



**VAN GÖLÜ'NDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus pumilus*
VLC7 İLE SELÜLAZ ÜRETİMİ, ÜRETİM
KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, SELÜLAZIN
SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**

Aysun Ayşe YILMAZ

**Danışman: Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
2023**

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**VAN GÖLÜ'NDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus pumilus* VLC7 İLE SELÜLAZ ÜRETİMİ,
ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, SELÜLAZIN SAFLAŞTIRILMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI**
(Cellulase Production with *Bacillus pumilus* VLC7 Isolated from Lake Van, Optimization of
Production Conditions, Purification, Characterization and Biotechnological Applications of
Cellulase)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aysun Ayşe YILMAZ

Danışman: Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

Erzurum
Aralık, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Aysun Ayşe YILMAZ tarafından hazırlanan “*Van Gölü’nden İzole Edilen Bacillus pumilus VLC7 ile Selüloz Üretimi, Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Selülozün Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları*” çalışması 06 / 12 / 2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Biyoloji Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Murat ÖZDAL <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ <i>Van Yüzyüncü Yıl Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun/.../....
tarih ve sayılı kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Doç. Dr. Sümeyra Gürkök* danışmanlığında sunulan “*Van Gölü’nden İzole Edilen Bacillus pumilus VLC7 ile Selüloz Üretimi, Üretim Koşullarının Optimizasyonu, Selülozun Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Biyoteknolojik Uygulamaları*” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik davranış ve akademik kurallara uygun yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Yöntem	9	35
Araştırma Bulguları	12	20
Tartışma ve Sonuçlar	7	20
Tezin Geneli	9	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5’ten büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Aysun Ayşe YILMAZ	Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK
6.12.2023	6.12.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... Tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tezimin her aşamasında bilgi ve birikimini benimle paylaşan değerli danışman hocam Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK'e,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Murat ÖZDAL'a,

Van Gölü su örneklerinin temin edilmesindeki yardımları ve tez savunmasında jüri üyesi olarak yer aldığı için Dr. Öğr. Üyesi Tuğba ÖZAKTAŞ'a,

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan doktora öğrencisi İlknur ÇOLAK'a ve yüksek lisans öğrencisi Yusuf GÜLŞAHİN'e,

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve her koşulda beni destekleyen değerli annem Kezban YILMAZ, babam Sami YILMAZ, kardeşlerim; Aylin YILMAZ, Ömer YILMAZ ve Melek SARIBOĞA'ya,

Teşekkürlerimi sunarım.

Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne FYL-2022-10654 numaralı proje ile bu tez çalışmasını desteklediğinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Aysun Ayşe YILMAZ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VAN GÖLÜ'NDEN İZOLE EDİLEN *Bacillus pumilus* VLC7 İLE SELÜLAZ ÜRETİMİ, ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU, SELÜLAZIN SAFLAŞTIRILMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOTEKNOLOJİK UYGULAMALARI

Aysun Ayşe YILMAZ

Danışman: Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

Amaç: Bu tezin amacı öncelikle Van Gölü'nden alkali pH ortamına adapte olmuş ve yüksek selülaaz üretim potansiyeline sahip bir bakterinin izole edilmesi ve bu izolatın tanımlanmasıdır. Daha sonra bu izolattan selülaazın saflaştırılması, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulama alanlarının araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Van Gölü'nden izole edilen alkalifilik bakteriler arasından, karboksimetil selüloz substratı kullanılarak selülaaz aktivitesi en yüksek olan bakteri belirlenmiştir. Bu izolat, klasik ve moleküler tanı yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Selülaaz üretimi için en uygun koşullar belirlenmiş, ardından selülaaz amonyum sülfat çöktürmesi, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim karakterize edilmiş ve enzimin kumaş boyalarını parçalama, kağıdı parçalama ve kumaş yüzeyindeki tüylenmenin uzaklaştırılması gibi biyoteknolojik kullanım alanları incelenmiştir.

Bulgular: İzolatlar arasından en iyi selülaaz üretici izolat *Bacillus pumilus* VLC7 (GenBank Acc No: OR415888.1) olarak tanımlanmıştır. Bu bakterinin maksimum selülaaz üretimi, pH 7,0 ve 30 °C sıcaklıkta karboksimetil selüloz ve maya özütü varlığında, 96 saatlik inkübasyon süresinde elde edilmiştir. Enzimin optimum aktivitesinin gözlemlendiği pH değeri 9,0 ve sıcaklık ise 40 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin sıcaklık ve pH stabiliteleri belirlenmiştir. Enzimin çeşitli reaktifler, metal iyonları, organik çözücüler ve deterjanlar varlığında kararlı olduğu tespit edilmiştir. *B. pumilus* VLC7 alkali selülaazının kumaş yüzeyindeki tüylenmeyi uzaklaştırmada (biyoparlatma), kağıdı ve kumaş boyasını parçalamada etkili olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Bu tez çalışmasında, *B. pumilus* VLC7 bakterisinden selülaaz enzimi saflaştırılarak karakterize edilmiştir. Alkali selülaazın kumaş biyoparlatmada, kağıt ve kumaş boyalarını parçalamada kullanılabileceği saptanmıştır. Bu bulgular, *B. pumilus* VLC7'nin endüstriyel biyoteknoloji uygulamalarında potansiyel bir biyo-ürün kaynağı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus pumilus*, Alkali Selülaaz, Protein Saflaştırma, Enzim Karakterizasyonu, Deterjan, Kağıt, Biyoparlatma.

Aralık 2023, 93 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

CELLULASE PRODUCTION WITH *Bacillus pumilus* VLC7 ISOLATED FROM LAKE VAN, OPTIMIZATION OF PRODUCTION CONDITIONS, PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF CELLULASE

Aysun Ayşe YILMAZ

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

Purpose: The aim of this thesis is to isolate a bacterium from Lake Van, which is adapted to alkaline pH environment and has a high cellulase production potential and to identify this isolate. Then, it was aimed to purify and characterize cellulase from this isolate and to investigate its biotechnological applications.

Method: Among the alkaliphilic bacteria isolated from Lake Van, the bacterium with the highest cellulase activity was identified using carboxymethyl cellulose substrate. This isolate was characterized by classical and molecular identification methods. The optimum conditions for cellulase production were determined and the cellulase was purified by ammonium sulfate precipitation, ultrafiltration, and ion exchange chromatography. The purified enzyme was characterized and its biotechnological applications such as degradation of fabric dyes, degradation of paper and removal of pilling on fabric surface were investigated.

Results: Among the isolates, the best cellulase producer was identified as *Bacillus pumilus* VLC7 (GenBank Acc No: OR415888.1). The maximum cellulase production with this bacterium was achieved at pH 7.0 and 30 °C, in the presence of carboxymethyl cellulose and yeast extract, during a 96-hour incubation period. The optimum temperature for activity was determined as 40 °C and pH 9.0. Furthermore, the temperature and pH stabilities of the enzyme were characterized. The enzyme was found to be stable in the presence of various reagents, metal ions, organic solvents, and detergents. *B. pumilus* VLC7 alkaline cellulase was found to be effective in shredding paper, degrading fabric dye, and removing pilling from the fabric surface.

Conclusion: In this thesis, cellulase enzyme from *B. pumilus* VLC7 was purified and characterized. It was found that alkaline cellulase can be used in fabric biopolishing and degradation of paper and fabric dyes. These findings suggest that *B. pumilus* VLC7 may be a potential source of bioproducts for industrial biotechnology applications.

Keywords: *Bacillus pumilus*, Alkaline Cellulase, Protein Purification, Enzyme Characterization, Detergent, Paper, Biopolishing.

December 2023, 93 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Enzimler	3
Enzimlerin sınıflandırılması.....	3
Enzimlerin kullanım alanları.....	3
Selüloz.....	4
Selülazlar.....	5
Selülazların sınıflandırılması	6
Selülazların uygulama alanları	7
Selülaz üretimine etki eden faktörler	10
Alkalifilik bakteriler.....	11
Van Gölü	11
<i>Bacillus</i> ve <i>B. pumilus</i>	12
Selülaz enzimiyle yapılan çalışmalar	13
MATERYAL VE YÖNTEM	16
Materyal	16
Kullanılan kimyasallar	16
Kullanılan cihazlar	16
Kullanılan tampon ve çözeltiler	16
Kullanılan besiyerleri	19
Yöntem.....	20
Örneklerin toplanması ve izolatların eldesi.....	20

Selüla��z üreten izolatların seçimi	20
Glukoz standart grafiğinin hazırlanması	21
p-Nitrofenol standart grafiğinin hazırlanması	22
Bakterilerin klasik ve moleküler yöntemlerle tanılanması.....	22
Sel��la��z ��retim koşullarının optimizasyonu	25
Azot kaynaklarının sel��la��z üretimi ve bakteri gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi ..	25
Azot kaynağının farklı konsantrasyonlarının sel��la��z üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	26
Karbon kaynaklarının sel��la��z üretimi ve bakteri gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi	26
Karbon kaynağının farklı konsantrasyonlarının sel��la��z üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	26
Başlangıç pH'sının sel��la��z üretimi ve bakteri gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi ..	26
��nk��basyon sıcaklığının sel��la��z üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	26
Enzim saflaştırma.....	27
Sel��la��zın amonyum sülfat ����t��rmesi metoduyla kısmi saflaştırılması	27
��yon değişim kromatografisi ile saflaştırma.....	27
Protein miktar tayini.....	27
Örneklerin SDS-PAGE için hazırlaması ve elektroforez.....	28
Saflaştırılan sel��la��zın karakterize edilmesi	29
Sel��la��zın biyoteknolojik uygulama alanları.....	31
BULGULAR	33
Bakterilerin izolasyonu	33
Seçilen bakteri izolatının tanılanması	34
Moleküler yöntemlerle tanılama	35
<i>B. pumilus</i> VLC7'nin sel��la��z üretim koşullarının optimizasyonu	36
��nk��basyon süresinin <i>B. pumilus</i> VLC7'nin sel��la��z üretimi ve gelişimine etkisi	36
Azot kaynaklarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin sel��la��z üretimi ve gelişimine etkisi.....	37
Maya ��z��t��n��n farklı konsantrasyonlarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin sel��la��z üretimi ve gelişimine etkisi	37
Karbon kaynaklarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin sel��la��z üretimi ve gelişimine etkisi	38
CMC'nin farklı konsantrasyonlarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin sel��la��z üretimi ve gelişimine etkisi	39
Başlangıç pH'sının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin sel��la��z üretimi ve gelişimine etkisi.....	39

İnkübasyon sıcaklığının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin selüloz üretimi ve gelişimi üzerine etkisi	40
Enzim saflaştırma ve enzim karakterizasyonu	41
Selülozün amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla kısmi saflaştırılması	41
Saflaştırılmış selülozün karakterizasyonu	42
Metal iyonlarının <i>B. pumilus</i> VLC7 selülozı üzerine etkisi	46
Reaktif maddelerin <i>B. pumilus</i> VLC7 selülozı üzerine etkisi	46
Organik çözücü maddelerin <i>B. pumilus</i> VLC7 selülozı üzerine etkisi.....	47
Selüloz aktivitesi üzerine ticari deterjanların etkisi	48
Selüloz stabilitesi üzerine deterjanların etkisi	48
Enzimin biyoteknolojik uygulamaları.....	49
<i>B. pumilus</i> VLC7 selülozünün kağıt parçalama özelliği.....	49
Selülozün kumaşda biyoparlatma etkisinin araştırılması	50
Selülozün kumaş boyası üzerine etkisinin araştırılması.....	51
TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	53
Sonuçlar.....	63
KAYNAKÇA	64
EKLER	75
Ek 1. Glukoz standart grafiği	75
Ek 2. <i>p</i> -Nitrofenol standart grafiği	76
EK 3. Van Gölü bakteri izolatu <i>B. pumilus</i> VLC7'nin 16S rRNA sekans dizisi.....	77
EK 4. BSA standart grafiği	78
ÖZGEÇMİŞ.....	79

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Enzimler ve kullanım alanları	4
Tablo 2. PCR master mix hazırlanışı	24
Tablo 3. Yığma jel (%7,5) yapımı	28
Tablo 4. Ayırıcı jel (%12,5) yapımı.....	28
Tablo 5. Van Gölü’nden izole edilen selülitik V7 kodlu izolatın özellikleri.....	35
Tablo 6. <i>B. pumilus</i> VLC7’den selülozün saflaştırma basamakları	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Selüloz yapısı (Miljković vd., 2021).....	5
Şekil 2. Selüloz üzerinde selülaz etki bölgeleri (Khan vd., 2016'dan Türkçeleştirilmiştir.)	6
Şekil 3. Van Gölü havza sınırları ve bağlantılı akarsular (Köse vd., 2005).....	12
Şekil 4. Van Gölü'nden elde edilen izolatların CMC-A besiyerinde 30 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda oluşturdıkları selülotik zonlar	33
Şekil 5. Van Gölü bakteri izolatlarının CMC-B besiyerinde 30 °C'de 120 saatlik inkübasyonları boyunca selülaz aktiviteleri	34
Şekil 6. Van Gölü bakteri izolatlarının CMC-B besiyerinde 30 °C'de 120 saatlik inkübasyonları boyunca mikrobiyal gelişimleri	34
Şekil 7. Van Gölü izolatı <i>B. pumilus</i> VLC7'nin filogenetik ağacı.....	36
Şekil 8. CMC-B besiyerinde, 30 °C ve 180 rpm'de <i>B. pumilus</i> VLC7'nin 120 saat inkübasyonu boyunca mikrobiyal gelişimi ve selülaz üretimi	36
Şekil 9. Farklı azot kaynaklarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selülaz üretimine etkisi.....	37
Şekil 10. Farklı maya özütü konsantrasyonlarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selülaz üretimi üzerine etkisi	38
Şekil 11. Farklı karbon kaynaklarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selülaz üretimi üzerine etkisi.....	38
Şekil 12. Farklı CMC konsantrasyonlarının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selülaz üretimi üzerine etkisi.....	39
Şekil 13. Ortam pH'sının <i>B. pumilus</i> VLC7'nin selülaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi	40
Şekil 14. Sıcaklığın <i>B. pumilus</i> VLC7'nin selülaz üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi	40
Şekil 15. Saflaştırma örneklerin SDS-PAGE analizi. M: Precision Plus Protein Unstained Standart (250-10 kDa) 1: Süpernatant; 2: 40% amonyum sülfat çöktürmesi; 3: iyon değişim kromatografisi	42
Şekil 16. <i>B. pumilus</i> VLC7 selülazının Michaelis-Menten grafiği	43
Şekil 17. <i>B. pumilus</i> VLC7 selülazının Lineweaver-Burk grafiği	43
Şekil 18. Sıcaklığın <i>B. pumilus</i> VLC7 selülazının aktivitesi üzerine etkisi	44
Şekil 19. Sıcaklığın <i>B. pumilus</i> VLC7 selülazının kararlılığına etkisi.....	44

Şekil 20. pH'nın <i>B. pumilus</i> VLC7 selülaının aktivitesine etkisi.....	45
Şekil 21. pH'nın <i>B. pumilus</i> VLC7 selülaının stabilitesine etkisi	45
Şekil 22. Selüla aktivitesi üzerine 5 ve 10 mM konsantrasyonlardaki metal iyonlarının etkisi	46
Şekil 23. <i>B. pumilus</i> VLC7 selüla aktivitesi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisi	47
Şekil 24. Selüla aktivitesi üzerine çeşitli organik çözücülerin (%20'lik) etkisi.....	47
Şekil 25. Ticari deterjanların <i>B. pumilus</i> VLC7 selüla aktivitesine etkisi.....	48
Şekil 26. Ticari deterjanların <i>B. pumilus</i> VLC7 selüla stabilitesine etkisi.....	49
Şekil 27. Filtre kağıdı varlığında selüla üretimi	49
Şekil 28. <i>B. pumilus</i> VLC7 selülaının kağıdı parçalama potansiyeli. %1 Whatman no.1 filtre kağıdı (0,75 × 0,75 cm) ve %1 CMC içeren CMC-B besi ortamlarının inkübasyon öncesi (A1) ve <i>B. pumilus</i> VLC7 ile 96 saatlik inkübasyonu sonrası (A2) görünümü. Filtre kağıtlarının inkübasyon öncesi (B1) ve inkübasyon sonrası (B2) görünümleri.	50
Şekil 29. <i>B. pumilus</i> VLC7 selüla ile farklı zaman aralıklarındaki inkübasyonunun kumaştaki tüylenme üzerine etkisi	51
Şekil 30. <i>B. pumilus</i> VLC7 selüla ile farklı zaman aralıklarındaki inkübasyonun kumaştaki boya giderimi üzerine etkisi	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
μ	: Mikron
μL	: Mikrolitre
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
M	: Molarite
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
nm	: Nanometre
U/mg	: Ünite/miligram-Spesifik Aktivite Birimi
U	: Ünite-Enzim Birimi
K _m	: Michealis - Menten sabiti
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
rpm	: Bir dakika içerisindeki devir sayısı
V _{max}	: Enzimin ulaşabileceği maximum hız

Kısaltmalar

APS	: Amonyum persulfat
CMC	: Karboksimetil selüloz
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNS	: Dinitrosalisilik asit
EC	: Enzim komisyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletillen diamin

GİRİŞ

Enzimler canlı hücrelerin ürettiği ve canlı metabolizmasındaki çoğu biyolojik süreci katalize eden, biyokatalizörlerdir (Hinnemann ve Norskov, 2006). Selülaz ise selülozun enzimatik hidrolizinde rol oynayan önemli bir enzim türüdür ve selülozun son ürünü olan glukozu dönüştürülmesini sağlar. Selülazlar, ilk olarak selüloz moleküllerini daha kısa polisakkaritlere, sonrasında sellobiyoz gibi oligosakkaritlere ve son olarak D-glukoz gibi monosakkaritlere dönüştürmekle görevlidir (Teeri, 1997; Zhang ve Lynd, 2004).

Selülazlar bitki, fungus ve bakterilerde hatta hayvanlarda bulunabilir. Ancak mikroorganizmalar hızlı ve kontrollü koşullar altında yetiştirilebildikleri için endüstriyel enzim üretimi bakımından birincil kaynaktır. Mikroorganizmalardan üretilen enzimler, yüksek katalitik aktiviteleri, istenmeyen yan ürünlerin olmaması, yüksek stabiliteleri, düşük maliyetleri ve büyük miktarlarda elde edilebilmeleri nedeniyle bitki ve hayvanlardan elde edilen enzimlerden daha fazla tercih edilirler (Wiseman, 1987).

Bu çalışmada, öncelikle etkili bir alkali selülaz üreticisinin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlandı. Van Gölü'nün bazik pH'sına uyum sağlamış ekstremofilik bakteriler izole edildi. İzolatlar arasından en iyi selülaz üreticisi seçilerek selülaz enziminin optimizasyonu, klasik ve moleküler yöntemlerle karakterizasyonu yapıldı.

Klasik ve moleküler yöntemlerle tanımlanan yüksek selülaz aktivitesine sahip izolatın üretim koşullarının optimizasyonu amacıyla optimum pH ve sıcaklık, inkübasyon süresi, en iyi azot kaynağı ve konsantrasyonu, en iyi karbon kaynağı ve konsantrasyonu belirlendi. Sonrasında enzim saflaştırma işlemi için amonyum sülfat tuzu ile protein çöktürme, ultrafiltrasyon filtreleri ve anyon değişim kromatografisi teknikleriyle saflaştırılma yapıldı.

Saflaştırılan enzimin karakterizasyonu için moleküler kütlesi, V_{max} ve K_m kinetik sabitleri, optimum pH ve pH stabilitesini, optimum sıcaklık ve sıcaklık stabilitesini, çeşitli metal iyonları, çeşitli reaktif maddeler, organik çözücü maddeler ve deterjanlar içeren ortamlarda dayanıklılığı belirlenerek biyoteknolojik kullanım sahaları incelendi.

Selülozların endüstriyel kullanım alanlarından biri olan kağıt sanayisinde karton gibi büyük kâğıt parçalarının parçalanmasını kolaylaştırmak amacıyla kağıdı parçalama özelliği araştırıldı ve kağıdı parçaladığı tespit edildi.

Bu tez çalışmamızın son aşamasında, selülozların ayrıca deterjan ve tekstil endüstrisinde kullanım olanakları araştırılmıştır. Deterjan içeriklerine, daha çok yıpranmış kumaş yüzeyindeki tüylenmeyi giderme özellikleriyle biyoparlatma için eklenen selülozlar, tekstil endüstrisinde boya giderimleri ve renk tonu düzenlemesi gibi kullanım alanlarına da sahiptir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarla, selüloz enziminin kumaş yüzeyindeki tüylenmeyi azalttığı ve boya gideriminde etkili olduğu tespit edilmiştir.



KURAMSAL TEMELLER

Enzimler

Enzim terimi ilk olarak 1878'de Kühne tarafından kullanılmıştır. Enzimler küresel proteinlerdir ve diğer proteinler gibi uzun doğrusal amino asit zincirleri içerirler. Her bir amino asit dizisi, kendine özgü özelliklere sahip benzersiz bir yapı oluşturur (Choudhury, 2020). Enzimler, canlı hücrelerce üretilen biyokatalizörlerdir; fakat hücrelerden bağımsız hareket edebilen çözünür, kolloidal organik katalizörler olarak da tanımlanabilir. Eski çağlardan beri enzimler peynir, şarap ve ekmek üretimi gibi çeşitli alanlarda kullanılmışlardır. Enzimlerin endüstriyel uygulamaları, mikroorganizmalar ve oluşturdıkları metabolitler üzerine yapılan yoğun araştırmalar sebebiyle 20. yüzyılın ikinci yarısından bu yana önemli ölçüde artmıştır (Kulkarni vd., 1999) ve endüstriyel biyoteknolojiye de büyük katkıda bulunmuşlardır. Endüstriyel işlemlerde kullanılan enzimlerin çoğu hidrolitik enzimlerdir ve çeşitli doğal maddelerin bozunması için kullanılmaktadırlar (Kirk vd., 2002). Enzimler gıda, yem, kağıt, deri, tarım, deterjan, moda ve tekstil endüstrilerinde çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Böylece hem maliyette büyük düşüşler sağlamış (Bhatia ve Bhatia, 2018) hem de toksik kimyasalların kullanımını azaltmıştır (Choudhury, 2020).

Enzimlerin sınıflandırılması

Geçmişte, enzimlerin sınıflandırılması için çeşitli sistemler kullanılmıştır. Günümüzde ise, Uluslararası Enzimler Komisyonu tarafından tanıtılan sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır. Bu komisyon, enzimlerin ve koenzimlerin sınıflandırılması ve isimlendirilmesi, enzimlerin aktivite birimleri ve standart tahlil yöntemleri ile enzim kinetiğinin tanımında kullanılan semboller konusunu ele almıştır (Aszalos, 1978). Enzimlerin sınıflandırılmasında EC (Enzim komisyonu) numarası kullanılmaktadır. Katalizledikleri reaksiyonlara göre oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar ve translokazlar olarak yedi enzim sınıfı tanımlanmıştır (de Souza Vanderberghe vd., 2020).

Enzimlerin kullanım alanları

Endüstriyel biyoproseslerin geliştirilmesinde mikrobiyal enzimler oldukça önemli roller üstlenmiştir. Kağıt ve kağıt hamuru, deterjan, deri ve tekstil, kimyasallar, ilaçlar, yiyecekler ve içecekler, biyoyakıtlar, hayvan yemi ve kişisel bakım da dahil olmak üzere çok sayıda pazar mevcut uygulamaların odak noktasıdır (Tablo 1). Mikrobiyal enzimler ekonomik fizibilite,

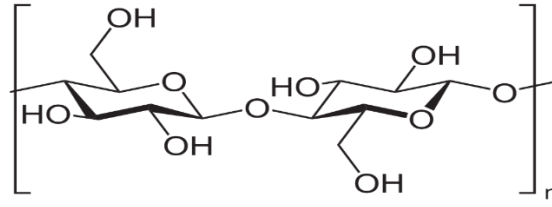
yüksek verim, tutarlılık, üründe modifikasyon ve optimizasyon kolaylığı, mevsimsel dalgalanmalardan etkilenmeme nedeni ile düzenli tedarik, ucuz ortamlarda mikroorganizmaların hızlı büyümesi, stabilite ve optimum katalitik aktivite nedeniyle uygun üretim sistemleridir (Barragán vd., 2016).

Tablo 1. Enzimler ve kullanım alanları

Enzimler	Kaynaklar	Kullanıldığı Yer	Endüstri	Kaynak
Amilaz	Fungus Bakteri	Fermantasyon İlaç katkı maddesi Nişasta parçalayıcı	Gıda Tekstil Kağıt Deterjan Fırın İlaç	Brisman ve Belin, 1991; Souza ve Magalhães, 2010; Wang vd., 2020
Laktaz	Maya Bakteri	Laktoz parçalayıcı	Gıda	Jones ve Lee, 2017
Lipaz	Fungus	Deterjan katkı maddesi Enerji kazanımı	Deterjan Yağ	Choudhury ve Bhunia, 2015
İnvertaz	Fungus	Sakkaroz hidrolizi	Gıda İçecek	Kotwal ve Shankar, 2009
Proteaz	Fungus Bakteri	Süt katkı maddesi Tüy temizleme Leke çıkarıcı	Süt Deri Deterjan	Ismail ve Nielsen, 2010; Jian vd., 2011; Yadav vd., 2019
Selülaz	Fungus Bakteri	Odunsu hammadde öğütülmesi Biyo-taşıma Ekstraksiyon Ekin büyümesi	Gıda İçecek Deterjan Tarım Kağıt Tekstil	Bhat, 2000; Sharada, 2014; Srivastava vd., 2015

Selüloz

Yeryüzündeki en yaygın organik molekül, mikroorganizmalar tarafından üretilen, bitkilerin ve alglerin hücre duvarlarında bulunan selülozdur. Selüloz, Şekil 1’de gösterildiği gibi glukoz ünitelerinin β -1,4-glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşan $(C_6H_{10}O_5)_n$ kimyasal formülüne sahip bir tür düz polimerdir. Selüloz basit bir polimerdir; ancak enzimatik hidrolize karşı oldukça dirençli olan çözünmez, kristalin mikrofibriller oluşturur. Selülozu verimli bir şekilde bozduğu bilinen tüm organizmalar, sinerjizmde birlikte hareket eden farklı özgülöklere sahip bir enzim dizisi üretir (Béguin ve Aubert, 1994).



Şekil 1. Selüloz yapısı (Miljković vd., 2021)

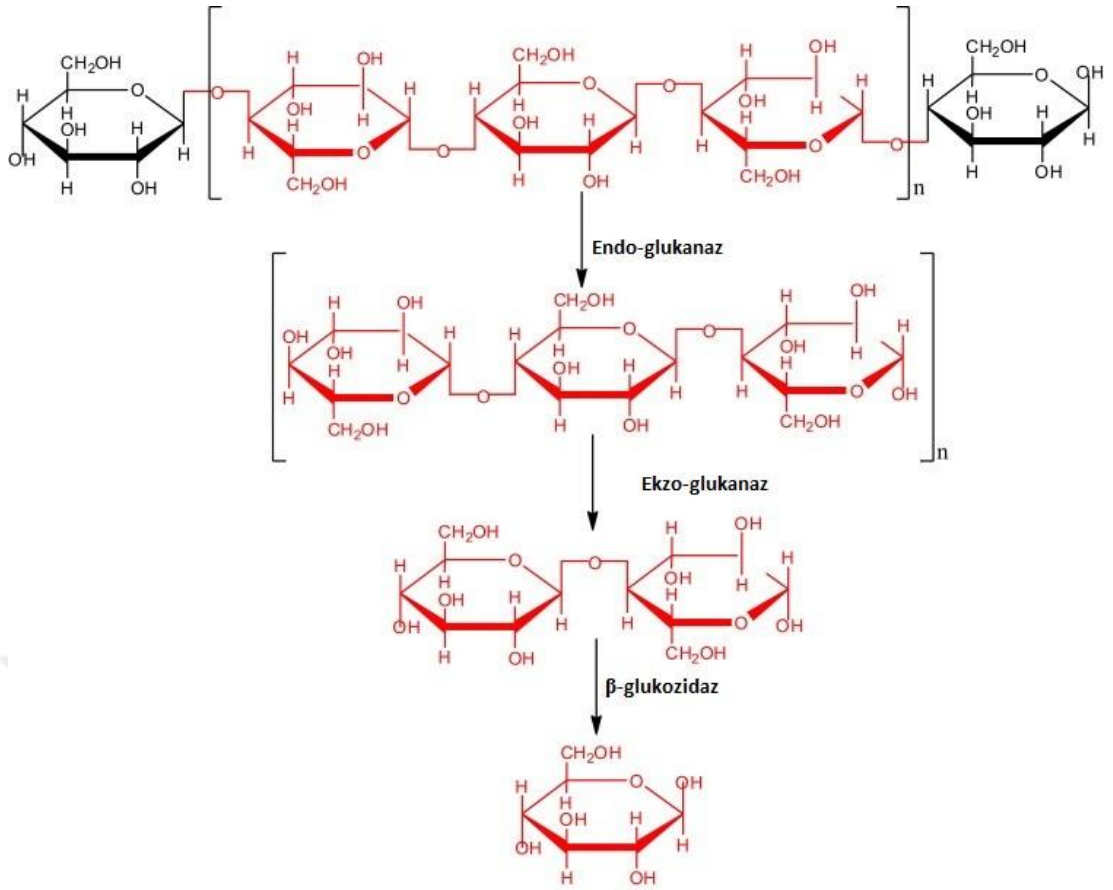
Selülozlar

Selülaz adı verilen enzimler, glikozu serbest bırakmak için selüloz moleküllerindeki β -1,4-glikozidik bağları parçalar. Selülazlar, endoglukanazlar (EC 3.2.1.4, β -1,4-D-glukan glukanohidrolazlar), ekzoglukanazlar (EC 3.2.1.91, β -1,4-D-glukan selobiyohidrolazlar) ve β -1,4-D-glukozidazlar (EC 3.2.1.21, selobiyazlar veya -D-glukozit glikozil hidrolazlar) şeklinde üretilirler (Lynd vd., 2002) ve selüloz üzerinde Şekil 2’de gösterildiği şekilde etki ederler.

Başta fungus ve bakteriler olmak üzere çok sayıda mikroorganizma, selülozu glikoza parçalayan ve hidrolitik enzimlerden olan selülazları üretebilir (Jahangeer vd., 2005). Genellikle *Bacillus* cinsine ait bakteriler tarafından üretilen selülaz enzimi, doğada geniş bir mikroorganizma spektrumu ile ifade edilir. Selülaz üreten mikroorganizmaların doğadan taranması ve izole edilmesi, yeni selülazlar elde etmenin önemli yollarından biridir. Bu yeni taranan mikroorganizmalar, çeşitli özelliklere sahip yeni selülaz genlerinin kaynaklarıdır. Selülazlar sıklıkla ölü ve çürüyen organik maddeler üzerinde büyüyen saprofitik mikroorganizmalar tarafından üretilir. Birçok bitki patojeni de selülaz eksprese eder. Genellikle selülaz üreten mikroorganizmalar, orman ve doğa rezervlerinden, sıcak su kaynaklarından, komposttan, kanalizasyondan, hayvan gübresinden ve sığır rumenlerinden elde edilen toprak ve su örneklerinden izole edilir. Mantarlardan elde edilen selülazlar hücrelerin dışına salgılandığı ve dayanıklı olduğu için ticari olarak önemlidir. Genel olarak, termofilik selülazlar yüksek sıcaklıklara ve aşırı pH değerlerine dayanabildikleri için ticari uygulamalara sahip oldukları düşünülmektedir (Juturu ve Wu, 2014).

Son yıllarda endüstriyel alanda kullanılan enzimlerin %75’i hidrolitik enzimlerden oluştuğu bildirilmiştir (Bhat, 2000). Selülazlar, 30 yılı aşkın bir süredir ticari olarak kullanıma sunulduklarından beri hem akademik hem de ticari çalışmaların odak noktası haline gelmiştir (Kuhad vd., 2011).

Selülazlar, diğer enzimlerde olduğu gibi aktivitelerinde değişikliklere neden olan çok sayıda dış parametreden etkilenmektedir. pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu vb. parametreleri yapısal stabiliteyi, enzimatik aktiviteyi ve nihayetinde glikoz verimini etkilemektedir (Ranganathan vd., 2022).



Şekil 2. Selüloz üzerinde selülaz etki bölgeleri (Khan vd., 2016’dan Türkçeleştirilmiştir.)

Selülazların sınıflandırılması

Selülaz, selülozun hidrolizini katalize eden bir enzim sınıfıdır. Selülaz, endo-1,4-β-D-glukanazlar ve ekzo-1,4-β-D-glukanazlar ile selobiyozdan (β-D-glukozidglukano hidrolaz) oluşan çoklu bir enzim sistemidir (Sharada vd., 2014).

Endo-glukanaz [EC 3.2.1.4]

Endo-glukanazlar, selüloz polisakkarit zincirindeki iç amorf bölgeleri rastgele keserek çeşitli uzunluklarda oligosakkaritler oluştururlar (Lynd vd., 2022). Endo-glukanaz ayrıca selüloz hidrolizinin ara ürünleri olan selodekstrinler üzerinde de etki ederek onları selobiyoz ve glikoza dönüştürür (Sharada vd., 2014). Endo-glukanazın yapısı, *Thermoascus aurantiacus*’a ait endoglukanazın kristal yapısı alınarak açıklanmaktadır. Glikozil hidrolaz 5 ailesine aittir. Bu enzim, kısa döngüler içeren kompakt bir yapıya sahip sadece bir katalitik alt birim içerir. Enzim yapısı, klasik sekiz katlı β/α-barrel, β/α-loop 3’te kısa bir iki iplikli antiparalel β-sheet ve üç adet tek dönüşlü sarmal ile karşılaştırıldığında sadece birkaç ekstra ikincil yapıya sahiptir (Leggio ve Larsen, 2002).

Ekzo-glukanaz [EC 3.2.1.91] ve [EC 3.2.1.176]

Selüloz 1,4- β -selobiyosidaz [EC 3.2.1.91] selüloz ve benzer substratlardaki β -(1-4)-D-glukozidik bağların hidrolizi ile zincirlerin indirgen uçlarından selobiyozu serbest bırakırken, selüloz 1,4- β -selobiyosidaz [EC 3.2.1.176] selüloz ve selotetraozdaki β -(1-4)-D-glukozidik bağların hidrolizi ile zincirlerin indirgeyici olmayan uçlarından selobiyozun serbest bırakılmasını gerçekleştirirler.

Ekzo-glukanazların veya selobiyohidrolazların yapısı, *Phanerochaete chrysosporium aurantiacus*'a ait selobiyohidrolaz kristal yapısı alınarak açıklanır. Bu enzim, GH 7 ailesine aittir. Translasyon sonrası modifikasyonlar ile, 431 amino asit uzunluğundaki peptit zinciri kalıpları, 3 boyutlu bir β -jöle rulo yapısına sahip fonksiyonel bir enzime dönüşür (Muñoz vd., 2001).

β -glukozidaz [EC 3.2.1.21]

Toprakdaki hücre dışı enzimlerden, toprak organik maddesinin parçalanmasında rol oynayanlar özellikle ilgi çekicidir. β -glukozidaz (eski adı gentiobiaz veya selobiyaz), bitki polisakkaritlerinin ana bileşeni olan selülozun enzimatik bozunmasında rol oynayan bir enzimdir. Selüloz, β -1,4 bağlı glukoz birimlerinin polimer zincirlerinden oluşur ve enzimatik bozunması, selüloz zincirlerini daha küçük birimlere ayıran endo- β -1,4-glukanaz ve iki β -1,4 bağlı glikoz birimini moleküllerin indirgeyici uçlarından ayıran selobiyohidrolaz tarafından başlatılır. β -glukozidaz, her mol selobiyoz başına iki mol glukoz açığa çıkarmak için selobiyozun bölünmesini katalize ederek hidroliz işlemi tamamlar ve bu nedenle selobiyozu doğrudan alamayan mikroorganizmalar için önemli bir enerji kaynağının tedariğini düzenler (Turner vd., 2002).

Selülazların uygulama alanları

Mikrobiyal enzimlerin kullanımı yüzyıllardır yaygın olarak bildirilmiştir; ancak enzimlerin ticari kullanımı son zamanlarda daha çok benimsenmiştir. Mikrobiyal kökenli selülazlar, gıda, tekstil, kağıt ve kağıt hamuru, çamaşırhane, içecek, tarım, biyoyakıt üretimi ve deterjan endüstrileri de dahil olmak üzere çeşitli ticari sektörlerde kullanılması sebebiyle genel olarak küresel enzim pazarının %20'sini oluşturmaktadır (Ejaz vd., 2021). Selülazlar, selülozu etanole fermente edilebilen bir şeker olan glikoza hidrolize etme kabiliyetleri nedeniyle önemli biyoyakıt enzimleridir. Gelecekte biyoyakıtların ticari üretimi tarafından güçlü bir şekilde seçilecek ve biyoyakıt endüstrisinde selüloz talebini daha da arttırma yolunda devam edecektir (Srivastava vd., 2015).

Kağıt endüstrisinde selülozlar

Selülozların kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde uygulanması, kullanılan kağıtların ve gazetelerin geri dönüşümü, odunsu hammaddenin rafine edilmesi ve öğütülmesi, kağıdın dayanıklılık özellikleri gibi mekanik hamurlaştırma işlemlerinde geçerlidir. Rafinasyon sonucunda selülozlar, yüksek miktarda ince, hacimli ve sertliğe sahip hamurların oluşmasına yol açar. Buna karşın, selülozların kullanıldığı biyomekanik hamurlaştırma, rafine etme sırasında önemli miktarda enerji tasarrufu sağlamaktadır (Bhat, 2000). Selülozlar kağıt hamuru üretimi işleminde hamurun kalitesini azaltan odunsu maddeleri uzaklaştırır (Zoppas vd., 2013). Ayrıca yine kağıt endüstrisinde kağıttaki mürekkebi gidermede de kullanılır. Mürekkep giderme işleminde asidik selülozlar kullanılır ve bu enzimler kağıdın sararmasını önlediği, parlaklık verdiği, kağıdı temiz gösterdiği ve çevre kirliliğinde azaltıcı rol oynadığı için tercih edilir (Ratnayake ve Jayasekara, 2019). Ayrıca selülozlar kağıt havluların yumuşak dokuda olmasını sağladıkları için de tercih edilirler (Sukumaran vd., 2005).

Tekstil endüstrisinde selülozlar

Selülozlar, tekstil ıslak işlemede ve özellikle selüloz bazlı tekstillerin terbiyesinde kullanılan en başarılı enzimlerdir. Kotların biyo-taşlanması, pamuk ve diğer selülozik kumaşların biyoparlatılması için bu enzimler kullanılmıştır (Hebeish ve Ibrahim, 2007). Kotların taşlanmasında sıklıkla ponza taşı kullanılmaktadır; ancak ponza taşı kullanımı donanımlara hasar vermesinin yanı sıra fazla emek isteyen bir uygulamadır. Selülozların ponza taşına alternatif olarak kullanılması uygulama verimliliğini olumlu yönde etkilemiştir (Schafer vd., 2007). Biyoparlatmada, selülozlar farklı kimyasallar gerekmeden pamuklu kumaşlarda yüzeydeki lifleri uzaklaştırarak kumaşın pürüzsüzlük hissini, görüntüsünü ve renk parlaklığını artırır. Yıkamaya dayanıklılık, esnekliğin geliştirilmesi ve kumaş yüzeyinin yumuşaklığı için de önemli rol oynamaktadır (Bhat, 2000). Ek olarak selülozlarla yapılan biyoparlatma işlemi, işlenmiş ürünlerde nem oranını yaklaşık olarak %6 artırır (Doğan, 2015). Yün kumaşlarda, yün ham haldeyken bulunan bitkisel atıkları temizleme işleminde kullanılır ve bu temizleme işlemi karbonizasyon olarak adlandırılır. Karbonizasyon işlemi ile bitkisel atıkları uzaklaştırmak için kimyasal olarak sülfürik asit kullanılır, selüloolitik enzimler bu sülfürik asit kullanımını azaltarak daha çevre dostu bir yöntem olarak tercih edilir (Gouveia vd., 2008).

Şarap ve bira endüstrisinde selülozlar

Bira gibi fermente edilmiş içeceklerin üretiminde, glukanın hidrolizini teşvik etmek için endoglukanazlar dahil edilebilir, bu da şıranın viskozitesinde bir azalmaya neden olur ve böylece onun filtrelenebilirliğini artırır. Selülozlar, kırmızı şarap üretim sürecinde de

kullanılabilir. Hatta üzüm kabuğu hücrelerinin hücre duvarının polisakkarit fraksiyonu üzerinde etki ederek, üzüm kabuğunun daha iyi maserasyonuna izin verdikleri için maserasyon enzimleri olarak adlandırılırlar (de Souza ve Kawaguti, 2021).

Gıda işleme endüstrisinde selülozlar

Selülozlar, gıda işleme endüstrisinde geniş uygulamalara sahiptir. Selülozlar, toplu olarak maserasyon enzimleri olarak bilinen diğer enzimlerle (ksilanazlar ve pektinazlar) birlikte verimlerini artırmak için meyve ve sebze sularının ekstraksiyonunda ve berraklaştırılmasında kullanılmaktadır. Maserasyon enzimleri viskoziteyi azaltır, işleme sırasında meyve sularının posa stabilitesini ve aromatik özelliklerini iyileştirir. Enzim ön işleme, meyve suyu filtrasyonu sırasında zar kümelenmesi riskini azaltır (Baker ve Wicker, 1996).

Hayvan yemi endüstrisinde selülozlar

Hayvan yemi endüstrisindeki selüloz ve hemiselüloz uygulamaları, hayvanların yem değerini ve performansını iyileştirme potansiyelleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Tarımsal silajın ve tahıl yeminin selülozlar veya ksilanazlarla ön işleme tabi tutulması, besin değerini iyileştirebilir. Enzimler aynı zamanda yem tanelerinde bulunan beslenme karşıtı faktörleri ortadan kaldırabilir, besin değerini iyileştirmek için belirli yem bileşenlerini bozabilir. Bu durumda, selülozlar, yem malzemelerindeki anti-beslenme faktörü olan selülozu etkin bir şekilde hidrolize ederek kolayca emilen bileşene dönüştürür, böylece hayvan sağlığını ve performansını iyileştirir (Sharada vd., 2014).

Arpa, yulaf gibi yem maddelerin üretimi ve bitkisel atıkların fazla miktarda ortaya çıkması sebebiyle *Bacillus* cinsine ait bakterilerden üretilen selüloz enzimleri, yüksek seviyede selüloz bulunduran yemlere eklendiğinde sindirimin artırılmasına katkı sağlamaktadır (Gado vd., 2007; Murad ve Azzaz, 2010).

Tarım endüstrisinde selülozlar

Selülozların, hemi-selülozların ve pektinazların farklı kombinasyonlarından oluşan çeşitli enzim preparatları, ekinlerin büyümesini arttırmak ve bitki hastalıklarını kontrol etmek için tarımda potansiyel uygulamalara sahiptir. Mikrobiyal hidrolazlar kullanılarak üretilen bitki veya mantar protoplastları, istenen özelliklere sahip hibrit suşlar üretmek için kullanılabilir. Bazı mantarlardan elde edilen selülozlar ve ilgili enzimler olarak fungal β -glukanazlar, bitki patojenlerinin hücre duvarlarını bozarak hastalıkları kontrol etme yeteneğine sahiptir (Kuhad vd., 2011). Selülitik mantarlar bitkinin hızlı büyümesini ve tohumun çimlenmesini kolaylaştırdığı için ekin verimini artırır (Bailey ve Lumsden, 1998).

Deterjan endüstrisinde selülaazlar

Selülaazlar deterjan endüstrilerinde de kullanım alanına sahiptir. Proteazlar, lipazlar, amilazlar, oksidazlar ve peroksidazlar dahil olmak üzere diğer enzimlerle birlikte deterjanlara dahil edilir (Gurkok ve Ozdal, 2021). Bu enzimler birlikte çalışarak kir içerisindeki farklı türde kimyasal bağların parçalanmasına yardımcı olur. Bu nedenle, deterjana toleranslı olmalarının yanı sıra, yüksek sıcaklıklarda (60 °C) ve yüksek pH'larda (pH 9.0-11.0) aktivitelerini korumaları tercih edilir (Dadwal vd., 2021). *Trichoderma harzianum*, *T. reesei* ve *T. viride*'den üretilen selülaazlar deterjan endüstrisinde yaygın olarak kullanılırlar. Bu enzimler alkali ortama uyum sağlamış ve termofilik özellik gösteren *Humicola* cinsi funguslardan üretilen selülaazlar da yıkama tozlarına eklenerek deterjan sanayisinde kullanıma uygundur (Sukumaran vd., 2005). Deterjanlara toleranslı çeşitli termostabil selülaazlar incelenmiştir. Termostabil selülaazlar, tekstil endüstrisinde kot pantolonların biyotaşlanması, pamuğun biyolojik olarak parlatılması ve diğer selülozik kumaşlar için kullanılan önemli enzimlerden biridir. Biyo-parlatma, 70 °C'den daha yüksek sıcaklıkta ve genellikle boyutlandırma adı verilen başka bir enzimatik işlemle sonra gerçekleştirilir. Bu nedenle, bu kadar yüksek sıcaklıklarda aktif olan selülaazlar, her iki işlemi birleştirmek için yararlı olacaktır (Dadwal vd., 2021). Selülaazlar kumaş onarımı, parlatma işlemi, yumuşaklık verme ve kumaş yüzeyindeki tüylü görüntüyü azaltma özellikleri ile deterjan sanayisinde kullanıma uygundur (Paulo ve Gubitz, 2003). Selülaazların deterjan endüstrisinde yüksek oranda kullanımı pamuksu kumaşlara zarar verebilir (Aehle, 2007). Bu nedenle amilaz, lipaz ve proteaz enzimleri ile karıştırılarak daha güçlü aktivite gösteren ve performansı artırılmış deterjanlar elde edilir (Singh vd., 2001).

Selülaaz üretimine etki eden faktörler

Selülaaz üretiminde fermentasyon yöntemi, karbon kaynağı, nitrojen kaynağı, pH, sıcaklık, tuz ve metal iyonları, inkübasyon süresi gibi çeşitli fermentasyon koşulları temel rol oynar (Ahmed ve Bibi, 2018).

Karbon kaynağı

Selülaazlar, fermentasyon ortamında bulunan farklı karbon kaynaklarına yanıt olarak hücreler tarafından eksprese edilen indüklenebilir enzimlerdir. Bu nedenle karbon kaynağı selülaaz üretimini etkileyen ana faktördür. Selülaaz üretimi için kullanılabilecek karbon kaynakları arasında laktoz, galaktoz, karboksimetil selüloz (CMC), nişasta, maltoz, fruktoz, sükroz bulunur (Rashid vd., 2009). Bu karbon kaynaklarından farklı olarak potansiyel bir etanol kaynağı olan pirinç samanı, Asya ülkelerinde düşük maliyetlerle selülaaz üretmek için

kullanılmıştır (Hideno vd., 2011). Bunun yanı sıra mısır sapı ve ahşap gibi karbon kaynakları da selülaz üretiminde kullanılabilir (Juhasz vd., 2005).

Azot Kaynağı

Protein salınımını etkileyen bir diğer önemli faktör de azottur. Selülaz üretimi için fermantasyon ortamına farklı azot kaynakları dahil edilebilir. Kullanılabilecek organik azot kaynakları arasında pepton, maya veya et özütü, tripton veya soya küspesi bulunur. Amonyum klorür, amonyum sülfat ve amonyum hidrojen fosfat şeklinde inorganik azot kaynakları da azot kaynağı olarak kullanılabilir (Ahmed vd., 2017).

pH ve sıcaklık

Selülazın sadece ürün değil, aynı zamanda selüloz hidrolizi için katalizör olduğu ve bu sürecin karmaşıklığı nedeniyle, pH ve ortamın sıcaklığı gibi ortam koşullarının kontrol edilmesi, sürecin optimum performansı için son derece önemlidir. pH bu süreçte önemli bir kontrol faktörüdür. Bununla birlikte, selülaz üretimi sırasında pH kontrolündeki en büyük zorluk, farklı selülaz bileşenlerinin sentezinin ve salgılanmasının, suşlara göre değişen farklı optimal pH aralıkları gerektirmesidir (Li vd., 2013).

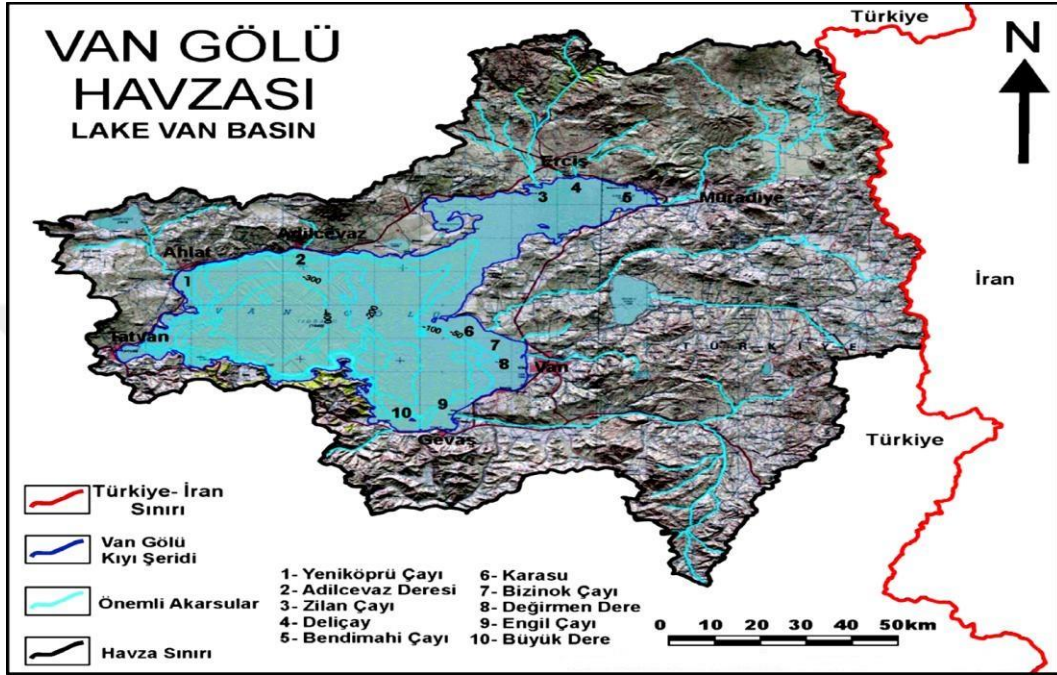
Alkalifilik bakteriler

Alkalifilik mikroorganizmalar veya alkalifiller terimi, genellikle pH 9 ve üzeri değerlerde iyi gelişen, sıklıkla 10-13 pH aralığında büyüyen mikroorganizmalara atıfta bulunur. Zorunlu alkalifiller, yalnızca pH 9 ve üzeri pH değerlerinde büyüyen alkalifiller için kullanılan bir terimdir, fakültatif alkalifiller ise zorlu alkali koşullar altında optimal olarak büyüyen ancak aynı zamanda nötr pH'a yakın değerlerde büyüeyebilen suşlardır. Aşırı alkalifillere olan ilgi, yararlı, kararlı enzimlerin kaynakları olmaları ve hücrelerin kendileri yüksek pH'ta biyoteknolojik ve diğer uygulamalar için kullanılabilmesi nedeniyle ortaya çıkar. Alkalifiller, ürettikleri doğal ürünler aracılığıyla sağladıkları büyük katkılar ve çeşitli ekolojik ortamlar üzerindeki etkileri nedeniyle çok daha fazla dikkat çekmiştir. İlginç bir şekilde, bazı zorunlu alkalifiller de dahil olmak üzere yüksek alkalifilik bakteriler, bahçe topraklarından veya diğer ekstremofilik olmayan ortamlardan da izole edilmiştir (Preiss vd., 2015).

Van Gölü

Van Gölü, alkali katyonlara ve alkali toprak iyonlarına ek olarak bikarbonat ve karbonat iyonlarının yük dengesini koruduğu gerçeğiyle tanımlanır. pH değeri 9,52 düzeyinde farklı bir soda kimyası sergileyen, tuz konsantrasyonu ise %0,224 olan tuzlu bir göldür (Çiftçi vd., 2008). Bu göl aynı zamanda Şekil 3'de gösterildiği gibi farkı akarsulara da bağlıdır ve dünyadaki en

büyük soda gölüdür ve erken okyanusun olası yüksek alkali kimyasının bir modeli olarak görülmektedir. Soda gölleri büyük tuzluluk ve pH aralıkları gösterir; ancak özellikle yüksek tuz içeriği ve alkaliniteleri 10^{-2} mol/L'nin üzerinde olan kapalı göllerde pH derecesi 10'un üzerindeki değerlere yükselebilir (Reimer vd., 2009). Bu göller önemli sayıda mikrobiyal topluluğa ev sahipliği yapar ve mikrobiyal çeşitlilikleri üzerine yapılan çalışmalar, ekstrem ortamların biyolojisinin anlaşılmasına da yardımcı olur (Poyraz ve Mutlu, 2017).



Şekil 3. Van Gölü havza sınırları ve bağlantılı akarsular (Köse vd., 2005)

Bacillus ve *B. pumilus*

Bacillaceae familyası üyesi olan *Bacillus*, hücreleri genellikle düz ya da hafif eğimli, çomak şeklinde ve birçok zorlu çevresel koşula karşı dirençli türler içeren bir cinstir (Turnbull, 1996). Endospor oluşturma yeteneğine sahip olan bu bakteriler, hareketsiz olarak yıllarca kalabilir. *Bacillus* üyeleri Gram-pozitif özellik gösterir, peritrik kamçılara sahip olabilir ve hem aerobik hem de fakültatif anaerobik koşullarda yaşayabilirler. Toksin, enzim, antibiyotik üretme özellikleri nedeniyle fazla tercih edilirler. Koloni morfolojisi ve büyüklüğü türler arasında ve tür içinde çok değişkendir. Tek başlarına, ikili veya gruplar halinde gelişebilirler, çoğunlukla beyaz ya da krem renkli kolonilere sahiplerdir (Zemek vd., 1981). Birçok mikroorganizma gibi, *Bacillus* türleri de toprakta önemli bir yaşam alanına sahiptir. Özellikle toprağın ilk 10 cm'lik üst tabakasında yoğun bir şekilde bulunurlar (Ediz ve Beyatlı, 2005). Bu bakterilerin ürettiği amilaz ve selülaz enzimleri deterjan sanayisinde, bazı amilazlar gıda endüstrisinde meyve suyu sanayisinde, nötral proteazlar ise yine gıda endüstrisinde süt sanayisinde kullanılır (Rosovitz vd., 1998).

B. pumilus, *Bacillus* cinsinin en çok çalışılan türlerinden biridir (Gutierrez-Manero vd., 2001). Deniz suyu, derin deniz çökeltileri ve toprak gibi çeşitli ortamlarda yaygın olarak ortaya çıkan spor oluşturan bir bakteridir (Pudova vd., 2022; Yakovleva vd., 2022; Zhang vd., 2022). Bu tür, örneğin düşük besin olan ortamlarda ya da besin olmayan ortamlarda, kuraklık, UV radyasyonu, kimyasal dezenfektanlar veya oksitleyici enzimler gibi çevresel streslere karşı önemli bir direnç gösterir (Nicholson vd., 2000). Daha önce *B. pumilus*, *B. subtilis* grubuna dahildi. Şu anda *B. pumilus*, *B. altitudinis*, *B. australimaris*, *B. safensis*, *B. xiamenensis* ve *B. zhangzhouensis*'i de içeren *B. pumilus* grubuna aittir (Chen vd., 2016; Dobrzyński vd., 2022). *B. pumilus* biyokontrol açısından da kullanışlıdır. Örneğin; mantar fitopatojenlerinin baskılanmasında rol oynayan çok sayıda lipopeptit ve enzim üretebilir. Bu durum türün ticarileştirilmesi konusunda büyük bir öneme sahip sahiptir (Jeong vd., 2014). *B. pumilus* genellikle toprak bakterisi olarak bilinir. Bazı sebze ve meyvelerde çürüklük oluşturan bir patojendir (Dadasoglu, 2016). Bunun yanı sıra, kateterle ilişkili olarak endokardit, bakteriyemi ve önemli ölçüde hematolojik kanserli hastalarda dolaşım yolu enfeksiyonlarının nedeni olarak da belirlenmiştir (Ozkocaman, 2006).

Selülaaz enzimiyle yapılan çalışmalar

Selülaaz enzimiyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Mikrobiyal selülaazlar üzerine yapılan temel ve uygulamalı araştırmalar, sadece önemli bilimsel bilgi üretmekle kalmamış, aynı zamanda biyoteknolojideki muazzam potansiyellerini de ortaya çıkarmıştır. Dünyada en bol ve yenilenebilir enerji kaynağı olan selülozu glikoz ve çözünür şekerlere dönüştürme potansiyelleri nedeniyle selülaazlar üzerine aktif araştırmalar çok eskilere dayanmaktadır. Son yıllarda ise daha güncel kullanım alanlarına yönelik çalışmaların sayısı oldukça artmıştır. Örneğin, selülaazlar, kumaşların kalitesini artırmak için selülozik lifleri kontrollü ve istenen bir şekilde modifiye etme yetenekleri nedeniyle tekstil ve deterjan sektöründe dünya çapında başarı elde etmişlerdir. Gerçekleştirilen bir çalışmada, deterjan sanayisinde selülaaz enziminin kir uzaklaştırma özelliğinin belirlenmesi için *Bacillus sp.* KSM-635 suşundan alkali selülaaz elde edilmiş ve pamuklu kumaşlardan kirleri uzaklaştırma potansiyeli çalışılmıştır (Hoshino vd., 2000).

Pek çok çalışmada da selülaaz üretim verimini ve hızını artırmak, maliyeti düşürmek gibi nedenlerle farklı koşullarda ve farklı mikrobiyal kaynaklarla selülaaz üretimi ve optimizasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. *Cellulomonas biazotea* bakterisinden, çeşitli selülozik substratlar içeren ortamlarda selülaaz üretimini inceleyen bir çalışmada, en yüksek β -glikozidaz üretimi, sellobiyoz ve kallar otu (*Diplachne fusca*) içeren ortamlarda elde edilmiştir (Rajoka ve Malik, 1997). Selülaaz üreticisi olan *Bacillus sp.* JCM 9141 ve JCM 9156 suşları tatlı patates

sakkarifikasyon işlemi için aynı besiyerinde üretilerek multi enzim uygulaması tespit edilmiştir (Zhang vd., 2004). Pirinç kabuğunu kullanarak, *Bacillus amyloliquefaciens* bakterisinden karboksimetil selüloz (CMCaz) enzimi elde etmek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Araştırmacılar, bu kültürde CMCaz üretimi için en uygun büyüme koşullarının 37 °C sıcaklık ve pH 6,8 olduğunu tespit etmişlerdir (Jo vd., 2008). *Bacillus* sp. tarafından üretilen selüloz enzimi için en iyi karbon kaynağının şeker kamışının kuru poasası olduğunu belirlemişlerdir (Sadhu vd., 2013a). *B. amyloliquefaciens* DL-3 ve *B. halodurans* CAS 1'in selüloz üretimi için en iyi sonuç veren karbon kaynakları pirinç kepeği ve pirinç kabuğu olarak belirlenmiştir (Jo vd., 2008; Annamalai vd., 2013).

Topraktan izole edilmiş olan *B. subtilis*'den selüloz üretimi için üretim ortamında bulunan glukozu çıkartıp karbon kaynağı olarak nişasta, sükroz, maltoz, fruktoz eklenerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda en iyi karbon kaynağının glukoz olduğu belirlenmiştir. Selüloz üretim ortamına azot kaynağı olarak amonyum sülfat, pepton, maya özütü ve üre eklenmesi sonucunda amonyum sülfatın diğerlerinden daha iyi azot kaynağı olduğu belirlenmiştir (Sethi vd., 2013).

Selüloz enzimleriyle gerçekleştirilen çalışmaların büyük bir kısmında hem araştırma hem de endüstriyel uygulamalarda enzimin fonksiyonunu anlamak, katalizlediği reaksiyonu ve prosesi optimize etmek ve yine maliyeti düşürmek amacıyla enzim karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. *B. shaericus* bakterisinden elde edilen alkalın karboksimetil selüloz (CMCaz) enziminin karakterizasyonunda SDS-PAGE analizi sonucu 42 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen enzimin optimum sıcaklığı 60 °C olup, optimum pH'sı 8,0 olarak belirlenmiştir. Enzimin 1 mM konsantrasyondaki metal iyonlarından K^+ , Co^{+2} ve Na^+ varlığında aktive olduğu, Fe^{+2} ve Hg^{+2} varlığında ise inhibe olduğu tespit edilmiştir (Singh vd., 2004). *Bacillus* sp. HSH-810 suşundan üretilen alkalın selüloz enziminin moleküler ağırlığı 80 kDa olarak belirtilmiş, optimum sıcaklığı 50 °C olup, 60 °C'de 1 saat muamele edilmesi sonucu enzim aktivitesinin %60'lık bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, enzimin optimum pH'sı 10 olup, pH 6-10 aralığında stabilitesini koruduğu belirlenmiştir (Kim vd., 2005).

Çalışmalar selüloolitik bakterilerin, selüloz bakımından zengin materyallerin bulunduğu çok çeşitli habitatlardan izole edilebileceğini de göstermiştir. Yapılan çalışmalarda hayvan sindirim kanallarından (Pandiarajan ve Revathy, 2020), çürüyen organik maddelerden (Ma vd., 2020) ve tarım atıklarından (Pangsri vd., 2021), otçul hayvan gübrelerinden (Croos vd., 2019), sedimentlerden (Pramono vd., 2021), topraktan (Zhang vd., 2023), göl (Yousef ve Mawad, 2023) ve deniz gibi (Tsudome vd., 2023) sucül çevrelerden selüloolitik bakterilerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bir çalışmada da kitap arşivinden *Penicillium* sp. ve *Chaetomium* sp.,

kitaplardan *Aspergillus nidulans* ve *A. niger* fungusları izole edilmiştir. İzole edilen 4 fungus da selüloz üretmiştir. *Chaetomium sp.* en fazla selüloz üretimini yaptığı için çalışmada kullanılmıştır. En yüksek selüloz aktivitesinin 144. saatte olduğu belirtilmiştir (Al-Kharousi vd., 2015). Bir başka çalışmada kağıt endüstrisi atık su topraklarından 4 adet bakteri izole edilmiştir. Bu 4 bakteride 37°C sıcaklıkta 48-72 saat inkübe edildiğinde tamamının selüloz pozitif olduğu belirlenmiştir (Reddy vd., 2018).



MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler; karboksimetil selüloz (CMC), CH_3COOH (asetik asit), CH_3OH (metanol), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (yedi sulu magnezyum sülfat), agar, maya ekstraktı, pepton (meat), NaCl (sodyum klorür), K_2HPO_4 (dipotasyum fosfat), CaCl_2 (kalsiyum klorid), Na/K Tartarat, NaOH (sodyum hidroksit), 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (amonyum sülfat), $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ (gliserol), $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ (glisin), tris, HCl (hidroklorik asit), KOH (potasyum hidroksit), H_2O_2 (hidrojen peroksit), gliseril tribütirat, fenol kırmızısı, tripton, $\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$ (üre), NH_4NO_3 (amonyum nitrat), $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ (β -merkaptetoetanol), NH_4Cl (amonyum klorür), NaNO_3 (sodyum nitrat), KNO_3 (potasyum nitrat), $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (laktoz), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (fruktoz), $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ (nişasta), $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (sukroz), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (glukoz), $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ (seluloz), BSA, SDS, TEMED, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$ (akrilamit), Comassie Brilliant Blue G-250, orto-fosforik asit, bis-akrilamit, kağıt, distile su ve kongo kırmızısıdır. Kullanılan kimyasal maddeler Merck, Sigma-Aldrich, Carlo Erba ve Biorad firmalarından temin edilmiştir.

Kullanılan cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar; vorteks (Heidolph Reax Top), pH Metre (InoLab pH730 wtw Series), steril kabin (Esco AC2-4E1), inkübatör (Binder BD53), otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L), soğutmalı masaüstü santrifüj (Zentrifugen D-78532), buzdolabı (Siemens KS 42431), derin dondurucu (-20°C) (Arçelik), mikroskop (Olympus Europa SE & CO. KG), su banyosu (Grant Instrument Limited, Barrington), spektrofotometre (UV mini-1240 UV-VIS Shimadzu), manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A), distile su cihazı (GFL 2004), hassas terazi (Enver), santrifüj (Hereus Christ Hereus Christ UJ II), Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell ve etüv (Elektro-mag) şeklindedir.

Kullanılan tampon ve çözeltiler

Glisin-NaOH (50 mM): 1 L distile su içerisinde 0,35 g NaOH ve 3,75 g çözüldü ve hazırlandı. Enzim aktivitesinin pH 8,5-10,5 arasındaki değişimini hesaplamak için kullanıldı.

Tris-HCl (50 mM): 1 L distile su içerisinde 6,06 g tris ve 1,06 g HCl çözünerek hazırlandı. Enzim aktivitesinin pH 7,2-8 arasındaki değişimini hesaplamak için kullanıldı.

DNS solüsyonu: DNS ayırıcı iki çözeltinin karıştırılmasıyla hazırlandı. Birinci çözelti 20 mL 2 N NaOH içerisinde 1 g DNS çözülerek ve ikinci çözelti olarak 30 g Na-K-Tartarat 50 mL saf suda çözülerek hazırlandıktan sonra iki çözelti karıştırılıp saf su ile final hacmi 100 mL'ye getirildi. Enzim reaksiyonunu durdurmak ve enzimin aktivitesini nicel olarak belirlemek amacıyla kullanıldı.

Congo Red (Kongo Kırmızısı, %0,1): 100 mL distile su içerisinde 0,1 g Kongo kırmızısı çözüldü ve hazırlandı. Katı besiyerinde selülag aktivitesini belirlemek, besiyerini boyama ve zon oluşumunu izlemek amacıyla kullanıldı.

Substrat solüsyonu: 50 mM Glisin-NaOH tamponunda taze hazırlanmış %1'lik CMC çözeltisi substrat olarak kullanılmak üzere hazırlandı. Karboksimetil selülag (endo- β -1-4-glukanaz) aktivitesi için substrat olarak kullanıldı.

***p*-Nitrofenyl- β -D-cellobioside (pNPC):** 50 mM Glisin-NaOH tamponunda 5 mM konsantrasyonda *p*-nitrofenol- β -D-cellobioside çözeltisi hazırlandı. Ekzo- β -1-4 glukanaz aktivitesi için substrat olarak kullanıldı.

***p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG):** 50 mM Glisin-NaOH tamponunda 5 mM konsantrasyonda *p*-nitrofenyl- β -D-glukopiranoside çözeltisi hazırlandı. β -glukanaz aktivitesi için substrat olarak kullanıldı.

Gliserol stok solüsyonu (%20): Önce 40 mL NB steril edildi sonrasında 10 mL gliserol steril edilerek karıştırıldı ve ependorf tüplerine aktarıldı. Bakterileri -20 °C'de muhafaza etmek amacıyla kullanıldı.

Sodyum klorür çözeltisi (NaCl, 1 M): Katı besiyerinde selülag aktivitesini belirleyebilmek amacıyla kullanılan Kongo kırmızısı boyasını besiyerinden uzaklaştırmak için yıkama işleminde kullanıldı. Son hacmi 1 L'ye tamamlanacak şekilde 58,5 g NaCl saf suda çözüldü.

Sodyum hidroksit çözeltisi (NaOH, 2 N): Kuvvetli baz olup, besiyerinde pH değerini ayarlamak amacıyla kullanıldı. 80 mL distile su içerisinde 8,01 g NaOH çözüldürüldükten sonra final hacmi 100 mL'ye getirildi.

Hidroklorik asit çözeltisi (HCl, 2 N): 80 mL distile su içersine %37 konsantrasyondaki HCl'den 17,56 mL eklendi ve final hacmi distile suyla 100 mL'ye getirildi. Besiyerlerinde pH ayarlanması için kullanıldı.

Hidroklorik asit çözeltisi (HCl, 0,1 N): 99,172 mL distile su içersine %37 konsantrasyondaki HCl'den 0,828 mL eklenerek Bradford yöntemi için hazırlandı.

Potasyum hidroksit çözeltisi (KOH, %3): 3 g KOH 80 mL distile su içerisinde çözündürüldü ve final hacmi 100 mL'ye getirildi. Bakterilerin Gram özelliklerinin tespiti için kullanıldı.

Hidrojen peroksit (H₂O₂, %3): Bakterilerin katalaz enzimi üretme özelliklerini belirlemek için kullanıldı. 3 mL H₂O₂ 100 mL distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

5X Bradford reaktifi: 50 mg Comassie Brilliant Blue G-250, 25 mL %96 etanol ve 50 mL %85 orto-fosforik asit karıştırılarak son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

SDS-PAGE solüsyonları

Yığma Jel Tamponu: 160 mL saf suda 10,2 g tris ile 0,8 g SDS çözöldü, pH'sı 6,7'ye HCl kullanılarak ayarlandı. Final hacmi 200 mL'ye getirildi. 4 °C'de saklandı.

Ayırıcı Jel Tamponu: 160 mL saf suda 37 g tris ile 0,8 g SDS çözöldü. pH'sı 7'ye HCl kullanılarak ayarlandı. Final hacmi 200 mL'ye getirildi. 4 °C'de saklandı.

Amonyum persölfat (%25): 1 mL distile su içerisinde 0,25 g amonyum persölfat (APS) çözölerek hazırlandı.

Yürütme tamponu (10x): 450 mL saf suda 5 g SDS, 72 g glisin ve 15 g tris karıştırılarak çözöldü. pH'sı 8,3'e HCl ile ayarlandı. Final hacmi 500 mL'ye tamamlanarak 4 °C'de muhafaza edildi.

Coomassie Brilliant Blue R-250: Son hacim saf suyla 1 L'ye tamamlanacak şekilde 450 mL metanolde Coomassie Brilliant Blue R-250'dan 2,5 g dikkatlice alınarak çözöldü. Çözöldükten sonra üzerine 70 mL asetik asit eklenerek. Hazırlanan boya karanlık şişede oda sıcaklığında saklandı.

Örnek yükleme tamponu (4x): 2 mL gliserol, 2 mL tris-HCl (1 M, pH 7), 4 mL %20 SDS ve bromofenol blue boyasından bir miktar karıştırılarak son konsantrasyonu %20 olacak şekilde hazırlandı. Kullanmadan hemen önce merkaptotanol eklendi.

Boya uzaklaştırma solüsyonu: Son hacmi suyla 1 L'ye tamamlanacak şekilde 75 mL asetik asit ve 250 mL metanol karıştırıldı. Hazırlandıktan sonra karanlık şişede oda sıcaklığında saklandı.

Kullanılan besiyerleri

Nutrient Agar (NA): Bakterilerin izolasyonu, canlandırılması, kısa süreliğine muhafaza edilmesi ve çoğaltılması amacıyla kullanıldı. 20 g NA hacmi 1 L'ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi. Besiyeri 1,5 atmosfer basınçta 121 °C olacak şekilde 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi. Daha sonra besiyeri soğuduğunda steril şekildeki petri kaplarına aktararak kullanıma hazır hale getirildi.

Nutrient Broth (NB): Sıvı besiyeri olarak kullanıldı. Ek olarak gliserol stoklarının hazırlanmasında kullanıldı. 8 g NB tartılarak son hacmi 1 L'ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi. Sonrasında 50 mL olacak şekilde erlenlere aktarıldı. Daha sonra 1,5 atmosfer basınçta 121 °C olacak şekilde 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

Karboksimetil selüloz - agar (CMC-A): Saf kültürlerin selüloz aktivitesine sahip olup olmadıklarını selüloolitik zon oluşturma esasına göre incelemek için kullanıldı. NA besiyerine %1 CMC eklenerek hazırlandı ve pH'sı 9'a ayarlandı. 1,5 atmosfer basınçta 121 °C olacak şekilde 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi. Daha sonra besiyeri soğuduğunda steril şekildeki petri kaplarına aktararak kullanıma hazır hale getirildi.

Karboksimetil selüloz - Broth (CMC-B): Sıvı selüloz üretim ortamı olarak kullanıldı. Son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanacak şekilde 10 g CMC, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g NaCl, 10 g pepton, 2 g maya özütü, 1 g K_2HPO_4 ve 0,1 g $CaCl_2$ tartılarak karıştırıldı, pH 9'a ayarlandı. Erlenlere 100'er mL aktarılıp, 1,5 atmosfer basınçta 121 °C olacak şekilde 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi.

Tribütirin agar (TBA): Bakteri izolatlarının lipaz aktivitesini belirlemek amacıyla kullanıldı. Son hacmi saf su ile 1 L'ye tamamlanacak şekilde 5,0 g pepton, 3,0 g maya özütü, 10,0 mL tributirin ve 20,0 g agar karıştırıldı. 1,5 atmosfer basınçta 121 °C olacak şekilde 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi. Daha sonra besiyeri soğuduğunda steril şekildeki petri kaplarına aktarıldı.

Üreli NA besiyeri: İzolatların üreyi hidroliz edebilme yeteneğini tespit etmek amacıyla kullanıldı. Son hacmi saf su ile 2 L'ye tamamlanacak şekilde 0,024 g fenol kırmızısı ve 40 g NA karıştırıldı. 1,5 atmosfer basınçta 121 °C olacak şekilde 15 dk otoklavlanarak sterilize edildi. Besiyeri soğutulduktan sonra içerisine %40'luk 40 mL üre filtreden geçirildikten sonra eklenip ve petri kaplarına aktarıldı.

Yumuşak agar besiyeri: İzolatların hareket yeteneklerini belirlemek için kullanıldı. 0,5 g NA 50 mL saf su içerisine eklenerek deney tüplerine aktarıldıktan sonra 1,5 atmosfer basınçta 15 dk 121 °C olacak şekilde otoklavlanarak sterilize edildi.

Skim-milk agar (SMA): Kolonilerin etrafında oluşan proteolitik zon tayini ile izolatların ekstraselüler proteaz üretimlerinin kontrolünde yağsız süt tozu içeren agar kullanıldı. %1'lik yağsız süt tozu NA içerisine eklenerek 1,5 atmosfer basınçta 121 °C olacak şekilde otoklavlanarak 15 dk sterilize edildi ve petri kaplarına aktarıldı.

Yöntem

Örneklerin toplanması ve izolatların eldesi

Van Gölü'nün 5 farklı lokasyonundan (38.520374, 43.314816; 38.309119, 43.040275; 38.560118, 43.282007; 38.427571, 43.258307; 38.422899, 43.285634) 3'er tane su örneği steril falkon tüplere alındı. Örneklerden doğrudan ve serum fizyolojik içinde çeşitli oranlarda seyreltilerek NA içeren petri kaplarına yayma ekim yapıldı. 30 °C'de inkübe edilen agar üzerinde gelişmiş kültürden, tek koloni ekimleri yapılarak saf şekilde kültürler oluşturularak gliserol stokları hazırlandı. Gliserol stokları -80 °C'de saklandı.

Selüloz üreten izolatların seçimi

Kalitatif selüloz aktivite tayini

Selüloz aktivitesine sahip izolatları belirlemek amacıyla saf kültürlerin CMC-A besiyerine inokülasyonları yapıldı ve 30 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında zon oluşumunu gözlemlemek için kolonilerin üzerine %0,1'lik Kongo kırmızısı döküldü ve 15 dk bekletilerek boyandı. Daha sonra boya uzaklaştırılarak 1 M NaCl çözeltisi ile 30 dk yıkama işlemi gerçekleştirildi. İzolatların etraflarında oluşturduğu selüloolitik zonların çapları ölçülerek en geniş zon oluşturanlar belirlendi (Gohel vd., 2014).

Kantitatif selüloz aktivite tayinleri

Selülozun parçalanması için multi enzim şeklinde sinejistik çalışan karboksimetil selüloz, ekzo- β -1-4 glukanaz ve β -1-4 glukanaz aktivitelerinin tayinleri farklı substratlar kullanılarak gerçekleştirildi.

CMC-A üzerinde en geniş selüloolitik zon oluşumu gösteren izolatlar seçilerek 100 mL CMC-B içeren 250 mL'lik erlen mayerlerde, 30 °C'de, 180 rpm'de, 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde ölçümü yapılacak şekilde inkübasyona kaldırıldı. Inkübasyon sonunda kültürlerden 2 mL alınarak eppendorf tüplerine konuldu. 6000 rpm ve 4 °C'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant kısmı hücre içeriğinden ayrılarak ham enzim olarak kullanılmak üzere hazırlandı. Substrat solüsyonu kullanılmadan önce 35 °C'lik su banyosunda 5 dk ısıtılarak hazırlandı. 0,5 mL substrat solüsyonu ve 0,5 mL ham enzim karıştırılarak homojen hale getirildi ve 35 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 30 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda reaksiyon

karişımına 1 mL DNS ayırıcı eklendi, 5 dk kaynar suda kaynatıldı ve reaksiyon durduruldu. Kaynatılan örnekler oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğutulan örneklerin absorbansları spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçüldü (Miller, 1959), glukoz standart grafiğine göre karboksimetil selülaz aktivite hesaplamaları yapıldı. Deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

Ekzo- β -1-4 glukanaaz aktivite tayini için 100 μ l ham enzim ve 900 μ l pNPC substrat solüsyonu kariştirılarak 35 °C'de 30 dk inkübe edildi. 100 μ l Na₂CO₃ eklenerek reaksiyon durduruldu. 410 nm de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak ham enzim yerine 100 μ l 50 mM glisin-NaOH tamponu konuldu. *p*-Nitrofenol standart grafiğine göre ekzo- β -1-4 glukanaaz aktivite hesaplamaları yapıldı. Deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

β -1-4 glukanaaz aktivitesi için 100 μ l ham enzim ve 900 μ l pNPG substrat solüsyonu kariştirılarak 35 °C'de 30 dk inkübe edildi. 100 μ l Na₂CO₃ eklenerek reaksiyon durduruldu. 410 nm de absorbansları ölçüldü. Kontrol olarak ham enzim yerine 100 μ l 50 mM glisin-NaOH tamponu konuldu. *p*-Nitrofenol standart grafiğine göre β -1-4 glukanaaz aktivite hesaplamaları yapıldı. Deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

Selülaz mikrobiyal gelişim tayinleri

İnkübasyon süresi optimizasyonunda kullanılması amacıyla bakteri gelişiminin takibi için 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde kültürlerden 2 mL alınarak eppendorf tüplerine konuldu. 6000 rpm ve 4 °C'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet kısmı 2 mL distile su içerisinde vorteks ile homojen hale getirdikten sonra absorbansları spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçüldü. Distile su ile gerekli dilüsyonlar yapıldı. Deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

Glukoz standart grafiğinin hazırlanması

Karboksimetil selülaz (endoglukanaz) enzim reaksiyonu sonucu açığa çıkan glukoz miktarı, farklı konsantrasyondaki saf glukozla hazırlanan standart glukoz eğrisi ile hesaplandı (Ek 1'de verilmiştir). Bir ünite selülaz enzimi aktivitesi (1 U), test koşulları altında 1 dakikada 1 μ mol glukoz üreten enzim miktarı şeklinde değerlendirildi. Aşağıdaki formül ile selülaz aktiviteleri hesaplandı. Deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

Selülaz aktivitesi (U/mL) = [Üretilen glukoz miktarı (μ mol) x Toplam reaksiyon hacmi (mL) / Enzim hacmi (mL) x İnkübasyon süresi (dakika)] x Seyreltme faktörü

p-Nitrofenol standart grafiğinin hazırlanması

Ekzo-β-1-4 glukanaaz ve β-1-4 glukanaaz reaksiyonları sonucu açığa çıkan p-nitrofenol miktarı, farklı konsantrasyondaki saf p-nitrofenolle hazırlanan standart p-nitrofenol eğrisi ile hesaplandı (Ek 2’de verilmiştir). Bir ünite ekzo-β-1-4 glukanaaz ve β-1-4 glukanaaz enzimi aktiviteleri (1 U), test koşulları altında 1 dakikada 1 µmol p-nitrofenol açığa çıkaran enzim miktarı şeklinde değerlendirildi. Aşağıdaki formül ile aktiviteleri hesaplandı. Deneyler üç tekrar şeklinde gerçekleştirildi.

Enzim (Ekzo-β-1-4 glukanaaz veya β-1-4 glukanaaz) aktivitesi (U/mL) = [Üretilen p-nitrofenol miktarı (µmol) x Toplam reaksiyon hacmi (mL) / Enzim hacmi (mL) x İnkübasyon süresi (dakika)] x Seyreltme faktörü

Bakterilerin klasik ve moleküler yöntemlerle tanılanması

Klasik yöntemlerle bakterilerin tanılanması

Kalitatif ve kantitatif selüloz aktivite tayinlerine göre en yüksek selüloz aktivitesi gösteren bakteri izolatı seçildi, klasik yöntemlerle; morfolojik (koloni rengi ve şekli, hücre şekli, Gram boyama, KOH) ve biyokimyasal (oksidaz, amilaz, proteaz, hemoliz, H₂O₂ katalaz, üreaz, lipaz, asparaginaz, glutaminaz, maltoz vb.) özellikleri tespit edildi.

Koloni morfolojisi: Bakterilerin kolonilerinin renk ve şeklini belirlemek için NA besiyerindeki izolatlarının oluşturdukları koloniler incelenerek değerlendirildi.

Hareket testi: Bakteri izolatından iğne öze ile yarı katı (5 g/L agar) NA besiyerine ekim yapıldı. 30 °C etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Besiyerinin üzerindeki yayılımına göre hareket özelliği değerlendirildi.

Oksidaz testi: Oksidaz enziminin (sitokrom C oksidaz) varlığını belirlemek için gerçekleştirildi. Oksidaz test çubukları kullanıldı. Çubuğa 100 µL sıvı besiyerinden damlatılarak 10 saniyelik sürede kırmızı-mor bir renk oluşması durumunda oksidaz pozitif olarak değerlendirildi.

KOH testi: Bakteri hücre duvarının kimyasındaki farklılıkları kullanarak Gram reaksiyonunu belirlemede kullanıldı. İzolatdan bir öze alınıp lamın üzerine yayıldıktan sonra 1 mL %3’ lük KOH çözeltisinden bakterinin üzerine eklendi, öze yardımıyla karışması sağlandı. Öze yukarı kaldırılarak izolatın öze ile lam arasındaki sünme (uzama) oluşumuna göre Gram-negatif ve Gram-pozitif olacak şekilde değerlendirdi.

Hemoliz testi: Hemolitik aktivite varlığını belirlemek için kullanıldı. %5 koyun kanı içeren kanlı agar üzerine ekilerek izolatlar 30 °C etüvde 24-72 saat inkübasyona kaldırıldı. İzolatların çevresinde şeffaf zon oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

Katalaz testi: Katalaz enzimi üretme özelliğini belirlemek için kullanıldı. 24 saat önce ekimi yapılan bakterilerden öze yardımıyla alınarak lamın üzerine koyuldu. %3'lük H₂O₂ çözeltisinden lam üzerine 1 mL eklendi. Köpük oluşturma esasına göre değerlendirildi. İzolatlar köpük gözlenmesi durumunda pozitif, köpük gözlenmemesi durumunda ise negatif olacak şekilde değerlendirildi.

Amilaz testi: Amilaz enzimi üretebilme özelliğini belirlemek için kullanıldı. %1 çözülebilir nişasta içermekte olan NA besiyerine bakteri izolatları ekilerek 30 °C etüvde 24-72 saat inkübe edildi. Sonrasında besiyerine lügol eklenerek izolatın oluşturduğu şeffaf zona göre pozitif olarak değerlendirildi.

Proteaz testi: İzolatların proteaz enzimi üretebilme özelliklerinin belirlenmesi için kullanıldı. SMA besiyerine ekim yapıldıktan sonra 30 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. İzolatın oluşturduğu şeffaf zona göre pozitif olarak değerlendirildi.

Lipaz testi: %1 tributirin eklenerek hazırlanan TBA besiyerine ekim yapıldıktan sonra 30 °C'de 24-72 saat inkübe edildi. Lipaz enzimi üretebilme özelliği izolatın oluşturduğu şeffaf zona göre pozitif olarak değerlendirildi.

Asparaginaz, glutaminaz ve üreaz testi: %1 oranında sırasıyla L-asparajin, L-glutamin ve üre bulunduran NA besiyerine (% 0,02 fenol kırmızısı içeren) ekim yapılarak 30 °C'lik etüvde 24-72 saat inkübe edildi ve asparaginaz, glutaminaz ve üreaz aktiviteleri belirlendi. Besiyeri renginin sarıdan mor-pembe renge dönmesi pozitif olarak değerlendirildi.

Karbonhidrat fermantasyon testleri: Bakterilerin belirli bir karbonhidratı fermente etme yeteneğini değerlendirmek ve bakterileri karbonhidrat fermantasyon modellerine göre ayırt etmek ve tanımlamak için kullanılan biyokimyasal testtir. Kullanılan ortam aşağıdaki bileşime sahipti: 2 g/L pepton, 0.5 g/L NaCl ve %1 oranında D-xyloze, L-arabinose, myo-inositol ve maltoz ilave edildi (pH 6,8). İndikatör boya olarak bromotimol mavisi kullanıldı. Bakteriler bir şekeri veya şeker türevini fermente edebilirse, asit üretir ve bu da pH'yı düşürerek bromotimol mavisinin rengini mordan sarıya değiştirir. Bu durumda pozitif olarak değerlendirilir.

Moleküler tanılama (rDNA sekanslama)

Seçilen izolatin 16S rDNA analizleri ile moleküler karakterizasyonları hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti DNA izolasyonu için kullanılmıştır. İzole edilen DNA'lar saflık kontrolü ve miktar analizi yapılması için spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonraki basamakta evrensel primer olan 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') ve 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT) primerleri kullanılarak yaklaşık 1470 bazlık bölgeyi çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. PCR master mix hazırlanışı

Bileşen	Reaksiyon konsantrasyon
PCR Buffer	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP mix	0,2 mM
F. primer	0,3 µM
R. primer	0,3 µM
Taq DNA Polymerase	2 U
DNA template	3 µM
PCR grade su ile 35 µl'ye tamamlanır	

Hazırlanan örnekler PCR işlemi ile aşağıdaki döngüye tabi tutuldu.

- 1) 5 dakika 95 °C
- 2) 30 döngü olacak şekilde sırasıyla,
 - a. 45 saniye 95 °C
 - b. 45 saniye 57 °C
 - c. 1 dakika 72 °C'de
- 3) 5 dakika 72 °C tamamlanmıştır.

Sıcaklık 4 °C'ye düşürülüp PCR tamamlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar 1x TAE tampon ile hazırlanan %1,5 agaroz jelde 100 volt akımda 90 dakika elektroforezde yürütülerek UV ışığında görüntüsü alınmıştır. PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılmıştır. Sanger Dizileme örnekleri için ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle

Dizileme Kiti kullanıldı (Applied Biosystems, Foster City, CA). 27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak amacıyla kontig haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

Firmadan yukarıdaki işlemler sonucu elde edilen sekanslar National Center for Biotechnology Information (NCBI) bilgi bankasının programı olan Blast Search kullanılıp mevcut verilerle karşılaştırılıp, benzerlikler tespit edildi ve GenBank numarası alındı.

Filogenetik ağacının inşası hizalama (allignment) ve filogeni programlarını harmanlayarak kullanıma sunan hazır Phylogeny.fr platformu ile gerçekleştirilmiştir (<https://www.phylogeny.fr/phylogeny.cgi>). Çoklu sekans hizlaması (multible sequence allignment) için NCBI MSA Viewer 1.25.0 programı kullanılmıştır. Phylogeny.fr platformunda ağaç inşası maksimum olabilirlik (maximum-likelihood) varsayılan (default) seçeneği ile gerçekleştirilmiştir (Kuhner ve Felsenstein, 1994).

Selülaaz üretim koşullarının optimizasyonu

Kalitatif ve kantitatif aktivite tayinlerine göre en yüksek selülaaz aktivitesi gösteren izolatın selülaaz üretim koşullarını optimize etmek amacıyla üretim besiyerinde farklı azot ve karbon kaynakları kullanıldı. Daha sonra belirlenen en iyi kaynakların optimum konsantrasyonları tayin edildi. Ayrıca üretim ortamının başlangıç pH'sı ve inkübasyon sıcaklığı optimize edildi.

Azot kaynaklarının selülaaz üretimi ve bakteri gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı azot kaynaklarının seçilen en iyi selülaolitik izolatın selülaaz üretimine etkisinin araştırılması için CMC-B içeriğinde kullanılan toplam 12 g/L azot kaynağı çıkartılarak yerine %1,2 olacak şekilde pepton, tripton, maya özütü, üre, NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 veya NH_4Cl besiyerlerine ayrı ayrı eklendi. Ek olarak kontrol için CMC-B ve azot kaynağı içermeyen boş besiyeri kullanıldı. Hazırlanan ortamlar 250 mL'lik Erlen mayerlerde 96 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda standart selülaaz üretimi ve mikrobiyal gelişim tayinleri gerçekleştirildi.

Azot kaynağının farklı konsantrasyonlarının selülag üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Azot kaynağının farklı konsantrasyonlarının selülag üretimine etkisinin araştırılması için CMC-B besiyeri içeriğinde kullanılan toplam 12 g/L azot kaynağı çıkartılarak yerine seçilen azot kaynağı %0,3, %0,6, %1,2, %1,8, %2,4, %3, %3,6 ve %4,2 olacak şekilde eklendi ve selülitik izolatın 96 saat inkübasyon sonunda standart selülag üretimi ve mikrobiyal gelişim tayinleri gerçekleştirildi.

Karbon kaynaklarının selülag üretimi ve bakteri gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı karbon kaynaklarının selülitik izolatın selülag üretimine etkisinin araştırılması için CMC-B içeriğinde kullanılan toplam 10 g/L karbon kaynağı çıkartılarak yerine %1 konsantrasyonda laktoz, fruktoz, nişasta, sukroz, glikoz, selüloz, CMC, gliserol ve sıvı yağ denendi. Ek olarak kontrol için CMC-B ve karbon kaynağı içermeyen besiyeri kullanıldı. 96 saatlik inkübasyon sonunda standart selülag üretimi ve mikrobiyal gelişim tayinleri gerçekleştirildi.

Karbon kaynağının farklı konsantrasyonlarının selülag üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Karbon kaynağının farklı konsantrasyonlarının selülag üretimine etkisinin araştırılması için CMC-B içeriğinde kullanılan toplam 10 g/L karbon kaynağı çıkartılarak yerine seçilen karbon kaynağı %0,25, %0,5, %1, %1,5, %2, %2,5, %3, %4, %5, %7,5 ve %10 konsantrasyonlarda eklendi, 96 saatlik inkübasyon sonrası selülag aktivite ve mikrobiyal gelişim tayinleri gerçekleştirildi.

Başlangıç pH'sının selülag üretimi ve bakteri gelişimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı pH değerlerinin selülag üretimine etkisinin araştırılması için belirlenen en iyi azot ve karbon kaynaklarını içeren selülag üretim besiyerinin başlangıç pH'sı pH 6, pH 7, pH 8, pH 9 ve pH 10 olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan ortamlar 250 mL'lik Erlen mayerlerde 96 saat inkübasyon sonunda standart selülag üretimi ve mikrobiyal gelişim tayinleri gerçekleştirildi.

İnkübasyon sıcaklığının selülag üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Farklı sıcaklık değerlerinin selülag üretimine etkisinin araştırılması için belirlenen en iyi azot ve karbon kaynaklarını içeren selülag üretim ortamında 25, 30, 35 ve 40 °C'de 96 saat inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda standart selülag üretimi ve mikrobiyal gelişim tayinleri gerçekleştirildi.

Enzim saflaştırma

Selülazın amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla kısmi saflaştırılması

Belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen inkübasyon sonunda 5000 rpm’de, 4 °C’de 25 dk santrifüjlenerek bakteri hücrelerinin uzaklaştırılması sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatantta son konsantrasyonu %20, %40 ve %60 olacak şekilde amonyum sülfat tuzu yavaş yavaş eklenerek çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Her konsantrasyon için amonyum sülfat 30 dk boyunca eklendi ve 4 °C’de karıştırılarak minimum 4 saat olacak şekilde bekletildi. Daha sonra 10000 rpm’de 30 dk boyunca santrifüjlenip proteinler çöktürülerek süpernatant diğer amonyum sülfat konsantrasyonunda çöktürmek için ayrıldı. Çöken proteinler 50 mM’lık Glisin-NaOH (pH 9) tamponu eşliğinde çözüldü. Protein çözeltisinde iyonların ve yapıları işlem sonrasında bulunan tuzların uzaklaştırılıp çözeltinin yoğunlaştırılması için 6000 rpm’de ultrafiltrasyon (Millipore, 10 kDa cut-off) uygulandı.

İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma

Amonyum sülfat çöktürmesi ve ultrafiltrasyon sonrası elde edilen örnekler 50 mM Glisin-NaOH (pH 9.0) tamponu eşliğinde dengelenerek anyon değişim HiPrep Q XL 16/10 kolonuna yüklendi. 0-1 M konsantrasyonları arası artan NaCl gradyanı sayesinde kolondan geçirildi. Fraksiyonlarla selülaz aktivite ölçümleri yapıldı. Yüksek selülaz aktivitesi gösteren fraksiyonlar birleştirildi ve ultrafiltrasyon ile konsantre edilerek -20 °C’ye kaldırıldı.

Protein miktar tayini

Toplam protein konsantrasyonlarını belirlemek için Bradford yöntemi kullanıldı (Bradford, 1976). 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 ve 3 konsantrasyonlarında BSA stokları hazırlandı. Ölçüm için tüplere sırasıyla 10 µL örnek, 40 µL 0,1 N HCL ve 1,75 ml Bradford reaktifi eklenir. 5X Bradford reaktifi distile su ile 1:3 oranında seyreltilerek kullanılır. 5 dk inkübasyonun ardından absorbans 595 nm’de ölçüm yapılır. Absorbansa karşı standart eğri hesaplanması için mg protein grafiği çizildi (Ek 4’de verilmiştir.). BSA konsantrasyonlarından elde edilen standart grafiği değerlerine göre örnek miktarı belirlendi.

SDS-PAGE analizi

Selülaz enzimin molekül ağırlığını saptamak ve saflığını kontrol etmek için saflaştırma işlemlerinden sonra örneklerin analiz işlemi Laemmli metodu kullanılarak SDS-PAGE ile gerçekleştirildi (Laemmli, 1970).

Ayırma (Separating) jeli ve yığma (Stacking) jeli olarak yoğunlukları farklı iki ayırma ortamı birlikte kullanıldı. Jel oluşturulması sırasında uygun şekilde hazırlanmış cam plakaları

olan Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra Cell elektroforez sistemi olarak kullanıldı. %12,5'lik konsantrasyonda ayırıcı jel, Tablo 4'te belirtilen şekilde hazırlandı. Taze hazırlanan APS ve TEMED en son eklenerek hazırlanan ayırıcı jel çözeltisi cam levhalar arasına döküldü ve havayla temasını kesmek için üzeri su ile tamamlanarak 30 dk bekleyerek su uzaklaştırıldı, ayırıcı jelin üstünde yer alan ve örnek yüklenmesi için oluşan tarak gözlerinin yer aldığı bölüm olan Tablo 3'te verilen maddelerin belirtilen konsantrasyonlarda karıştırılmasıyla hazırlanan %7,5'lik yığma jel döküldü. Üzerine taraklar yerleştirildi ve 30 dk beklenerek polimerleşme tamamlandı. Taraklar çıkartılarak kuyucuklar şeklindeki boşluklar 1X yürütme tamponu ile yıkanarak örneklerin yüklemesi için hazırlandı.

Tablo 3. Yığma jel (%7,5) yapımı

Yığma jel (%7,5)	Hacim (mL)
APS (%25)	0,02
Yığma jel tamponu	0,6
TEMED	0,002
%30 Akrilamid stok solüsyonu	0,4
H ₂ O	1,4
Toplam	2,422

Tablo 4. Ayırıcı jel (%12,5) yapımı

Ayırıcı jel (%12,5)	Hacim (mL)
APS (%25)	0,03
Ayırıcı jel tamponu	1,2
TEMED	0,003
%30 Akrilamid stok solüsyonu	2,1
H ₂ O	1,7
Toplam	5,033

Örneklerin SDS-PAGE için hazırlaması ve elektroforez

Örnek tampon ve β -mercaptoethanol 1:4 oranında karıştırıldı. Hazırlanan karışımdan 5 μ L, örnek ile birleştirilip 15 μ L toplam hacim elde edilerek 5-6 dk boyunca kaynatıldı. Daha sonra denatürasyona uğrayan örnekler soğutulularak 10 saniye boyunca 6000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüjlenen örnekler hazırlanmış olan jeldeki kuyucuklara yüklenerek elektroforez işlemi 120 V'da 1 saat 30 dk boyunca devam etti. Yürütülen proteinlerin moleküler kütlesi 250-10 kDa aralığında bantlara sahip Precision Plus Protein Standard (Unstained) kullanılarak belirlendi.

Jellerin Coomassie Brilliant Blue ile boyanması

SDS-PAGE işlemini takiben jeller çıkartılarak Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı. 150 mL Coomassie Brilliant Blue boyası içine koyulan jeller 1 saat boyunca düşük devirde çalkalanıp oda sıcaklığında boyanması için bekletildi. Sonrasında boya solüsyonu dökülerek jeller 150 mL boya uzaklaştırma solüsyonunda 30 °C’de çalkalanarak 1 saat bekletildi. Boya uzaklaştırıldığında istenilen proteinlerin bantlarının görünür şekile getirilmesi için uzaklaştırma solüsyonu ile yıkama işlemi birkaç kez tazelendi.

Selülazın moleküler kütlelerinin hesaplanması

Protein standartından yararlanılarak selülaz enziminin moleküler kütlesi hesaplandı. SDS-PAGE bittiğinde jelde yürüyen protein bantlarının göç mesafeleri (R_f) aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Bu sonuçlar ile çizilen grafikteki eğrinin oluşan denklemi ile selülaz enziminin moleküler kütlesi belirlendi.

$$R_f = \frac{\text{Protein Göç Mesafesi}}{\text{Boya Göç Mesafesi}}$$

Saflaştırılan selülazın karakterize edilmesi

Selülazın K_m ve V_{max} değerlerinin belirlenmesi

Saflaştırılmış selülaz için Michaelis-Menten kinetik sabitleri, K_m ve V_{max} ; %0,1, %0,25, %0,5, %0,75, %1, %1,25, %1,5, %2, %2,5 ve %3 CMC konsantrasyonlarında standart koşullarda enzim aktivitesi ölçülerek belirlendi (Counotte ve Prins, 1979).

Saflaştırılan enzimin aktivitesi üzerine pH, sıcaklık, çeşitli reaktifler, metal iyonları, organik çözücülerin etkileri araştırıldı.

Selülazın optimum sıcaklığının tayini

Saflaştırılmış selülazın optimum sıcaklığını belirlemek amacıyla enzim aktivite tayinleri diğer koşullar sabit kalacak şekilde 25, 30, 40, 50, 60 ve 95 °C’de yapıldı. Reaksiyon öncesi substrat çözeltileri ve enzim 10 dk belirtilen sıcaklıklarda inkübasyona bırakıldı.

Selülazın sıcaklık stabilitesinin tayini

Enzimin sıcaklık stabilitesini belirlemek amacıyla örnekler 25, 30, 40, 50, 60 °C olacak şekilde 30, 60, 90 ve 120 dk inkübe edildi. Sonrasında örneklerin standart selülaz aktivite tayinleri gerçekleştirildi ve kontrol numunesi ile karşılaştırılarak kalan aktivite belirlendi.

Selülazın optimum pH'sının tayini

Selülaz enziminin optimum pH'sını belirlemek amacıyla pH 4,0 ile pH 12,0 aralığındaki aktivitelere bakıldı. pH 4,0-5,0 aralığı için 50 mM asetik asit-sodyum asetat tamponu, pH 6,0 için potasyum fosfat tamponu, pH 7,0-8,0 aralığı için Tris-HCl tamponu ile pH 9,0-12,0 aralığı için Glisin-NaOH tamponu kullanıldı. Substrat solüsyonu bu tamponlar içerisinde hazırlandı ve diğer koşullar sabit tutularak standart enzim aktivitesine bakıldı.

Selülazın pH stabilitesinin tayini

Enzimin pH stabilitesini belirlemek amacıyla, örnekler; 50 mM asetik asit-sodyum asetat tamponu (pH 4,0-5,0), potasyum fosfat tamponu (pH 6,0), Tris-HCl tamponu (pH 7,0-8,0) ve Glisin-NaOH tamponu (pH 9,0-12,0) ile 1:1 oranda karıştırılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri standart koşullarda ölçülerek kontrol numunelerine göre kalan aktiviteler belirlendi.

Selülaz üzerine metal iyonlarının etkisinin tayini

Selülaz aktivitesine metal iyonlarının etkisini belirlemek amacıyla Ag^{+1} , Ba^{+2} , Ca^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} ve Zn^{+2} iyonlarının 50 mM glisin-NaOH (pH 9) tamponu kullanılarak 5 mM ve 10 mM'lık çözeltiler hazırlandı. Bunun için $CuSO_4$, $BaCl_2$, $AgNO_3$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $CaCl_2$, $FeCl_2$, $Cd(NO_3)_2$, $HgCl_2$, $MgCl_2$, $NiCl_2$ ve $CoCl_2$ bileşikleri kullanıldı. Enzim ve metal iyonları çözeltileri 1:1 oranında 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Enzim aktiviteleri metal iyonları ile muamele edilmeden aynı koşullar altında inkübe edilen kontrol numunesi ile karşılaştırılarak bağlı aktivite hesaplaması yapıldı.

Selülaz üzerine çeşitli reaktiflerin etkisinin tayini

50 mM, pH 9,0 glisin-NaOH içerisinde %20'lik EDTA, Triton X-100, H_2O_2 , SDS, Tween 80 ve Tween 20 çözeltileri hazırlandı. Saf enzim örnekleri bu çözeltilerin içerisinde 1:1 oranda karıştırılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında selülaz aktiviteleri ölçülerek, reaktif içermeyen ve aynı koşullar altında inkübe edilen kontrol numunesine göre bağlı aktiviteleri belirlendi.

Selülaz üzerine organik çözücü maddelerin etkisinin tayini

Selülaz aktivitesine organik çözücü maddelerin etkisini belirlemek için etanol, DMSO, gliserol, aseton ve izopropanolün 50 mM glisin-NaOH (pH 9,0) tamponu ile %20'lik çözeltileri hazırlandı. Selülaz enzimi çözeltiler ile 1:1 oranında karıştırılıp oda sıcaklığında 1 saat inkübe

edildi. Sonrasında selüloz aktiviteleri ölçülerek, organik çözücü içermeyen ve aynı koşullar altında inkübe edilen kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı.

Selüloz üzerine ticari deterjanların etkisinin tayini

Selüloz aktivitesine ticari deterjanların etkisini belirlemek için 50 mM pH 9,0 glisin-NaOH tamponu içerisinde %1'lik sıvı sabun, bulaşık deterjanı, sıvı çamaşır deterjanı ve toz çamaşır deterjanının çözeltileri hazırlandı. Koşullar sabit tutularak standart selüloz aktivite tayinleri gerçekleştirildi.

Selülozun stabilitesi üzerine ticari deterjanların etkisinin tayini

Enzimin stabilitesi üzerine deterjanların etkisini belirlemek için aynı şekilde %1'lik sıvı sabun, bulaşık deterjanı, sıvı çamaşır deterjanı ve toz çamaşır deterjanının çözeltileri hazırlandı. Deterjan çözeltileri ile enzim 1:1 oranda karıştırılıp 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri standart koşullarda ölçülerek deterjan içermeyen ve aynı koşullar altında inkübe edilen kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı.

Selülozun biyoteknolojik uygulama alanları

Selülozun kağıt parçalama özelliğinin araştırılması

Selülozun kağıt parçalama özelliği değerlendirilmek üzere hem selüloz üretim ortamındaki CMC yerine sadece %1 oranında filtre kağıdı eklenerek hem de selüloz üretim besiyerindeki CMC'ye ek olarak %1 oranında filtre kağıdı içeren ortamlarda gerçekleştirildi. 96 saat boyunca inkübasyona bırakıldı ve enzim aktivite ölçümleri gerçekleştirildi (Ariffin vd., 2006).

Selülozun kumaş biyoparlatma etkisinin araştırılması

Selülozun kumaş yüzeyindeki tüylenmeyi azaltma etkisi pamuklu kumaş üzerinde değerlendirildi. Kültür süpernatantı içeriğine pamuklu kumaş parçaları yaklaşık 2-2,5 cm olacak şekilde eklendi 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dk çalkalanarak inkübe edildi ve sonrasında kumaş parçaları saf su ile yıkanarak temizlendi. Temizlenen kumaşlar 60 °C etüvde 1 saat kurutulduktan sonra kumaş yüzeyindeki tüylenmeyi azaltma seviyeleri görsel olarak incelendi (Duran vd., 2008).

Selülozun kumaş boyası üzerine etkisinin araştırılması

Selülozun kumaş boyalarını parçalama özelliği değerlendirilmek üzere boya olarak indigo boyası kullanıldı. Bir tekstil boyası olan indigo sulu ortamda çözünür bir boya olmadığından alkali koşullar altında çözünür formu olan löko-indigoya dönüştürüldü (Pathak

ve Madamwar, 2010). Çözünebilir löko-indigo, ham indigo boya tozunun (5 g/L), sodyum hidroksit (2 g/L) ve sodyum hidrosülfid (2 g/L) ile indirgenmesiyle hazırlandı. Kumaşlar 2-2,5 cm boyutunda kesilerek boyanın içerisine eklendi. Boyama oda sıcaklığında 1 saat süreyle gerçekleştirildi. Boyamanın ardından numuneler havada oksitlendi, durulandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kumaş parçaları 1, 3, 5, 15 ve 20 saat boyunca 5 mL enzim solüsyonunda bekletildi. İnkübasyon sonunda kumaş parçaları saf su ile yıkanarak temizlendi. Temizlenen kumaşlar 60 °C etüvde 1 saat kurutulduktan sonra kumaşdaki boyanın yoğunluk seviyeleri görsel olarak incelendi (Tayade ve Adivarekar, 2014).



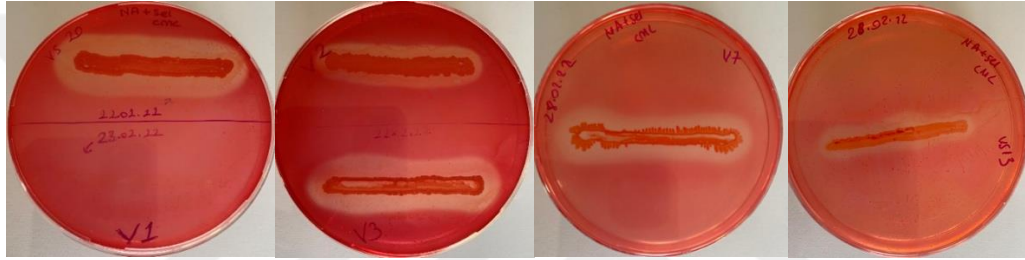
BULGULAR

Bakterilerin izolasyonu

Gerçekleştirilen izolasyon çalışmaları sonucunda Van Gölü'nden 60 adet izolat elde edilerek kalitatif selüloz tayini amacıyla kullanıldı.

İzolatların selüloz aktivitelerinin tayini

İzolatların CMC-A üzerindeki kalitatif selüloz aktivite tayinleri sonucu selüloz üreticisi 19 izolatı seçilmiştir. Şekil 4'te en geniş selüloolitik zon oluşturan izolat örnekleri gösterilmiştir. En belirgin selüloolitik zonlar V2 (7 mm), V3 (8 mm), V4 (4 mm), V7 (9 mm), VS1 (4 mm), VS13 (6 mm), VS15 (4 mm), VS20 (11 mm) ve B6 (5 mm) kodlu izolatlarda gözlemlenmiştir.



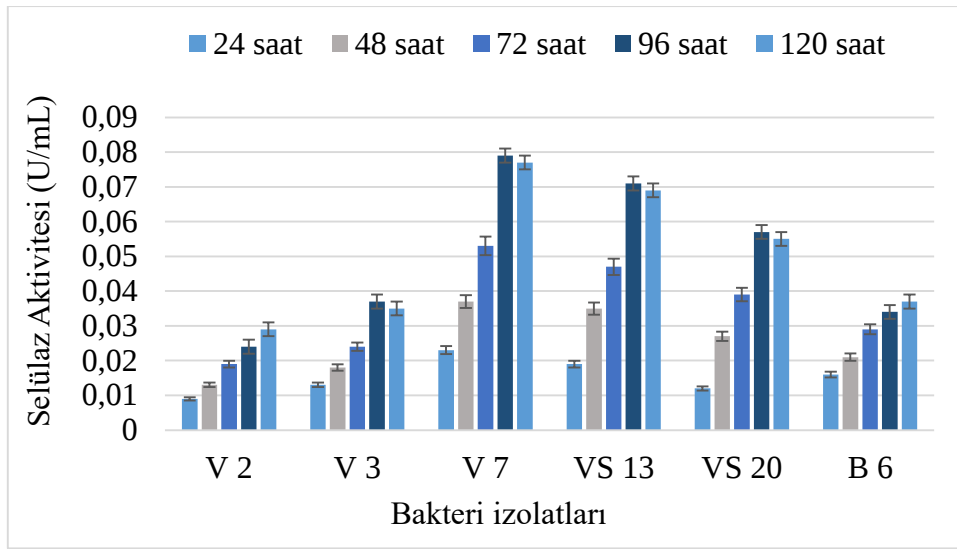
Şekil 4. Van Gölü'nden elde edilen izolatların CMC-A besiyerinde 30 °C'de 48 saat inkübasyon sonucunda oluşturdukları selüloolitik zonlar

Bakteri izolatlarının kantitatif selüloz aktivitelerinin tayini

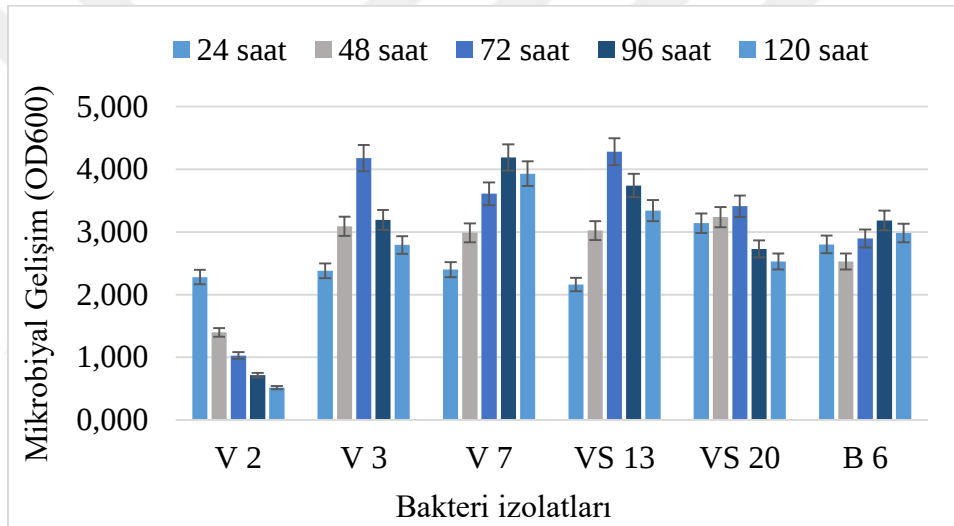
CMC-A üzerinde oluşturdukları zon çaplarına göre seçilen 6 adet izolat (V2, V3, V7, VS13, VS20 ve B6) ile kantitatif aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Ön kültür hazırlamak üzere izolatlar NB besiyerinde 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda NB besiyerinde gelişen bakterilerden 1 mL alınarak 100 mL CMC-B besiyeri içeren 250 mL'lik erlen mayerlerde, 30 °C'de, 180 rpm'de, 120 saat inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda izolatların selüloz aktivite tayini DNS yöntemi ile standart olarak gerçekleştirilerek en fazla aktivite gösteren izolat belirlendi.

CMC-A besiyerinde oluşturdukları zon çapı ve Şekil 5'te görülen kantitatif selüloz aktivite sonuçları dikkate alınarak en iyi selüloz üretici olarak V7 kodlu bakteri izolatı seçildi.

V7 izolatının karboksimetil selüloz aktivitesi 96 saat inkübasyon sonrası 0,079 U/mL bulunurken, ekzo- β -1-4 glukanaz U/mL ve β -1-4 glukanaz aktiviteleri sırasıyla 0,007 U/mL ve 0,005 U/mL olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, çalışmamızda selüloolitik aktivite olarak karboksimetil selüloz aktivitesi üzerinde durulmuştur.



Şekil 5. Van Gölü bakteri izolatlarının CMC-B besiyerinde 30 °C’de 120 saatlik inkübasyonları boyunca selüloz aktiviteleri



Şekil 6. Van Gölü bakteri izolatlarının CMC-B besiyerinde 30 °C’de 120 saatlik inkübasyonları boyunca mikrobiyal gelişimleri

Seçilen bakteri izolatının tanılanması

İzolatin klasik yöntemlerle tanılanması

İzolatlar arasından en iyi selüloz üreticisi olarak seçilen V7 kodlu izolatın klasik yöntemlerle karakterizasyon sonuçları Tablo 5’de özetlendi.

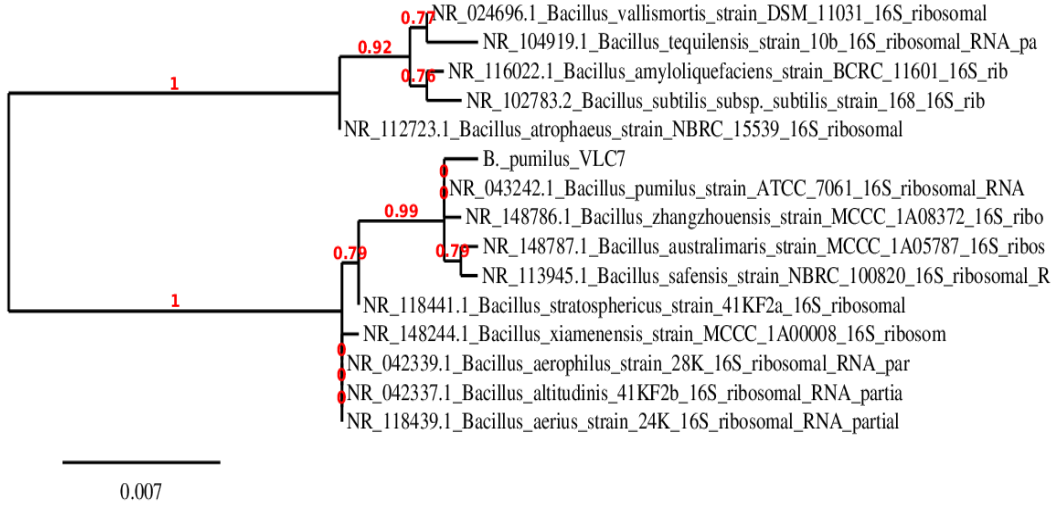
Hareketli ve basil şekilli V7 izolatının Gram-pozitif hücre duvar yapısına ve küçük, düzgün kenarlı, çubuk, krem renkli kolonilere sahip olduğu görüldü. Oksidaz, hemoliz, katalaz, proteaz, lipaz, KOH, asparaginaz, maltoz, L-arabinose, D-xylose ve myo-inositol pozitif olurken amilaz, glutaminaz ve üreaz negatif olduğu tespit edildi.

Tablo 5. Van Gölü'nden izole edilen selüloolitik V7 kodlu izolatın özellikleri

Özellikler	Sonuçlar
Bakteri Suşu	<i>Bacillus pumilus</i> VLC7
GenBank Numarası	OR415888.1
Hareket testi	+
Koloni Şekli	Çubuk
Koloni Rengi	Krem
Hücre Şekli	Basil
H ₂ O ₂ Katalaz	+
Lipaz	+
Oksidaz	+
Hemoliz	+
Üreaz	-
Asparaginaz	+
Glutaminaz	-
D-xylose	+
Maltoz	+
L-arabinoz	+
Myo-inositol	+
Gram	+
KOH	+
Amilaz	-
Proteaz	+

Moleküler yöntemlerle tanılama

V7 kodlu izolatının 16S rDNA bölgesinin analizi ile yaptırılan moleküler karakterizasyonu sonucu elde edilen sekansı (Ek 3 'de verildi) NCBI veri tabanındaki sekanslarla karşılaştırılarak izolatın *Bacillus pumilus* türü olduğu tespit edildi. Filogenetik ağaç oluşturuldu (Şekil 7) ve *B. pumilus* VLC7 suşu olarak adlandırılarak OR415888.1 GenBank numarası alındı.



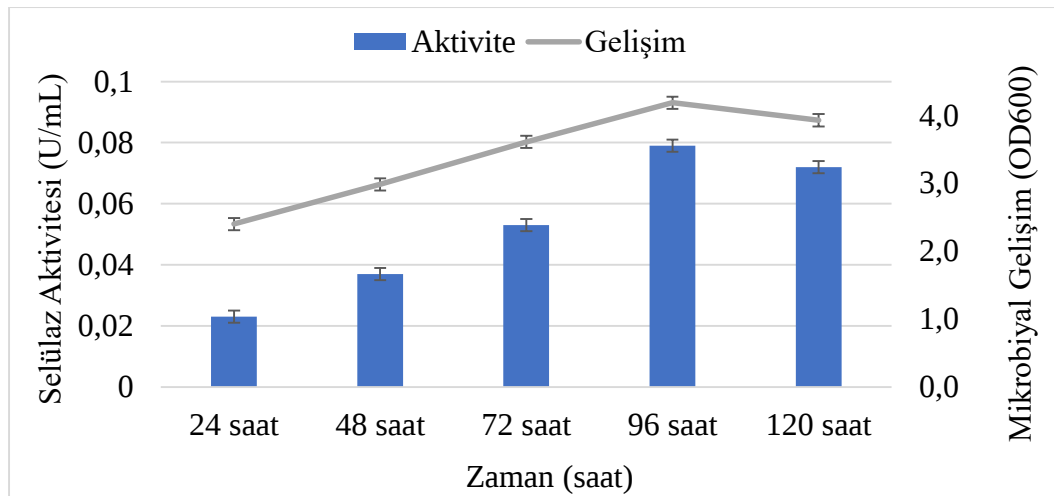
Şekil 7. Van Gölü izolatu *B. pumilus* VLC7'nin filogenetik ağacı

B. pumilus VLC7'nin selülag üretim koşullarının optimizasyonu

B. pumilus VLC7 suşunun selülag üretimini artırmak amacıyla inkübasyon koşulları optimize edildi. İlk olarak optimum inkübasyon süresi belirlendi ve daha sonra en iyi azot ve karbon kaynakları seçilerek bunların optimum konsantrasyonları belirlendi. Ayrıca optimum başlangıç pH'sı ve inkübasyon sıcaklığı belirlendi.

İnkübasyon süresinin *B. pumilus* VLC7'nin selülag üretimi ve gelişimine etkisi

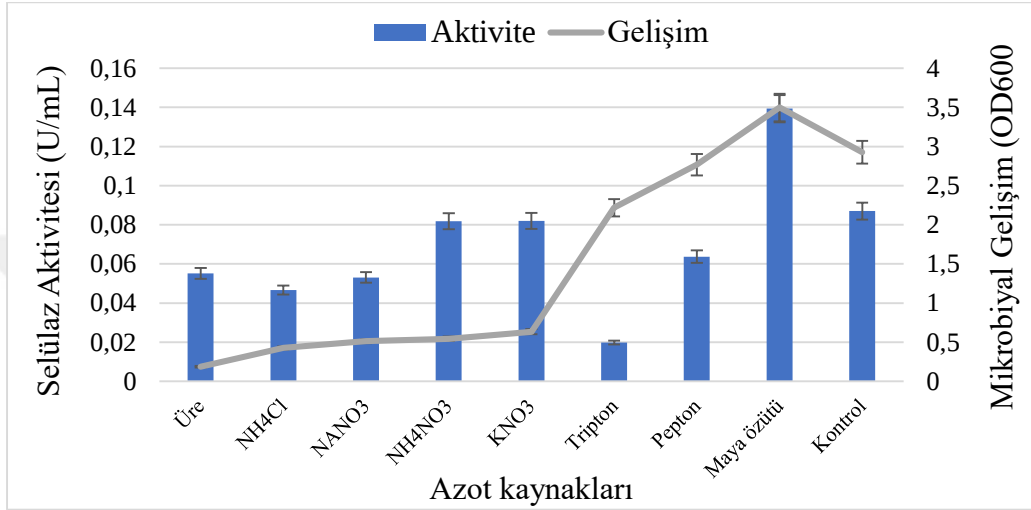
CMC-B besiyerinde *B. pumilus* VLC7, 120 saat boyunca 30 °C'de, 180 rpm'de inkübasyona bırakıldı. 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde mikrobiyal gelişimi ve selülag üretimi değerlendirildi (Şekil 8). 96. saate kadar selülag üretiminin düzenli olarak artış gösterip, sonrasında azalmaya başladığı belirlendi. Yapılan analizler sonucu en yüksek selülag üretimi gösterdiği saat inkübasyonun 96. saatinde 0,079 U/mL olarak belirlendi.



Şekil 8. CMC-B besiyerinde, 30 °C ve 180 rpm'de *B. pumilus* VLC7'nin 120 saat inkübasyonu boyunca mikrobiyal gelişimi ve selülag üretimi

Azot kaynaklarının *B. pumilus* VLC7'nin selülag üretimi ve gelişimine etkisi

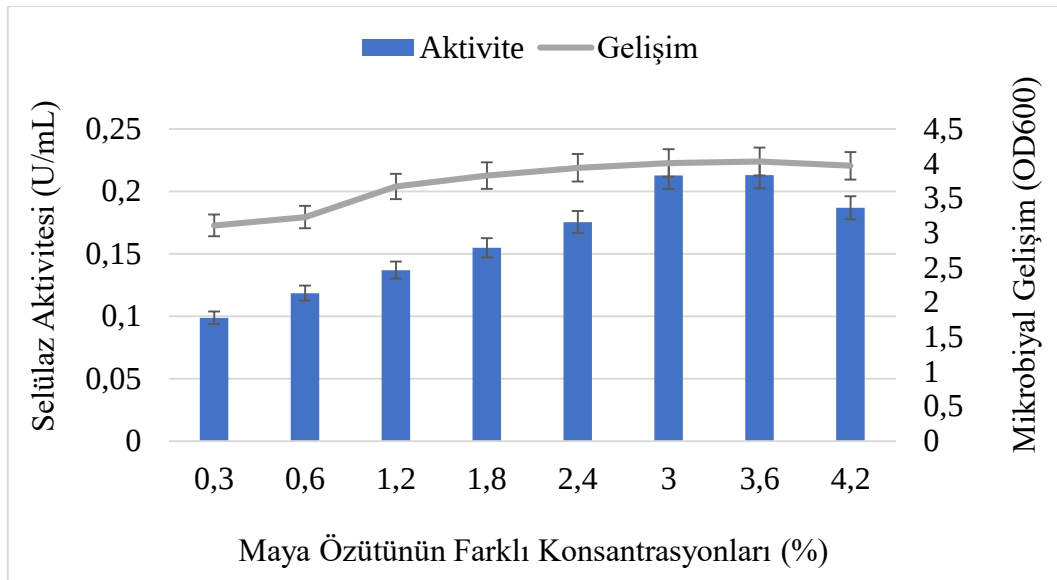
Farklı azot kaynaklarının *B. pumilus* VLC7'nin gelişim ve selülag üretimi üzerindeki etkisini gözlemlemek için %1,2 oranında pepton, tripton, maya özütü, üre, NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 ve NH_4Cl kullanıldı. 96 saat süren inkübasyon sürecinde günlük olarak selülag üretimi ve gelişimi takip edildi. Şekil 9'da görüldüğü gibi en fazla selülag üretimi maya özütü varlığında elde edildi, maya özütünü KNO_3 , NH_4NO_3 izledi ve en düşük selülag üretiminin triptonunda olduğu belirlendi.



Şekil 9. Farklı azot kaynaklarının *B. pumilus* VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selülag üretimine etkisi

Maya özütünün farklı konsantrasyonlarının *B. pumilus* VLC7'nin selülag üretimi ve gelişimine etkisi

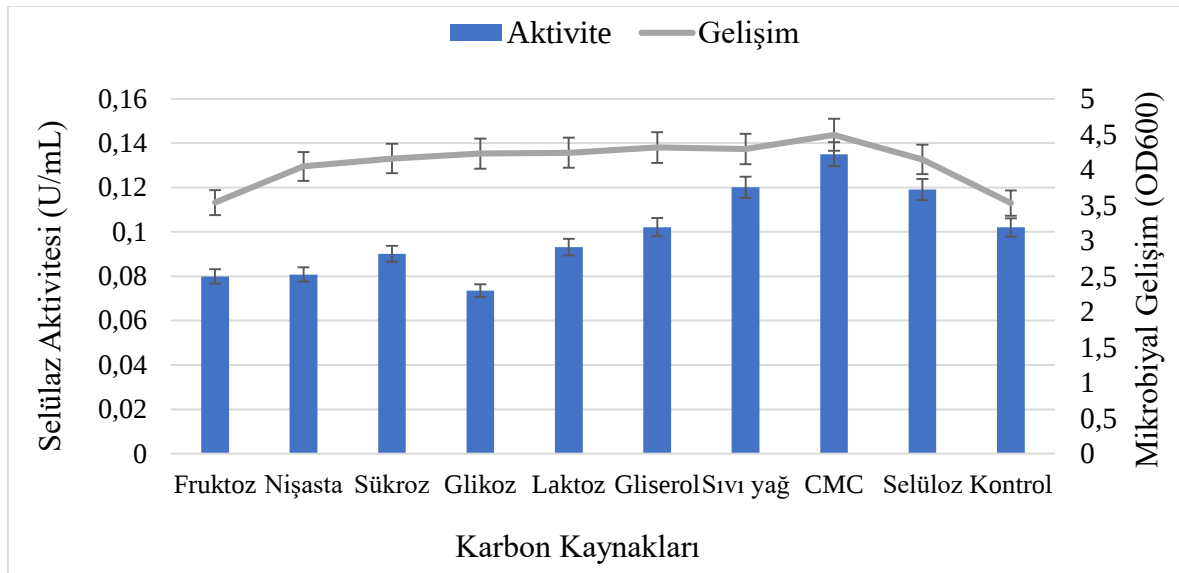
Maya özütünün farklı konsantrasyonlarının selülag üretimine etkisini değerlendirmek için selülag üretim besiyerinde %0,3, %0,6, %1,2, %1,8, %2,4, %3, %3,6 ve %4,2 maya özütü kullanıldı. 96 saatlik inkübasyon sonunda Şekil 10'da gösterildiği gibi en yüksek üretimin %3 ile %3,6 maya özütü varlığında elde edildiği ve optimum maya özütü konsantrasyonu olarak bundan sonra 0,21 U/mL ile %3'lük konsantrasyon tercih edildi.



Şekil 10. Farklı maya özütü konsantrasyonlarının *B. pumilus* VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selüloz üretimi üzerine etkisi

Karbon kaynaklarının *B. pumilus* VLC7'nin selüloz üretimi ve gelişimine etkisi

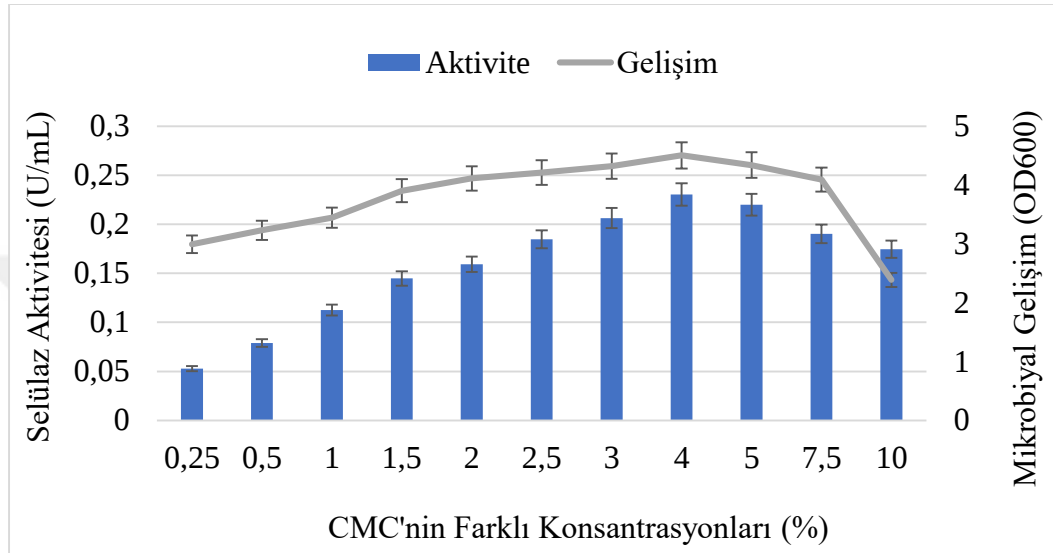
Farklı karbon kaynaklarının selüloz üretimine etkisi %1'lik laktoz, fruktoz, nişasta, sukroz, glikoz, selüloz, CMC, gliserol ve sıvı yağ varlığında incelendi. Hazırlanan ortamlar 96 saat inkübe edildi. İnkübasyon sürecinde günlük olarak selüloz üretimi ve gelişimi takip edildi. Şekil 11'de görüldüğü gibi inkübasyon sonunda en yüksek selüloz üretimi CMC, sıvı yağ ve selüloz varlığında elde edildi.



Şekil 11. Farklı karbon kaynaklarının *B. pumilus* VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selüloz üretimi üzerine etkisi

CMC'nin farklı konsantrasyonlarının *B. pumilus* VLC7'nin selüloz üretimi ve gelişimine etkisi

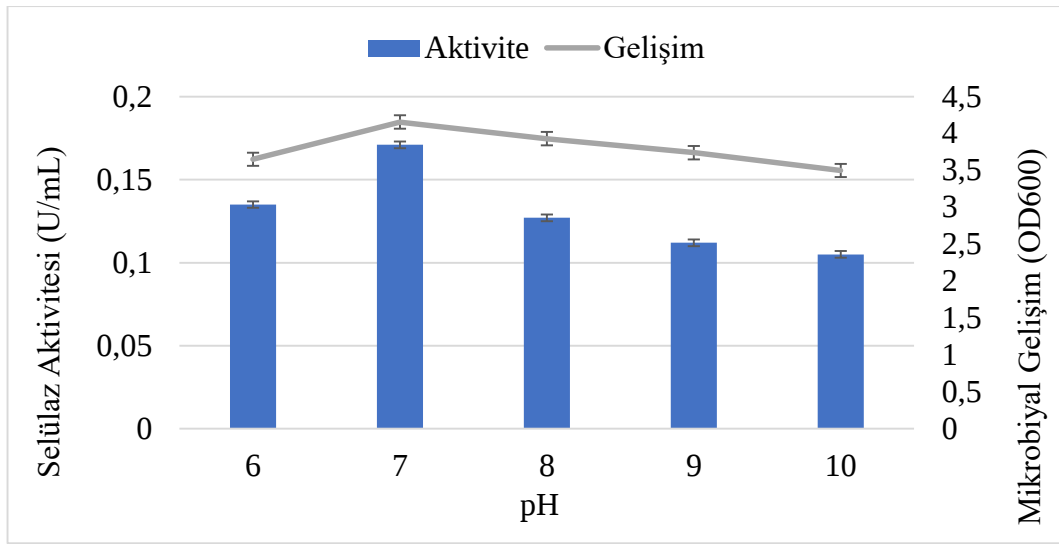
CMC'nin farklı konsantrasyonlarının selüloz üretimine etkisini değerlendirmek için %0,25, %0,5, %1, %1,5, %2, %2,5, %3, %4, %5, %7,5 ve %10 konsantrasyonları kullanılmıştır. Şekil 12'de gösterildiği gibi 96 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek mikrobiyal gelişim ve enzim üretiminin %4'lük CMC varlığında elde edildiği görüldü. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise aktivitenin azalmaya başladığı belirlendi.



Şekil 12. Farklı CMC konsantrasyonlarının *B. pumilus* VLC7'nin mikrobiyal gelişimi ve selüloz üretimi üzerine etkisi

Başlangıç pH'sının *B. pumilus* VLC7'nin selüloz üretimi ve gelişimine etkisi

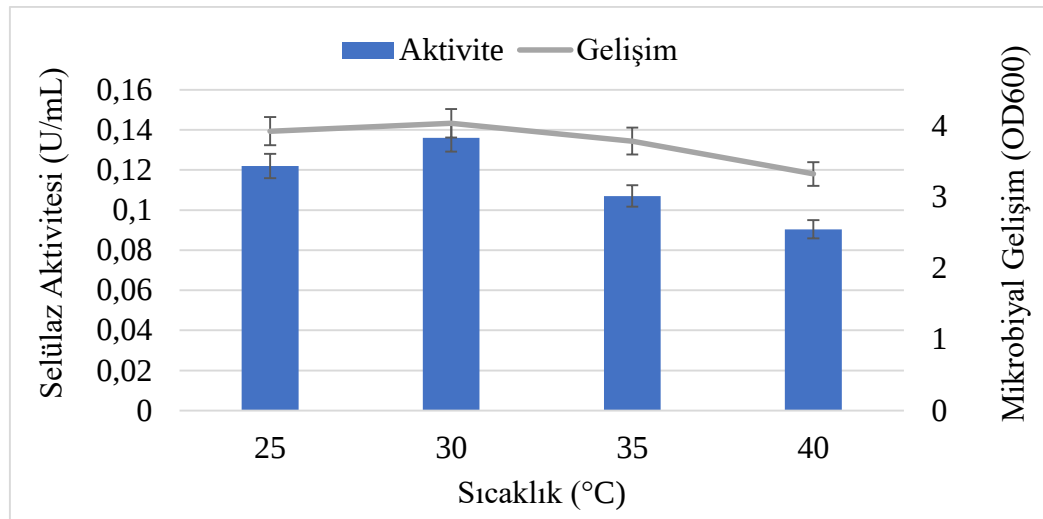
B. pumilus VLC7'nin başlangıç pH'sı için pH 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ve 10,0'da hazırlanan selüloz üretim ortamları, 30 °C ve 180 rpm'de, 96 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda mikrobiyal gelişim ve selüloz aktivitesi incelendi ve selüloz aktivitesinin mikrobiyal gelişim ile paralel şekilde olduğu belirlendi. *B. pumilus* VLC7'nin Şekil 13'de görüldüğü üzere en yüksek selüloz üretimi ve en yüksek gelişimi pH 7'de olduğu ve yüksek pH'larda (8,0, 9,0 ve 10,0) selüloz aktivitesi ve mikrobiyal gelişimin düşük olduğu belirlendi.



Şekil 13. Ortam pH'sının *B. pumilus* VLC7'nin selülag üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi

İnkübasyon sıcaklığının *B. pumilus* VLC7'nin selülag üretimi ve gelişimi üzerine etkisi

Farklı sıcaklık değerlerinin selülag üretimine etkisinin araştırılması için *B. pumilus* VLC7 selülag üretim ortamında 25, 30, 35 ve 40 °C'de, 180 rpm'de 96 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda mikrobiyal gelişim ve selülag aktivitesi incelendi. Bakterinin mikrobiyal gelişimi ve selülag aktivitesinin paralel olduğu belirlendi. Yapılan ölçümler sonucu Şekil 14'te gösterildiği gibi en yüksek selülag üretimi ve en yüksek gelişim 30 °C'de gözlemlendi ve daha yüksek sıcaklıkların (35 ve 40 °C) selülag aktivitesini olumsuz etkilediği belirlendi.



Şekil 14. Sıcaklığın *B. pumilus* VLC7'nin selülag üretimi ve mikrobiyal gelişimi üzerine etkisi

Enzim saflaştırma ve enzim karakterizasyonu

Belirlenen optimum koşullarda hazırlanan sıvı selüloz üretim ortamında *B. pumilus* VLC7 ile üretilen selüloz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat ile çöktürme, ultrafiltrasyon ve iyon değişim kromatografisi gerçekleştirilmiştir.

Selülozün amonyum sülfat çöktürmesi metoduyla kısmi saflaştırılması

B. pumilus VLC7'nin 96 saatlik inkübasyonu sonrasında amonyum sülfat çöktürmesi ile saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Enzimin maksimum üretildiği koşullar sağlanacak şekilde 96 saatlik inkübasyonu sonunda 10000 rpm'de, +4 °C'de 30 dk santrifüj edilerek bakteri hücreleri uzaklaştırıldı. Süpernatantın son konsantrasyonu sırasıyla %20, %40, %60 ve %80 olacak şekilde amonyum sülfat ile muamele edildi ve çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Çöktürülen proteinlerin ve süpernatantların selüloz aktiviteleri ölçüldü. %40'luk amonyum sülfat tuzu konsantrasyonunda selüloz enziminin çöktüğü gözlemlendi.

İyon değişim kromatografisi ile saflaştırma

Kısmi olarak saflaştırılan selüloz enzimi konsantre etmek ve amonyum sülfat tuzlarını uzaklaştırmak için ultrafiltrasyon tüpü ile santrifüj edildi. İyon değişim kromatografisi HiTrap Q HP anyon değişim kolonu ile 0-1 M NaCl gradienti kullanılarak gerçekleştirildi. Kolondan elde edilen fraksiyonların selüloz aktivitelerine bakıldı ve en yüksek aktiviteye sahip olanlar +4 °C'de saklandı.

Kültür süpernatantının, amonyum sülfat ile çöktürülen örneklerin ve aktif fraksiyonların protein miktarları Bradford Yöntemi'ne göre Ek 4'te verilen BSA standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Selülozün saflaştırma detayları Tablo 6'da sunulmuştur. Bu tabloya göre selülozün 20,5 kat ve %3,7 verimle saflaştırıldığı görülmektedir.

Tablo 6. *B. pumilus* VLC7'den selülozün saflaştırma basamakları

Saflaştırma Aşaması	Hacim (mL)	Protein kons. (mg/mL)	Total protein (mg)	Aktivite (U/mL)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg)	Saflaştırma verimi (%)	Saflaştırma derecesi
Süpernatant	250	0,166	41,5	0,13	32,5	0,78	100	1
Amonyum Sülfat	50	0,16	8	0,384	19,2	2,4	59	3
İyon Değişim Kromatografisi	15	0,005	0,075	0,08	1,2	16	3,7	20,5

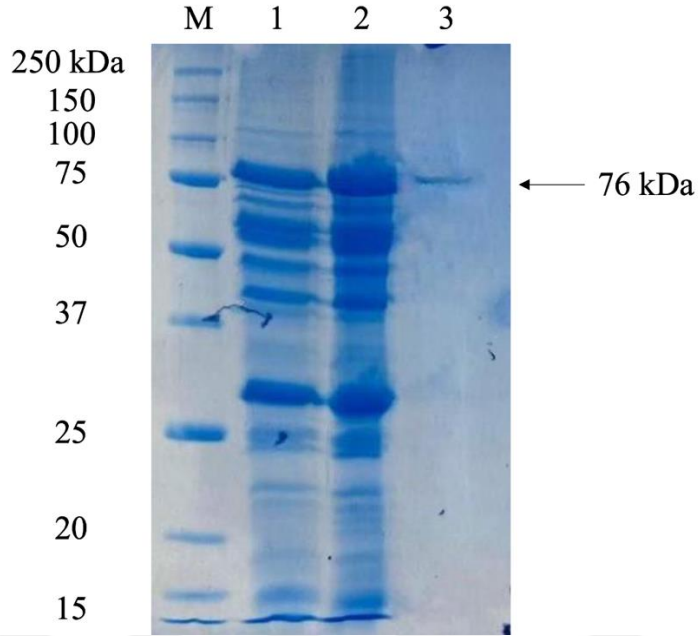
Spesifik Aktivite (U/mg protein): Selüloz aktivitesi (U/mL)/Protein miktarı (mg/mL)

Saflaştırma Verimi (%): [Total selüloz aktivitesi (U)/Ham enzim total aktivitesi (U)]x100

Saflaştırma Derecesi: Spesifik selüloz aktivitesi (U/mg)/Ham ekstrakt spesifik selüloz aktivitesi (U/mg)

SDS-PAGE analizi ile selülag enziminin moleküler kütesinin hesaplanması

Saflaştırılan örneklerin SDS-PAGE analizleri selülag enziminin yaklaşık moleküler ağırlığını belirlemek ve saflığını kontrol etmek amacıyla Laemmli Yöntemi ile gerçekleştirildi (Laemmli, 1970). Selülag proteininin moleküler ağırlığının 76 kDa olduğu tespit edildi.

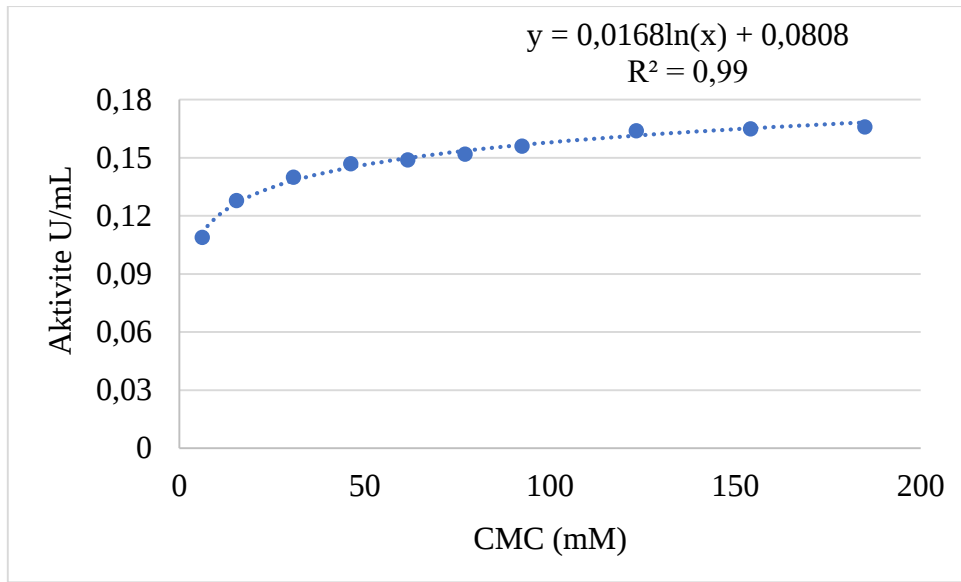


Şekil 15. Saflaştırma örneklerin SDS-PAGE analizi. M: Precision Plus Protein Unstained Standart (250-10 kDa) 1: Süpernatant; 2: 40% amonyum sülfat çöktürmesi; 3: iyon değişim kromatografisi

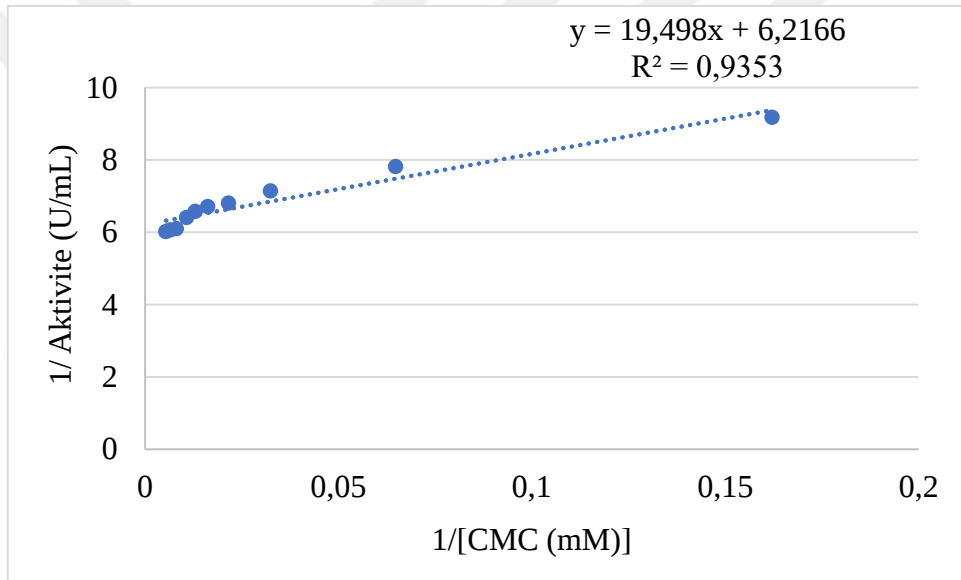
Saflaştırılmış selülagın karakterizasyonu

Selülagın K_m ve V_{max} kinetik değerlerinin tayini

Saflaştırılmış selülag enzimi kinetik sabitlerini belirlemek amacıyla %0,1-3 konsantrasyon aralığında enzimin substratı olan CMC kullanılarak hesaplamalar yapıldı. Şekil.16'daki Michaelis-Menten grafiği ve Şekil 17'deki Lineweaver-Burk grafiği elde edildi. Lineweaver-Burk çift resiprokal grafiği kullanılarak 0,160 V_{max} ve 3,13 mM K_m kinetik değerleri elde edildi.



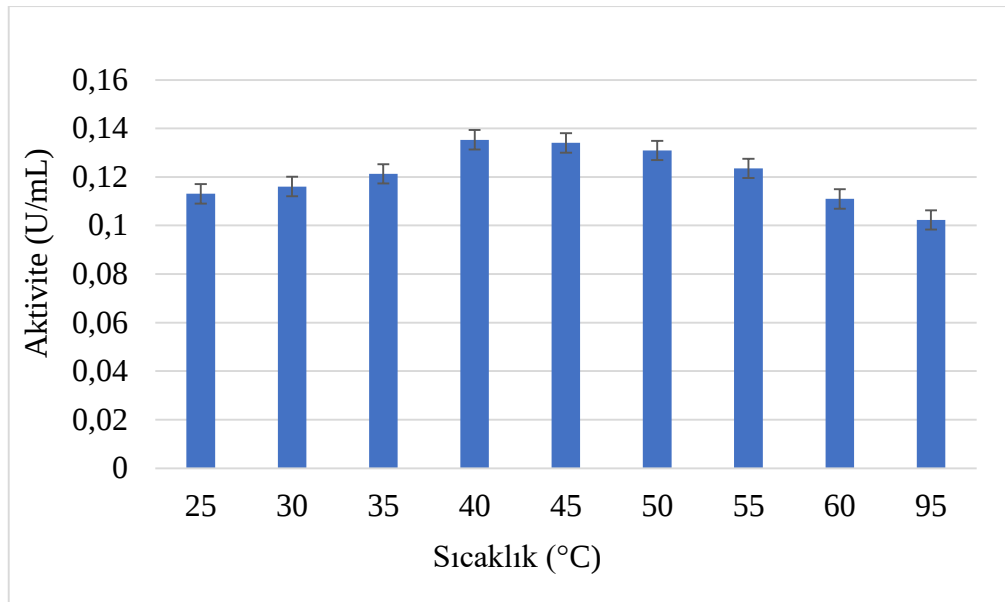
Şekil 16. *B. pumilus* VLC7 selülaazının Michaelis-Menten grafiği



Şekil 17. *B. pumilus* VLC7 selülaazının Lineweaver-Burk grafiği

***B. pumilus* VLC7 selülaazının optimum sıcaklık değerinin tayini**

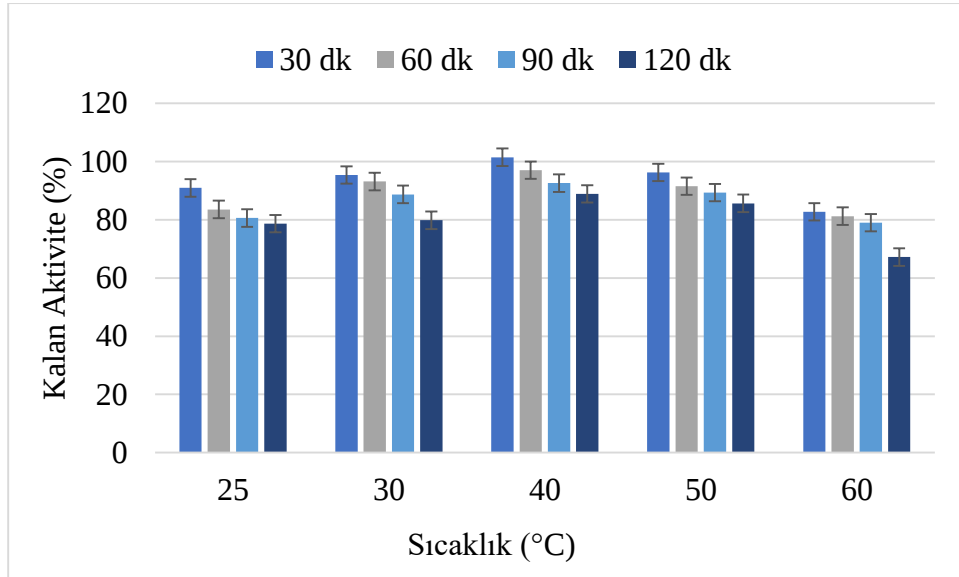
Saflaştırılan selülaaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesi için enzim ve substrat solüsyonu ayrı ayrı 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 ve 90 °C’de 10 dk inkübe edildi. Süre sonunda enzim ve substrat birleştirilerek enzim aktivitesi bu sıcaklıklarda belirlendi. Selülaaz enzimi için optimum sıcaklık 40 °C şeklinde belirlendi (Şekil 18). Ancak 45 °C ve 50 °C’de de aktivitesinin yüksek olduğu belirlendi.



Şekil 18. Sıcaklığın *B. pumilus* VLC7 selülazinin aktivitesi üzerine etkisi

***B. pumilus* VLC7 selülazinin sıcaklık stabilitesi**

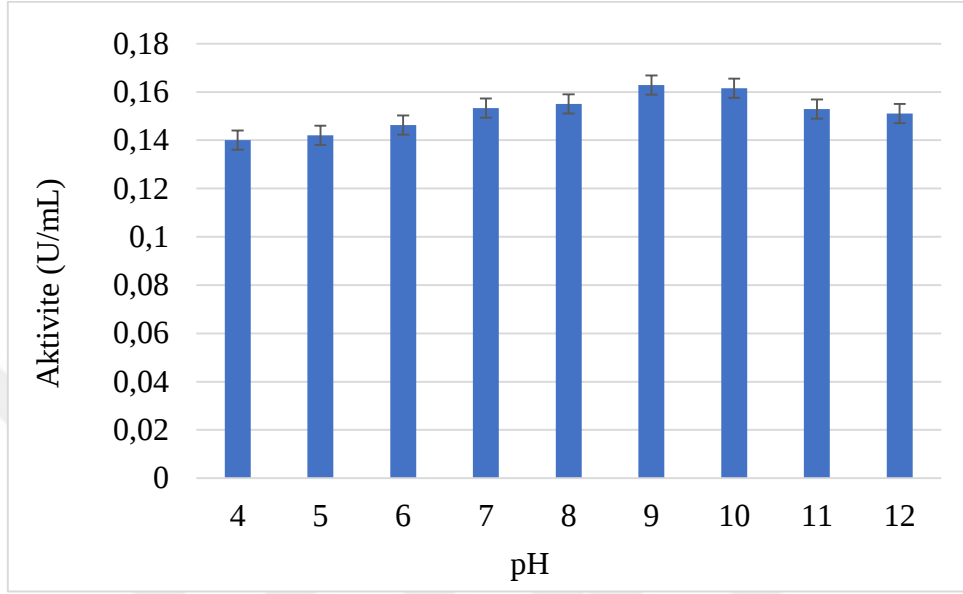
Stabiliteyi belirlemek amacıyla örneklerin 25, 30, 40, 50 ve 60 °C’de her biri 30, 60, 90, 120 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda enzim aktiviteleri ölçülerek kontrol numunesi ile karşılaştırılarak kalan aktiviteler belirlendi. Enzimin aktivitesini 120 dk sona erdiğinde 25 °C %78 değerinde, 30 °C %79 değerinde, 40 °C %88 değerinde, 50 °C %85 değerinde ve 60 °C %67 değerinde korunduğu tespit edildi (Şekil 19). Daha kısa olan inkübasyon sürelerinde selüla enziminin kararlılığının daha iyi korunduğu belirlendi.



Şekil 19. Sıcaklığın *B. pumilus* VLC7 selülazinin kararlılığına etkisi

***B. pumilus* VLC7 selülaının optimum pH değeri**

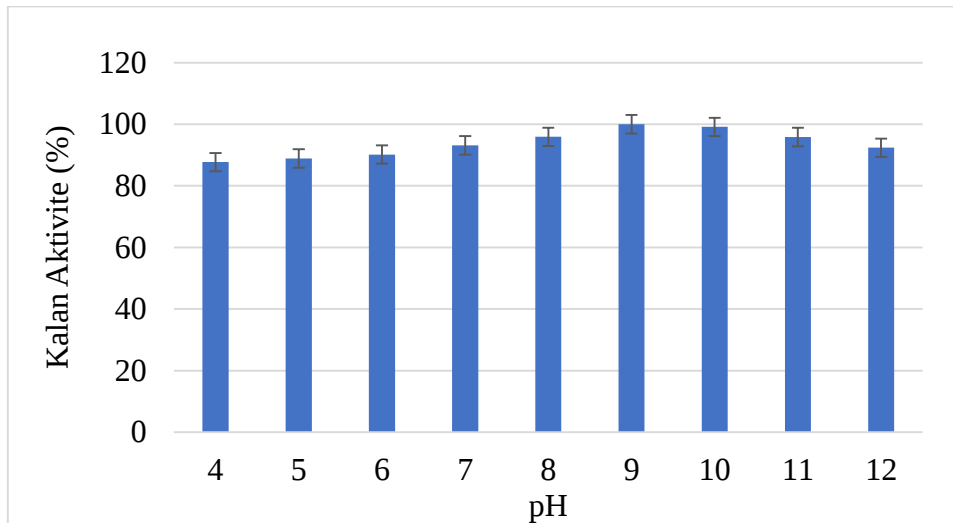
Optimum pH değeriinin tayini amacıyla pH 4,0 ile pH 12,0 aralığında enzimin aktivitesi ölçüldü. Selülaı enziminin optimal pH'sının 9 olduğu belirlendi, en düşük aktivite ise pH 4,0 olarak tespit edildi (Şekil 20). pH 7,0 ila pH 12,0 aralığında ise aktivitenin optimum değere oldukça yakın olduğu belirlendi.



Şekil 20. pH'nın *B. pumilus* VLC7 selülaının aktivitesine etkisi

***B. pumilus* VLC7 selülaının pH stabilitesi**

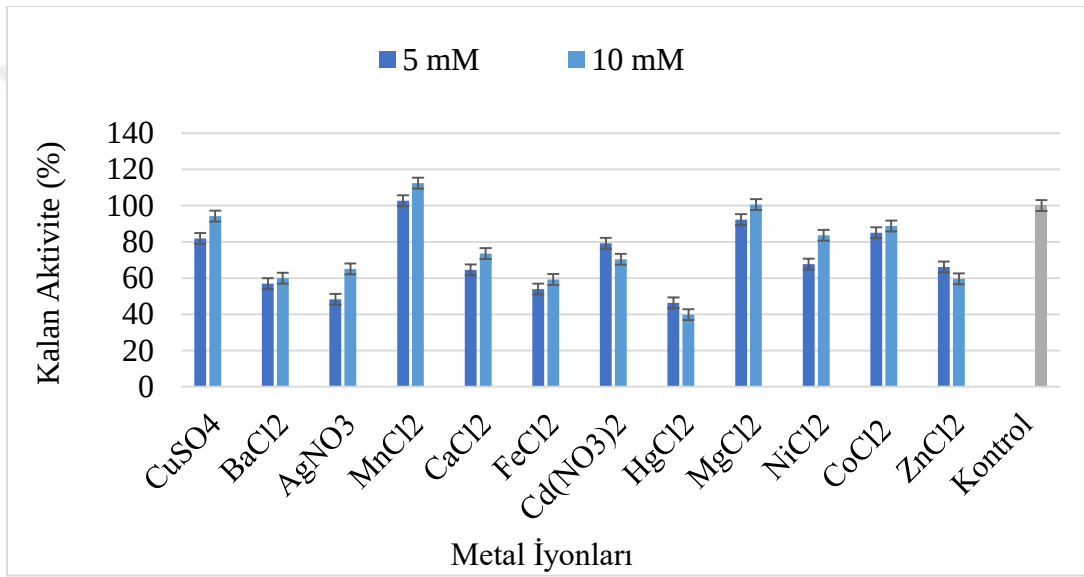
Enzimin pH stabilitesini belirlemek amacıyla enzim örnekleri pH 4,0-12,0 aralığında 1 saat inkübe edildi. Sonrasında enzim aktiviteleri kontrol numunesi dikkate alınarak ölçüldü, kalan aktiviteler belirlendi. Şekil 21'de gösterildiği gibi enzimin pH 8,0-11,0 aralığında %95'ten büyük olacak şekilde stabilitesini koruduğu, pH 9,0'da ise oldukça kararlı olduğu belirlendi.



Şekil 21. pH'nın *B. pumilus* VLC7 selülaının stabilitesine etkisi

Metal iyonlarının *B. pumilus* VLC7 selülaıı üzerine etkisi

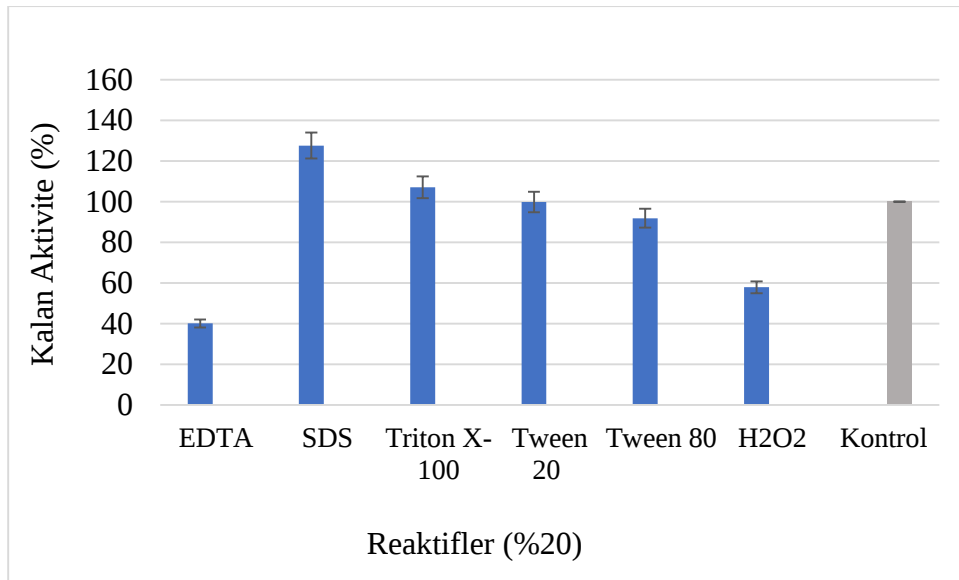
Selülaıı aktivitesine metal iyonlarının etkisini belirlemek amacıyla CuSO_4 , BaCl_2 , AgNO_3 , MnCl_2 , ZnCl_2 , CaCl_2 , FeCl_2 , $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 , MgCl_2 , NiCl_2 ve CoCl_2 bileşiklerinin 5 mM ve 10 mM'lık çözeltileri 50 mM glisin-NaOH (pH 9,0) tamponu içinde hazırlandı. Metal iyon ve enzim çözeltileri 1:1 oranında karıştırılarak 1 saat 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında enzim aktiviteleri kontrol numunesi dikkate alınarak ölçüldü ve bağıl aktiviteleri hesaplandı. Test edilen metal iyonları arasında Şekil 22'de de gösterildiğı gibi MnCl_2 'nin 5 ve 10 mM'lık konsantrasyonlarında enzim aktivitesini bir miktar artırdığı tespit edildi. Diğer iyonların ise enzim aktivitesini farklı oranlarda azalttığı, en yüksek düşüşün ise %39 kalan aktiviteyle 10 mM HgCl_2 'de gerçekleştiğı belirlendi.



Şekil 22. Selülaıı aktivitesi üzerine 5 ve 10 mM konsantrasyonlardaki metal iyonlarının etkisi

Reaktif maddelerin *B. pumilus* VLC7 selülaıı üzerine etkisi

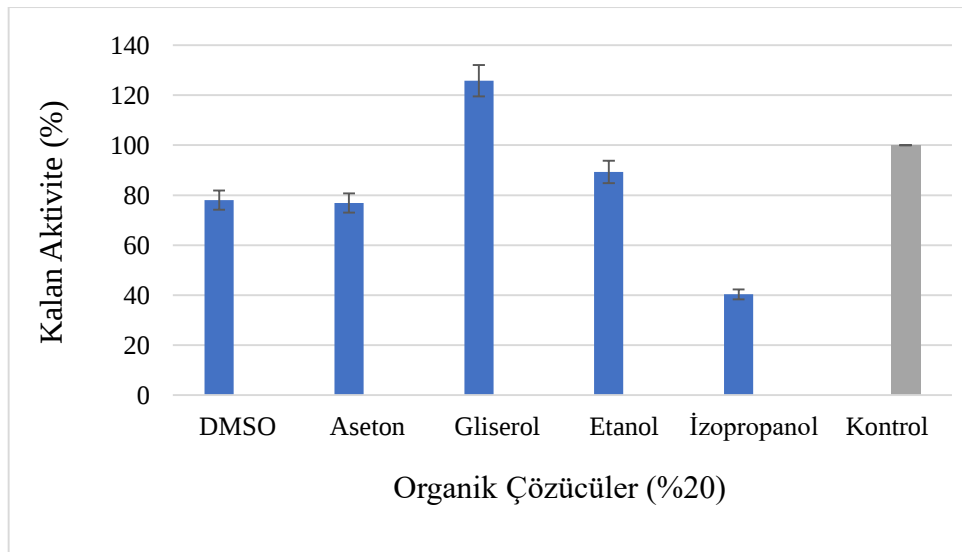
Selülaıı aktivitesine reaktiflerin etkisini belirlemek amacıyla EDTA, SDS, H_2O_2 , Tween 20, Triton X-100 ve Tween 80'in 50 mM glisin-NaOH (pH 9,0) tamponu eşliğinde %20'lik çözeltileri kullanıldı. Saf enzim örnekleri bu çözeltilerin içerisinde 1:1 oranında karıştırılıp 1 saat 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kontrol numunesi dikkate alınarak ölçüldü ve bağıl aktiviteleri hesaplandı. Süre sonunda Şekil 23'de de gösterildiğı gibi görelı enzim aktivitelerine bakıldığında EDTA (%40) ve H_2O_2 (%57) enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltırken, SDS (%127) ve Triton X-100 (%107)'ün enzim aktivitesini artırdığı, Tween 20 (%99,8) ve Tween 80'nin (%91) ise enzim aktivitesinin çok fazla etkilemediğı belirlendi.



Şekil 23. *B. pumilus* VLC7 selülaaz aktivitesi üzerine çeşitli reaktiflerin etkisi

Organik çözücü maddelerin *B. pumilus* VLC7 selülaazı üzerine etkisi

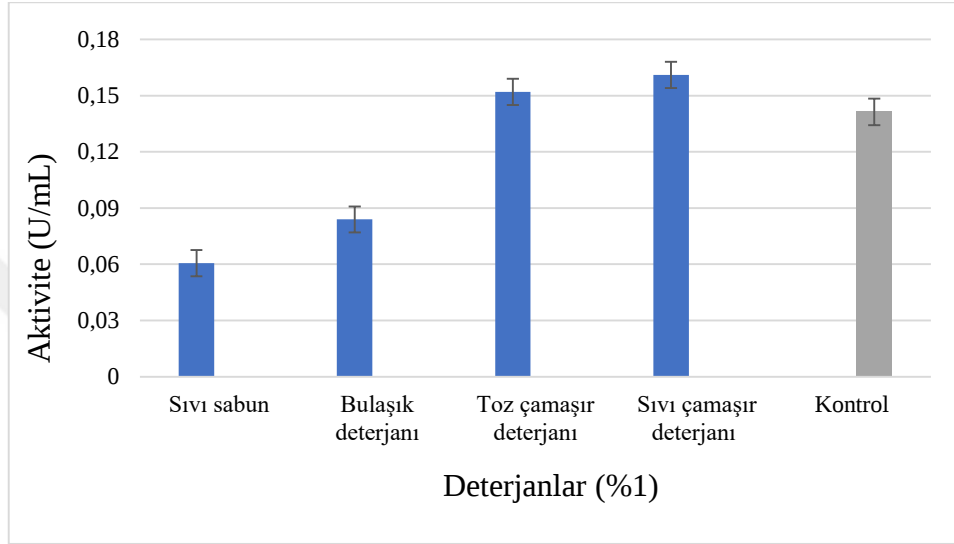
Selülaaz aktivitesi üzerine organik çözücü etkisini belirlemek amacıyla DMSO, gliserol, aseton, etanol ve izopropanol 50 mM Glisin-NaOH (pH 9,0) tamponu eşliğinde %20 olacak şekilde çözeltileri hazırlanarak enzim ile 1:1 oranında karıştırılıp 30 °C’de, 150 rpm’de 1 saat inkübe edildi. Sonrasında kontrol numunesine göre selülaaz aktiviteleri ölçülerek bağıl aktiviteleri belirlendi. Şekil 24’de de gösterilen göreceli aktivitelere bakıldığında izopropanol (%40) enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltırken, gliserol (%125)’ün enzim aktivitesini artırdığı, aseton (%76), etanol (%89) ve DMSO’nun (%78) ise enzim aktivitesini az da olsa azalttığı belirlendi.



Şekil 24. Selülaaz aktivitesi üzerine çeşitli organik çözücülerin (%20’lik) etkisi

Selülaz aktivitesi üzerine ticari deterjanların etkisi

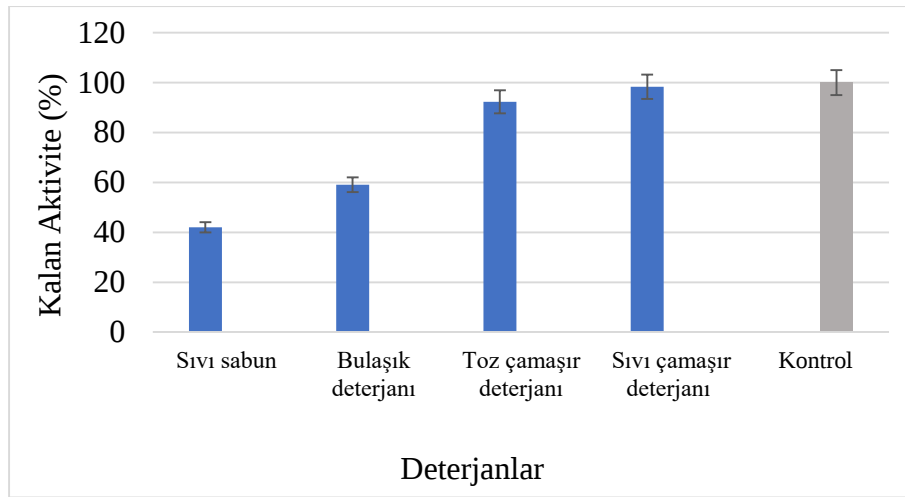
Selülaz aktivitesine ticari deterjanların etkisini belirlemek için %1'lik deterjan çözeltileri kullanıldı. Selülaz enzimi çözeltiler ile 1:1 oranında karıştırıldı ve standart koşullarda selülaz aktivite tayinleri gerçekleştirildi. Şekil 25'de verildiği gibi selülaz aktivitesinin sıvı çamaşır deterjanı (0,16 U/mL) ve toz çamaşır deterjanı varlığında kontrole göre arttığı belirlendi. Sıvı el yıkama sabunu ve bulaşık deterjanı varlığında ise aktivitede düşüş olduğu belirlendi.



Şekil 25. Ticari deterjanların *B. pumilus* VLC7 selülaz aktivitesine etkisi

Selülaz stabilitesi üzerine deterjanların etkisi

Deterjanların enzimin stabilitesi üzerine etkisini belirlemek için de %1'lik deterjan çözeltileri kullanıldı. Deterjan çözeltileri ile 1:1 oranında karıştırılan enzim örnekleri 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve sonra kontrol numunesine göre bağıl aktiviteleri hesaplandı. Şekil 26'da verilen göreceli aktivitelere bakıldığında sıvı çamaşır deterjanı (%98) ve toz çamaşır deterjanı (%92) varlığında enzimin kararlılığını büyük ölçüde koruduğu, bulaşık deterjanı (%59) ve sıvı sabun (%42) varlığında ise kararlılığında düşüş olduğu belirlendi.

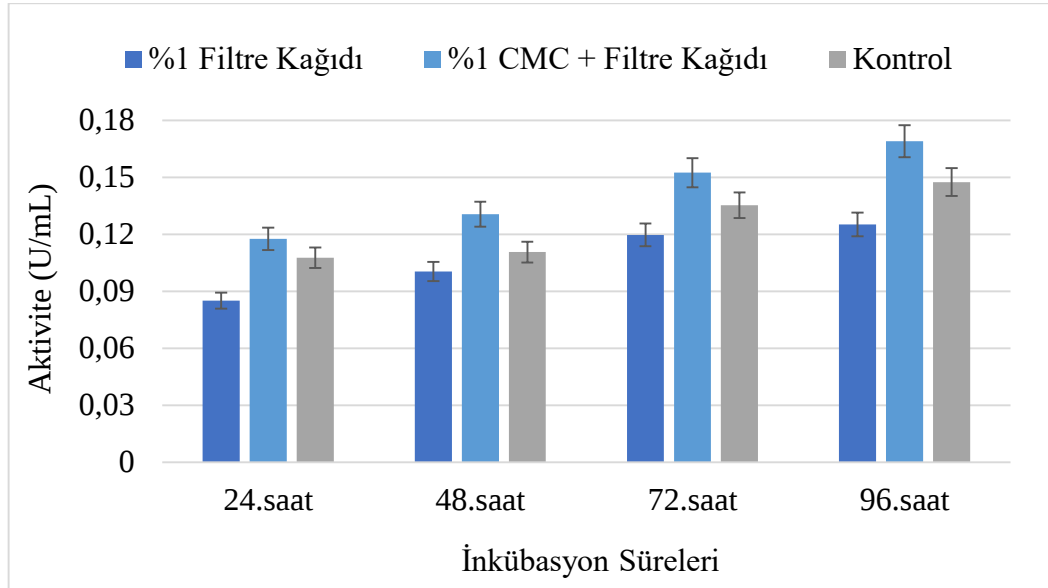


Şekil 26. Ticari deterjanların *B. pumilus* VLC7 selülaz stabilitesine etkisi

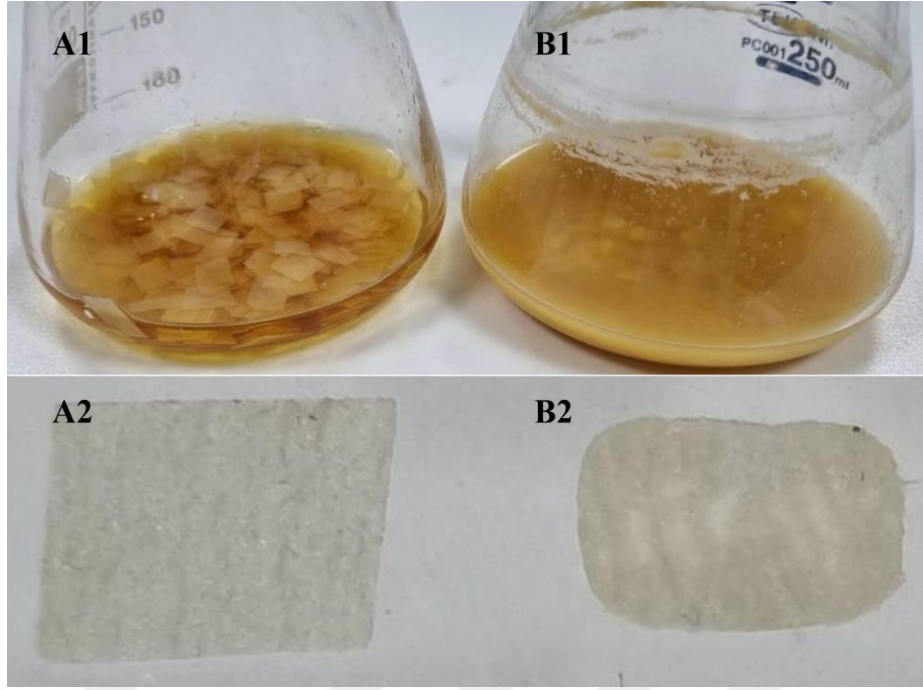
Enzimin biyoteknolojik uygulamaları

B. pumilus VLC7 selülazının kağıt parçalama özelliği

Selülazın kağıdı parçalama özelliği %1 oranında filtre kağıdı içeren ve %1 oranında filtre kağıdına ek olarak %1 CMC içeren ortamlarda araştırılmıştır ve sadece CMC içeren kontrol ile karşılaştırılmıştır. Şekil 27’de görüldüğü üzere sadece filtre kağıdı içeren ortamda selülaz aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Ancak CMC’ye ek olarak eklenen filtre kağıdının olduğu besiyerinde enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki ortamda da filtre kağıtlarının parçalandığı gözlemlenmiştir.



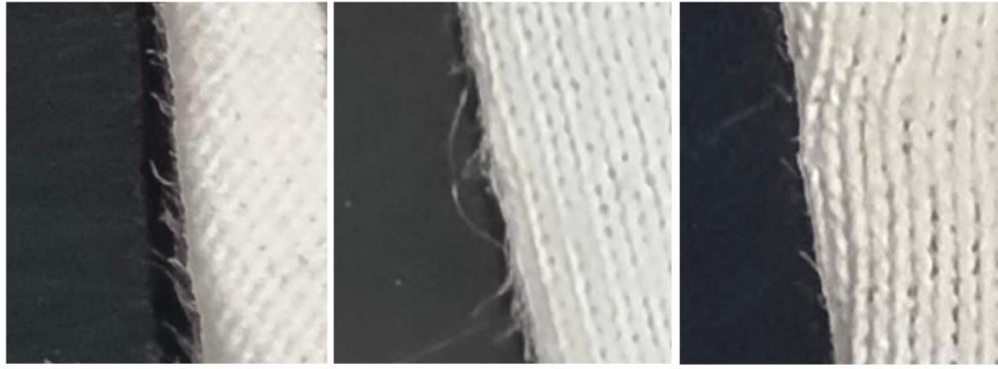
Şekil 27. Filtre kağıdı varlığında selülaz üretimi



Şekil 28. *B. pumilus* VLC7 selülazının kağıdı parçalama potansiyeli. %1 Whatman no.1 filtre kağıdı (0,75 × 0,75 cm) ve %1 CMC içeren CMC-B besi ortamlarının inkübasyon öncesi (A1) ve *B. pumilus* VLC7 ile 96 saatlik inkübasyonu sonrası (A2) görünümü. Filtre kağıtlarının inkübasyon öncesi (B1) ve inkübasyon sonrası (B2) görünümleri.

Selülazın kumaşda biyoparlatma etkisinin araştırılması

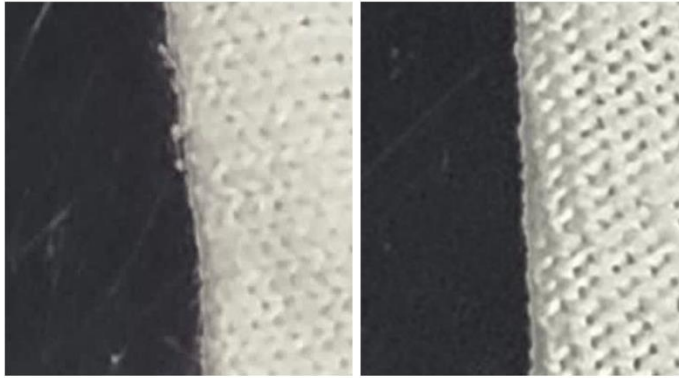
Selülazın yıpranmış kumaş yüzeyindeki tüylenmeyi azaltmak üzerine etkisini değerlendirmek için kültür süpernatantı içeriğine pamuklu kumaş parçaları eklenerek 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dk inkübe edildi. Sonrasında kumaş parçaları saf su ile yıkandı ve 60 °C etüvde kurutuldu. Şekil 29'dan da anlaşıldığı üzere kumaş yüzeyindeki tüylerde 30 dk sonra bile gözle görülür bir azalma olduğu, 30. dakikadan itibaren tüy gideriminin zamanla arttığı ve 120. dakikada tüylerin tamamen yok olduğu gözlemlendi.



Kontrol

30. Dakika

60. Dakika



90. Dakika

120. Dakika

Şekil 29. *B. pumilus* VLC7 selülaı ile farklı zaman aralıklarındaki inkübasyonunun kumaıdaki tüylenme üzerine etkisi

Selülaın kumaı boyası üzerine etkisinin araştırılması

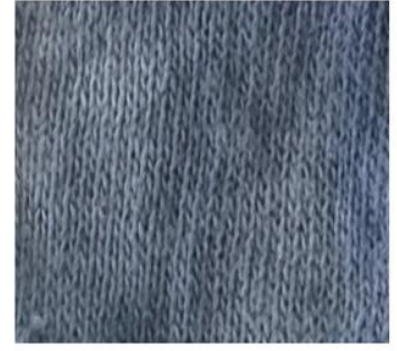
B. pumilus VLC7 selülaı ile kumaı boyası gideriminde indigo boyası kullanıldı. İndigo, alkali koşullar ile çözünür forma dönüştürüldü. Oda sıcaklığında 1 saat boyanan ve daha sonra oksitlenen kumaılar saf su ile durulandı ve yine oda sıcaklığında kurutuldu (Tayade ve Adivarekar, 2014). Enzim solüsyonunda farklı sürelerde inkübe edilen kumaı parçaları inkübasyon sonunda saf su ile yıkanarak kurutuldu. Şekil 30'dan anlaşıldığı üzere inkübasyon süresi arttıkça kumaılardan indigo boyanın giderimi gözle görülür derecede artmıştır. Bir saat sonunda bile boya gideriminin gerçekleştiğı, 20. saatte kumaıdaki boya gideriminin en fazla olduğı belirlenmiştir.



Kontrol



1. saat



3. saat



5. saat



15. saat



20. saat

Şekil 30. *B. pumilus* VLC7 selülaı ile farklı zaman aralıklarındaki inkübasyonun kumaştaki boya giderimi üzerine etkisi

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Küresel çapta, endüstriyel kullanım için üretilen enzimlerin yaklaşık olarak %40'ı ABD ve Japonya gibi ülkelerde, %60'ı Avrupa'da üretilir (Bhat, 2000). Günümüzde 200 enzim tanımlanmış olup sadece %10'u ticari olarak kullanılabilir. Endüstriyel alanlarda kullanılacak enzimlerin kolay, ucuz ve yüksek verimde üretilibilmelerine ek olarak ekstrem şartlarda stabilitelerini ve aktivitelerini korumaları da önem taşımaktadır. Farklı sıcaklıklarda ve pH'larda aktivite gösterebilen, yüksek toleransı olan enzimler endüstriyel kullanımlar için özellikle tercih edilen enzimlerdir.

Mikrobiyal enzimler hayvansal ve bitkisel enzimlere kıyasla daha stabil ve aktif olmaları sebebiyle tercih edilir (Anbu vd., 2017). Ayrıca mikrobiyal enzimlerin bitkisel veya hayvansal enzimlere göre katalitik aktivitelerinin yüksek olması, daha stabil olmaları ve istenmeyen yan ürün oluşturmamaları gibi avantajları vardır (Güven, 2011). Tutarlılık, maliyet, kısa sürede üretim, modifikasyon ve optimizasyonunun kolaylığı gibi avantajlardan dolayı da endüstriyel enzim üretimi için mikrobiyal kaynaklar tercih edilmektedir (Prakash ve Jaiswal, 2010).

Mikrobiyal enzimler gıda, kağıt, tekstil ve deterjan endüstrilerinde geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Endüstriyel önemlerinden dolayı, enzim üreticisi yeni bakteriyel suşların izolasyonu oldukça önemlidir (Ghorbel vd., 2009). *Bacillus* cinsine ait tür ve alttürler tarafından üretilen enzimler çeşitli sektörlerde yaygın olarak kullanılır. *Bacillus* cinsinden üretilen amilaz, selüloz, pektinaz ve proteazlar gibi çeşitli termostabil alkalın hidrolitik enzimler endüstriyel öneme sahip ekstraselüller enzimlerdir (Aygan vd., 2011).

Endüstriyel enzimlerin en büyük uygulama alanlarından biri deterjan katkısı olarak kullanılmasıdır (Kirk vd., 2002). Deterjan katkısı olarak kullanılan enzimler alkalın pH koşullarında aktivite ve stabiliteye sahip olmalıdırlar (Fujinami ve Fujisawa, 2010). Alkalın selülozlar, kumaşın interfibriler boşluklarındaki kir ve toprak parçalarını temizleyebilme özellikleri nedeniyle deterjanlarda kullanılan katkı maddelerindendir. Ayrıca, kumaşa bağlı selüloz atıklarının ve selüloz elyaflarının çıkıntılarını gidermesiyle kumaşa pürüzsüzlük ve parlaklık sağlar (Breen 1999). Bu bilgiler doğrultusunda tez kapsamında enzimin biyoteknolojik kullanım alanlarından deterjan sektöründeki etkisi de araştırılacaktır. Selüloz enzim kaynağı olarak, yüksek pH seviyeleri ile karakterize edilen ve organizmalar için ekstrem bir habitat olarak nitelendirilen Van Gölü'nden izolatlar elde edilmiştir. Örneklem lokasyonu olarak Van Gölü'nün seçilmesi, kendi kaynaklarımızdan yararlanarak özgün bir endüstriyel suş ya da ürün geliştirmeye yönelik bir çalışma olması açısından önem taşımaktadır. Van

Gölü’nden elde edilen izolatlar arasından en yüksek selülag üretim potansiyeline sahip V7 kodlu izolatin çalışmada selülag kaynağı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Biyoteknolojik kullanımı açısından ön bilgi sahibi olunması ve yapılan deneylerde kolaylık sağlaması amacıyla bu izolatu tanılamak için klasik ve moleküler yöntemler kullanılmış, izolat *B. pumilus* VLC7 olarak tanılanmıştır. *B. pumilus* türüne ait izolatlar pek çok habitatta geniş yayılım göstermektedir ve daha önce de derin deniz çökeltileri, toprak ve deniz suyu gibi çok çeşitli ortamlardan yaygın olarak izole edilmiş bir bakteridir (Pudova vd., 2022; Yakovleva vd., 2022; Zhang vd., 2022). Ancak Van Gölü’nden *B. pumilus* türü ilk kez bu çalışma kapsamında izole edilmiştir.

Yapılan klasik tanılama yöntemleriyle tespit edilen basil hücre morfolojisi ve krem rengi koloni morfolojisi, Gram-pozitif hücre duvar yapısı ve spor oluşturmaları gibi özelliklerinin yanısıra oksidaz ve katalaz pozitif; üreaz negatif olduğu daha önceki çalışmalarla da tespit edilmiştir (Menon vd., 2010; Dar vd., 2022). Ayrıca, *B. pumilus* VLC7’nin hemoliz, lipaz, proteaz, KOH, asperaginaz, D-xylose, maltoz, L-arabinoz, Myo-inositol pozitif; glutaminaz ve amilaz negatif olduğu belirlenmiştir.

Endüstriyel uygulamalarda enzimlerin kullanılması çevre dostu olmaları, biyo-bozunur ve biyo-yenilenebilir olmaları, çeşitli kimyasal süreçlere alternatif olması ve toksik kimyasal kullanımını azaltması gibi pek çok avantaj sağlamakla birlikte daha yaygın şekilde kullanımlarının önündeki en büyük engellerden biri enzimlerin yüksek maliyetli olmalarıdır. Enzim üretiminde kullanılan hammaddelerin yüksek maliyetli olması, yine saflaştırma işlemlerinin hem pahalı hem de meşakkatli olmaları ve üretim veriminin düşük olması enzimlerin kullanımını kısıtlayan faktörlerin başında gelmektedir. Bu nedenle, *B. pumilus* VLC7 ile selülag üretimini artırmak amacıyla üretim koşullarının optimize edilmesi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi ve sıcaklığı, başlangıç pH’sı, farklı karbon ve farklı azot kaynakları ve bunların konsantrasyonları belirlenerek daha yüksek verim elde edilmiştir. Mikrobiyal kültürlerde selülag üretimi organizmanın türü ve hatta suşuna, büyüme ortamının sıcaklığına, besiyeri bileşimindeki besin kaynakları ve konsantrasyonlarına, ortam pH’sı gibi pekçok parametreye bağlı olarak farklı sürelerde gerçekleşmektedir. *B. subtilis* SV1 ile yapılan bir çalışmada en fazla selülag üretimi 72. saat sonunda elde edilmiştir (Nargotra vd., 2016). Bir başka çalışmada, 9 bakteri izolatu CMC içeren agarda inkübe edilmiş ve 5 günlük inkübasyon sonrası selülagolitik zon tespit edilmiştir. En yüksek zon çapı *B. pumilus* EB3 ile elde edilmiştir. 24 saatin sonunda 0,079 U/mL olacak şekilde maksimum aktivite bulunmuş ve *B. pumilus* EB3’ün selülagı büyüme fazında ürettiği belirlenerek selülagın büyümeyle ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Ariffin vd., 2006). Örnek gösterilen çalışmalara benzer olarak CMC-A üzerinde *B. pumilus* VLC7 ile selülagolitik zon oluşumu 48 saatten sonra görülmeye başlanmıştır, CMC-B

sıvı besi ortamında ise 120 saat boyunca inkübe edilmiş ve maksimum selülaaz üretimi 96. saatte 0,079 U/mL ile elde edilmiştir.

B. pumilus VLC7 ile selülaaz üretimi için optimum sıcaklık ve pH değerleri de araştırılan parametreler arasındır. Enzim üretiminin optimum sıcaklığı 30 °C olarak belirlenmiştir. 25 °C ve 35 °C’de de üretimin çok düşük olmadığı belirlenmiştir. Oda sıcaklığına yakın bir değerde üremesi bakteriyi geliştirmek konusunda daha kolay bir yol izlenebileceğiyle ilgili bilgi vermiştir. Enzim üretimi için optimum pH değerlerinin pH 7,0 olduğu belirlenmiştir.

Hammadde olarak CMC’ye ek olarak glikoz, ksiloz, galaktoz ve melibioz (Liu vd. 2019) gibi pek çok hazır karbon kaynağının yanısıra filtre kağıdı, şeker kamışı küspesi ve buğday samanı gibi atık maddelerin (Malik ve Javed, 2021) selülaaz üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir. Örneğin; *Bacillus* sp. Y3’ten selülaaz üretim ortamında karbon kaynağı olarak pirinç kepeği, laktoz, glukoz, buğday kepeği ve CMC denenmiş maksimum aktivite CMC (4,49 IU/mL) varlığında belirlenmiştir (Lugani vd., 2015). Yine maksimum selülaaz üretimi *B. subtilis* ile %2 CMC varlığında elde edilmiştir (Asha ve Sakthivel, 2014). Bir başka örnekte *Fusarium oxysporum* ile maksimum selülaaz üretimi CMC varlığında elde edilmiştir (Ramanathan vd., 2010). Malik ve Javed (2021)’in de bildirdiği gibi selüloz üretimini indükleyen en iyi karbon kaynağı çoğu çalışmada CMC olarak bildirilmiştir (Muthuvelayudham ve Viruthagiri, 2010). *B. pumilus* VLC7 ile selülaaz üretimi için de farklı karbon kaynakları (laktoz, fruktoz, nişasta, sukroz, glikoz, selüloz, CMC, gliserol, sıvı yağ) arasından en yüksek verim literatürdeki çalışmalarla paralel olarak yine CMC varlığında gözlenmiştir. En düşük enzim üretimi ise glikoz varlığında elde edilmiştir.

Karbon kaynağı çeşidinin yanısıra, konsantrasyonunun da selülaaz üretiminde oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, *B. pumilus* VLC7 ile selülaaz üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılan CMC’nin optimum konsantrasyonu araştırılmış ve %4 CMC içeren besi ortamında maksimum verim elde edilmiştir. %4’lük CMC içeren besiyerinin vizkositesi inkübasyonun ilk günlerinde oldukça yüksek iken, ilerleyen inkübasyon günlerinde jel kıvamında olan besi ortamı CMC’nin üretilen selülaaz enzimi ile parçalanmasıyla sıvılaşmaya başlamıştır.

Mikrobiyal kültürlerde karbon kaynağı kadar azot kaynağı da hem enzim üretiminde hem de organizmaların gelişimlerinde oldukça büyük öneme sahiptir. Selülaaz üretiminde azot kaynağı olarak kazein, maya ekstraktı, pepton, jelatin, sığır eti ekstraktı gibi organik azot kaynakları ve potasyum nitrat, amonyum klorür, amonyum nitrat ve amonyum sülfat gibi inorganik azot kaynakları kullanılabilmektedir (Bai vd., 2012). *B. pumilus* EWBCM1 ile farklı azot kaynakları varlığında gerçekleştirilen selülaaz üretim çalışmalarında maksimum verim malt

ekstresi ile elde edilirken, en düşük üretim üre ve glisin varlığında elde edilmiştir (Shankar ve Isaiarasu, 2011). Bir başka çalışmada, *B. subtilis*'in selüloz üretim ortamına azot kaynağı olarak üre, potasyum nitrat, tripton, amonyum nitrat, maya özütü, amonyum sülfat, pepton, amonyum klorür eklenmiş ve maya özütü varlığında maksimum selüloz enzimi üretilmiştir (Asha ve Sakthivel, 2014). *B. subtilis* CB-2 ile maksimum selüloz üretimleri ise organik kaynaklardan maya özütü, inorganik kaynaklardan da amonyum sülfat varlığında gözlenmiştir (Waseem vd., 2014). Azot kaynağının çeşidi organizmanın türüne hatta suşuna göre değişiklik göstermekle birlikte genellikle organik azot kaynakları varlığında inorganik azot kaynaklarına kıyasla daha yüksek selüloz üretimi elde edilmektedir (Lugani vd., 2015). *B. pumilus* VLC7 ile selüloz üretiminde de benzer organik (pepton, triptone, maya özütü ve üre) ve inorganik azot kaynakları (NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 ve NH_4Cl) denenmiş ve literatürdeki pek çok çalışmayla uyumlu olarak en yüksek üretim maya özütü varlığında elde edilmiştir. En az verim alınan azot kaynağının tripton olduğu belirlenmiştir.

Karbon kaynaklarında olduğu gibi azot kaynaklarının çeşidine ek olarak konsantrasyonu da mikrobiyal kültürlerde önem teşkil etmektedir. En iyi azot kaynağı olarak seçilen maya özütü ile maksimum verim elde etmek amacıyla farklı konsantrasyonları denenmiş ve %3 ile %3,6 maya özütü içeren ortamlarda en yüksek selüloz üretimi elde edilmiştir. Üretim miktarları birbirine oldukça yakın olduğu için %3 maya özütü kullanımı uygun görülmüştür.

Tıp ve farmakoloji gibi spesifik hassas uygulama alanlarında yüksek saflıkta enzimlere ihtiyaç duyulurken, deterjan, tekstil, kağıt ve benzeri uygulama alanlarında saflaştırmanın yüksek maliyeti ve zorluğu nedeniyle kısmen saflaştırılmış ya da ham enzim kullanımı tercih edilmektedir. Ancak enzimlerin belirli endüstriyel uygulamalarda kullanılabilirliğini, biyokimyasal özellikleri ve stabilitesi gibi parametreler belirlemektedir. Enzimlerin özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları ise daha güvenilir olması için genellikle saf enzimle gerçekleştirilmektedir. Pek çok enzim gibi selüloz enzimlerin saflaştırılmasında da genellikle amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi sıklıkla tercih edilen yöntemler arasındadır (dos Santos vd., 2023; Shyaula vd., 2023). *B. pumilus* VLC7 selülozünün saflaştırma işleminde de amonyum sülfat çöktürmesi, iyon değişim kromatografisi ve ultrafiltrasyondan faydalanılmıştır.

Literatüre bakıldığında *Bacillus* türlerine ait selülozların sıklıkla 40-80 kDa aralığında moleküler ağırlıklara sahip olduğu görülmektedir. *B. vallismortis* (Gaur ve Tiwari, 2015) ve *Bacillus* sp. HSH-810'den (Kim vd., 2005) 80 kDa, *B. subtilis* 171ES'den (Msakni, 2020) 73

kDa moleküler ağırlığa sahip selülaazlar örnekler arasındadır. Ancak, moleküler ağırlıkları bakteri türlerine göre de büyük değişkenlik göstermektedir. Örneğin, *B. cereus*'dan 16.9 kDa'luk düşük moleküler ağırlıklı bir selülaaz bildirilmiştir (Nema vd., 2016). Bir başka çalışmada ise mutant *B. pumilus*'tan saflaştırılan enzimin SDS-PAGE ile 80 kDa, jel filtrasyon kromatografisi ile 170 kDa molekül ağırlığına sahip olduğu belirlenmiştir (Kotchoni vd., 2006).

Karakterizasyon çalışmalarında enzimin substratına olan ilgisinin belirlenmesinde K_m ve V_{max} kinetik sabitlerinin tayini gerçekleştirilmiştir. K_m değerinin düşük olması enzimin substratına olan afinitesinin fazla olduğu anlamına gelmektedir. Yapılan bir çalışmada *B. subtilis* 171ES selülaaz aktivitesi için substrat olarak CMC kullanılmış, V_{max} ve K_m kinetik değerleri ise sırasıyla 63,7 U/mL ve 0,0064 mM olarak bulunmuştur (Msakni, 2020). *Trichoderma viride* selülaaz aktivitesi için yine CMC substratına karşı K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 68 μ M ve 148 U/mL olarak bulunmuştur (Iqbal vd., 2011). Bir başka çalışmada *B. subtilis* suşundan elde edilen selülaza substrat olarak CMC kullanılmış, K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,996 mM ve 1,647 U/mL olarak belirlenmiştir (Malik ve Javed, 2021). *B. pumilus* VLC7 selülaazının CMC hidrolizindeki V_{max} değeri 0,160 U/mL ve K_m değeri 3,13 mM olarak belirlenmiştir.

Sonrasında enzim aktivitesi için optimum pH ve sıcaklık belirlenmiştir. *Bacillus* üyelerinden elde edilen selülaaz enzimleri için farklı sıcaklık ve pH optimum değerleri bildirilmiştir. *Bacillus* türlerinden izole edilen çoğu alkalın selülaazların 35-60 °C arasında optimum aktivite gösterdiği belirtilmiştir. Örneğin; *B. flexus* NT'den üretilen selülaaz enziminin optimum sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur (Trivedi vd., 2011b). Van Gölü çevresinden alınan toprak örneklerinden izole edilen halofilik *Bacillus*'lardan (Aygan ve Arıkan, 2008) ve *Bacillus sp.* P-5 izolatından (Aygan ve Battaloğlu, 2015) elde edilen selülaazların optimum aktivite gösterdiği sıcaklık 35 °C olarak bildirilmiştir. *B. subtilis*'den üretilip saflaştırılan enzimin 45 °C'de en fazla aktivite gösterdiği ve 35-75 °C aralığında stabilitesini koruduğu belirtilmiştir (Asha ve Sakthivel, 2014). *Bacillus sp.* HSH-810'den izole edilen selülaaz enziminin optimum aktivitesini 50 °C'de gösterdiği bulunmuştur (Kim vd., 2005). Örnek gösterilen çalışmalarla benzer şekilde *B. pumilus* VLC7 selülaazının optimum sıcaklığı 40 °C olup, 30 °C ve 50 °C'de de aktivitenin yine yüksek olduğu bulunmuştur. Enzimin 120 dk sonunda 25 °C'de %78 değerinde, 30 °C'de %79 değerinde, 40 °C'de %88 değerinde, 50 °C'de %85 değerinde ve 60 °C'de %67 değerinde stabilitesini koruduğu belirlenmiştir.

Van Gölü çevresi toprak örneklerinden izole edilen halofilik *Bacillus*'ların selülaaz enzimleri için optimum pH'nın 7,5 - 9,5 aralığında (Aygan ve Arıkan, 2008), *Bacillus sp.* P-5

selülaı için pH 6,0 - 10,5 aralığında (Aygan ve Battaloğlu, 2015), *Bacillus* PC-BC6 selülaı için pH 5,0-9,0 aralığında (Abdullah vd., 2016) ve *Bacillus* sp.VG1 selülaı için pH 9,0-10,0 aralığında olduğu belirlenmiştir (Singh vd., 2001). *B. flexus* NT'den üretilen selülaı enziminin ise optimum pH'sı 10,0 olarak bulunmuştur (Trivedi vd., 2011b). Yapılan bir başka çalışmada *B. subtilis*'den üretilip saflaştırılan enzimin pH 8,0'da en fazla aktivite gösterdiği ve stabilitesini pH 7,0-9,0 aralığında 30 dk boyunca %50 koruduğu belirlenmiştir (Asha ve Sakthivel, 2014). *B. licheniformis* tarafından üretilen CMCaz enziminin saflaştırılması sonrası optimum pH'sının 9 olduğu belirlenmiştir (Azadian vd., 2016). VLC7 selülaının pH profiline bakıldığında alkali bir gölden izole edildiği için beklendiği gibi optimum pH'sı 9,0 olarak belirlenmiştir. pH 8,0-11,0 aralığında ise stabilitesini %95'den fazla koruduğu, ancak en fazla pH 9,0'da stabil kaldığı belirlenmiştir. Yüksek pH'da aktivite göstermesi ve kararlılığını koruması, enzimin deterjan sanayisinde kullanılabileceği hakkında bilgi vermektedir.

Çeşitli metal iyonları (5 mM ve 10 mM), reaktifler (%20), organik çözücüler (%20) ve deterjanların (%1) *B. pumilus* VLC7 enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. *B. licheniformis* tarafından üretilen CMCaz enziminin saflaştırılması sonrası Ca^{+2} ve Cu^{+2} metal iyonları varlığında aktivitenin arttığı; Mg^{+2} ve Zn^{+2} varlığında aktivitenin az miktarda arttığı, Hg^{+2} ve Zn^{+2} varlığında aktivitenin önemli ölçüde azaldığı belirtilmiştir (Azadian vd., 2016). Peng vd. (2011) *Clostridium thermocellum* selülaı enziminin 1 mM Ca^{+2} , Mg^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} ve Sr^{+2} ile indüklendiğini, 1 mM Li^{+} , Zn^{+2} , Ni^{+2} ve Cu^{+2} ile enzim aktivitesinin önemli ölçüde değişmediğini belirtmişerdir. CaCl_2 , MgCl_2 , CoCl_2 metallerinin *Bacillus* sp. BK17 ve *Bacillus* sp. SU44 CMCaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerine bakıldığında, bu metallerden CaCl_2 ve MgCl_2 her iki enzim üzerinde de farklı oranlarda aktivatör etki gösterirken, CoCl_2 her iki enzim üzerinde de kontrol grubuna göre *Bacillus* sp. BK17 enzimi %2, *Bacillus* sp. SU44 enzimi için %5 inhibisyon etkisi göstermiştir (Sarıçam ve Baylan, 2023). *B. licheniformis* AU01'den izole edilmiş olan CMCaz enziminin 1 mM MnSO_4 varlığında %145, MgSO_4 varlığında %129 ve CaCl_2 varlığında %146 aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Enzim ayrıca 1 mM HgCl_2 varlığında %16 aktivite göstererek inhibe olmuştur (Annamalai vd., 2011). Bir başka çalışmada, *Bacillus* PCBC6 'nın selülaının metal iyonlarından Mn^{+2} varlığında aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Abdullah vd., 2016). Örnek gösterilen çalışmalara paralel olarak *B. pumilus* VLC7 selülaının aktivitesi Mn^{+2} iyonunun 5 mM'lık (%102) ve 10 mM'lık (%112) konsantrasyonlarında artış gösterirken, Mg^{+2} de de aktivitenin düşmediği (%100) fakat artış da göstermediği belirlendi. 10 mM Hg^{+2} varlığında ise kalan aktivitenin %39 olduğu ve selülaı aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. Genel olarak Hg^{+2} , diğer proteinlerde de olduğu gibi önemli kükürt içeren amino asit kalıntılarıyla etkileşimi nedeniyle etkili bir selülaı

inhibitörü gibi davranır bu nedenle aktiviteyi düşürür (Tejirian ve Xu, 2010). Selülaaz aktivitesinin Hg^{+2} iyonu tarafından inhibisyonunun, enzimdeki tiyol grupları, triptofan kalıntısı veya amino asit kalıntılarının karboksil grubu ile bağlanmasıyla ilişkili olabileceği rapor edilmiştir (Lusterio vd., 1992). Shafei vd. (2010), enzimin metal iyonları ile inhibe olmasını ise metallerin enzim aktif bölgesine bağlanarak aktiviteyi düşürmesi nedeni ile olabileceğini belirtmişlerdir.

Deterjan endüstrisinde kullanılacak olan selülaazların yüzey aktif maddeler gibi çeşitli deterjan bileşenlerine karşı da dayanıklı olması beklenir (Gaur ve Tiwari, 2015). Yapılan bir çalışmada *B. subtilis*'den üretilip saflaştırılan enzimin Triton X-100, Tween 20 ve SDS gibi yüzey aktif maddelerin varlığında aktivitesi artarken EDTA'nın aktiviteyi düşürdüğü belirtilmiştir. Bu durum enzimatik aktivite için iki değerlikli katyonun gerekliliğini göstermiştir (Asha ve Sakthivel, 2014). Bir başka çalışmada, *Bacillus* PC-BC6 'nın ürettiği selülaazın SDS varlığında aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Abdullah vd., 2016). *B. aquimaris*'ten saflaştırılan selülaaz enzimi EDTA varlığında %68 aktivite göstererek inhibe olmuştur. Enzim anyonik ve iyonik olmayan deterjanlarla muamele edildiğinde ise deterjanlar aktivatör olarak davranmışlardır. SDS ile %136, Triton X-100 ile %124, Tween-20 ile %109 ve Tween-80 ile %103 aktivite göstermiştir (Trivedi vd., 2011a). *B. pumilus* VLC7 suşundan üretilen selülaazın görece aktivitesi örnek gösterilen çalışmalarla paralel olarak SDS varlığında %127, Triton X-100 varlığında %107, Tween 20 varlığında %99,8, Tween 80 varlığında %91,8, H_2O_2 varlığında %57, EDTA varlığında %40 olarak belirlendi. Anyonik bir deterjan olan SDS varlığında yüksek artış gösterirken Triton X-100 varlığında da aktivitesinde artış olduğu belirlenmiştir. Şelatlayıcı ajan olan EDTA ve H_2O_2 varlığında ise aktivitede düşüş olduğu belirtilmiştir. Satheesh Kumar vd., (2010), EDTA ile inhibe olan enzimin metallo enzim (metala bağımlı) olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle elde edilen sonuçlara göre enzim, metallo enzimlerle benzerlik göstermektedir. SDS varlığındaki direnç ise enzimin deterjanlarda etkili bir katkı maddesi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Gaur ve Tiwari, 2015).

B. vallismortis RG-07'nin selülaazının aseton ile 24 saat ve metanol ile 48 saatlik inkübasyondan sonra selülaaz aktiviteleri sırasıyla 115,9 ve 131,9 şeklindedir. Etanol varlığında selülaazın kalan aktivitesi %88,2 olarak bulunmuştur (Gaur ve Tiwari, 2015). Organik çözücülerin varlığında *B. halodurans* CAS 1'den izole edilen selülaazın aktivitesinin arttığı ve organik çözücülere dayanıklı alkalın selülaaz olduğu bildirilmiştir (Annamalai vd., 2013). *B. pumilus* VLC7 suşundan üretilen selülaazın aktivitesinin gliserol varlığında artış gösterdiği (%125), izopropanol varlığında ise aktivitesinin düştüğü (%40) belirlendi. Etanol (%89), DMSO (%78) ve aseton (%76) varlığında ise enzim aktivitesinin bir miktar azaldığı belirlendi.

Enzim aktivitesinin organik çözücüler tarafından uyarılmasının, taşınan polar olmayan hidroforik çözücü kalıntılarının bir arayüz sağlamasından kaynaklanabileceğini, böylece enzimi açık bir yapıda tutarak uyarılmış aktivasyonla sonuçlanabileceği belirtilmiştir (Zaks ve Klivanov, 1988).

Sadhu vd. (2013b) ticari deterjanların varlığında bir *Bacillus* türüne ait selüloz ile %57-72 kalan aktiviteyi bildirmiştir. Yapılan bir çalışmada enzim, Ariel marka deterjan varlığında 65 °C'de 1 saat inkübasyon sonunda aktivitesini %89 korurken, Surf Excel (%80), Tide (%75), Fena (%68) ve Henko (%55,9) marka deterjanlarda farklı oranlarda stabilitesini koruyabilmiştir (Gaur ve Tiwari, 2015). *B. halodurans* CAS 1'den elde edilen saflaştırılmış selülozun, Rin (%85,33), Ariel (%76,67), Henk (%64,67) ve Tide (%80,33) gibi bazı ticari deterjanların varlığında aktivitesini yine farklı oranlarda koruduğunu bildirilmiştir (Annamalai vd., 2013). *B. pumilus* VLC7 suşundan üretilen selüloz da ticari deterjanlar varlığında stabilitesini korumuştur. Sıvı ve toz çamaşır deterjanı varlığında aktivitesinin arttığı ve yine bu deterjanlar varlığında stabilitesini büyük ölçüde koruduğu görülmüştür. Sıvı çamaşır deterjanı varlığında %98 oranında, toz çamaşır deterjanı varlığında %92 değerinde kararlılığını korurken, bulaşık deterjanı (%59) ve sıvı sabun (%42) varlığında stabilitesinde düşüş gözlemlenmiştir. Sıvı deterjanda dolgu maddeleri bulunmaz ve toz deterjana kıyasla daha az kimyasal bulunur; ayrıca sıvı deterjanın pH'sı toz deterjandan yüksek olduğu için aktivitesi daha fazla çıkmıştır. Sıvı el sabunu asidik yapıda olduğu için enzim aktivitesini düşürmüştür (Kuşçulu ve Cücer, 2009). Bu durumda selüloz deterjanlar ve oksitleyici maddeler varlığında stabilitesini koruduğu için ev tipi deterjanların formülasyonlarında potansiyel uygulamasını kanıtlar (Gaur ve Tiwari, 2015).

Çoğu deterjan üreticisi, kumaş bakımı ve kumaşların beyazlığının veya renk berraklığının korunması için farklı selüloz karışımları kullanmaktadır (Gurkok, 2019). Pamuk veya pamuk karışımlarından yapılmış giysilerin birkaç yıkamadan sonra, pamuk liflerinde mikrofibriller oluşur. Giysiler yavaş yavaş pürüzsüz görünümünü kaybeder ve kabarık görünür. Mikrofibriller ışığı dağıtır ve beyazlık grimsi renge dönüşür ve parlak renkler bulanık ve donuk görünür. Selülozlar bu çıkıntılı lifleri (tüyleri) pamuklardan veya sentetik liflerdeki diğer selüloz bölümlerinden çıkarır ve kumaşları pürüzsüzleştirir, parlaklığını artırır (Breen, 1999). Katı kirleri de temizleyerek leke ve tozların yeniden birikmesini önlerler (Rähse, 2014). Ayrıca selülozlar, mürekkep veya çamur gibi partiküllü kirlerin içindeki mikrofibrilleri uzaklaştırarak deterjanların etkinliğini artırır (Sukumaran vd., 2005). Kumaştaki esnekliğin iyileştirilmesi, yumuşaklığı, yıkamaya olan dayanıklılığının artırılması amacıyla da selüloz enzimi kullanılır (Doğan, 2015). Deterjan yapısına katılacak enzimlerin sahip olması gereken

özelliklerin başında alkali koşullara, deterjanların içeriğindeki surfaktanlar, hidrojen peroksit gibi ağartıcı kimyasallar, solventler ve diğer kimyasal maddelere dayanıklılığı gelmektedir. Bu nedenle de deterjan sektöründe kullanılacak alkali selüloz enzim kaynağı olarak en fazla çalışılan ve tercih edilen bakteriler *Bacillus* cinsine ait türlerdir.

Selülozın deterjan sanayisinde kullanılabilirliğini araştırma amaçlı alkalifilik *Bacillus* KSM-635 suşundan alkali selüloz saflaştırılmış ve deterjan sanayisi için uygunluğu gösterilmiştir (Ito, 1997). Aynı suşla gerçekleştirilen bir başka çalışmada *Bacillus sp.* KSM-635 suşundan alkali selüloz elde edilerek pamuklu kumaşlardaki kirleri uzaklaştırma potansiyeli çalışılmıştır (Hoshino vd., 2000). Selüloz enziminin pamuk ve viskon kumaşlardaki selüloz artığının yaş halde kumaşta kalma süresinin kumaşların yüzeylerindeki kısa lif çıkıntılarının görünümünü azalttığı belirlenmiştir (Körlü vd., 2008). *B. pumilus* VLC7 selülozünün da kumaş yüzeyindeki lif uçlarını uzaklaştırma potansiyeli ve deterjan sektöründe kullanılabilirliği incelenmiştir. Deterjanlar varlığında, özellikle de çamaşır deterjanları varlığında, aktivitesini ve stabilitesini koruduğu gösterilmiş olan *B. pumilus* VLC7 enzim preparasyonları ile muamele edilen kumaşlar mikroskopta görsel olarak incelenmiştir. Kumaş yüzeyindeki lif uçlarının uzaklaşması için 30. dakikadan itibaren kumaş yüzeyindeki liflerin azalmaya başladığı ve 120. dakikada tamamen yok olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla deterjan sektöründe kullanım potansiyeli olduğu aşikardır.

Yıpranmamış ve canlı renge sahip kot için, enzim ile yıkama işlemi denimlerin ömrünü uzatmak amacıyla önemlidir. İndigo renge boyanmış denim kumaşın yıkanmasında kullanılan enzimler denime eskimiş bir görüntü kazandırır. İndigo boya kumaşın yüzeyindedir ve selülozlar yüzeydeki lifleri kaldırarak beyaz ipliği ortaya çıkartır (Aggarwal vd., 2019; Islam, 2021; Arbab vd., 2022). Denim yüzeyindeki indigo boyanın “biyotaşlama” olarak adlandırılan işlemle selüloz tarafından gevşetildiği incelenmiştir (Periyasamy ve Venkatesan, 2019). Asidik selülozların pH 6,0’a çıktığında boya uzaklaştırma etkisi %40’ın altına düşerken, nötral selülozlarda pH 7,0 - 7,5 aralığında boya uzaklaştırma etkisi %90’ların üzerinde çıkar. Fakat nötral selülozlar daha uzun inkübasyon süresinde asidik selülozlardan daha az boya uzaklaştırırken tekrarlanabilirliği daha fazladır (Çetinaslan vd., 2013). *Thermomonospora sp.* tarafından üretilen alkalın selüloz ise denim giysilerin biyotaşlanmasında başarıyla kullanılmıştır (Anish vd., 2004). Taşla yıkama işleminde kumaştaki eskimiş görüntü elde edilir. Kumaşların makinede sürtünmesiyle eskitilmiş görüntü elde edilebilir ya da selüloz enzimi ile kimyasal olarak sağlanabilir. Bu görüntüyü elde etmek amacıyla sürtünmeyi daha etkili hale getirmek için ponza taşı da kullanılabilir. Daha eskimiş bir görüntü elde edilmek isteniyorsa taş ve enzim ile birlikte çalışılır. Bu şekilde indigo boyalı ürünleri grileştirir, maliyeti düşüktür ve

yıkama süresi kısadır (Çetiner, 2006). Ponza taşının yerini az miktarda enzim alabilir, bu da kullanımı kolaylaştırır. Biyotaşlama prosedürü denim kumaş bozulmasını, işleme makinesi aşınmasını ve ponza tozu üretimini azaltır (Rahman vd., 2020; Korsa vd., 2023). Ponza taşı yerine enzimlerin kullanılması çevre dostudur (Mevada vd., 2022). *B. pumilus* VLC7 selülaaz enziminin endüstriyel kullanım alanı olan boya giderimi işlemi de indigo boyası ile denenmiş olup, kumaştaki renk değişimi ve solüsyondaki renk değişiminin 1 saat sonunda bile boya gideriminin gerçekleştirildiğini ve 20. saatte kumaştaki boya gideriminin en fazla olduğu gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresi arttıkça boya gideriminin de artacağı gözlemlenmiştir. Bu durum maliyeti azaltmanın yanı sıra yıkanma süresini de kısaltacaktır.

Selülaaz enzimlerinin bir başka kullanım alanı olarak kağıt endüstrisine entegrasyonu, çevresel sürdürülebilirliğe ulaşma yolunda önemli bir adım teşkil eder. Selülaaz enzimleri, yüksek enerji ve kimyasal kullanılan proseslere olan bağımlılığı azaltarak yalnızca maliyet açısından fayda sağlamakla kalmaz, aynı zamanda kağıt üretiminin çevresel etkisini azaltmaya yönelik küresel çabaya da katkıda bulunur. Enzimlerin kağıt hamuru ve kağıt endüstrisinde uygulanması %20-40 enerji tasarrufu sağlar. Selülaaz enzimi odunsu hammaddenin rafine edilmesi ve öğütülmesi gibi mekanik hamurlaştırma işlemlerinde kullanılır. Rafinasyon sonucunda selülaazlar, yüksek miktarda ince, hacimli ve sertliğe sahip hamurların oluşmasına yol açar (Bhat, 2000). Atık kağıtlar da esas olarak %40-80 selüloz, %5-15 hemiselüloz ve az miktarda ligninden oluşur (Sun ve Cheng, 2002). Atık kağıdın selüloz içeriğinin sakkarifikasyonu, selülaaz üreten mikroorganizmaların ve bunların selülaaz enzimlerinin katılımına dayanır. Atık ofis kağıtlarının (waste office paper: WOP) bakteriler kullanılarak selüloolitik enzimlerin üretiminde kullanımına ilişkin raporlar sınırlıdır. Diğer yandan, fiziksel veya kimyasal ön işlemler olmadan kolayca sindirilebilen WOP'un selülaaz üretmek için kullanılması yalnızca üretim maliyetini düşürmekle kalmaz, aynı zamanda katı atıkların toprağı kirleten çöplüklere atılması sorununu da çözer (Lo vd., 2009; Wang vd., 2013; Brummer vd., 2014). Bu nedenle çevre dostu bir yöntem olup maliyeti ve çevresel kirliliğı azaltır. Bu kapsamda *B. pumilus* VLC7 selülaazının kağıt sanayisindeki kullanım potansiyelini araştırmak amacıyla CMC-B besiyeri içeriğine %1 oranında filtre kağıdı ve %1'lik karbon kaynağı CMC'ye ek olarak %1 oranında da filtre kağıt eklendi ve 4 gün boyunca enzim üretimi takip edildi. Yapılan çalışmada enzimin kağıdı parçalamada etkisi olduğu görüldü. Besiyeri içeriğinde toplamda %2 oranında karbon kaynağı olan (%1 CMC ve %1 filtre kağıdı bulunan) 24. saat (0,117 U/mL), 48. saat, (0,130 U/mL), 72. saat (0,152 U/mL), 96. saat (0,169 U/mL) olacak şekilde besiyerinin enzim aktivitesinin daha fazla olduğu belirlendi. Bu durumda kağıt atıkları substrat olarak kullanılmış olup çevre kirliliğini azaltıcı rol oynadığı kanıtlanmıştır.

Sonuçlar

1. Van Gölü izolatları arasında en geniş selülitik zon oluşturan V2, V3, V7, VS13, VS20 ve B6 kodlu izolatlar seçildi. V7 kodlu izolatın hem en geniş zonu oluşturduğu hem de en yüksek aktiviteyi gösterdiği tespit edildi.
2. V7 kodlu izolat klasik ve moleküler yöntemlerle *B. pumilus* VLC7 olarak tanılandı ve filogenetik ağacı oluşturuldu.
3. *B. pumilus* VLC7 bakterisinin krem renginde ve basil şekilde olduğu, Gram-pozitif, lipaz, katalaz, oksidaz, hemoliz, KOH, proteaz, asparaginaz, D-xylose, maltoz, L-arabinoz, Myo-inositol pozitif; glutaminaz, amilaz ve üreaz negatif olduğu belirlendi.
4. *B. pulimus* VLC7 bakterisinin en yüksek selülaz üretiminin 96 saatlik inkübasyon süresinde, 30 °C’de, pH 7,0’da, %3 maya özütü ve %4 CMC varlığında gerçekleştiği belirlendi.
5. *B. pulimus* VLC7selülazının moleküler ağırlığının 76 kDa, V_{max} ve K_m değerleri ise sırasıyla 0,160 U/mL ve 3,13 mM olarak belirlendi.
6. Enzim aktivitesi için optimum pH 9,0, optimum sıcaklık ise 40 °C olarak belirlendi. Çeşitli metal iyonları, reaktifler, organik çözücüler ve deterjanlar varlığında enzimin kararlılığı belirlendi.
7. *B. pulimus* VLC7 selülazının pamuklu kumaş yüzeyindeki tüylenmeyi gözle görülür şekilde azalttığı belirlendi.
8. *B. pulimus* VLC7 selülazının boya gideriminde kullanılabilirliği belirlendi.
9. *B. pulimus* VLC7 selülazının kağıdı parçalamada etkisinin olduğu görüldü.

KAYNAKÇA

- Abdullah, R., Zafar, W., Nadeem, M., Iqtedar, M., Kaleem A., Naz, S. (2016). Partial purification and characterization of cellulases produced by *Bacillus strain*. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(1): 11103-11109.
- Aehle, W. (2007). Enzymes in industry aroduction and applications. *Third, Completely Revised Edition*, 99-262.
- Aggarwal R, Dutta T, Sheikh J (2019) Extraction of amylase from the microorganism isolated from textile mill effluent vis a vis desizing of cotton. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 14: 100178.
- Ahmed, A., Aslam, M., Ashraf, M., ul-Hassan Nasim, F., Batool, K., Bibi, A. (2017). Microbial β -glucosidases: screening, characterization, cloning and applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 5: 57-73.
- Ahmed, A., & Bibi, A. (2018). Fungal cellulase; production and applications: minireview. *Journal of Health and Life Sciences*, 4(1): 19-36.
- Al-Kharousi, M. M., Sivakumar, N., & Elshafie, A. (2015). Characterization of cellulase enzyme produced by *Chaetomium sp.* isolated from books and archives. *EurAsian Journal of BioSciences*, 9.
- Anbu, P., Gopinath, S. C., Chaulagain, B. P., & Lakshmipriya, T. (2017). Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2016. *BioMed Research International*, 2017.
- Anish, R., Ahmad, A., Rao, M. B., Rahman, M. S., & Trivedi, C. (2004). A process for the biofinishing of denims in textile industry. *Indian Patent Application No, 1299*.
- Annamalai, N., Thavasi, R., Vijayalakshmi, S., & Balasubramanian, T. (2011). A novel thermostable and halostable carboxymethylcellulase from marine bacterium *Bacillus licheniformis* AU01. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27: 2111-2115.
- Annamalai, N., Rajeswari, M. V., Elayaraja, S., & Balasubramanian, T. (2013). Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate Polymers*, 94(1): 409-415.
- Arbab, S., Ullah, H., Khan, M. I., Khattak, M. N., Zhang, J., Li, K., & Hassan, I. U. (2022). Diversity and distribution of thermophilic microorganisms and their applications in biotechnology. *Journal of Basic Microbiology*, 62(2): 95-108.
- Ariffin, H., Abdullah, N., Umi Kalsom, M. S., Shirai, Y., Hassan, M. A. (2006). Production and characterisation of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal of Engineering and Technology*, 3(1): 47-53
- Asha, B.M., Sakthivel, N. (2014). Production, purification and characterization of a new cellulase from *Bacillus subtilis* that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent-tolerant properties. *Annals of Microbiology*, 64(4): 1839-1848.
- Aszalos, A. A. (1978). Classification of enzymes. New York, NY: Springer New York
In *Enzymes in Anesthesiology*, 71-88

- Aygan, A., Arikan, B. (2008). Amilaz selüloz ve ksilanaz üretebilen orta düzeyde halofil *Bacillus* sp. izolasyonu ve optimum üreme ve enzim sentezlerinin belirlenmesi. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 18(2): 1-11.
- Aygan, A., Karcioğlu, L., & Arikan, B. (2011). Alkaline thermostable and halophilic endoglucanase from *Bacillus licheniformis* C108. *African Journal of Biotechnology*, 10(5): 789-796.
- Aygan, A., Battaloğlu, G. (2015). Kahramanmaraş topraklarından izole edilen *Bacillus* sp. P-5 tarafından endoglukanaz üretimi, kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 11:11-20.
- Azadian, F., Badoei-dalfard, A., Namaki-Shoushtari, A., Hassanshahian, M. (2016). Purification and biochemical properties of a thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus licheniformis* AMF-07 and its application for hydrolysis of different cellulosic substrates to bioethanol production. *Molecular Biology Research Communications*, 5(3): 143-155.
- Bai, S., Ravi kumar, M., Mukesh kumar, D.J., Balashanmugam, P., Bala kumaran, M.D., Kalaichelvan, P.T. (2012). Cellulase production by *Bacillus subtilis* isolated from cow dung. *Scholars Research Library*, 4(1): 269-279.
- Bailey, D. A., & Lumsden, R. D. (1998). Direct effect of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens, Di dalam Harman GE, Kubicek CP, editor. *Trichoderma and Gliocladium*. Volume ke-2.
- Baker, R. A., & Wicker, L. (1996). Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 7(9): 279-284.
- Barragán, L. P., Buenrostro-Figueroa, J. J., González, C. A., & Marañón, I. (2016). Production, stabilization, and uses of enzymes from fruit and vegetable byproducts. In *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products* (pp. 271-286). Elsevier.
- Béguin, P., & Aubert, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(1): 25-58.
- Bhat, M. K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18(5): 355-383.
- Bhatia, S., & Bhatia, S. (2018). Introduction to enzymes and their applications. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology*, 2: 1-29.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Breen, A. (1999). Fungi in lignocellulose breakdown and bio pulping. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(3): 252-258.
- Brisman, J., & Belin, L. (1991). Clinical and immunological responses to occupational exposure to alpha-amylase in the baking industry. *Occupational and Environmental Medicine*, 48(9): 604-608.
- Brummer, V., Jurena, T., Hlavacek, V., Omelkova, J., Bebar, L., Gabriel, P., & Stehlik, P. (2014). Enzymatic hydrolysis of pretreated waste paper-Source of raw material for production of liquid biofuels. *Bioresource Technology*, 152: 543-547.
- Chen, L., Liu, Y., Wu, G., Veronican Njeri, K., Shen, Q., Zhang, N., & Zhang, R. (2016). Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiologia Plantarum*, 158(1): 34-44.

- Choudhury, A. K. R. (2020). Introduction to enzymes. In *Sustainable technologies for fashion and textiles* (pp. 75-90). Woodhead Publishing.
- Choudhury, P., & Bhunia, B. (2015). Industrial application of lipase: a review. *Journal of Biopharmaceutics Sciences*, 1(2): 41-47.
- Counotte, G. H., Prins, R. A. (1979). Calculation of K_m ve V_{max} from substrate concentration versus time plot. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(4): 758-760.
- Croos, A.M.B., Rajendran, S., Ranganathan, K. (2019). Isolation of a cellulase producing *Bacillus cereus* from cow dung and determination of the kinetic properties of the crude enzyme. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 47: 261-267.
- Çetinaslan, K., Mezarcıöz, S. & Çetiner, S., (2013). Yıkama İşleminin Denim Kumaşların Kopma ve Yırtılma Mukavemetine Etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1): 38-42.
- Çetiner, S., (2006). Seçilmiş Denim Kumaş ve Dikiş İpliklerinde Yıkama İşleminin Dikiş Performansı Üzerindeki Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı 48, Kahramanmaraş.
- Çiftçi, Y., Işık, M.A., Alkevli, T., Yeşilova, Ç. (2008). Van Gölü havzasının çevre jeolojisi. *Jeoloji Mühendisliği Dergisi*, 32(2): 45-77.
- Dadasoglu, F. (2016). The Effect of Volatile Oil and its extracts of Giant Fennel (*Ferula communis*) against Soft Rot (*Bacillus pumilus* isolates) *Journal of the Institute of Science and Technology*, 6(4): 83-90.
- Dadwal, A., Sharma, S., & Satyanarayana, T. (2021). Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188: 226-244.
- Dar, M. A., Syed, R., Pawar, K. D., Dhole, N. P., Xie, R., Pandit, R. S., & Sun, J. (2022). Evaluation and characterization of the cellulolytic bacterium, *Bacillus pumilus* SL8 isolated from the gut of oriental leafworm *Spodoptera litura*: An assessment of its potential value for lignocellulose bioconversion. *Environmental Technology & Innovation*, 27: 102459.
- de Souza Vandenberghe, L. P., Karp, S. G., Pagnoncelli, M. G. B., von Linsingen Tavares, M., Junior, N. L., Diestra, K. V., ... & Soccol, C. R. (2020). Classification of enzymes and catalytic properties. In *Biomass, biofuels, biochemicals* (pp. 11-30). Elsevier.
- de Souza, T. S., & Kawaguti, H. Y. (2021). Cellulases, hemicellulases, and pectinases: Applications in the food and beverage industry. *Food and Bioprocess Technology*, 14(8): 1446-1477.
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., & Dybek, B. (2022). Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1069053.
- Doğan, M. (2015). Yünlü kumaşın fiziksel özellikleri üzerine yeni izolat *Bacillus sp.* suşundan elde edilen proteaz enziminin etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Bursa.
- dos Santos, D. M. R. C., Albuquerque, F., Silva, T. P., Ferreira, A. N., Machado, S. S., da Luze, J. M. R., & Pereira, H. J. V. (2023). Production, Purification, Characterization, and Application of Halotolerant and Thermostable Endoglucanase Isolated from *Pycnoporus sanguineus*. *Waste and Biomass Valorization*, 1-12.
- Duran, K., Ekmakçı, A., Bahtiyari, M., & Perinçek, S. (2008). Selülaz enziminin selülozik esaslı kumaşlar üzerine etkisi. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 1.

- Ediz, N., & Beyatlı, Y. (2005). *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5: 1-22.
- Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. *Biomimetics*, 6(3): 44.
- Fujinami, S., & Fujisawa, M. (2010). Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes-past, present and future. *Environmental Technology*, 31(8-9): 845-856.
- Gado, H. M., Metwally, H. M., Soliman, H., Basiony, A. Z. L., El-Galil, E. R. (2007). Enzymatic treatments of bagasse by different sources of cellulase enzymes. In: *The 11th World Conference on Animal Nutrition*, 10: 607-613.
- Gaur, R., & Tiwari, S. (2015). Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnology*, 15(1): 1-12.
- Ghorbel, R. E., Maktouf, S., Massoud, E. B., Bejar, S., & Chaabouni, S. E. (2009). New thermostable amylase from *Bacillus cohnii* US147 with a broad pH applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157: 50-60.
- Gohel, H. R., Contractor, C. N., Ghosh, S. K., & Braganza, V. J. (2014). A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on carboxy methyl cellulose (CMC) agar plates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5): 261-6.
- Gouveia, I.C., Fiadeiro, J.M. and Queiroz, J.A. (2008). Combined bio-carbonization and dyeing of wool: a possibility using cell wall-degrading enzymes and 1:1 metal-complex dyes. *Engineering in Life Sciences*, 8: 250-259.
- Gurkok, S. (2019). Microbial enzymes in detergents: a review. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 10(9): 75-81.
- Gurkok, S., & Ozdal, M. (2021). Purification and characterization of a novel extracellular, alkaline, thermoactive, and detergent-compatible lipase from *Aeromonas caviae* LipT51 for application in detergent industry. *Protein Expression and Purification*, 180: 105819.
- Gutierrez-Manero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., & Talon, M. (2001). Development, growth and differentiation-The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2): 206-211.
- Güven, R. G. (2011). Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(1): 1-10.
- Hebeish, A., & Ibrahim, N. A. (2007). The impact of frontier sciences on textile industry. *Colourage*, 54(4): 41-55.
- Hiden, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Yano, S., Fang, X., Endo, T., & Sawayama, S. (2011). Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(2): 162-168.
- Hoshino, E., Chiwaki, M., Suzuki, A., & Murata, M. (2000). 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.
- Ismail, B., & Nielsen, S. S. (2010). Invited review: plasmin protease in milk: Current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 93(11): 4999-5009.

- Iqbal, H. M. N., Ahmed, I., Zia, M. A., & Irfan, M. (2011). Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2(3): 149-156.
- Ito, S., (1997). Alkaline cellulase from alkaliphilic *Bacillus*: Enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles*, 1: 61-66.
- Jahangeer, S., Khan, N., Jahangeer, S., Sohail, M., Shahzad, S., Ahmad, A., & Khan, S. A. (2005). Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. *Pakistan Journal of Botany*, 37(3): 739.
- Jeong, H., Choi, S. K., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2014). Genome sequence of the plant endophyte *Bacillus pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops. *Genome Announcements*, 2(5): 10-1128.
- Jian, S., Wenyi, T., & Wuyong, C. (2011). Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. *Journal of Cleaner Production*, 19(4): 325-331.
- Jo, K. I., Lee, Y. J., Kim, B. K., Lee, B. H., Chung, C. H., Nam, S. W., Kim, S. K., & Lee, J. W. (2008). Pilot-scale production of carboxymethylcellulase from rice hull by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13: 182-188.
- Jones, G. K., Hoo, Y., & Lee, K. (2017). Production technology of lactase and its application in food industry application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1: 4-6.
- Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Siika-Aho, M., & Viikari, L. (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40(11): 3519-3525.
- Juturu, V., & Wu, J. C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33: 188-203.
- Khan, M. N., Luna, I. Z., Islam, M. M., Sharmeen, S., Salem, K. S., Rashid, T. U., & Rahman, M. M. (2016). Cellulase in waste management applications. In *New And Future Developments In Microbial Biotechnology And Bioengineering* (pp. 237-256). Elsevier.
- Kim, J. Y., Hur S. H., & Hong J. H. (2005). Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Biotechnology Letters*, 27: 313-316.
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4): 345-351.
- Korsa, G., Konwarh, R., Masi, C., Ayele, A., & Haile, S. (2023). Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. *Annals of Microbiology*, 73(1): 13.
- Kotchoni, S. O., Gachomo, E. W., Omafuvbe, B. O., & Shonukan, O. O. (2006). Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(2): 286-92.
- Kotwal, S. M., & Shankar, V. (2009). Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*, 27(4): 311-322.
- Körlü, A. E., Duran, K., Bahtiyari, M. İ., & Perincek, S. (2008). The effects of cellulase enzymes on cellulosic fabrics. *Textile and Apparel*, 18(1): 35-41.
- Köse, O., Gökdere, F., & Tolluoğlu, D. (2005). Van Gölü havzasının genel tanıtımı. 12. *Ulusal Kil Sempozyumu*, 05-09.

- Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 1-10.
- Kuhner, M. K., & Felsenstein, J. (1994). A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 459-468.
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(4): 411-456.
- Kuşçulu, N. G., & Cücer, N. (2009). *Rhus coriaria* L.'nin Sıvı Sabun İçeriğindeki Önemi. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(2): 93-98.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Leggio, L. L., & Larsen, S. (2002). The 1.62 Å structure of *Thermoascus aurantiacus* endoglucanase: completing the structural picture of subfamilies in glycoside hydrolase family 5. *FEBS Letters*, 523(1-3): 103-108.
- Li, C., Yang, Z., Zhang, R. H. C., Zhang, D., Chen, S., & Ma, L. (2013). Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, 168(4): 470-477.
- Liu, H., Zeng, L., Jin, Y., Nie, K., Deng, L., & Wang, F. (2019). Effect of different carbon sources on cellulase production by marine strain *Microbulbifer hydrolyticus* IRE-31-192. *Applied biochemistry and Biotechnology*, 188: 741-749.
- Lo, Y. C., Saratale, G. D., Chen, W. M., Bai, M. D., & Chang, J. S. (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(6-7): 417-425.
- Lugani, Y., Singla, R., & Sooch, B. S. (2015). Optimization of cellulase production from newly isolated *Bacillus* sp. Y3. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 5(11): 1- 264.
- Lusterio, D. D., Suizo, F. G., Labunos, N. M., Valledor, M. N., Ueda, S., Kawai, S., & Ito, S. (1992). Alkali-resistant, alkaline endo-1, 4-β-glucanase produced by *Bacillus* sp. PKM-5430. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(10): 1671-1672.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., Van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3): 506-577.
- Ma, L., Lu, Y., Yan, H., Wang, X., Yi, Y., Shan, Y., & Lü, X. (2020). Screening of cellulolytic bacteria from rotten wood of Qinling (China) for biomass degradation and cloning of cellulases from *Bacillus methylotrophicus*. *BMC Biotechnology*, 20(1): 1-13.
- Malik, W. A., & Javed, S. (2021). Biochemical characterization of cellulase from *Bacillus subtilis* strain and its effect on digestibility and structural modifications of lignocellulose rich biomass. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9: 800265.
- Mawadza, C., Kaul, R. H., Zvauya, R., & Mattiason, B. (2000). Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology* 83: 177-187.
- Menon, G., Mody, K., Keshri, J., & Jha, B. (2010). Isolation, purification, and characterization of haloalkaline xylanase from a marine *Bacillus pumilus* strain, GESF-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15: 998-1005.
- Mevada, V. A., Beladiya, U. H., Gandhi, H. R., Mangrola, A. V., & Patel, R. K. (2022). Alkalophiles: Environmental distribution, taxonomy, physiology, bioenergetics,

- survival mechanism, and enzymes. In *Physiology, Genomics, and Biotechnological Applications of Extremophiles* (pp. 35-64). IGI Global.
- Miljković, V., Gajić, I., & Nikolić, L. (2021). Waste materials as a resource for production of CMC superabsorbent hydrogel for sustainable agriculture. *Polymers*, 13(23): 4115.
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- Msakni, S. (2020). Türkiye topraklarından izole edilmiş *Bacillus* sp. suşlarından selüloz enzim üretiminin taranması, besinsel optimizasyon, enzimin kısmi saflaştırılması, karakterizasyonu ve yünlü kumaştaki bitki atıklarının giderilmesinde etkinliği, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Bursa.
- Muñoz, I. G., Ubhayasekera, W., Henriksson, H., Szabó, I., Pettersson, G., Johansson, G., & Ståhlberg, J. (2001). Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CBH58) at 1.32 Å resolution and homology models of the isozymes. *Journal of Molecular Biology*, 314(5): 1097-1111.
- Murad, H. A., & Azzaz, H. H. (2010). Cellulase and dairy animal feeding. *Biotechnology*, 9(3): 238-256.
- Muthuvelayudham, R., & Viruthagiri, T. (2010). Application of central composite design based response surface methodology in parameter optimization and on cellulase production using agricultural waste. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 4(1): 12-19.
- Nargotra, P., Vaid, S., Bajaj, B. K. (2016). Cellulase production from *Bacillus subtilis* SV1 and its application potential for saccharification of ionic liquid pretreated pine needle biomass under one pot consolidated bioprocess. *Fermentation*, 2(4): 19.
- Nema, N., Alamir, L., & Mohammad, M. (2016). Partial purification and molecular weight determination of cellulase from *Bacillus cereus*. *International Food Research Journal*, 23(2): 894.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3): 548-572.
- Ozkocaman V., Ozcelik T., Ali R., vd. (2006) *Bacillus* spp. among hospitalized patients with haematological malignancies: clinical features, epidemics and outcomes. *Journal of Hospital Infection* 64(2): 169-76.
- Paulo, A. C., & Gubitz, G. M. (2003). Textile processing with enzymes. *CRC press, Cornwall, England*. Woodhead publishing. 29: 228
- Pandiarajan, J., & Revathy, K. (2020). Cellulolytic potential of gut bacterial biomass in silkworm *Bombyx mori*. *Ecological Genetics and Genomics*, 14: 100045.
- Pangsri, P., Wuttiornpun, T., & Songserm, W. (2021). Mannanase and cellulase enzyme production from the agricultural wastes by the *Bacillus subtilis* P2-5 strain. *Applied Science and Engineering Progress*, 14(3): 425-434.
- Peng, J., Wang, W., Jiang, Y., Liu, M., Zhang, H., & Shao, W. (2011). Enhanced soluble expression of a thermostable cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Escherichia coli*. *Current Microbiology*, 63: 523-530.
- Periyasamy, A. P., & Venkatesan, H. (2019). Eco-materials in textile finishing. *Handbook of ecomaterials*.

- Poyraz, N., & Mutlu, B. M. (2017). Alkaliphilic bacterial diversity of Lake Van/Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 10: 92-103.
- Prakash, O., & Jaiswal, N. (2010). α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160: 2401-2414.
- Pramono, H., Mariana, A., Ryandini, D., & Sudiana, E. (2021). Diversity of cellulolytic bacteria isolated from coastal mangrove sediment in Logending Beach, Kebumen, Indonesia. *Biodiversitas: Journal of Biological Diversity*, 22(4): 1869-1878.
- Preiss, L., Hicks, D. B., Suzuki, S., Meier, T., & Krulwich, T. A. (2015). Alkaliphilic bacteria with impact on industrial applications, concepts of early life forms, and bioenergetics of ATP synthesis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3: 75.
- Pudova, D. S., Toymentseva, A. A., Gogoleva, N. E., Shagimardanova, E. I., Mardanova, A. M., & Sharipova, M. R. (2022). Comparative genome analysis of two *Bacillus pumilus* strains producing high level of extracellular hydrolases. *Genes*, 13(3): 409.
- Rähse, W. (2014). Production of tailor-made enzymes for detergents. *ChemBioEng Reviews*, 1(1): 27-39.
- Rajoka, M. I., & Malik, K. A. (1997). Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Bioresource Technology*, 59: 21-27.
- Ramanathan, G., Banupriya, S., & Abirami, D. (2010). Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 69: 454-459.
- Ranganathan, S., Mahesh, S., Suresh, S., Nagarajan, A., Z. Sen, T., & M. Yennamalli, R. (2022). Experimental and computational studies of cellulases as bioethanol enzymes. *Bioengineered*, 13(5): 14028-14046.
- Rashid, S. S., Alam, M. Z., & Karim, M. I. A. (2009). Optimization of the nutrient suppliers for cellulase production with the basal medium palm oil mill effluent. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 3(12): 568-574.
- Ratnayake, R., Jayasekara, S. (2019). Microbial cellulases: an overview and applications. *Cellulose*, 22: 92.
- Reddy, K. V., Vijayalashmi, T., Ranjit, P., & Raju, M. N. (2018). Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from pulp and paper mill effluent contaminated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.
- Reimer, A., Landmann, G., & Kempe, S. (2009). Lake Van, eastern Anatolia, hydrochemistry and history. *Aquatic Geochemistry*, 15(1): 195-222.
- Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I., & Chambliss, G. H. (1998). *Bacillus*, Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, systematic, bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman. *Oxford University Press, Ninth Edition, New York*, 2: 5-193.
- Sadhu, S., & Maiti, T. K. (2013a). Cellulase production by bacteria: a review. *British Microbiology Research Journal*, 3(3): 235-258.
- Sadhu, S., Saha, P., Sen, S. K., Mayilraj, S., & Maiti, T. K. (2013b). Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *SpringerPlus*, 2(1): 1-10.
- Sarıçam, S., & Baylan, M. (2023). Selüloz enzimi üreten bakterilerin izolasyonu ve su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılabilirliğinin araştırılması. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2): 1543-1561.

- Satheesh Kumar, G., Chandra, M. S., Mallaiah, K. V., Sreenivasulu, P., & Choi, Y. L. (2010). Purification and characterization of highly thermostable α -amylase from thermophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15: 435-440.
- 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., Oxenboll, K. M., Wu, G. F., Pedersen, H. H., and Xu H. (2007). Industrial enzymes. *White Biotechnology*, 105:59-131.
- Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Shankar, T., Isaiarasu L. (2011). Cellulase production by *Bacillus pumilus* EWBCM1 under varying cultural conditions. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8(1): 40-45.
- Sharada, R., Venkateswarlu, G., Venkateswar, S., & Rao, M. A. (2014). Applications Of cellulases-Review. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 4(2).
- Shyaula, M., Regmi, S., Khadka, D., Poudel, R. C., Dhakal, A., Koirala, D., & Maharjan, J. (2023). Characterization of thermostable cellulase from *Bacillus licheniformis* PANG L isolated from the Himalayan Soil. *International Journal of Microbiology*, 2023.
- Singh, J., Batra, N., & Sobti, R. C. (2001). A highly thermostable, alkaline CMCase produced by a new isolated *Bacillus sp.* VG1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 17: 761-765.
- Singh, J., Batra, N., & Sobti, R. C. (2004). Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, *Bacillus sphaericus* JS1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31(2): 51-56.
- Souza, P. M. D., & Magalhães, P. D. O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry- A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 850-861.
- Sukumaran R. K., Singhanian R. R., & Pandey A. (2005). Microbial cellulases production, applications and challenges. *Journal of Scientific And Industrial Research*, 64: 832-844.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1): 1-11.
- Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P. K., Singh, P., & Ramteke, P. W. (2015). Application of cellulases in biofuels industries: an overview. *Journal of Biofuels Bioenergy*, 1(1): 55-63.
- Tao, Z., Dong, B., Teng, Z., & Zhao, Y. (2020). The classification of enzymes by deep learning. *IEEE Access*, 8: 89802-89811.
- Tayade, P. B., & Adivarekar, R. V. (2014). Extraction of indigo dye from *Couroupita guianensis* and its application on cotton fabric. *Fashion and Textiles*, 1:1-16.
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*, 15(5): 160-167.
- Tejirian, A., & Xu, F. (2010). Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23): 7673-7682.
- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011a). Solvent tolerant marine bacterium *Bacillus aquimaris* secreting organic solvent stable alkaline cellulase. *Chemosphere*, 83(5): 706-712.

- Trivedi, N., Gupta, V., Kumar, M., Kumari, P., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011b). An alkali-halotolerant cellulase from *Bacillus flexus* isolated from green seaweed *Ulva lactuca*. *Carbohydrate Polymers*, 83(2): 891-897.
- Tsudome, M., Tachioka, M., Miyazaki, M., Tsuda, M., Takaki, Y., & Deguchi, S. (2023). *Marinagarivorans cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the deep-sea off Noma-misaki, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 73(3): 005748.
- Turnbull, P. C. B. (1996). *Bacillus*: Barron's medical microbiology. *University of Texas Medical Branch*.
- Turner, B. L., Hopkins, D. W., Haygarth, P. M., & Ostle, N. (2002). β -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology*, 20(2): 157-162.
- Voget, S., Steele, H. L., Streit, W. R. (2006). Characterization of metagenome-derived halotolerant cellulase. *Journal Biotechnology* 126(1): 26-36.
- Wang, G., Zhang, X., Wang, L., Wang, K., Peng, F., & Wang, L. (2012). The activity and kinetic properties of cellulases in substrates containing metal ions and acid radicals. *Advances in Biological Chemistry*, 2(04): 390-395.
- Wang, L., Sharifzadeh, M., Templer, R., & Murphy, R. J. (2013). Bioethanol production from various waste papers: economic feasibility and sensitivity analysis. *Applied Energy*, 111: 1172-1182.
- Wang, Y. C., Hu, H. F., Ma, J. W., Yan, Q. J., Liu, H. J., & Jiang, Z. Q. (2020). A novel high maltose-forming α -amylase from *Rhizomucor miehei* and its application in the food industry. *Food Chemistry*, 305: 125447.
- Waseem, I., Gulsher, M., Choudhry, S. (2014). Cellulase production from newly isolated bacterial strains from local habitat. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(8): 1454-1459.
- Wiseman, A. (1987). The application of enzymes in industry. *Handbook of Enzymes Biotechnology*, 2nd ed., Horwood, Chichester, 274-373.
- Yadav, V. K., Singh, V., & Mishra, V. (2019). Alkaline protease: a tool to manage solid waste and its utility in detergent industry. *Microbial Genomics in Sustainable Agroecosystems*, 2: 231-254.
- Yakovleva, G., Kurdy, W., Gorbunova, A., Khilyas, I., Lochnit, G., & Ilinskaya, O. (2022). *Bacillus pumilus* proteome changes in response to 2, 4, 6-trinitrotoluene-induced stress. *Biodegradation*, 33(6): 593-607.
- Yousef, N. M., & Mawad, A. M. (2023). Characterization of thermo/halo stable cellulase produced from halophilic *Virgibacillus salarius* BM-02 using non-pretreated biomass. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1): 22.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1988). Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry*, 263(7): 3194-3201.
- Zang, Y. H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(7): 797-824.
- Zemek J., Augustin J., Borris R., Kuniak L., Svaboa M., Pacova. (1981). Polysaccharide-hydrolyzing enzymes in the genus *Bacillus*. *Folia Microbiology*, 26: 403 407.

- Zhang C., Xing x. H., & Liu M. S. (2004). 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*, 19:181-187.
- Zhang, Q., Lin, Y., Shen, G., Zhang, H., & Lyu, S. (2022). Siderophores of *Bacillus pumilus* promote 2-keto-L-gulonic acid production in a vitamin C microbial fermentation system. *Journal of Basic Microbiology*, 62(7): 833-842.
- Zhang, T., Wei, S., Liu, Y., Cheng, C., Ma, J., Yue, L., & Lu, Z. (2023). Screening and genome-wide analysis of lignocellulose-degrading bacteria from humic soil. *Frontiers in Microbiology*, 14.
- Zoppas, F.M., Meneguzzi, A., & Tramontina, F. (2013). Alternatives for cellulase production in submerged fermentation with agroindustrial wastes. *International Journal of Modern* 3: 2374-2381



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Aysun Ayşe YILMAZ
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	
Lisans:	
Yüksek lisans:	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	