	17
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler .....	17
3.2. Metot .....	18
3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu .....	18
3.2.2. Bakterilerin Selülaz Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	19
3.2.3. Bakterilerden Master ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması .....	20

3.2.4. Bakterilerin Zamana Göre Kütle Artışlarının Belirlenmesi .....	22
3.2.5.Enzimatik Analizler .....	23
3.2.5.1. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi .....	24
3.2.5.2. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesi .....	25
3.2.5.3. Enzimlerin Termal (Sıcaklık) Stabilitelerinin Belirlenmesi .....	25
3.2.5.4. İzolatların Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	25
3.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ...	26
3.2.6.1. Bakterilere Ait Hücre Dışı Protein Örneklerinin Hazırlanması .....	26
3.2.6.2. SDS-PAGE'nin Hazırlanması .....	26
3.2.6.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi .....	27
3.2.6.4. SDS-PAGE Jelinin Boyanması .....	28
3.2.7. İzolatlara Ait Antibiyogram Analizleri .....	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....	31
4.1. BULGULAR .....	31
4.1.1. <i>Bacillus</i> sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması .....	31
4.1.2. Enzimatik Analizler .....	31
4.1.2.1. Zamana Göre CMCaz Üretimi .....	31
4.1.2.2. CMCaz Enzimlerine Ait Optimum Sıcaklık Değerleri .....	32
4.1.2.3. CMCaz Enzimlerine Ait Optimum pH Değerleri .....	33
4.1.2.4. CMCaz Enzimlerinin Termal Kararlılıkları .....	34
4.1.3. Enzimlere Ait Spesifik Aktivite Değerleri .....	35
4.1.4. İzolatlara Ait Toplam Proteinlerin SDS-PAGE'de Karşılaştırılması .....	36
4.1.5. İzolatların Antibiyogram Analizleri .....	36
4.2. TARTIŞMA .....	37
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	40
KAYNAKLAR .....	41
ÖZGEÇMİŞ .....	50

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Selülozun moleküler yapısı.....	2
Şekil 1.2. Selülaz enziminin şematik modeli .....	3
Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan genel bir görüntü.....	18
Şekil 3.2. Toprak numunelerinin alındığı Haruniye Kaplıcası'ndan genel bir görüntü .....	19
Şekil 3.3. İzolatların CMCaz aktivitesi için Congo-red ile boyanması.....	20
Şekil 3.4. CMCaz pozitif izolatlardan master stok hazırlanması .....	21
Şekil 3.5. CMCaz pozitif izolatlardan gliserol stok hazırlanması.....	21
Şekil 3.6. Zamana göre bakteri kütle artışının spektrofotometrik olarak ölçümü.....	22
Şekil 3.7. CMCaz enzimlerinin DNS yöntemi ile analizleri.....	24
Şekil 3.8. İzolatlara ait hücre dışı protein örneklerinin SDS-PAGE'ye yüklenmesi (A ve B) ve örneklerin elektroforezi (C) .....	28
Şekil 3.9. Protein örneklerinin elektroforez sonrası Coomassie blue ile boyanması.....	29
Şekil 3.10. İzolatların farklı antibiyotikler emdirilmiş diskler ile antibiyogram analizi .....	30
Şekil 4.1. CMCaz aktiviteleri belirlenmek üzere LB-CMC-agar plaklarına ekilmiş izolatların bulunduğu plakların Congo-red boyaması sonucu görüntüleri .....	31
Şekil 4.2. HR-1, HR-2 ve HR-3 izolatlarının zamana göre relatif CMCaz üretimi .....	32
Şekil 4.3. İzolatlara ait CMCaz enzimlerinin değişik sıcaklık değerlerinde gösterdikleri relatif aktivite değerleri.....	33
Şekil 4.4. İzolatlara ait CMCaz enzimlerinin değişik pH değerlerinde gösterdikleri relatif aktivite değerleri .....	34
Şekil 4.5. Enzimlerin farklı sıcaklık koşullarında gösterdikleri termal kararlılık grafiği .....	35

Şekil 4.6. Enzimlere ait spesifik aktivite değerlerinin grafik üzerinde karşılaştırılması .....	35
Şekil 4.7. İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE’de karşılaştırılması. ....	36
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> sp. suşlarının antibiyotik emdirilmiş disklerle yapılan antibiyogram görüntüsü .....	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	: Amonyum persülfat
CMC	: Karboksimetilselüloz
CMCaz	: Karboksimetilselülaz
Dev	: Devir
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNS	: Dinitrosalisilik asit
EDTA	: Etilen diamino tetra asetik asit
gr	: Gram
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria Bertani
lt	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
OD	: Optikal densite
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
RNA	: Ribonükleik asit
rpm	: Revolutions per minute (dakikada devir sayısı)
SDS	: Sodyum Dedosil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dedosil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
sp.	: Tür
TCA	: Trikloro asetik asit
TEMED	: N,N,N,N-Tetrametil etilendiamin
Tris	: 2-Amino-2-Hidroksimetilpropan-1,3-diol
U/mg	: Ünite/miligram
U/ml	: Ünite/mililitre
v	: Hacim

V	: Volt
v/v	: Hacim/hacim
wt/v	: Ağırlık/hacim
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{l}$	: Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Enzimler biyolojik katalizörler olup canlı hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonların hızını artıran fakat kendileri değişime uğramadan çıkan biyomoleküllerdir. Kökeni yunanca "zymae" kelimesine dayanan, "hamur mayası" veya "ekşi hamur" anlamına da gelen "enzimle" ilgili bilimsel araştırmalar 18. yy'da gözlenmeye başlamıştır. Enzimle katalize olan reaktanlara substrat adı verilir ve her enzim özel bir substrat için veya bundan ürün oluşturmak için oldukça spesifiktir (Palmer, 1991).

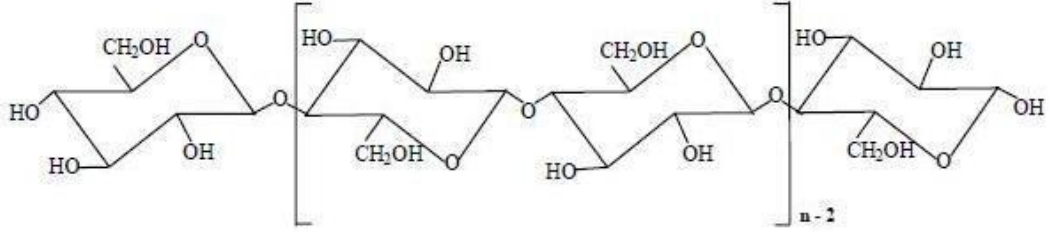
Diğer bir tanıma göre enzimler; oksijen, hidrojen, karbon ve azottan oluşan, kimyasal tepkimelerde katalizör olarak görev yapan, mikroorganizmalardan (bakteriler, virüsler, mantarlar) salgılanan protein yapısında olan molekulardır. Hemen hemen her metabolik reaksiyon enzimler yardımıyla kontrol edilip hızlandırılır ve kontrol edilir. Ayrıca enzimler sulu ortamda etkili olup, genellikle su miktarının %18'in altında olduğu ortamlarda çalışmazlar (Bhat, 2000).

Her enzimin katalitik aktivitesinin en yüksek seviyede olduğu bir sıcaklık değerine 'optimal sıcaklık değeri' denir. Bu değerden yüksek sıcaklıklarda enzim yapısı molekül içi veya moleküller arası bağların kopması sonucu bozulmaya başlar. Aynı zamanda her enzimin en iyi çalıştığı bir pH aralığı (optimum pH) da mevcuttur. Bu, enzimin molekül yapısının pH daki değişime bağlı olarak etkilenmesinden kaynaklanmaktadır. Bazı maddeler ise enzimlerin aktif bölgelerinin engellenmesi sonucu enzimin bozulmasını sağlayarak, katalitik aktivitesini düşürebilir, hatta tamamen durdurabilir. Bu tür maddelere 'inhibitör' adı verilir (Aehle, 2004).

### 1.1. Selüloz ve Selülazlar

Selüloz, yeryüzünde en yaygın bulunan organik molekül olup bitki ve alglerin hücre duvarlarının yapısında bulunmakla beraber, bazı hayvanlar ve bakteriler tarafından da üretilmektedir (Lynd, vd., 2002).

Moleküler düzeyde düz bir polimer olan selüloz, glikoz ünitelerinin  $\beta$ -1,4-glikozidik bağlarla bağlanması sonucu oluşmaktadır (Sukumaran vd., 2005) (Şekil 1.1). Selülazlar ise selüloz moleküllerindeki  $\beta$ -1,4-glikozidik bağları hidrolize ederek glikoz moleküllerini serbest bırakan enzimlerdir (Nishida, vd., 2007).



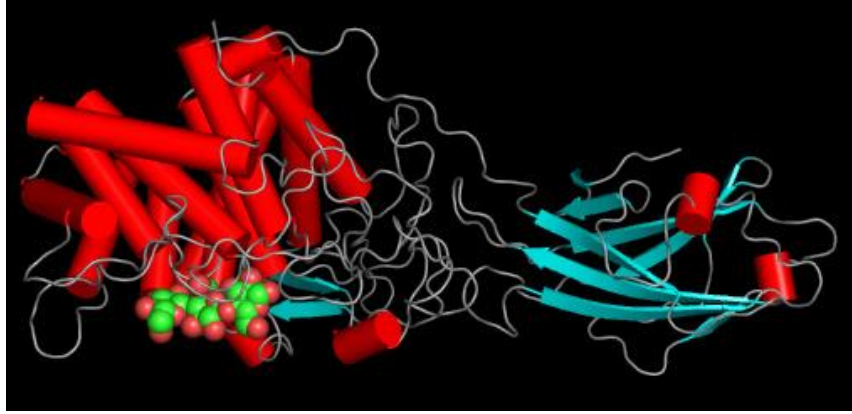
Şekil 1.1. Selülozun moleküler yapısı

Selülitik organizmalar, endoglukanazlar ( $\beta$ -1,4-D-glukan glukanohidrolaz; EC 3.2.1.4), ekzoglukanazlar ( $\beta$ -1,4-D-glukan sellobiyohidrolaz; EC 3.2.1.91) ve  $\beta$ -1,4-D-glukosidazlar (sellobiaz veya  $\beta$ -D-glikozid glikozil hidrolaz; EC 3.2.1.21) olmak üzere üç temel grup enzim üretirler (Ryu ve Mandels, 1980). Bu enzimlerden ilk ikisi selülozu oligosakkaritlere ve sellobiyozu parçalarken,  $\beta$ -glukosidaz sellobiyozu glikoza parçalar (Shimada, vd., 1994). Genel olarak diğer selülitik bakteriler gibi *Bacillus*'lar da selüloz ve diğer  $\beta$ -glukan substratlara karşı düşük hidrolitik aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler *Bacillus*'ların selülitik enzim kaynağı olarak yeniden revaçta olmalarını sağlamıştır (Uhlig, 1998).

Selüloz genellikle kristalin selüloz ve daha az miktarda şekilsiz (amorf) selüloz zincirleri formunda mevcut olup, şekilsiz formu enzimatik parçalanmaya daha duyarlıdır (Perez, vd., 2002).

Selülazlar (Şekil 1.2) yaygın olarak bakteri ve diğer mikroorganizmalar tarafından üretilir. Bakteriler mantarlara göre daha hızlı büyüme oranına sahip olmaları sebebiyle daha fazla selülaz üretme potansiyeline sahiptirler (Sethi, vd., 2013).





Şekil 1.2. Selüloz enziminin şematik modeli

Selülozik materyallerin enzimatik hidrolizi üzerine gerçekleştirilen biyoteknolojik işlemler günümüzde oldukça artmıştır. Yenilenemeyen kaynakların gittikçe azalması; selülozu gıda, enerji, yakıt ve diğer ürünler için temel ham materyal haline getirmiştir (Krishna, vd., 2000).

### 1.1.1. Selülazların Bazı Uygulama Alanları

Selülazların biyoteknolojide kullanılmaya başlamaları 1980'li yılların başlarında başlamış olup ilk uygulama hayvan yeminde gerçekleştirilirken bunu gıda endüstrisi izlemiştir. Sonraki yıllarda da enzimlerin kullanım alanı daha çok tekstil, çamaşır deterjanı ve kâğıt endüstrilerinde yoğunlaşmaya başlamıştır (Wolfgang, 2004).

Selülaz enzimlerinin yüksek spesifikliğı, toksisitesinin olmaması, biyobozunur olması ve optimum pH, sıcaklık, basınç gibi özelliklerinin ılımlı aralıklarda olması inorganik katalizörlere göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır (Taylor, 1991).

Ülkemizde tahıl üretiminin yaygın olması, üretilen arpa, yulaf gibi yüksek selüloz içerikli yem hammaddelerinin, sap ve saman gibi bitkisel artıkların tarımsal üretim sonucu büyük miktarlarda ortaya çıkması, bunların ekonomik bir şekilde değerlendirilmesini zorunlu kılmaktadır (Özcan, vd., 1994). Bu sebeple başta *Bacillus*'lar olmak üzere mikroorganizmalarca üretilen selülaz enzimleri, yüksek düzeyde selüloz içeren yemlere ilave edilerek sindirimlerinin artırılmasına yardımcı

olabilir (Gado, vd., 2007; Azzaz, 2009; Murad ve Azzaz, 2010). Silaja selüloz enzimlerinin ilavesi ile silajın sindirilebilirliğinde kayda değer bir artış sağlandığı da bildirilmiştir (Van Vuuren, vd., 1989; Ridla ve Uchida, 1993). Yine karışık bağlı beta-glukanaz enziminin ( $\beta$ -(1,3-1,4)-glukanaz, likenaz) kanatlı rasyonlarında kullanımı, kanatlılarda yapışkan dışkı adı verilen ve arpa gibi yüksek selüloz içeren yemlerin oluşturduğu sorunun ortadan kalkmasını sağlamaktadır. Bazı uygulamalar ayrıntılı olarak incelendiğinde çok farklı kullanım alanlarının olduğu görülür (Kırkpınar ve Basmacıoğlu, 2001).

#### **1.1.1.1. Gıda Endüstrisinde Selülazlar**

Selüloz enzimleri son yıllarda gıda endüstrisinde yaygın bir kullanım potansiyeline sahip olmuştur. Bu uygulamalardan bazıları aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- a) Tohumlardan yağ ve meyve suyu ekstraksiyonunda,
- b) Meyve sularının berraklaştırılmasında,
- c) Tahılların homojen olarak su çekmesini sağlamak ve yeterince ıslanmasının artırılmasında,
- d) Soya sosu gibi fermente soya gıdaların üretiminde soyanın dış zarının uzaklaştırılmasında,
- e) Kokonat ve soya fasulyesinden protein izolasyonunda.
- f) Mısır ve tatlı patatesten nişasta üretiminde.
- g) Sindirimini artırmak amacı ile yosunların jelatinizasyonunda.
- h) Su yosunlarından agar ekstraksiyonunda.
- i) Gıda katkı maddesi olarak kullanılan öğütülmüş lignoselülozik materyalin parçalanmasında.
- j) Selülozik atıklardan çözünür şeker, glikoz ve selooligosakkarit üretiminde.
- k) Bioetanol üretimi için substrat eldesinde.
- l) Kurutulmuş sebze ve çorba karışımlarının geri sulandırılmasının artırılmasında.
- m) Polisakkarit, protein, enzim ve tat verici maddelerin açığa çıkışını kolaylaştırmak amacıyla bitki hücre duvarlarının uzaklaştırılmalarında kullanılmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997).

### **1.1.1.2. İçecek ve Şarap Endüstrisinde Kullanımı**

Selülağ enzimleri Şarap yapımında bitki hücrelerindeki polisakkarit duvarlarının hidroliz edilmesiyle yüzeylelerinin yumuŐatılmasını sağlamakla birlikte, üzümlerin renk ekstraksiyonunda kullanılarak kalite, filtrasyon ve arıtma işlemlerinin gerçekleşmesinde kullanılır. Rekombinant mayalardan elde edilen  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glukanağlar Őaraplarda aroma artışının sağlanması, biranın filtrasyonunun kolaylaştırılması ve düşük kalite arpada bulunan  $\beta$ -1,3 ve  $\beta$ -1,4 glukanağın hidrolize edilmesinde kullanılmaktadırlar (Bhat, 2000).

### **1.1.1.3. Hayvan Yemi Endüstrisinde Kullanımı**

Selülağlar evcil hayvanlar ve balık çiftliklerinde kullanılmasının yanında kümes hayvanları, domuzlar ve geviŐ getiren hayvanlar tarafından tüketilen hayvan yemleri endüstrisinde kullanılmaktadır. Dünyada son zamanlarda yemlerin besleyici özelliğini, geviŐ getiren hayvanların süt verimini ve vücut ağırlığını artırmak için selülağ ve hemiselülağları fazla miktarda içeren enzim preparatlarını kullanmaya karşı büyük miktarda bir ilgi duyulmaya baŐlanmıŐtır.

Selülağ enzimleri özellikle ruminant ve monogastrik hayvanların beslenmesi başta olmak üzere, yemlerin sindirilebilirliğinin artırılmasında kullanılmaktadır. Diğer taraftan, lignoselülozik materyallerin ön işlemden geçirilmesinde, hububatların kabuklarından arındırılmasında, ruminant ve monogastrik hayvanların selüloğdan yararlanmalarını artırmak için silaj yapımında ve yemlerin saklanmasında kullanılmaktadır (Bhat ve Bhat, 1997).

### **1.1.1.4. Tekstil Endüstrisinde Kullanımı**

Selülağ enzimleri;

- a) KumaŐlardan boyanın fazlasını almada (biostoning),
- b) Birçok yıkama sonunda pamuk kumaŐlardan çıkan mikrofibrillerin giderilmesinde,

c) Pamuk ya da pamuklu kumaşların yıkanması, renk parlaklığının artırılması ve yumuşaklığının geri kazandırılmasında kullanılır (Bhat ve Bhat, 1997).

#### **1.1.1.5. Deterjan Endüstrisinde Kullanımı**

Selülozlar diğer hidrolazların yaptığı gibi lekeleri özümlemediklerinden dolayı deterjan enzimleri tarihinde bir dönüm noktası olmuşlardır. Bunun yerine selülozlar leke parçacıklarının uzaklaştırılması için pamuğun mikrofibrillerini parçalamaktadırlar. Alkalın pH'daki deterjanların stabilitesi deterjan enzimi için gereklidir (Shirai vd., 2001). Alkalın selülozların keşfi ile çamaşır deterjanlarına karıştırılarak kullanılması enzimin yeni bir uygulama alanını oluşturmuştur (Horikoshi, 1999). Alkalın selüloz, pamuklulardan toprağın uzaklaştırılmasında etkili olup, pamuk liflerini parçalamamaktadır (Kıran vd., 2006). Selülozlar hem temizleme performansını artırmakta hem de kumaşın onarılmasına katkı sağlamaktadır. Diğer yandan kumaşların onarım etkisi yüzey tüyü olarak görünen ve/veya kumaşın renk tonunu etkileyen ve gözle görülebilecek büyüklükte olan fragmentler gibi büyük selüloz lif fragmentlerinin uzaklaştırılmasıyla ilgilidir. Bu lif fragmentleri kumaşa yıpranmış, eskimiş bir görüntü verir ve onların uzaklaştırılmasıyla gençleştirme işlemi yapılmış olur (Schafer vd., 2007).

Günümüzde yüksek aktiviteli modern deterjanların aktivitelerini daha fazla arttırmak amacıyla karışıma lipaz, selüloz, amilaz, proteaz gibi bir veya daha fazla enzimin karıştırılması söz konusudur (Singh vd., 2001).

#### **1.1.1.6. Kâğıt Endüstrisinde Kullanımı**

Kullanılmış kâğıtlar, gazete kâğıtları ve ambalaj kâğıtları geri dönüşüm için önemli bir kaynaktır. Kâğıtlardaki mürekkeplerin enzimatik yolla uzaklaştırılması, günümüzde kimyasal uygulamanın yerini almış durumdadır (Schafer vd., 2007). Bu sebeple selülozlar kâğıt endüstrisinde kâğıt fabrikalarının drenajlarının ağartılması, kâğıtlardan mürekkebin uzaklaştırılması, kâğıdın mukavemet özellikleri ve kaba mekanik kâğıt hamurunun modifikasyonu için biyomekanik hamurlaştırmada

kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda kartonların biyolojik parçalanmasını kolaylaştırmak da selülozların bir diğer uygulama alanıdır. Selüloolitik enzimler temizlik kâğıtları ve kâğıt havluların daha yumuşak olması için de kullanılmaktadırlar (Sukumaran vd., 2005). Ayrıca selülozlar kabuk soyma, liflerin özelliklerinin değiştirilmesinde ve çözünebilir hamur üretiminde kullanılabilir (Karademir vd., 2002).

#### **1.1.1.7. Diğer Alanlarda Kullanımı**

Biyoyakıt üretimi için günümüzde en yoğun araştırmaların gerçekleştirildiği en önemli uygulama alanı lignoselülozik atıkların kullanımınıdır. Selüloz enzimleri, selülozik materyallerin glikoz ve diğer fermente edilebilir şekerlere çevrimi ile etanol gibi çeşitli fermantasyon ürünlerinin ya da tek hücre proteinlerinin üretilmesi amacıyla yıkımında kullanılmaktadırlar (Sukumaran vd., 2005). Ayrıca zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik sakkarifikasyonunda da selülozlardan faydalanılmaktadır (Kıran vd., 2006).

#### **1.2. Termofilik Bakteriler ve *Bacillus* Cinsi**

Termofilik bakterilerin yaşam alanları, sıcak su kaynakları ve kaplıca gibi doğal ve insan yapımı tüm karasal ve denizel sıcak çevrelerdir. Termofilik organizmalar optimum olarak 50-80 °C sıcaklık aralıklarında gelişim gösterirler (Vieille ve Zeikus, 2001). Bu mikroorganizmalarca üretilen enzimler, yüksek sıcaklık koşullarında aktivite göstermelerinden dolayı endüstriyel uygulamalarda sıklıkla tercih edilmektedirler (Gaur, vd., 2012).

*Bacillus* genusu düz ya da düze yakın hücreler olup uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedirler. Genelde gram pozitif olup aerobik veya fakültatif anaeropturlar. *Bacillus* genusunun koloni morfolojisi çeşitlilik göstermekte olup geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklere pigmentli kolonilere de rastlanmaktadır (Buchanan ve Gibbons, 1974).

*Bacillus*'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunmaktadır. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalabilmekle birlikte genellikle 35-37 °C'de ve pH 7.0 civarında üreme göstermektedirler. Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi üremektedirler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişim göstermektedirler (Taubman, 1992).

*Bacillus* genusunun tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilebilmektedirler (Robinson ve Lehninger, 1985).

*Bacillus*'lar  $\alpha$ -amilaz, proteaz,  $\beta$ -glukanaz, ksilanaz, likenaz ve diğer birçok önemli endüstriyel enzimler ile insektisit ve antibiyotik gibi biyomoleküllerin üretim kaynağıdırlar (Priest 1977; Horikoshi, 1996). *Bacillus* cinsine ait termofilik bakterilerin yayılımı sıklıkla tartışılmıştır. İzole edilen termofilik bakterilerden sadece birkaçının genotipik ve fenotipik çeşitliliğine göre tam olarak termofilik *Bacillus* sp. suşlarını karakterize ettiği bildirilmiştir (Mora, vd., 1998).

Bu tezin amacı, Osmaniye ili Düziçi ilçesi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcası'ndan toplanan toprak numunelerinden termofilik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve bu izolatlar tarafından üretilen selülaz enzimlerinin kısmi karakterizasyonlarıdır.

Bu tezin kapsamı ise aşağıda maddeler halinde verilmiştir;

- \* Farklı ortamlardan toprak örneklerinin alınması,
- \* Elde edilen numunelerin 80 °C'de 10 dk inkübe edilerek vegetatif hücrelerin ölmesi (pastörizasyon),
- \* Numunelerin LB ve L gibi zengin besiyerlerine aktararak bakteri sporlarının çimlenmesinin sağlanması,

- \* Zengin sıvı besiyerlerinde çimlenen bakterilerin katı besiyerlerine aktararak koloni oluşturmalarının sağlanması,
- \* Tek tek seçilen kolonilerin CMC içeren katı besiyerlerine ekilerek selüloz aktivitesine sahip izolatların belirlenmesi,
- \* Bakterilere ait selüloz enzimlerinin DNS yöntemi ile fiziksel özelliklerinin (optimum pH, optimum sıcaklık, sıcaklık direnci, zamana göre enzim aktivitesi vb.) belirlenmesi,
- \* SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ile selüloz aktivitesine sahip izolatların toplam protein bant profillerinin incelenmesi.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Greaves (1971), *Bacillus polmyxa*'nın selüloz sentezi üzerine yaptığı çalışmada, selülazın hücre dışı sentezlenen bir enzim olduğunu ve bu enzimin hücrelerden ekstrakte edilebileceğini bildirmiştir.

Knosel (1971), *Bacillus* cinslerinin aerobik ya da fakültatif türlerine ait spor formlarını karşılaştırmış ve bu türlerden *Bacillus brevis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polmyxa* ve *Bacillus cereus*'un selülitik aktiviteye sahip cinsler olduğunu göstermiştir.

Robson ve Chambliss (1984), *Bacillus* sp.'den üretilen selüloz enziminde aktivite tayinini yapmışlar ve sonuçta maksimum selüloz aktivitesin pH 4.8 ve 58 °C sıcaklıkta gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Ito (1997), izole ettiği alkalifilik *Bacillus* KSM-635 suşundan saflaştırdığı alkalın selüloz enziminin deterjan endüstrisi için kullanılabilir bir enzim olduğunu bildirmiştir.

Hakamada, vd. (1997), izole ettikleri *Bacillus* sp. KSM-S237 suşunun pH 9.0-12.0 pH ve 10-40 °C sıcaklık aralıklarında geliştiğini bildirmişlerdir. Bu suş tarafından üretilen selülazın ise 40 °C de ve pH 9.0'da en iyi aktiviteyi gösterdiğini belirtmişlerdir.

Singh ve Kumar (1998), *Bacillus brevis* VS-1'den selüloz enzimi elde etmek üzerine yaptıkları bir çalışma sonucunda enzim aktivitesi için optimum pH'nın 5.5 ve sıcaklığının ise 37 °C olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda da enzim aktivitesinin bazı ağır metallerle (Hg) inhibe edildiğini de belirtmişlerdir.

Krishna (1999), *B. subtilis*'ten selüloz enzimi üretimini katı faz fermantasyonuyla gerçekleştirmişler ve ortam pH'sı, substrat, nem, parça büyüklüğü, inkübasyon sıcaklığı ile karbon ve azotun enzim üretimine etkilerini çalışmışlardır. Bunun



sonucunda muz atıklarından yani lignoselülozik kütleden elde ettiği *B. subtilis*'in selülozu parçalayabilecek en iyi kaynaklardan biri olduğunu değerlendirmişlerdir.

Krishna, vd. (2000), selülozun enzimatik hidrolizi için yaptıkları çalışmalarda selülaz salgılayan mikroorganizmaların ortama doğrudan ilave edilmesini denemişler ancak elde edilen verimin düşük olduğunu görmüşlerdir. Bununla birlikte, selülazın selüloz ile doğrudan muamelesinin çok daha iyi bir çözüm olduğunu ortaya koymuşlar ve pek çok mikroorganizmanın selülaz enzimi üretme yeteneğinde olduğunu göstermişlerdir.

Hoshino, vd. (2000), *Bacillus* sp. KSM-635 suşundan alkalın selülaz enzimini izole edip, bunun deterjan alanında kullanılıp pamuklu giysilerden kirlerin uzaklaştırılması üzerine çalışmışlardır.

Mawadza, vd. (2000), iki adet *Bacillus* suşundan üretilen selülazı karakterize ederek, her iki enzimin de molekül ağırlığının 40 kDa olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca enzimlerin optimum aktivitelerinin pH 5.0-6.5'de ve sıcaklıklarının ise 65 ve 70 °C'de gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Gorska, vd. (2001), selülozik bakterileri elektron mikroskobu yardımıyla inceleyerek çeşitli çalışmalar yapmışlar ve bunun sonucunda *Bacillus polymyxa* tarafından selülaz enzimi üretiminin olduğunu belirlemişlerdir.

Kotchoni, vd. (2003), selülaz üretimi için yapılan bir diğer çalışmada kimyasal mutajenlerle muameleden sonra *Bacillus pumilus*'un bir mutantının olduğunu belirlemişlerdir. BpCRI 6 olarak adlandırdıkları bu mutantın selülaz enzimi üretebilme yeteneği için seçmişler ve optimum üreme şartlarının (pH 6.5, 25 °C ve 1 mM Ca) BpCRI 6 tarafından üretilen selülaz enzimi miktarının diğer muamelesiz türden dört kat daha fazla olduğunu ortaya koymuşlardır.

Zhang, vd. (2004), tarafından yapılan çalışmada alkali *Bacillus* suşundan etanol muamelesiyle elde ettikleri ham multienzim saf kültür ile benzer özellikler

sergilediğini, proteaz üretimini azalttığını, nişasta ve selülozu kendiliğinden çözerek parçaladığını ortaya koymuşlardır.

Singh, vd. (2004), *Bacillus sphaericus* JS1 suşundan alkali selülaz (CMCaz) enzimi izole ederek enzimin üretimini ve karakterizasyonunu çalışmışlardır. Enzimin SDS-PAGE analizinde moleküler ağırlığının 42 kDa olduğunu saptamış ve enzimin termostabilitesini 60–70 °C aralığında, pH stabilitesini 8.0-10.0 aralığında ve hidrolitik kapasitesi açısından da deterjan sanayi için uygun olduğunu belirtmişlerdir.

Çakmar (2005), farklı ortamlardan ayırımı yapılan aşırı halofilik bakterilerden protein profilleri ve bu bakterilerin selülaz enzim aktivitelerinin ölçülmesini araştırmıştır. Tuzköy Tuz Maden’inden ayırımı yapılan ve daha önceki çalışmalarda kalitatif olarak selülaz aktivitesi gösterdiği saptanan 4TK1, 2TK2 ve 2TK3 suşlarının selülaz aktivitelerini bu çalışmada kantitatif olarak saptamıştır. Aktivite tayini yapabilmek için bu suşları %25 ve %10’luk NaCl içeren sıvı besiyerinde üretmiştir. 0.5-4.0 M arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl kullanmış ve selülazın 2.5 M NaCl konsantrasyonunda maksimum aktivite gösterdiğini belirlemiştir. %10 NaCl içeren besiyerinde üreyen suşların, %25 NaCl içeren besiyerinde üreyen suşlara göre daha yüksek aktivite gösterdiğini, en fazla aktiviteyi ise 2TK2 suşunun gösterdiğini bildirmiştir.

Akita, vd. (2005), *Bacillus halodurans* C-125 suşundan izole edilen selülaz enziminin ince tabaka kromatografisi analizinde endo özellik gösterdiğini bulmuşlardır. Enzimin optimum aktivitesini 60 °C ile pH 6.0-8.0’de gösterdiğini bildirmişlerdir. Enzimin aktivitesini 50 ve 60 °C’de 2 saatlik inkübasyondan sonra %100 koruduğunu saptamışlar, moleküler ağırlığını ise 31 kDa olarak belirlemişlerdir.

Kim, vd. (2005), alkalifilik *Bacillus* sp. suşu HSH-810’dan alkali selülaz izolasyonu yapmışlar ve enzimin pH 10.0’da ve 50 °C’de optimum aktivite gösterdiğini, moleküler ağırlığının ise 80 kDa olduğunu bildirmişlerdir.

Heck, vd. (2005), *Bacillus coagulans* BL69 tarafından üretilen selülag enziminin aktivite gösterdiği şartların bulunması amacıyla yapılan bir çalışmada, enzimin 4.5-10.0 pH ve 47-75 °C sıcaklık aralığında optimum aktivite gösterdiğini, Co, Mn ve  $\beta$ -merkaptotanolün stimüle edici, Fe, Cu, Ca, Zn, Ba, Mg ve EDTA'nın ise inhibe edici etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Sukumaran, vd. (2005), mikrobiyal selülag enzimlerinin üretimin sürecini ve uygulamaları sırasında karşılaşılan zorlukları değerlendirmiş, selülozik materyalin mikrobiyal atıklardan daha yüksek miktarlarda, daha ucuz maliyetle nasıl elde edilebileceğini, enzim aktivitelerinin toleranslarının ve dayanıklılıkların geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Bischoff, vd. (2006), *Bacillus licheniformis*'den elde ettikleri endoglukanaz enziminin molekül ağırlığının 37 kDa olduğunu bildirmişlerdir. Enzimin optimum aktivitesini 65 °C'de gösterdiğini, 1 saatlik inkübasyon işleminden sonra ise 60 °C'de daha stabil olduğunu ve %90'dan fazla aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Enziminin optimum aktivitesini pH 6.0'da gösterdiğini, pH 10.0'da ise aktivitesinin %60'ını kaybettiğini bildirmişlerdir.

Kıran, vd. (2007), topraktan selülag enzimi üreticisi olan 42 tane *Bacillus* suşu izole etmişler, üreme, sıcaklık ve pH aralığı, enzim üretme yeteneği ve enzim sentezinin gerçekleştiği sıcaklık ve pH aralıkları bakımından en iyi sonucu *Bacillus* B23 suşunun verdiği bildirmişlerdir. Bu suşun enzim üretimini besi ortamında test etmişler ve en yüksek selülag üretiminin 42 °C'de ve pH 8.5'de gerçekleştiğini de belirtmişlerdir.

Aygan (2008), haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu ile amilaz, selülag ve ksilanaz enzimlerinin üretimini ve karakterizasyonunu yaptığı çalışmalarda amilazın optimum aktivitesini 150 °C sıcaklık ve pH 10.5'de, selülag enziminin 50 °C sıcaklık ve pH 11.0 de, ksilanaz enziminin ise 40 °C sıcaklık ve pH 6.0'da gösterdiğini bildirmiştir.

Jo, vd. (2008), pirinç kabuğundan yararlanarak *Bacillus amyloliquefaciens*'ten karboksimetilselülaz (CMCaz) sentezini gerçekleştirmişlerdir. Bu kültürün CMCaz üretimi için optimum gelişme koşulunu 37 °C sıcaklık ve 6.8 pH değeri olarak bulmuşlardır.

Coşkun (2010), Van Gölü, Tuz Gölü ve Adana'da yerelması yetiştiriciliği yapılan topraklardan  $\alpha$ -amilaz, ksilanaz ve CMCaz üreten alkalifilik, halofilik ve termofilik *Bacillus* sp. suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Alkalifilik *Bacillus* sp. VA-24 suşunun ürettiği  $\alpha$ -amilaz enziminin moleküler ağırlığını yaklaşık 120 kDa, sıcaklık ve pH optimumunu sırasıyla 90 °C ve 11.0 olarak belirtmiştir. Enzim 100 °C'de muhafaza edildiğinde de aktivitesinin tamamını koruduğunu belirtmiştir. Halofilik *Bacillus* sp. TGB-3 suşunun yaklaşık 52 ve 48 kDa moleküler ağırlığına sahip ksilanaz ana aktivitesi ile moleküler ağırlığı yaklaşık 123 kDa amilaz yan aktivitesine sahip iki enzim ürettiğini bildirmiştir. Halofilik ksilanaz enziminin sıcaklık ve pH optimumunu sırasıyla 60 °C ve 7.0 olarak tespit etmiştir. Araştırmacı ksilanaz enziminin termostabilitesini 70 °C'ye kadar kararlı olarak gözlenirken, halofilik  $\alpha$ -amilaz enziminin optimum sıcaklığı ve pH'sı ise 50 °C ve 7.0 olarak bildirmiştir. Adana'da yerelması yetiştiriciliği yapılan topraklardan izole edilen termofilik *Bacillus* sp. YET-1 suşunun ise ürettiği CMCaz enziminin moleküler ağırlığını yaklaşık olarak 48 kDa olarak bulmuş ve CMCaz enziminin termostabilitesini 90 °C'ye ulaştığını, optimum sıcaklık ve pH'sının ise sırasıyla 50 °C ve 7.0 olduğunu bildirmiştir.

Das, vd. (2010), CMCaz aktivitesini belirlemek için kongo kırmızısı boyama metodu ile kullandıkları çalışmada, elde ettikleri enzimin en iyi aktivitesini pH 8.0 ve 51 °C sıcaklıkta gösterdiğini bildirmişlerdir.

Rastogi, vd. (2010), *Geobacillus* sp. WSUCF1 ve *Bacillus* sp. DUSELR13'ten izole ettikleri CMCaz'ın optimum çalışma pH'sını iki enzim için de 5.0 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca WSUCF1 enziminin optimum sıcaklığının 70 °C, DUSELR13 enziminin ise 75 °C olduğunu, WSUCF1 ve DUSELR13 enzimlerinin 24 saat süreyle

70 °C inkübasyondan sonra sırasıyla %89 ve %78 kalan aktivitelere sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Shanmughapriya, vd. (2010), *Maribobacter* sp.'den elde ettikleri selüloz enziminin maksimum aktivitesini 27-35 °C aralığında ve pH 9.0'da gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar enzimin 37 °C'ye kadar stabil kaldığını, 40 °C'den yüksek sıcaklıklarda ise hızlıca inaktive olduğunu belirtmişlerdir.

Yang, vd. (2010), izole ettikleri yüksek selüloz aktiviteli bakteriyi 16S rRNA ile morfolojik olarak tanımlamışlardır. *B. subtilis* I15 olarak isimlendirdikleri bakteriden izole ettikleri enzimin maksimum aktivitesini 60 °C sıcaklık ve pH 6.0'da olduğunu göstermişlerdir. Enzimin 65 °C'de 2 saatlik inkübasyondan sonra orijinal CMCaz aktivitesininin %90'ından fazlasını koruyarak oldukça stabil olduğunu da belirtmişlerdir. Son olarak araştırmacılar selüloz genini (*celI15*), *Escherichia coli* BL21'e klonlamışlardır.

Annamalai, vd. (2011), *B. licheniformis* AU01 suşundan elde ettikleri halostabil, termostabil CMCaz enziminin moleküler ağırlığının 37 kDa olduğunu ve optimum aktivitesininin 9.0-10.0 pH ile 50-60 °C sıcaklık aralıklarında gerçekleştirdiğini, %20-30 NaCl konsantrasyonunda ise yüksek bir aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca enzim aktivitesininin  $Hg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ve EDTA ile inhibe olurken,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve  $Ca^{2+}$  ile arttığını da belirtmişlerdir.

Andriani, vd. (2011), Kirpi balığı olarak da bilinen *Takifugu rubripes*'den izole ettikleri *B. subtilis* TD6 suşundan selüloz enzimini ürettikten sonra %80 doygunluktaki amonyum sülfat ile saflaştırmışlar ve substrat olarak CMC kullanıp bunun sonucunda da 6.0 pH ve 50 °C sıcaklıkta selüloz enziminin optimum aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Korpole, vd. (2011), çöp ekosistemindeki karboksimetil selüloz üreticisi *Bacillus*'ların filogenetik yayılımı ve karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. CMCaz üreten 22 tane suş izole etmişler ve bu suşların optimum üremelerininin pH

9.0-10.0 aralığında olduğunu açıklamışlardır. Bu suşlardan maksimum CMCaz aktivitesini 50 °C’de LFC15 suşunun göstermiş olduğunu bildirmişlerdir.

Haliskaranfil (2012), termoalkalifilik selüloz enzim (multienzim) üreticisi *Bacillus* sp. izolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliğini araştırmıştır. Selüloz ve amilaz enzim sentez yeteneği olan suşları seçmiş ve en iyi suşun *Bacillus* sp. SHK-7 olduğunu belirlemiştir. Zimogram analizi ile selüloz enziminin 68.9 kDa moleküler ağırlığına sahip olduğunu, selüloz enziminin maksimum aktivitesini 60 °C ve pH 8.0’de gösterdiğini bildirmiştir. Araştırmacı bu sonuçlara göre SHK-7 selüloz enzimi termofil, alkalifil, halotolerant, termostabil ve alkali-stabil özellik gösterdiğini, bu sebeple başta deterjan endüstrisi olmak üzere tekstil, gıda ve içecek endüstrilerinde kullanılabilir özellikte olduğunu belirtmiştir.

Sethi, vd. (2013), topraktan *Pseudomonas fluorescens*, *B. subtilis*, *E. coli*, ve *Serratia marcescens* cinsi bakteriler elde edip bunların karakterizasyonlarını araştırmışlardır. Bu bakterilerin sıcaklık, pH, maksimum enzim üretimi olanaklarının tespitinde bulunmuşlar ve elde ettikleri bakteriler içinde en çok selüloz üretiminin *Pseudomonas fluorescens* cinsi tarafından gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir.

### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Bakteriler**

*Bacillus* sp. HR-1, HR-2 ve HR-3 bakterileri Türkiye'nin Osmaniye ili Düzici ilçesi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcası'ndan alınan nemli toprak numunelerinden izole edilmişlerdir.

##### **3.1.2. Kimyasal ve Diğer Sarf Malzemeler**

Çalışmada kullanılan kimyasal ve diğer sarf malzemeler aksi belirtilmedikçe Merc, Sigma, Ambresco'dan kimyasal malzeme satan firmalar aracılığı ile temin edilmiştir.

##### **3.1.3. Çalışmada Kullanılan Aletler**

Çalışmada kullanılan aletlerden santrifüj Hettich, otoklav Hmc Hirayama, inkübatör Nüve En 500, su banyosu Memmert, spektrofotometre Invitrogen, hassas terazi Denver Instrument, vorteks ve manyetik karıştırıcı Ika Genius 3, çalkalayıcı Ika K5 120, pH metre Hanna H1 221, dikey elektroforez seti Atto Ae-6210, otomatik pipetler Brand ve Axygen, steril kabin Nuair NU-301-530E, no-frost buzdolabı Arçelik, çalışmanın yapıldığı Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda bulunmaktadır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Çalışmanın yürütüldüğü Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'ndan genel bir görüntü

## 3.2. Metot

### 3.2.1. Bakterilerin İzolasyonu

Osmaniye ili Düziçi ilçesi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcasından (Şekil 3.2) alınan toprak numuneleri steril kaplar ile laboratuvara taşınmıştır. Toprak örnekleri önce steril saf su ile sulandırılarak iyice karıştırılmış, tortunun çökmesi için yarım saat beklendikten sonra üstteki sıvı kısımdan 1 ml numune alınmıştır. Alınan sıvı numune 80 °C'de 15 dakika inkübe edilerek vejetatif bakterilerin ölmesi sağlanmıştır. Daha sonra numune, termofilik *Bacillus* sporlarının çimlenmesi için 25 ml hacimli LB besiyerine (%1 wt/v tripton, %0.5 wt/v maya özütü, %1 wt/v NaCl, pH 7.5) aktararak 55 °C'de çalkalama yöntemiyle 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, içerisinde bakteriler üremiş olan kültür sıvısından seri sulandırmalar yapıldıktan sonra,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  oranında sulandırılmış olan numunelerden LB-agar (%1.5 wt/v agar) plaklarına cam çubukla yayma yöntemiyle ekimleri yapılmıştır. Plaklar bakterilerin koloni oluşturmaları için ters çevrilerek tekrar 55 °C'ye ayarlanmış inkübatöre konmuş ve gece boyunca üremeye bırakılmıştır (Lennete vd., 1985).





Şekil 3.2. Toprak numunelerinin alındığı Haruniye Kaplıcası'ndan genel bir görüntü

### 3.2.2. Bakterilerin Selüloz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Plaklarda gelişen koloniler tek tek steril kürdanlarla alınmış ve herbiri iki kopya olacak şekilde %0.1 wt/v karboksimetil selüloz (CMC) içeren LB-agar plaklarına aktarılarak 55 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Koloni gelişimi tamamlandıktan sonra, iki kopyadan birer plağa Congo-red solüsyonu (%0.1 wt/v Congo-red) dökülerek besiyerinin 15 dakika süreyle boyanmaları sağlanmıştır (Şekil 3.3). Süre sonunda boya uzaklaştırılarak bu sefer plaklara 1 M NaCl solüsyonu ilave edilmiş ve 15 dakika daha beklenerek fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Congo-red CMC'yi kırmızıya boyayacağından, kırmızıya boyanan zeminde sarımtırak zon oluşturan koloniler CMCaz pozitif, koloniler olarak belirlenmiştir. CMCaz pozitif koloniler numaralarına göre diğer kopya plaktan seçilerek master ve gliserol stokları hazırlanmıştır.



Şekil 3.3. İzolatların CMCaz aktivitesi için Congo-red ile boyanması

### 3.2.3. Bakterilerden Master ve Gliserol Stoklarının Hazırlanması

İzolatların günlük kullanım için master stok, uzun süre muhafazaları için ise gliserol stokları hazırlanmıştır. Master stok için gece boyunca 55 °C'de üreyen bakteri kültürleri steril öze yardımı ile tek tek düşecek şekilde LB Agar plaklarına ekilmiş (Şekil 3.4) ve gece boyunca 55 °C sıcaklık koşullarında üremeye bırakılmıştır. Ertesi gün üzerinde bakteri kolonileri gelişmiş olan plaklar etiketlenerek +4 °C'de muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 3.4. CMCaz pozitif izolatlardan master stoklarının hazırlanması

Gliserol stok için, gece boyunca LB sıvı besi ortamında üreyen bakteri kültürlerinden uygun miktarlarda alınarak daha önce efendorf tüplerinde sterilize edilmiş olan gliserol ile karıştırılmış (%20 gliserol, %80 bakteri kültürü olacak şekilde) (Şekil 3.5) ve vorteks ile homojenize edildikten sonra etiketlenerek muhafaza için  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır.



Şekil 3.5. CMCaz pozitif izolatlardan gliserol stok hazırlanması

### 3.2.4. Bakterilerin Zamana Göre Kütle Artışlarının Belirlenmesi

Gece boyunca uygun koşullarda sıvı besiyerinde üremiş olan bakteri kültürlerinden ertesi sabah 50 ml hacimli steril LB sıvı besiyerine %1 olacak şekilde aşılama yapılmış ve 55 °C'ye ayarlanmış inkübatörde uygun çalkalama hızında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun yapıldığı saat baz alınarak her 12 saatte bir (0, 12, 24, 36, 48, 72, 84) 5 ml kültür örneği alınarak 1'er ml efendorf tüplerine paylaştırılmıştır. Örnekler 5.000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Tüplerden sıvı faz uzaklaştırılmış ve her bir bakteri peleti 1'er ml distile saf su ile çözülmüştür. Örneklerin, saf su şahit olarak kullanılmak üzere spektrofotometrede OD<sub>600</sub> nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır (Şekil 3.6). Bu 5 örneğin ortalaması alınarak her bir 12 saatlik dilimin bakteri kütle artışı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Zamana göre bakteri kütle artışının spektrofotometrik olarak ölçümü

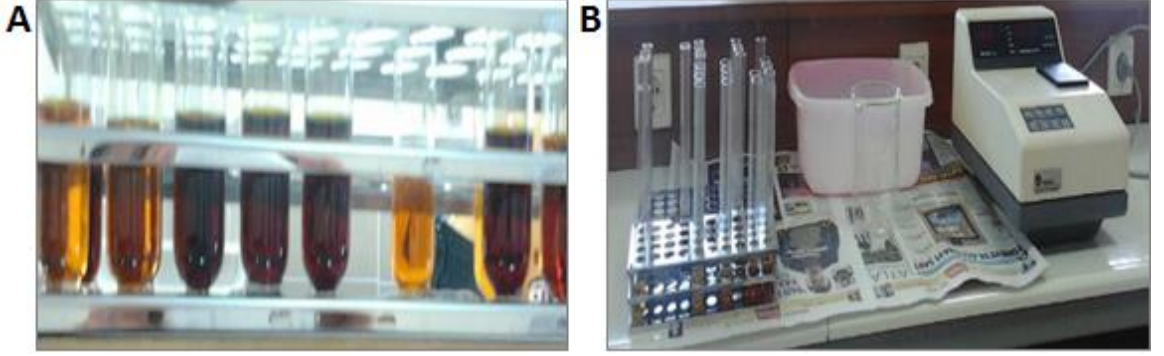
### 3.2.5. Enzimatik Analizler

Enzimatik analizler için öncesinde, Na-fosfat bafır (0.1 M, pH 6.5) ve bu bafır kullanılarak substrat solüsyonu (%2 wt/v CMC) hazırlanmıştır. Dinitrosalisilik asit yöntemine göre enzim analizi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır (Miller, 1959):

- a) Uygun koşullarda LB sıvı besiyerinde 24 saat süreyle üremiş olan bakteri kültürleri 4900 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- b) Süpernatant kısımlar temiz bir kaba alınarak buz üzerinde muhafaza edilmişlerdir.
- c) Cam deney tüpleri etiketlenerek (Kontrol (1 adet), Enzim kontrol (4 adet), substrat kontrol (4 adet), Enzim+substrat (5 adet)) hazır hale getirilmiştir.
- d) Deney tüplerine aşağıda verilen bileşenler seri halde ilave edilmiştir:

Kontrol	: 1 ml Na-fosfat bafır
Enzim kontrol	: 0.5 ml süpernatant + 0.5 ml Na-fosfat bafır
Substrat kontrol	: 0.5 ml substrat + 0.5 ml Na-fosfat bafır
Enzim + Substrat	: 0.5 ml süpernatant + 0.5 ml substrat
- e) Hazırlanan deney tüpleri vortekslenerek 55 °C'ye ayarlanmış su banyosuna dikkatli bir şekilde konmuş ve enzimin substratı hidrolize etmesi için 30 dk süreyle inkübe edilmiştir.
- f) Süre sonunda tüpler çıkarılarak her birinin üzerine 1.5'er ml DNS solüsyonu (20 gr Dinitrosalisilik asit, 4 gr fenol, 1 gr sodyum sülfid, 400 gr sodyum potasyum tartarat 1 lt %2'lik NaOH çözeltisi içinde çözülerek saf su ile 2 lt'ye tamamlanır) ilave edilerek vortekslenmiştir.
- g) Tüpler kaynar su içerisinde 5 dk inkübe edilerek açığa çıkan şekerlerin renk değiştirmesi sağlanmıştır. Sonrasında örneklerin oda sıcaklığında soğuması için beklenmiştir (Şekil 3.7A).
- h) Kontrol grubu şahit olarak kullanılmış ve tüm tüplerdeki örnekler spektrofotometre (Pharmacia) ile OD<sub>540</sub> nm dalga boyunda ölçülmüştür (Şekil 3.7B).

- i) Her bir grubun (enzim+substrat, enzim kontrol, substrat kontrol) ortalaması alınmış, sonra ise enzim+substrat ortalamalarından enzim kontrol ve substrat kontrol ortalamaları çıkarılarak aktivite değerleri elde edilmiştir.
- j) En yüksek değer 100 kabul edilerek diğer değerler relatif olarak hesaplanmıştır.
- k) Elde edilen relatif aktivite değerleri kullanılarak ilgili grafikler oluşturulmuştur.
- l) Bir enzim ünitesi, 1 dk boyunca 55 °C'de substrattan 1 mmol glikozu serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.7. CMCaz enzimlerinin DNS yöntemi ile analizleri

### 3.2.5.1. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerlerinin belirlenmesi amacı ile enzimler substrat (%2 wt/v CMC) ile 30-90 °C arasında değişen sıcaklık değerlerinde 30 dk süreyle inkübasyona sokulmuştur. Süre sonunda karışıma 1.5 ml DNS solüsyonu eklenmiş ve 5 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiştir. Soğutulan örnekler OD<sub>540</sub> nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. En yüksek absorbansın elde edildiği sıcaklık değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif aktivite değerleri belirlenmiştir.

### **3.2.5.2. Enzimlerin Optimum Aktivite Gösterdiği pH Değerlerinin Belirlenmesi**

Enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri pH değerlerinin belirlenmesi amacıyla 4.0 ile 10.0 aralıklarında değişen pH değerlerinde (Na-asetat (pH 4.0-6.0), Na-fosfat (pH 6.0-7.0), Tris (pH 7.0-10.0) solüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir pH değerinin substratı, ilgili pH'daki solüsyonlar kullanılarak %2 wt/v olacak şekilde hazırlanmıştır (Burhan vd., 2003). Her bir pH değeri için ayrı ayrı olacak şekilde reaksiyonlar hazırlanmış ve uygun sıcaklık koşullarında 30 dk süreyle reaksiyona sokulmuştur. Süre sonunda reaksiyon tüplerine 1.5'er ml DNS solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Son olarak örnekler 5 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiş ve soğuduktan sonra OD<sub>540</sub> nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. En yüksek absorbans değerinin elde edildiği pH değeri baz alınarak yüzde (%) olarak relatif enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

### **3.2.5.3. Enzimlerin Termal (Sıcaklık) Stabiliteilerinin Belirlenmesi**

Termal stabiliteilerinin belirlenmesi için enzimler reaksiyon öncesinde 50-90 °C arasında değişen sıcaklık değerlerinde 15 dakika süreyle ön inkübasyona bırakılmışlardır. Ön inkübasyon sonrasında 0.5 ml enzim 0.5 ml substrat (%2 wt/v CMC) ile optimum pH ve sıcaklık koşullarında 30 dakika reaksiyona sokulmuştur. Sonrasında reaksiyon 1.5 ml DNS solüsyonu eklenerek sonlandırılmış ve 5 dakika süreyle kaynatılarak soğuması beklenmiştir. Örnekler OD<sub>540</sub> nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüş ve enzimlerin relatif olarak termal kararlılık grafikleri oluşturulmuştur.

### **3.2.5.4. İzolatların Zamana Göre Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi**

Zamana göre enzim aktivitelerinin belirlenmesinde, bakteri inokülasyonu işleminin başlangıcından itibaren her 12 saatte bir olmak üzere 72 saat boyunca bakteri kültürlerinden enzim numuneleri alınmıştır. Enzim (0.5 ml) ve substrat (0.5 ml, %2'lik CMC) karışımı 37 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edildikten sonra örnek karışımına 1.5 ml DNS solüsyonu eklenerek 5 dakika kaynatma işlemi

uygulanmıştır. Soğutulan örnekler OD<sub>540</sub> nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüş ve zamana göre enzim aktiviteleri relatif olarak belirlenmiştir.

### **3.2.6. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)**

#### **3.2.6.1. Bakterilere Ait Hücre Dışı Protein Örneklerinin Hazırlanması**

İzolatlar LB sıvı besiyerinde 55 °C sıcaklık ortamında çalkalama yöntemiyle 48 saat süreyle üretilmişlerdir. Süre sonunda bakteriler santrifüjle çöktürülmüş (4900 rpm, 10 dk) ve hücre dışı sıvı kısımları (süpernatant) ayrı tüplere alınmıştır. Süpernatant örneklerine 1:1 oranında TCA (%20 wt/v) eklenerek homojenize hale getirilmiş ve 24 saat süreyle oda sıcaklığında muhafaza edilmişlerdir. Süre sonunda örnekler santrifüj edilmiş ve bakterilere ait hücre dışı proteinler pelet haline getirilmiştir. Süpernatant kısımları uzaklaştırılmış ve protein peletleri 15-20 dk süreyle oda sıcaklığında kurutulmuşlardır. Son olarak protein peletleri 1 M Tris (pH 8.0) solüsyonunda çözülmüş ve sonrasında kullanılmak üzere buzdolabına (+4 °C) kaldırılmıştır.

#### **3.2.6.2. SDS-PAGE'nin Hazırlanması**

SDS-PAGE çalışması Laemmli (1970)'e göre yapılmıştır. SDS-PAGE, yoğunlukları farklı olan iki ayrı katmandan meydana gelmektedir. Üstteki katman (toplayıcı jel) proteinlerin bir araya gelerek ayırıcı jele beraber girmelerini sağlarken, ayırıcı jel proteinlerin moleküler ağırlığına göre birbirinden ayrılarak farklı bölgelerde bantlar oluşturmalarını sağlar. SDS-PAGE düzeneği üretici firma tarafından verilen protokole göre hazırlanmıştır. Jel ise %12'lik olacak şekilde aşağıda verilen protokol uyarınca hazırlanmıştır:

1. Ayırıcı jel (akrilamid (%30 wt/v) 12.0 ml, Tris (2 M, pH 8.8) 5.62 ml, SDS (%10 wt/v) 0.3 ml, saf su, 12.1 ml) karışımı hazırlandıktan sonra, polimerizasyonu sağlamak için üzerine 200 µl amonyum persülfat (%10 wt/v) ve 20 µl TEMED ilave edilerek daha önce hazırlanan iki cam levhadan oluşan



düzenek arasındaki boşluğa bir pastör pipeti yardımıyla üstten yaklaşık 4 cm boşluk kalacak şekilde dökülmüştür.

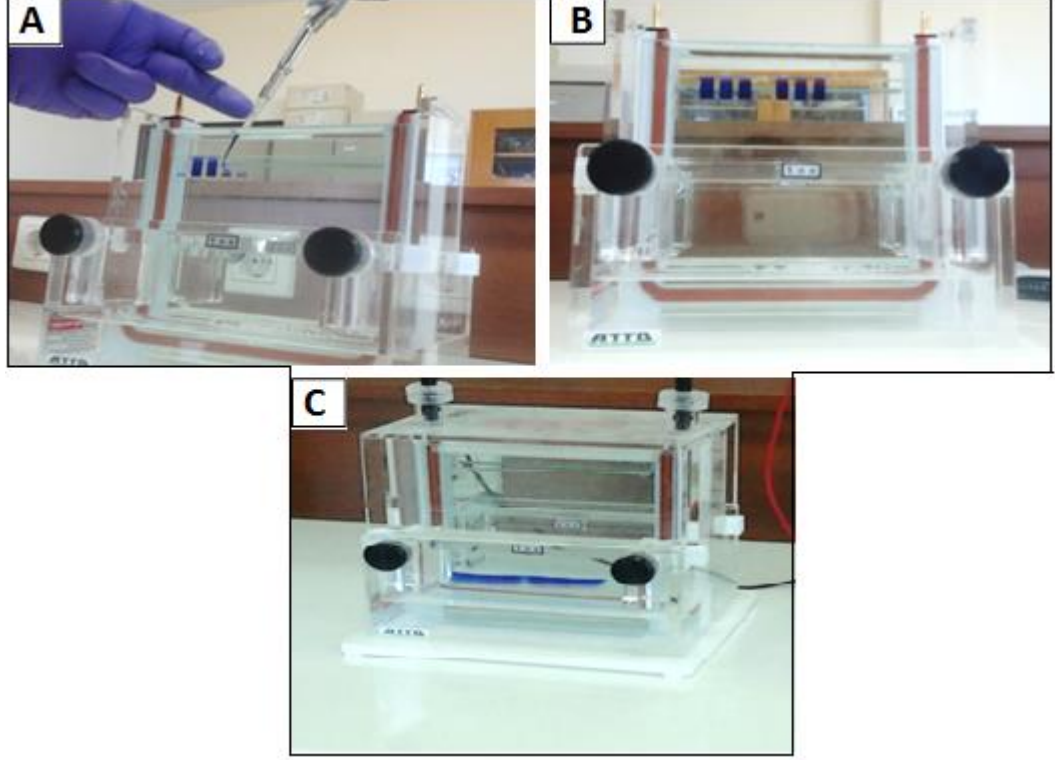
2. Jelin üzerine hava ile temasını önlemek için ince bir katman olacak şekilde su ile satüre edilmiş bütanol (veya saf su) ilave edilerek polimerizasyon için 45 dk beklenmiştir.
3. Süre sonunda bütanol dökülerek uzaklaştırılmış ve kalanı bir parça filtre kâğıdına emdirilerek jel bütanoldan iyice arındırılmıştır.
4. Toplayıcı jel (akrilamid (%30 wt/v) 1.8 ml, tris (0.5 M, pH 6.8) 3.65 ml, SDS (%10 wt/v) 0.15 ml, saf su 9.4 ml) hazırlanarak polimerize olması için içerisine 100 µl amonyum persülfat (%10 wt/v) ve 10 µl TEMED eklenmiş ve vakit kaybetmeden bir pipet yardımıyla toplayıcı jelin üzerine dökülmüştür.
5. Hemen arkasından jel tarağı yerleştirilerek jelin donması için 45 dk beklenmiştir.
6. Jel donduktan sonra tarak çıkarılmış ve jel daha önce hazırlanmış olan elektroforez tankı düzeneği içerisine yerleştirilmiştir.
7. Düzeneğe, jele alttan ve üstten temas edecek şekilde elektrod solüsyonu (0.05 M glisin, 0.05 M tris-baz, %0.1 wt/v SDS) ilave edilmiştir.

### 3.2.6.3. Enzim Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Enzim örneklerinin jele yüklenmesi ve elektroforezi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Daha önce hazırlanmış olan protein örneklerinin üzerine 1:2 hacim kaynatma solüsyonu (0.25 M Tris-HCL (pH 6.8), %15 w/v SDS, %50 v/v gliserol, %25 v/v β-merkaptoethanol, %0.01 w/v bromophenol blue) ilave edilerek ticari markır ile birlikte (Fermentas, SM0431) kaynar suda 3 dk süreyle bekletilmiştir.
2. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra marker (10 µl) ve protein örnekleri (30-50 µl) sırasıyla kuyulara bir mikropipet yardımıyla yüklenmiştir (Şekil 3.8A ve B).

3. Elektroforez tankı güç kaynağına bağlandıktan sonra protein örnekleri toplayıcı jelde 25 mA, 60 V, ayırıcı jelde ise 40 mA 80 V akım uygulanarak yürütülmüştür (Şekil 3.8C). İzleme boyası jelin sonuna geldiğinde akım durdurularak elektroforez sonlandırılmıştır.



Şekil 3.8. İzolatlara ait hücre dışı protein örneklerinin SDS-PAGE'ye yüklenmesi (A ve B) ve örneklerin elektroforezi (C)

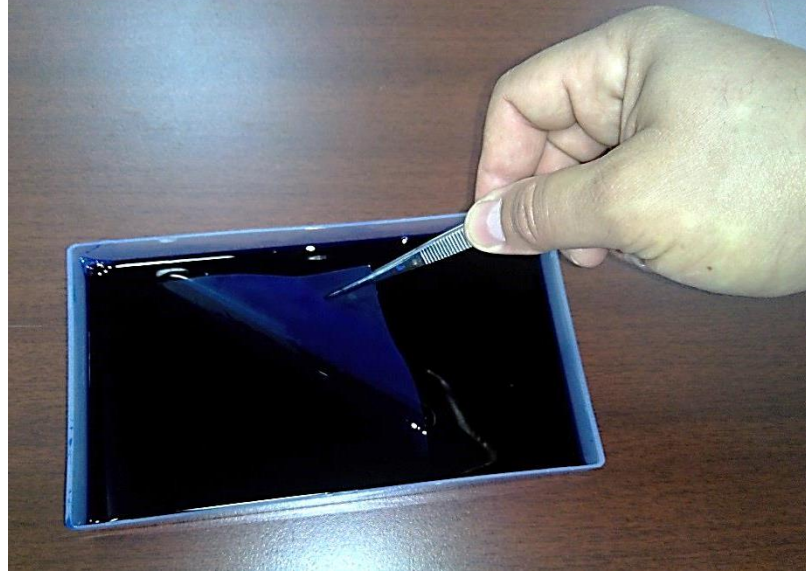
#### 3.2.6.4. SDS-PAGE Jelin Boyanması

SDS-PAGE jelin boyanması aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, iki cam levha arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak içerisinde boyama solüsyonu (%40 v/v metanol, %10 v/v glacial asetik asit, %50 v/v saf su, %0.1 wt/v Coomassie blue R 250) bulunan kabın içerisine konmuş ve 1 saat süreyle boyanması beklenmiştir (Şekil 3.9).
2. Süre sonunda jel boya solüsyonundan alınarak bu sefer destain (%40 v/v metanol, %10 v/v glacial asetik asit, %50 v/v saf su) solüsyonu içerisine

konmuş ve fazla boyanın uzaklaşması sağlanmıştır. Solüsyon birkaç kez değiştirilerek protein bantlarının iyice görünür hale gelmesi sağlanmıştır.

3. Jel görüntüsü netleştikten sonra fotoğraflanmıştır.



Şekil 3.9. Protein örneklerinin elektroforez sonrası Coomassie blue ile boyanması

### 3.2.7. İzolatlara Ait Antibiyogram Analizleri

İzolatların antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi aşağıda verilen protokol uyarınca yapılmıştır:

1. İzolat bakteriler (HR-1, HR-2, HR-3) LB-sıvı besiyerinde gece boyunca uygun çalkalama hızında üretilmişlerdir.
2. Üremiş olan bakteriler ayrı ayrı olacak şekilde LB-agar plaklarına cam çubukla yayılmışlardır.
3. Farklı antibiyotikler emdirilmiş ticari antibiyotik diskleri, bakteri yayılmış olan katı besi ortamına belirli aralıklarla yerleştirilmiş ve 10-15 dk süreyle beklenerek kurumaları sağlanmıştır (Şekil 3.10).
4. Bakteri ekilmiş plaklar 55 °C'de 1 gece inkübe edilerek bakterilerin üremesi sağlanmıştır.
5. Ertesi gün antibiyotik disklerinin etrafında bakteri gelişip gelişmediğine bakılarak, bakterilerin antibiyotik dirençlilikleri belirlenmiştir.



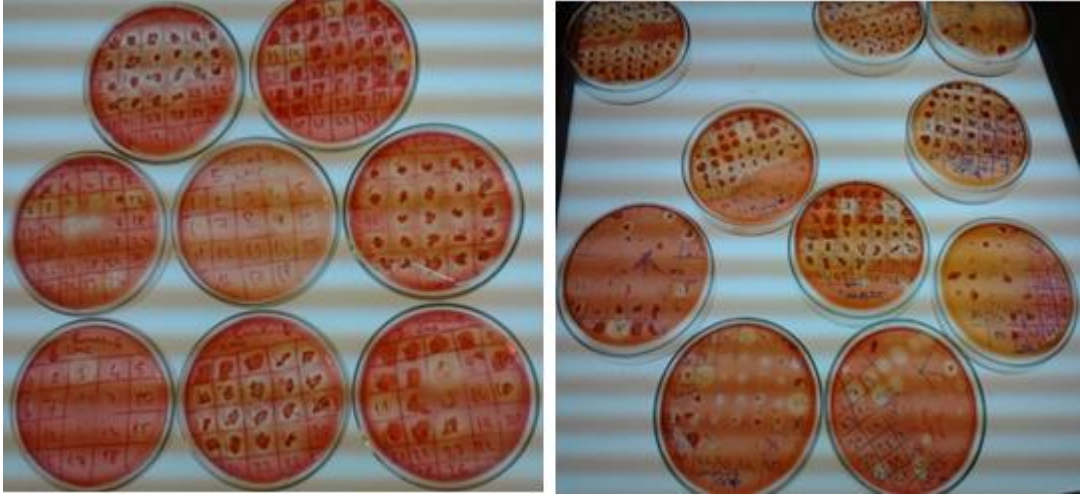
Şekil 3.10. İzolatların farklı antibiyotikler emdirilmiş diskler ile antibiyogram analizi

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. BULGULAR

#### 4.1.1. *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu ve Tanımlanması

Osmaniye ili Düziçi ilçesi sınırları içerisinde bulunan Haruniye Kaplıcası'ndan toplanan toprak numunelerinden yaklaşık 320 adet *Bacillus* sp. bakterisi izole edilmiştir. İzolatlar selüloz aktivitesi bakımından taranmış ve 63 adet izolatın selüloz pozitif olduğu belirlenmiştir. İzolatların etrafındaki aktivite zonlarının çap büyüklüğü göz önünde bulundurularak 3 adet izolat (*Bacillus* sp. HR-1, HR-2 ve HR-3) ileri çalışmalar için seçilmiştir (Şekil 4.1).



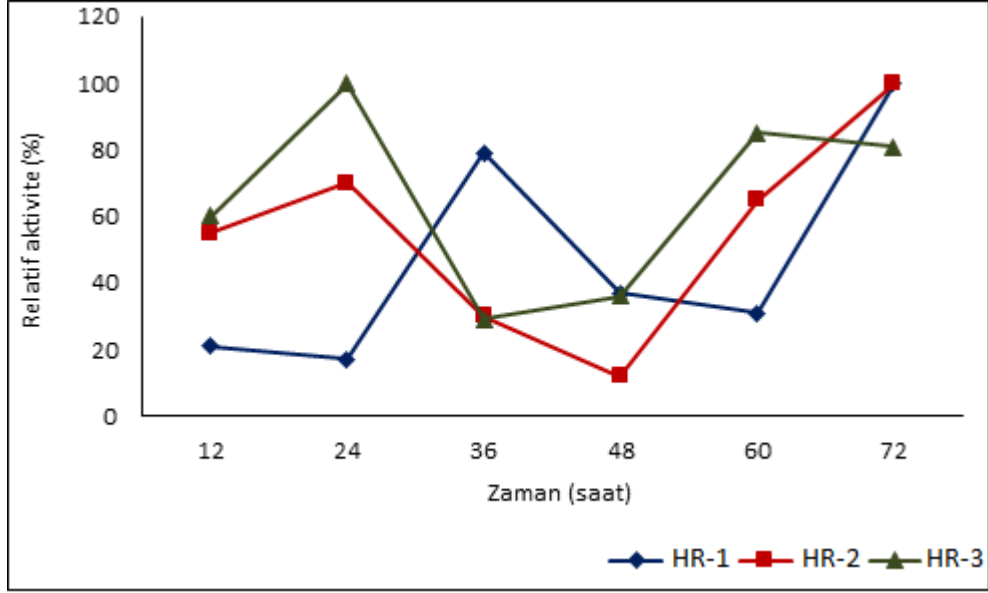
Şekil 4.1. CMCaz aktiviteleri belirlenmek üzere LB-CMC-agar plaklarına ekilmiş izolatların bulunduğu plakların Congo-red boyaması sonucu görüntüleri

#### 4.1.2. Enzimatik Analizler

##### 4.1.2.1. Zamana Göre CMCaz Üretimi

İzolatların üreme periyodunun her 12 saatinde bir enzim numunesi alınmış ve DNS yöntemiyle zamana göre enzim üretimleri relatif olarak belirlenmiştir. İzolatlardan HR-1 ve HR-2 en yüksek düzeyde selüloz üretimini, üreme periyodunun 72. saatinde

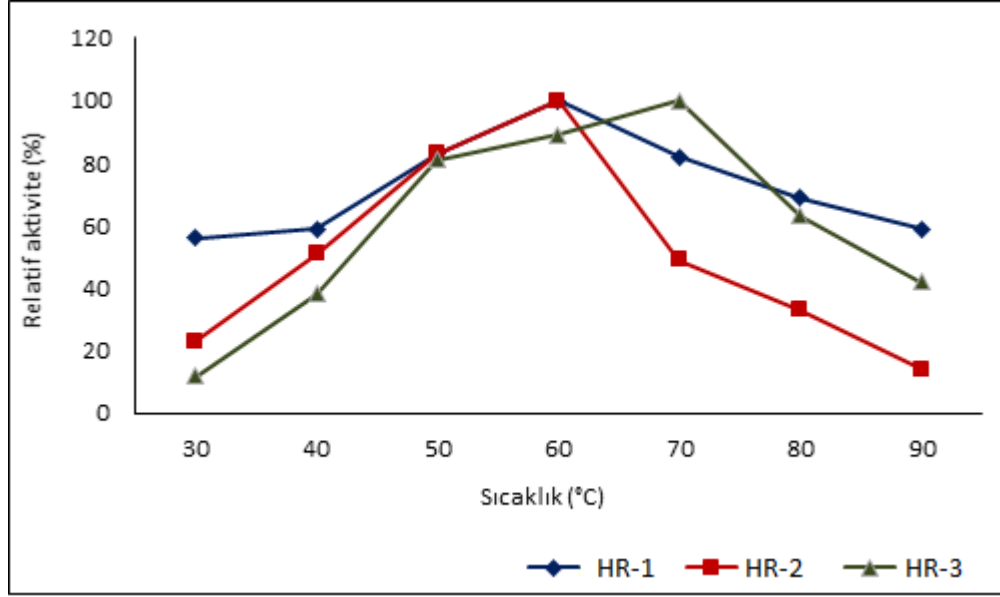
gösterirken, HR-3 izolatu 24. saatinde göstermiştir (Şekil 4.2). Selülaz üretiminde ikinci yüksek oransal aktivitelerini HR-1 izolatu üreme periyodunun 36., HR-2 24. ve HR-3 ise 60. saatinde göstermişlerdir. Her üç izolatu da zamana göre enzim üretiminde inişli-çıkışlı bir grafik eğrisi ortaya koyduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.2. HR-1, HR-2 ve HR-3 izolatlarının zamana göre relatif CMCaz üretimi

#### 4.1.2.2. CMCaz Enzimlerine Ait Optimum Sıcaklık Değerleri

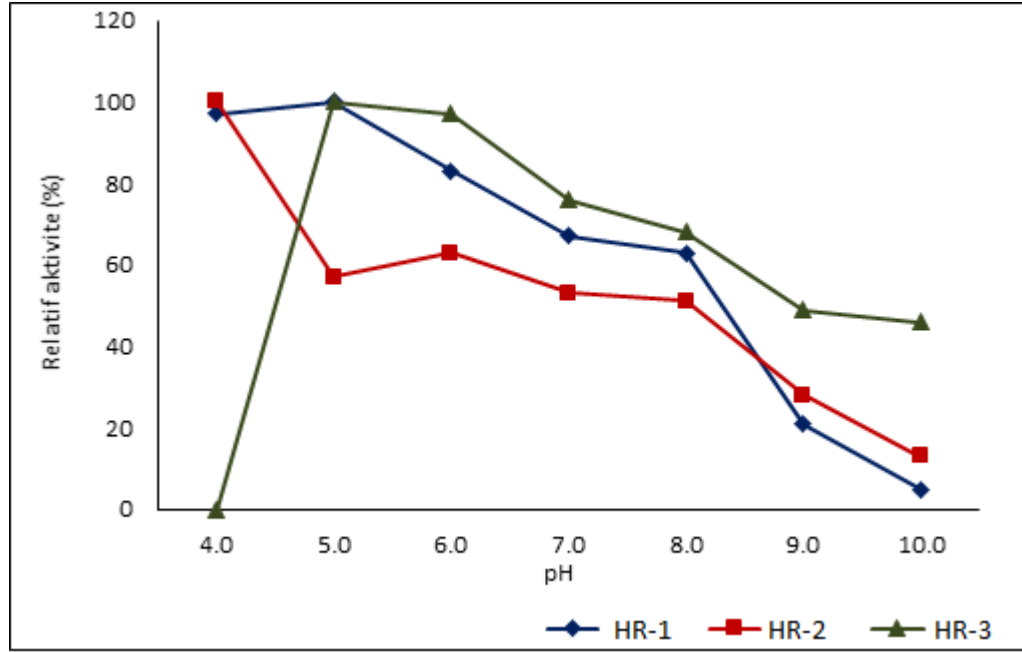
İzolatlar tarafından üretilen CMCaz enzimlerine ait optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre *Bacillus* sp. HR-1 ve HR-2 tarafından üretilen CMCaz enzimleri optimum aktivitelerini 60 °C’de gösterirken, HR-3 suşuna ait CMCaz enzimi 70 °C’de göstermiştir (Şekil 4.3). Ortalama enzim aktiviteleri HR-1, HR-2 ve HR-3 izolatları için 70, 80 ve 90 °C’lerde sırasıyla %70, 32 ve 68 olarak gerçekleşmiştir. 30, 40 ve 50 °C ortalama aktiviteleri ise yine izolatlar için sırasıyla %66, 52 ve 44 oranlarında gerçekleşmiştir.



Şekil 4.3. İzolatlara ait CMCaz enzimlerinin değişik sıcaklık değerlerinde gösterdikleri relatif aktivite değerleri

#### 4.1.2.3. CMCaz Enzimlerine Ait Optimum pH Değerleri

*Bacillus* sp. HR-1, HR-2 ve HR-3 CMCaz enzimlerine ait optimum aktivite için gerekli olan pH değerleri araştırılmıştır. *Bacillus* sp. HR-1 ve HR-3 CMCazları optimum aktivitelerini pH 5.0'de gösterirken, HR-2 CMCazı pH 4.0'de göstermiştir (Şekil 4.4). HR-1, HR-2 ve HR-3 CMCazlarının nötral pH'da aktiviteleri ortalama olarak sırasıyla %67, 53 ve 76 düzeyinde gerçekleşmiştir. Her üç enzim 4.0-6.0 pH aralığında ortalama enzim aktiviteleri sırasıyla %93, 73 ve 66 oranında gerçekleşirken, 8.0-10.0 pH aralığında bu oranlar yine sırasıyla %30, 31 ve 54 olarak gerçekleşmiştir.

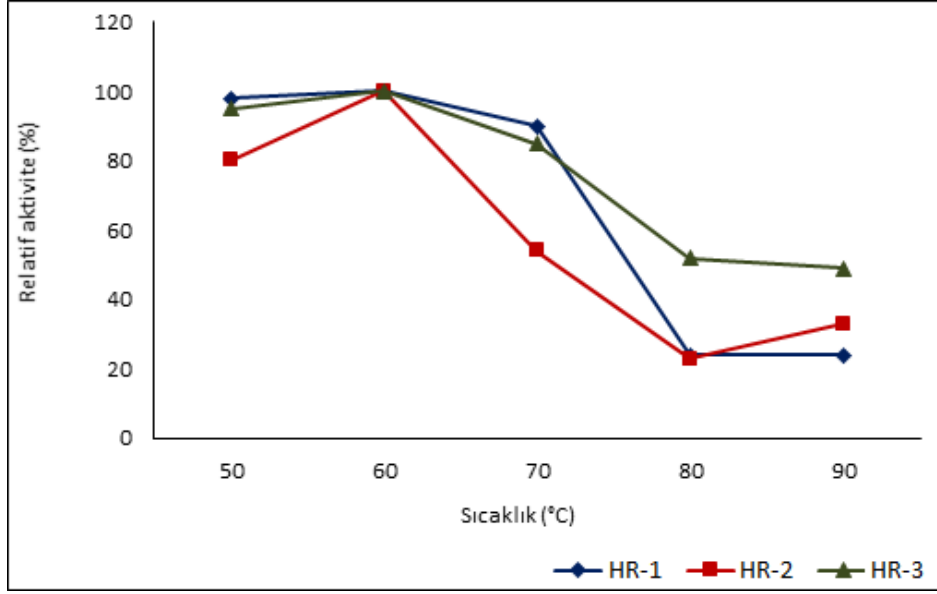


Şekil 4.4. İzolatlara ait CMCase enzimlerinin değişik pH değerlerinde gösterdikleri relatif aktivite değerleri

#### 4.1.2.4. CMCase Enzimlerinin Termal Kararlılıkları

Her üç enzim de CMC ile reaksiyona sokulmadan önce, 50-90 °C arasında değişen sıcaklık değerlerinde 15'er dakika süreyle ön inkübasyona tabi tutulmuşlardır. Sonrasında enzimler substrat ile optimum sıcaklık ve pH koşullarında 30 dk süreyle reaksiyona sokulmuş ve açığa çıkan şeker DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre her üç enzim de 60 °C'de 15 dk süreyle ön inkübasyonu sonucunda aktivitelerinin tamamını korurken, bu sıcaklık değerinden sonra termal kararlılıklarını kaybetmeye başladıkları görülmüştür (Şekil 4.5). 90 °C'de 15 dakika ön inkübasyon sonucunda HR-1 CMCase aktivitesinin %76'sını kaybederken, bu değer HR-2 ve HR-3 CMCase'leri için sırasıyla %67 ve %51 olmuştur.

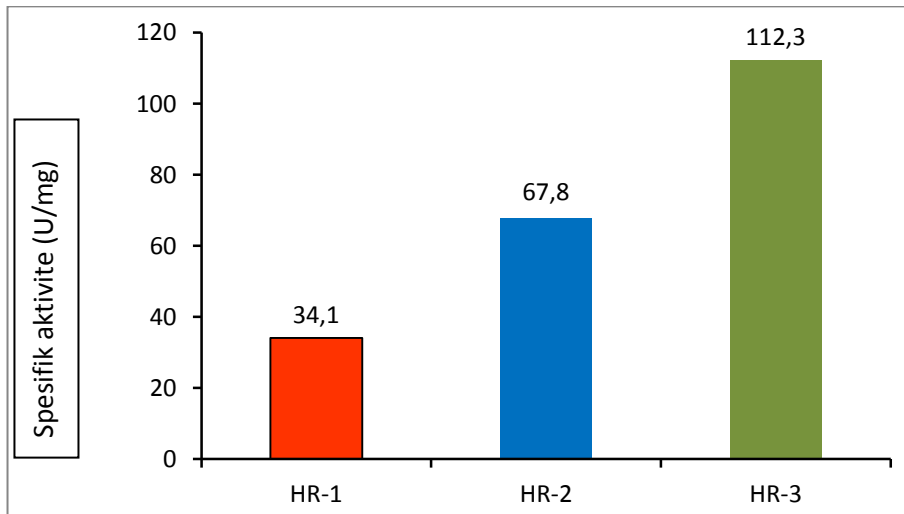




Şekil 4.5. Enzimlerin farklı sıcaklık koşullarında gösterdikleri termal kararlılık grafiği

#### 4.1.3. Enzimlere Ait Spesifik Aktivite Değerleri

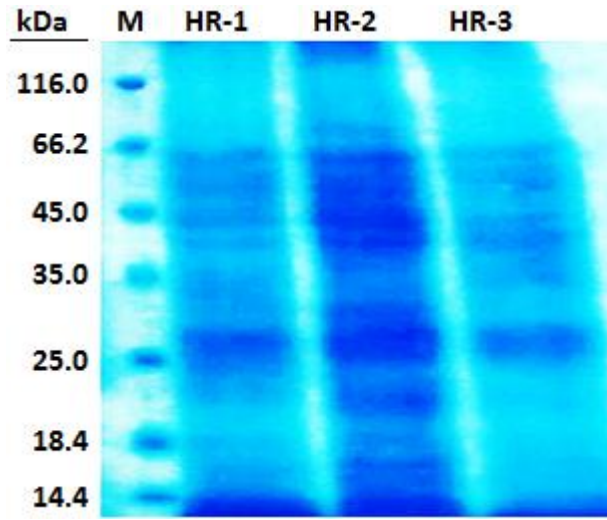
Enzimlere ait spesifik aktivite değerleri hesaplanmış ve HR-1, HR-2 ve HR-3 CMCazları için sırasıyla 34,1, 67,8 ve 112,3 U/mg olarak bulunmuştur. Enzimler bu spesifik aktivite değerlerine substrat olarak CMC kullanıldığı durumda ulaşmışlardır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Enzimlere ait spesifik aktivite değerlerinin grafik üzerinde karşılaştırılması

#### 4.1.4. İzolatlara Ait Toplam Proteinlerin SDS-PAGE’de Karşılaştırılması

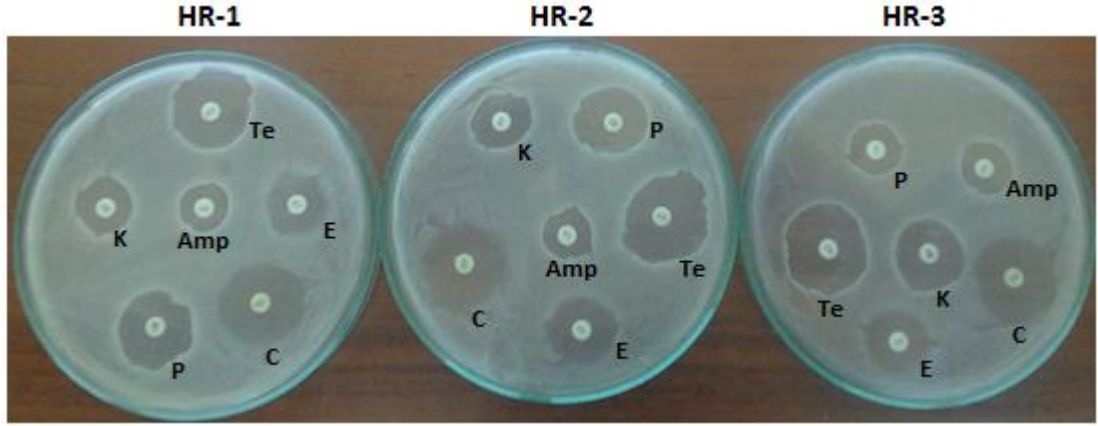
Her üç bakteriye ait hücre dışı proteinler SDS-PAGE’de karşılaştırılmışlardır. Toplam protein bantları incelendiklerinde, her üç bakterinin de bant profilleri bakımından kısmi farklılıklar gösterdikleri görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. İzolatlara ait hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE’de karşılaştırılması

#### 4.1.5. İzolatların Antibiyogram Analizleri

*Bacillus* sp. HR-1, HR-2 ve HR-3 izolatları ayrı ayrı olacak şekilde ticari antibiyotik diskleri (amfisilin (Amp), tetrasiklin (Te), kloram fenikol (C), eritromisin (E), kanamisin (K), penisilin (P)) ile antibiyogram testine tabi tutulmuşlardır. Antibiyogram sonrasında her üç izolatın da test edilen bütün antibiyotiklere hassas olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *Bacillus* sp. suşlarının antibiyotik emdirilmiş disklerle yapılan antibiyogram görüntüsü

## 4.2. TARTIŞMA

Selülozu hidrolize eden birçok mikroorganizma rapor edilmiştir. *Anoxybacillus flavithermus* (Ibrahim ve Ahmed, 2007), *Bacillus subtilis* (Deka, vd., 2011), *Bacillus thuringiensis* (Lin, vd., 2012), *Bacillus cereus* (Lah, vd., 2012), *Bacillus licheniformis* (Acharya ve Chaudhary, 2012), *Cellulomonas cellulans* (Mishra ve Pandey Lata, 2007), *Clostridium thermocellum* (Zhuang, vd., 2007), *Cytophaga hutchinsonii* (Mishra ve Pandey Lata, 2007) bu mikroorganizmalardan bazılarıdır. Bununla birlikte, bu mikroorganizmalar arasında sadece birkaçı sıcaklığa dirençli selülaz enzimi üretmektedir ve bu özelliklerinden dolayı endüstriyel kullanımda büyük önem taşımaktadırlar. Endüstriyel kullanımlarında sıcaklığa dirençliliğin önemli olması, termofilik ve hipertermofilik mikroorganizmalara sıcaklığa dirençli enzimlerin kaynağı olarak önemli bir rol yüklemiştir (Burhan, vd., 2003).

Vieille ve Zeikus (2001) termofilik mikroorganizmaların optimum olarak 50-80 °C'de gelişim gösterdiklerini bildirmiştir. Bu durumda *Bacillus* sp. HR-1, HR-2 ve HR-3 izolatları termofilik olarak tanımlanabilir. Bu izolatlardan HR-1 ve HR-2 en yüksek CMCaz aktivitesini 60 °C'de, HR-3 ise 70 °C'de göstermişlerdir. Termofil ve hipertermofil mikroorganizmalarca üretilen birçok enzimin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerlerinin, bu enzimleri üreten konukçu mikroorganizmanın optimum gelişim gösterdiği sıcaklık değerleri ile benzerlik gösterdikleri bildirilmiştir

(Vieille ve Zeikus, 2001). Bu çalışmada izole edilen bakterilerin optimum gelişim gösterdikleri sıcaklık değerleri ile bu bakterilerce üretilen enzimlerin optimum aktivite gösterdiği sıcaklık değerleri bu literatür bildirişi ile benzerlik göstermektedir.

Daha önce sıcaklığa dirençli selüloz enzimleri üreten bazı *Bacillus* türleri, *B. halodurans* (Annamalai, vd., 2013), *B. licheniformis* (Bischoff, vd., 2006), *B. subtilis* (Li, vd., 2008) ve *B. amyloliquefaciens* (Lee, vd., 2008) çalışılmış ve rapor edilmiştir. *Bacillus* kökenli sıcaklığa dirençli selülozların optimum aktivite için ihtiyaç duydukları sıcaklıkların 50-70 °C arasında değiştiği bildirilmiştir (Sadhu ve Maiti, 2013). Bu çalışmada izole edilen bakterilerce üretilen selüloz enzimlerinin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerleri bu sınırlar içerisinde yer almıştır. *Bacillus* sp. HR-1, HR-2 ve HR-3 izolatlarının optimum olarak 55 °C'de gelişim göstermeleri ve bu bakterilerce üretilen enzimlerin optimum aktivite gösterdikleri sıcaklık değerlerinin 60-70 °C aralığında olması, bu izolatların *B. stearothermophilus* suşları olabileceğini akla getirmektedir. Fakat bunu kesin olarak söyleyebilmek için, 50 farklı karbon kaynağını içeren API 50 CHB testi ile teyit edilmesi gerekmektedir (Wind vd., 1994). Literatürde termofilik *Bacillus* sp. YET-1 CMCaz enziminin optimum aktiviteyi 50 °C'de gösterdiğini ve enzimin inkübasyon sıcaklığının da 80 °C'ye kadar yükseltildiği zaman enzim aktivitesinin %51 düzeyine düştüğü bildirilmiştir (Coşkun 2010).

Çalışmada izole edilen bakterilerden HR-1 ve HR-3'e ait enzimler optimum aktivitesini pH 5.0'de gösterirken, HR-2 selülozu 4.0'de göstermiştir (Şekil 4.4). Bu sonuçlara göre her üç enzim de oldukça asit dirençli görülmektedir. Bununla birlikte, her üç enzim de bu optimum pH değerlerinin yanı sıra alkali pH değerlerinde de aktivite gösterebilmektedirler. HR-1 ve HR-2 selülozları pH 8.0'da aktivitelerinin sırasıyla %63 ve 51'ini korurken, pH 9.0'da yine sırasıyla %79 ve 72'lik bir aktivite kaybına uğramışlardır. Buna karşılık HR-3 selülozu 8.0, 9.0 ve 10.0 pH değerlerinde sırasıyla aktivitelerinin %68, 49 ve 46'sını korumuştur. Benzer pH optimumuna sahip selüloz enzimleri daha önce *Chaetomium thermophile* (Naim ve Jamil, 2007), *Bacillus* sp. AC-1 (Li vd., 2006), *Bacillus thuringiensis* (Lin, vd., 2012), *Bacillus* sp. (Patel, vd., 2005), *Bacillus subtilis* (Nakamura ve Kitamura, 1988), *Bacillus* M-9

(Bajaj, vd., 2009) ve *Clostridium thermocellum* (Ng ve Zeikus, 1988) bakterilerinde rapor edilmiştir. Enzimlerin geniş bir pH aralığında aktivite göstermeleri endüstriyel uygulamalar için arzu edilen bir durumdur.

HR-1, HR-2 ve HR-3 selülaazları için spesifik aktivite değerleri sırasıyla 34.1, 67.8 ve 112.3 U/mg olarak hesaplanmıştır. Genellikle selülaazların spesifik aktivite değerleri değişkenlik göstermektedir. Hakamada ve ark. (1997) çalıştıkları *Bacillus* sp. KSM-S237 suşuna ait selülaaz enziminin spesifik aktivitesini 49.4 U/mg olarak bildirirken, Irshad, vd., (2013) *Trichoderma viride* selülaazının spesifik aktivitesini 498 U/mg olarak bildirmiştir. Bu çalışmada izole edilen selülaaz enzimlerine ait spesifik aktivite değerleri normal sınırlar içerisinde görülmektedir. Fakat bununla birlikte, HR-1, HR-2 ve HR-3 selülaazlarının enzim üretim seviyelerinin klonlama veya mutagenesis ile artırılması, bu enzimleri sanayi için daha ekonomik hale getirecektir.

Sıcaklığa dirençli HR-1, HR-2 ve HR-3 selülaazlarının hücre dışı toplam proteinleri SDS-PAGE’de karşılaştırılmış ve benzer bant profilleri yanı sıra, farklı bant profilleri de sergiledikleri gözlenmiştir. Bu bulgu, her üç izolatın da birbirinden farklı olduklarını ortaya koymaktadır.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Geçen son 20 yıl içerisinde selüloz kullanımı özellikle tekstil, temizlik, kağıt, içecek ve şarap endüstrisinde önemli düzeyde artış göstermiştir. Ayrıca hayvan yemlerinin üretimi, tekstil ve temizlik endüstrisi, kâğıt hamuru hazırlama işletmeleri ile tarımsal uygulamalar endoglukanazların kullanım alanları arasındadır. Günümüzde selüloz (endoglukanaz) enziminin dünya enzim ticaretindeki yeri yaklaşık %20 düzeyindedir.

Son yıllarda özellikle selülozdan biyoetanol üretimi, üzerinde en fazla çalışılan konular arasında birinci sırada yer almaktadır. Selülozun tamamen oligosakkaritlere dönüşümünün sağlanmasında endoglukanaz ve ksilanaz enzimleri birlikte kullanılması başarı oranını üst düzeylere taşıyacaktır. Bu alanın giderek önem kazanması, selülozu kısa sürede hidrolize edecek enzimlere olan ihtiyacı giderek artırmaktadır.

Bu çalışmada sıcaklığa dirençli selüloz enzimleri üreten üç adet *Bacillus* sp. izole edilerek enzimlerin kısmi karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her üç enzim de geniş bir sıcaklık ve pH aralığında aktivite göstermişlerdir. Enzimlerin sıcaklığa dirençli olmaları yanı sıra asidik karakter göstermeleri endüstriyel kullanım açısından önem taşıyabilir. Bu enzimlerin üretimlerinin moleküler genetik yöntemleriyle artırılarak optimize edilmeleri sonucunda ticari kullanım olanakları araştırılabilir.

## KAYNAKLAR

- Acharya, S., Chaudhary, A., Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4): 497-503, 2012.
- Aehle, W., *Enzymes in industry production and application*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004.
- Akita, M., Kayatama, K., Hatada, Y., Ito, S., Horikoshi, K., A novel  $\beta$ -glucanase gene from *Bacillus halodurans* C-125. *FEMS Microbiology Letters*, 248: 9-15, 2005.
- Andriani, D., Sunwoo, C., Ryu, H.W., Prasetya, B., Park, D.H., Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35: 29-33, 2011.
- Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Elayaraja, S., Balasubramanian, T., Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate Polymers*, 94: 409-415, 2013.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., Balasubramanian, T., Extraction, purification and characterization of thermostable, alkaline tolerant  $\alpha$ -amylase from *Bacillus cereus*. *Indian Journal Microbiology*, 51: 424-429, 2011.
- Aygan, A., Haloalkalofil *Bacillus* sp. izolasyonu, amilaz, selüloz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 186, 2008.
- Azzaz, H.H., Effect of cellulytic enzymes addition to diets on the productive performance of lactating goats, M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University, Egypt, 2009.
- Bajaj, B.K., Pangotra, H., Wani, A.M., Sharma, P., Sharma, A., Partial purification and characterization of a highly thermo-stable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. *Indian Journal of Chemical Technology*, 16: 382-387, 2009.

- Bhat, M.K., Bhat, S., Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. United Kingdom, 1997.
- Bhat, M.K., Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18: 355-383, 2000.
- Bischoff, K.M., Rooney, A.P., Li, X., Liu, S., Hughes, S.R., Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, 28: 1761-1765, 2006.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>th</sup> edition, The Williams and Wilkins Company, 1246 p. Baltimore, 1974.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G., Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38: 1397-1403, 2003.
- Çakmar, E., Farklı ortamlardan ayrımı yapılan aşırı halofilik bakterilerin protein profilleri ve bu bakterilerin selüloz enzim aktivitelerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 58, 2005.
- Coşkun, A., Endüstriyel enzimler üreten yeni *Bacillus sp.* suşlarının izolasyonu ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 132, 2010.
- Das, A., Bhattacharya, S., Murali, L., Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus sp.* isolated from cow dung. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 8(6): 685-691, 2010.
- Deka, D., Bhargavi, 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*, Article ID: 151656, DOI: 10.4061/2011/151656, 2011.
- Gado, H.M., Metwally, H.M., Soliman, H., Basiony, A.Z.L., El-Galil, E.R., Enzymatic treatments of bagasse by different sources of cellulase enzymes. *The 11<sup>th</sup> World Conference on Animal Nutrition*, 10: 607-613, 2007.
- Gaur, D., Jain, P.K., Bajpai, V., Production of extracellular  $\alpha$ -amylase by thermophilic *Bacillus sp.* isolated from arid and semi-arid region of Rajasthan. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(5): 675-684, 2012.



- Gorska, E., Tudek, B., Russel, S., Degradation of Cellulose by nitrogen-fixing strain of *Bacillus polymyxa*. *Acta Microbiologica Polonica*, 50(2): 129-137, 2001.
- Greaves, H., The effect of substrate availability on cellulolytic enzyme production by selected wood-rotting microorganisms. *Australian Journal of Biological Sciences*, 24: 1169-1180, 1971.
- Hakamada, Y., Koike, K., Yoshimatsu, T., Mori, H., Kobayashi, T., Ito, S., Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, *Bacillus* sp. KSM-S237. *Extremophiles*, 1: 151-156, 1997.
- Haliskaranfil, S., Termoalkalifilik amilaz ve selüloz enzim (multi enzim) üreticisi *Bacillus* sp. izolasyonu, enzimlerin karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulanabilirliği. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 180, 2012.
- Heck, J.X., Flores, S.H., Hertz, P.F., Ayub, M.A.Z., Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. *Process Biochemistry*, 40(1): 107-112, 2005.
- Horikoshi, K., Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63: 735-750, 1999.
- Horikoshi, K., Alkaliphiles – from an industrial point of view. *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 1407-1414, 1996.
- Hoshino E., Chiwaki M., Suzuki A., Murata M., Improvement of cotton cloth soil removal by inclusion of alkaline cellulase from *Bacillus* sp. KSM-635 in detergents. *Journal of Surfactants and Detergents*, 3: 317-326, 2000.
- Ibrahim, A.S.S., Ahmed, I.E.D., Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4): 473-478, 2007.
- Irshad, M., Anwar, Z., But, H.I., Afroz, A., Ikram, N., The industrial applicability of purified cellulose complex indigenously produced by *Trichoderma viride* through solid-state bio-processing of agro-industrial and municipal paper wastes. *BioResources*, 8(1): 145-157, 2013.
- Ito, S., Alkaline cellulase from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles*, 1: 61-66, 1997.

- Jo, K.I., Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Chung, C.H., Nam, S.W., Kim, S.K., Lee, J.W., Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquenfaciens* DL-3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13: 182-188, 2008.
- Karademir, A., Akgül, M., Tutuş, A., Kağıt endüstrisinde enzim kullanımına genel bir bakış. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(1): 61-71, 2002.
- Kim, J-Y., Hur, S-H., Hong, J-H., Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus sp.* HSH-810. *Biotechnology Letters*, 27: 313-316, 2005.
- Kıran, Ö.E., Çömlekçioğlu, U., Dostbil, N., Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(1): 12-19, 2006.
- Kıran, Ö.E., Topuz, U., Çömlekçioğlu, U., Selülaz üreticisi *Bacillus* suşlarının enzimatik özelliklerinin araştırılması. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 10(2): 13-16, 2007.
- Kırkpınar F., Basmacıoğlu H., Etlik piliç karma yemlerinde soya küspesi yerine bir enzim karışımı ilave ederek ayçiçeği küspesi kullanımı. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25: 905-912, 2001.
- Knosel, D., Continued investigation for pectolytic and cellulolytic activity of different *Bacillus* species. *Zentralbl, Bacteriology Parasiten kd Infektionskr, Hyg. Abt*, 126: 604-609, 1971.
- Korpole S., Sharma R., Verma D., Characterization and phylogenetic diversity of carboxymethyl cellulase producing *Bacillus* species from a landfill ecosystem. *Indian Journal of Microbiology*, 51(4): 531-535, 2011.
- Kotchoni, O.S., Shonukan. O.O., Gachomo. W.E., *Bacillus pumilis* BpCRI 6, Promising candidate for cellulase production under conditions of catabolite repression. *African Journal of Biotechnology*, 2(6): 140-146, 2003.
- Krishna, C., Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana waste. *Bioresorce Technology*, 69: 231-239, 1999.
- Krishna, S.H., Rao, K.C.S., Babu, J.S., Reddy, D.S., Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. *Bioprocess Engineering*, 22: 467-470, 2000.

- Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lah, N.T., Rahman, N.B., Nama, M.B., Cellulase activity and glucose production by *Bacillus cereus* monoculture and co-culture utilizing palm kernel cake (PKC) under solid state fermentation. International Conference on Environment, Energy and Biotechnology Ipchee, Singapore, 33: 172-177, 2012.
- Lee, Y.J., Kim, B.K., Lee, B.H., Jo, K.I., Lee, N.K., Chung, C.H., Lee, Y.C., Lee, J.W., Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99: 378-386, 2008.
- Lennete, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., Shadomy, H., Manual of Clinical Microbiology, 4<sup>th</sup> Edition, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, 1985.
- Li, W., Zhang, W.W., Yang, M.M., Chen, Y.L., Cloning of the thermostable cellulase gene from newly isolated *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular Biotechnology*, 40: 195-201, 2008.
- Li, Y.H., Ding, M., Wang, J., Xu, G.J., Zhao, F., A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose-degrading bacterium, *Bacillus* sp. AC-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70: 430-436, 2006.
- Lin, L., Kan, X., Yan, H., Wang, D., Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, ISSN: 0717-3458, 15(3): 1-7, 2012.
- 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.
- Mawadza, C., Hatti-Kaul, R., Zvauya, R., Mattiason, B., Purification and characterization of cellulases produced by *Bacillus* strain. *Journal of Biotechnology*, 83(3): 177-187, 2000.
- Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428, 1959.

- Mishra, B.K., Pandey Lata, A.K., Lignocellolytic enzyme production from submerged fermentation of paddy straw. *Indian Journal of Microbiology*, 47(2): 176-179, 2007.
- Mora, D., Fortina, M.G., Nicastro, G., Parini, C., Manachini, P.L., Genotypic characterization of thermophilic bacilli: A study on new soil isolates and several reference strains. *Research in Microbiology*, 149: 711-722, 1998.
- Murad, H.A., Azzaz, H.H., Cellulase and dairy animal feeding. *Biotechnology*, 9: 238-256, 2010.
- Naim, S., Jamil, A., Production of endoglucanase from a thermophilic fungus. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 44(1): 59-63, 2007.
- Nakamura, K., Kitamura, K., Cellulases of *Cellulomonas uda*. *Methods in Enzymology*, 160: 211-216, 1988.
- Ng, T.K., Zeikus, J.G., Endoglucanase from *Clostridium thermocellum*. *Methods in Enzymology*, 160: 351-355, 1988.
- Nishida, Y., Suzuki, K.I., Kumagai, Y., Tanaka, H., Inoue, A., Ojima, T., Isolation and primary structure of a cellulase from the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus nudus*. *Biochimie*, 89(8): 1002-1011, 2007.
- Özcan, N., Demir, E., Pekel, E., Yüksek selülozlu yem hammaddelerinin hayvan beslemede kullanımında biyoteknolojik uygulamalar. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(2): 113-126, 1994.
- Palmer, T., *Understanding Enzymes* (3<sup>rd</sup> edition), Ellis Horwood Limited, London, 1991.
- Patel, M.A., Ou, M.S., Ingram, L.O., Shanmugam, K.T., Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermo-tolerant acidophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Progress*, 21: 1453-1460, 2005.
- Perez, J., Munoz-Dorado, J., De-La-Rubia, T., Martinez, J., Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin. *Universidad de Granada, İspanya*, 2002.
- Priest, F.G., Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriology Reviews*, 4183: 711-753. 1977.

- Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K.M., Hughes, S.R., Christopher, L.P., Sani, R.K., Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource Technology*, 101: 8798-8806, 2010.
- Ridla, M., Uchida, S., The effect of cellulase addition on nutritional and fermentation quality of barley straw silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 6(3): 383-388, 1993.
- Robinson, R.K., Lehninger, A.L., Principles of Biochemistry, USA, 149-164 p, 1985.
- Robson, L.M., Chambliss, G.H., Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(5): 1039-1046, 1984.
- Ryu, D.D., Mandels, M., Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 2(2): 91-102, 1980.
- Sadhu, S., Maiti, T.K., Cellulase production by bacteria: A review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3): 235-258, 2013.
- Schafer, T., Borchert, T.W., Nielsen, V.S., Skagerlind, P., Gibson, K., Wenger, K., Hatzack, F., Nilsson, L., Salmon, S., Pedersen, S., Hansen, H.P.H., Poulsen, P.B., Lund, H., Oxenbøll, K.M., WU, G.F., Pedersen, H.H., Xu, H., Industrial enzymes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 105: 59-131, 2007.
- Sethi, S., Datta, A., Lal Gupta, B., Gupta, S., Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. Hindawi Publishing Corporation ISRN Biotechnology, 2013.
- Shanmughapriya, S., Kiran, G.S., Selvin, J., Thomas, T.A., Rani, C., Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(3): 625-640, 2010.
- Shimada, K., Karita, S., Sakka, K., Ohimiya, K., Cellulases, xylanases, and their genes from bacteria. In: *Recombinant Microbes for Industrial and Agricultural Applications*. Murooka, Y., Imanaka, T. (Eds.), pp. 395-429, 1994.

- Shirai, T., Ishida, H., Noda, J.I., Yamane, T., Ozaki, K., Hakamada, Y., Ito, S.,  
Crystal structure of alkaline cellulase K: Insight into the alkaline adaptation of  
an industrial enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 310: 1079-1087, 2001.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., Purification and characterization of alkaline  
cellulase produced by a novel isolate. *Bacillus sphaericus* JS1, *Journal of*  
*Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31: 51-56, 2004.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R.C., A highly thermostable, alkaline CMCase produced  
by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. *World Journal of Microbiology and*  
*Biotechnology*, 17: 761-765, 2001.
- Singh, V.K., Kumar, A., Production and purification of extracellular cellulase from  
*Bacillus brevis* VS-1. *Biochemistry and Molecular Biology International*,  
45(3): 443-52, 1998.
- Sukumaran R.K., Singhanian R.R., Pandey A., Microbial cellulases production,  
applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64:  
832-844, 2005.
- Taubman, S., Genus *Bacillus*, *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*,  
355-356, 1992.
- Taylor, R.E., Protein Immobilization. Fundamentals and Applications, New York,  
1991.
- Uhlig, H., *Industrial enzymes and their applications*, John Wiley & Sons Inc. New  
York, 1998.
- Van Vuuren, A.M., Bergsma, K., Frol-Kramer, F., van Beers, J.A.C., Effect of  
addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the  
in sacco degradation of grass silage. *Grass and Forage Science*, 44: 223-230,  
1989.
- Vieille, C., Zeikus, G.J., Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular  
mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology*  
*Reviews*, 65: 1-43, 2001.
- Wind, R.D., Buitelaar, R.M., Eggink, G., Huizing, H.J., Dijkhuizen, L.,  
Characterization of a new *Bacillus stearothermophilus* isolate: A highly  
thermostable  $\alpha$ -amylase producing strain. *Applied Microbiology and*  
*Biotechnology*, 41: 155-162, 1994.

- Wolfgang, A., *Enzymes in industry: Production and Applications*, Wiley-vch Verlag, GmbH&Co KgaA, Weinheim, 2004.
- Yang, D., Weng, H., Wang, M., Xu, W., Li, Y., Yang, H., Cloning and expression of a novel thermostable cellulase from newly isolated *Bacillus subtilis* strain I15. *Molecular Biology Reports*, 37: 1923-1929, 2010.
- Zhang, C., Xing, X., Liu, M., Production of multienzymes consisting of alkaline amylase and cellulase by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. *Biochemical Engineering Journal*, 19(2): 181-187, 2004.
- Zhuang, J., Marchant, M.A., Nokes, S.E., Strobel, H.J., Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture*, 23(5): 679-687, 2007.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Harun Reşit KILIÇER  
**Doğum Tarihi** : 04/11/1987  
**E-Posta Adresi** : [harunresit.kilicer@gmail.com](mailto:harunresit.kilicer@gmail.com)

### Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Bitirme Yılı
Lise	Yavuz Sultan Selim Lisesi		2004
Lisans	Biyoloji	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi	2010

### İş Tecrübesi:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Memur	EGM Kriminal Daire Başkanlığı	2013-