



**T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**SELÜLOTİK ATIKLARDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus cereus*  
BAKTERİSİ TARAFINDAN ÜRETİLEN SELÜLAZ ENZİMİNİN  
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

**HATİCE ELİF IŞIK BİÇEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. SERPİL UĞRAŞ**

**DÜZCE, 2022**

T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SELÜLOTİK ATIKLARDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus cereus*  
BAKTERİSİ TARAFINDAN ÜRETİLEN SELÜLAZ ENZİMİNİN  
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

Hatice Elif IŞIK BİÇEN tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından  
Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK  
LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Baki ÇİÇEK

Balıkesir Üniversitesi

Doç. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 30/05/2022

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

30 Mayıs 2022

Hatice Elif IŞIK BİÇEN

## **TEŐEKKÖR**

Yüksek lisans tezimin hazırlanmasında gösterdiği her türlü destek, yardımları ve her alanda bilgi bırıkımı benimle paylaşımlarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yaşamın her alanında bana desteğini esirgemeneyen sevgili eşim Mesut BİÇEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, DÜ.BAP-2021.05.01.1150 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

**30 Mayıs 2022**

**Hatice Elif IŞIK BİÇEN**

# İÇİNDEKİLER

|                                                                          | <u>Sayfa No</u> |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| TEŞEKKÜR.....                                                            | IV              |
| İÇİNDEKİLER.....                                                         | V               |
| ŞEKİL LİSTESİ.....                                                       | VIII            |
| ÇİZELGE LİSTESİ.....                                                     | IX              |
| KISALTMALAR.....                                                         | X               |
| SİMGELER .....                                                           | XI              |
| ÖZET .....                                                               | XII             |
| ABSTRACT .....                                                           | XIII            |
| 1. GİRİŞ .....                                                           | 1               |
| 1.1. ENZİMLER.....                                                       | 2               |
| 1.1.1. Enzimlerin Genel Karakterleri.....                                | 2               |
| 1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması.....                                 | 2               |
| 1.1.3. Enzim Aktivitesi.....                                             | 2               |
| 1.1.4. Enzim Kinetiği.....                                               | 3               |
| 1.2. MİKROBİYAL ENZİMLER.....                                            | 5               |
| 1.3. SELÜLAZ ENZİMİ.....                                                 | 6               |
| 1.4. AMAÇ .....                                                          | 10              |
| 2. MATERYAL VE YÖNTEM.....                                               | 11              |
| 2.1. SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU .....                 | 11              |
| 2.2. İZOLATLARIN SELÜLAZ ÜRETME POTANSİYELLERİNİN<br>ARAŞTIRILMASI ..... | 11              |
| 2.3. SELÜLAZ ÜRETİMİNİN KANTİTATİF TAYİNİ.....                           | 12              |
| 2.3.1. Glukoz Standart Eğrisi ve Enzim Aktivitesi Hesabı .....           | 13              |
| 2.4. SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU ....               | 14              |
| 2.4.1. Enzim Üretimine Azot (N) Kaynağının Etkisi .....                  | 14              |
| 2.4.2. Enzim Üretimine pH'nın Etkisi.....                                | 15              |
| 2.4.3. Enzim Üretimine Sıcaklık ve Sürenin Etkisi.....                   | 15              |
| 2.5. ORTAM KOŞULLARININ SELÜLAZ ENZİMİ AKTİVİTESİNE ETKİSİ<br>.....      | 15              |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.1. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi .....                             | 15 |
| 2.5.2. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi.....                        | 16 |
| 2.5.3. pH Stabilitesinin Belirlenmesi .....                                | 16 |
| 2.5.4. Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi.....                           | 16 |
| 2.6. SELÜLAZ ENZİM KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ .....                          | 17 |
| 2.7. SELÜLAZ ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI .....                         | 17 |
| 2.8. PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ.....                                  | 18 |
| 2.9. ENZİMİN MOLEKÜLER AĞIRLIĞININ BELİRLENMESİ.....                       | 19 |
| 2.9.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE).. | 19 |
| 2.9.2. SDS-PAGE jelinin hazırlanması.....                                  | 20 |
| 2.9.3. Örneklerin hazırlanması ve elektrophorez koşulları.....             | 21 |
| 2.9.4. Boyama ve boyanın uzaklaştırılması .....                            | 21 |
| 2.9.5. Native-PAGE ve Zimogram Analizi.....                                | 22 |
| 2.10. SELÜLAZ ÜRETİCİ İZOLATIN TANIMLANMASI .....                          | 22 |
| 2.10.1. Morfolojik Tanımlama .....                                         | 22 |
| 2.10.2. Biyokimyasal Tanımlama .....                                       | 23 |
| 2.10.3. Moleküler tanımlama .....                                          | 23 |
| 2.10.3.1. Bakteri Teşhisi için DNA İzolasyonu .....                        | 23 |
| 2.10.3.2. Agaroz jel elektrophorezi.....                                   | 24 |
| 2.10.3.3. 16S rRNA Dizisinin Belirlenmesi.....                             | 24 |
| 2.10.4. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin Analizi .....                   | 25 |
| 2.10.5. Filogenetik Ağaç Tasarımı .....                                    | 26 |
| 3. BULGULAR.....                                                           | 27 |
| 3.1. SELÜLAZ ÜRETİCİ BAKTERİLERİN BELİRLENMESİ.....                        | 27 |
| 3.2. SELÜLAZ ÜRETİCİ BAKTERİYAL İZOLATIN TANIMLANMASI .....                | 28 |
| 3.3. FİLOGENETİK AĞAÇ OLUŞTURULMASI .....                                  | 30 |
| 3.4. SELÜLAZ ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU.....                        | 30 |
| 3.4.1. Selülaz Üretimine Azot (N) Kaynaklarının Etkisi .....               | 30 |
| 3.4.2. Selülaz Üretimine pH'nın Etkisi.....                                | 31 |
| 3.4.3. Selülaz Üretimine Sıcaklık Ve Sürenin Etkisi.....                   | 31 |
| 3.5. SELÜLAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU .....                              | 32 |
| 3.5.1. Sıcaklık ve Sıcaklık Stabilitesi.....                               | 32 |
| 3.5.2. pH ve pH Stabilitesi .....                                          | 33 |

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.6. SELÜLAZ ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI .....                                             | 34 |
| 3.7. ENZİM KİNETİĞİNİN HESAPLANMASI .....                                                      | 35 |
| 3.8. ENZİMİN MOLEKÜLER AĞIRLIĞININ BELİRLENMESİ.....                                           | 37 |
| 4. TARTIŞMA .....                                                                              | 38 |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                                                  | 42 |
| 6. KAYNAKLAR .....                                                                             | 43 |
| 7. EKLER.....                                                                                  | 49 |
| 7.1. EK 1: <i>BACILLUS CEREUS</i> DU-1 İZOLATINA AİT 16S RDNA’NIN<br>KISMİ SEKANS DİZİSİ ..... | 49 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                 | 50 |



## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                             | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Şekil 1.1. Michaelis-Menten grafiği ve denklemi.....                        | 3                      |
| Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği ve denklemi.....                         | 4                      |
| Şekil 1.3. Lignoselüloz. ....                                               | 6                      |
| Şekil 1.4. Selülozun genel yapısı. ....                                     | 7                      |
| Şekil 1.5. Selülozun enzimatik parçalanması. ....                           | 8                      |
| Şekil 2.1. Şeker konsantrasyonu ile renk değişimi. ....                     | 12                     |
| Şekil 2.2. DNS yönteminin etki mekanizması. ....                            | 13                     |
| Şekil 2.3. Glukoz standart grafiği. ....                                    | 14                     |
| Şekil 2.4. Protein standart grafiği. ....                                   | 19                     |
| Şekil 3.1. Kalitatif selülaz aktivite tayininde zon oluşumu. ....           | 28                     |
| Şekil 3.2. Bakteriyal izolat DU-1 ( <i>Bacillus cereus</i> ). ....          | 29                     |
| Şekil 3.3. PCR profili.....                                                 | 29                     |
| Şekil 3.4. Maksimum parsimoni yöntemiyle moleküler filogenetik analiz. .... | 30                     |
| Şekil 3.5. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi. ....                 | 32                     |
| Şekil 3.6. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi. ....                     | 33                     |
| Şekil 3.7. Michaelis-Menten grafiği. ....                                   | 36                     |
| Şekil 3.8. Lineweaver-Burk grafiği. ....                                    | 36                     |
| Şekil 3.9. Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi. ....                 | 37                     |

## ÇİZELGE LİSTESİ

|                                                                               | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Çizelge 2.1. Deneyde kullanılan enzim üretim besiyerleri. ....                | 11                     |
| Çizelge 2.2. SDS-PAGE’te kullanılan çözeltiler. ....                          | 19                     |
| Çizelge 2.3. SDS-PAGE işlemi için hazırlanan jel içerikleri. ....             | 21                     |
| Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan primerler. ....                             | 25                     |
| Çizelge 2.5. Polimer zincir reaksiyonu içeriği. ....                          | 25                     |
| Çizelge 2.6. PCR koşulları. ....                                              | 25                     |
| Çizelge 3.1. Selüloz üretici bakterilerin kalitatif tayini. ....              | 27                     |
| Çizelge 3.2. Kantitatif enzim aktivitesi. ....                                | 28                     |
| Çizelge 3.3. Farklı azot kaynaklarının enzim aktivitesine etkisi. ....        | 31                     |
| Çizelge 3.4. Sıcaklık ve sürenin enzim aktivitesine etkisi. ....              | 31                     |
| Çizelge 3.5. Sıcaklık ve sürenin enzim aktivitesine etkisi. ....              | 32                     |
| Çizelge 3.6. Sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi. ....                      | 33                     |
| Çizelge 3.7. pH’nın enzim stabilitesine etkisi. ....                          | 34                     |
| Çizelge 3.8. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi. .... | 34                     |
| Çizelge 3.9. Selüloz enziminin kısmi saflaştırılma özeti. ....                | 35                     |

## KISALTMALAR

|                     |                                                       |
|---------------------|-------------------------------------------------------|
| <i>Bacillus</i> sp. | <i>Bacillus</i> species                               |
| dH <sub>2</sub> O   | Distile su                                            |
| DNA                 | Deoksiribonükleik Asit                                |
| DNS                 | Dinitrosalisilik Asit                                 |
| TRIS                | Hidroksimetil aminometan                              |
| CMC                 | Karboksimetil Selüloz                                 |
| NA                  | Nutrient Agar                                         |
| OD                  | Optical Density                                       |
| PCR                 | Polymerase Chain Reaction                             |
| RNA                 | Ribonükleik Asit                                      |
| rDNA                | Ribozomal DNA                                         |
| SDS-PAGE            | Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi |
| NaCl                | Sodyum klorür                                         |
| Taq                 | <i>Thermus aquaticus</i>                              |
| TE                  | Tris EDTA                                             |

## SİMGELER

|     |                         |
|-----|-------------------------|
| °C  | Derece celsius          |
| V   | Enzimin Reaksiyon hızı  |
| g   | Gram                    |
| IU  | International Unit      |
| kDa | Kilodalton              |
| L   | Litre                   |
| Km  | Michaelis-Menten sabiti |
| µg  | Mikrogram               |
| µl  | Mikrolitre              |
| mL  | Mililitre               |
| mM  | Milimolarite            |
| M   | Molarite                |
| nm  | Nanometre               |
| rpm | Revolution per minute   |
| [S] | Substrat Konsantrasyonu |
| U   | Ünite                   |
| %   | Yüzde                   |

## ÖZET

### SELÜLOTİK ATIKLARDAN İZOLE EDİLEN *Bacillus cereus* BAKTERİSİ TARAFINDAN ÜRETİLEN SELÜLAZ ENZİMİNİN BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

Hatice Elif IŞIK BİÇEN

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Serpil UĞRAŞ

Mayıs 2022, 50 sayfa

Selülaaz enzimi, bazı bakteri ve mantar türleri tarafından sentezlenen ve selülozun  $\beta$ -1,4 glikozit bağlarını parçalayan enzimdir. Selülaaz enzimi gıda, kâğıt, tekstil endüstrisi, hayvan yemleri ve deterjan üretimi gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Böylesi geniş bir endüstriyel kullanıma sahip mevcut selülaaz enzimlerine bir yenisini ekleyebilmek amacıyla tasarlanmış bu çalışmada, selülotik bakteri izolasyonu, tanımlanması, tanımlanan bakteri tarafından sentezlenen selülaaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, fındık atıklarının olduğu toprak numunelerinden izole edilen otuz adet bakteri suşunun selülaaz enzimi üretme kapasitesi yapılan kalitatif tayin ile araştırılmış ve bu bakteriler arasında en iyi selülaaz üreticisinin izolat DU-1 olduğu belirlenmiştir. Enzim üretici izolat morfolojik, biyokimyasal ve moleküler teknikler ile tanımlanmış ve bakteri *Bacillus cereus* DU-1 olarak tür boyunda tanımlanmıştır. Yapılan enzim karakterizasyonu çalışmaları neticesinde *Bacillus cereus* DU-1 bakterisinin enzim üretmesi için gerekli optimum şartlar; tripton (azot kaynağı), pH 7.0, sıcaklık 37 °C ve süre 24 saat olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, 50 °C’de ve pH 6.0’ da enzimin aktivitesinin (4,73 U/mL) optimum olduğu tespit edilmiştir. Enzim kinetiği analizi sonucunda enzimin Vmax değeri 3,18 U/mL ve Km değeri 0,0019 mM olarak bulunmuştur. Son olarak enzim amonyum sülfat çöktürmesi ile kısmi olarak saflaştırılmıştır. Kısmi saflaştırılan enzimin moleküler büyüklüğü SDS-PAGE ve Zimogram analizi ile yaklaşık 40 kDa olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus cereus*, Selülaaz, SDS-PAGE, Enzim kinetiği.

## ABSTRACT

### BİOCHEMİCAL CHARACTERİZATION OF CELLULASE ENZYME BY *Bacillus cereus* ISOLATED FROM CELLULOTİC WASTE

Hatice Elif İŞİK BİÇEN

Düzce University

Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Chemistry

Master's Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serpil UĞRAŞ

May 2022, 50 pages

Cellulase enzyme is the enzyme synthesized by some bacterial and fungal species and breaks down the  $\beta$ -1,4 glycoside bonds of cellulose. Cellulase enzyme has a wide range of uses such as food, paper, textile industry, animal feed and detergent production. In this study, which was designed to add a new cellulase enzyme to the existing cellulase enzymes with such a wide industrial use, cellulotic bacteria isolation, identification, partial purification and characterization of the cellulase enzyme synthesized by the identified bacteria were performed. First of all, cellulase enzyme production capacity of thirty bacterial strains isolated from soil samples containing hazelnut wastes was investigated by qualitative assay and it was determined that the best cellulase producer among these bacteria was isolate DU-1. The enzyme producing isolate was identified by morphological, biochemical and molecular techniques and the bacterium was identified as *Bacillus cereus* DU-1. As a result of enzyme characterization studies, optimum conditions for enzyme production by *Bacillus cereus* DU-1 bacteria was determined as tryptone (nitrogen source), pH 7.0, 37 °C and 24 hours. However, it was determined that the activity of the enzyme (4.73 U/mL) was optimum at 50 °C and pH 6.0. As a result of the enzyme kinetic analysis, the Vmax value of the enzyme was found as 3.18 U/mL and the Km value was found as 0.0019 mM. Finally, the enzyme was partially purified by ammonium sulfate precipitation. The molecular size of the partially purified enzyme was determined as approximately 40 kDa by SDS-PAGE and Zymogram analysis.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, Cellulase, SDS-PAGE, Enzyme kinetics.

## 1. GİRİŞ

Hücrelerde önemli metabolik görevler yapan enzimler; bitki, hayvan ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen büyük çoğunluğu protein yapısında olan moleküllerdir. Enzim, hücrede gerçekleşen birçok reaksiyonun hız ve özgülüğünü değişikliğe maruz kalmadan düzenleyebilmektedir. Birçok metabolik reaksiyon enzimlerce kontrol edilmekte ve hızlandırılmaktadır. Substrat, reaksiyonun başlangıcında enzimin etki ettiği maddeye denmekte olup, ürün ise reaksiyon sonucu açığa çıkan ve miktara yükselen maddedir. Enzimler dış yüzeyden başlayarak substratın şeklini bozmakta ve ürünü ortaya çıkarmaktadır. Ürün oluştuktan sonra başka bir substrat molekülüne aynı reaksiyonu, aynı enzim ile gerçekleştirmektedir [1].

Günümüzde, böylesi önemli işlevleri olan enzimler canlı hücrelerden saflaştırılabilmekte ve birçok endüstriyel alanda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Enzimlerin, gıda sanayinde, temizlik sanayinde ve teknolojik gelişmeye bağlı birçok alanda kullanımı yaygınlaşmaktadır. Gelişen enzim teknolojisi sayesinde, ürünlerin kullanım sektörü, çeşitliliğinin artması ve yüksek ekonomik değerinin olması gibi sebepler ile endüstriyel enzim teknolojileri alanında yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır. Enzimlerin herhangi bir endüstri dalında kullanılabilmesi için maliyetinin düşük olması, farklı sektörlerde kullanılmasında ise sektöre göre enzimin alerjik veya toksik etki oluşturmaması önem arz etmektedir [2].

Endüstride kullanılan enzimler, mikroorganizmalardan genellikle elde edilmekle birlikte bitkiler ve hayvanlardan elde edilmektedir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin katalitik aktivitelerinin hayvansal ve bitkisel kaynaklara göre daha fazla olması, daha az yan ürün oluşturma, daha dayanıklı, ucuz ve yüksek saflıkta elde edilebilmeleri gibi nedenlerden dolayı kullanılmaktadır [3].

Bugüne değin yaklaşık 2.500 farklı enzimin keşfedildiği ve endüstriyel sektörde faydalanılan tüm enzimlerin %80'ini oluşturduğu gözlenmektedir [4].

Endüstriyel uygulamalarda proteaz, amilaz ve selüloz enzimlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Endüstriyel enzimler içerisinde selülozu hidrolize eden selüloz enzimleri endüstriyel alanda önemli biyoteknolojik bir enzim olduğu görülmektedir.

## **1.1. ENZİMLER**

### **1.1.1. Enzimlerin Genel Karakterleri**

Enzimler girdiği kimyasal tepkimeleri katalizleyen herhangi bir şekilde değişime uğramadan çıkan, tepkimenin hızını arttıran katalizörler olarak tanımlanmaktadır. Enzimler katalizleyeceği moleküller için özel bağlanma bölgesi taşımaktadır [5]. Enzim; 1878 yılında ilk kez Kuhne ile kullanılmıştır. Euduard Buchner 1897 yılında hücrelerden fonksiyonel enzimleri özütleyebildiğini bildirmiştir [6]. Buchner yaşayan hücreden aktif enzimin ayrılabilmesi göstermiş ve alkol fermantasyonunun ilk oluşumunda mayanın eklenmesi yerine, canlı hücre içermeksizin maya özütünü eklersek şeker alkole dönüştürebilmiştir [7].

Enzimler, canlı hücrede üretilen hemen hemen tamamı protein yapılı moleküllerdir. Enzimin etki ettiği substratlar aktif bölgelerde özel bölgelere bağlanır. Enzimin aktif bölgesi iki anahtar alan içermektedir. İlk anahtar alan, reaksiyon süresince substratla etkileşim içinde olan alan, ikincisi ise enzimin kimyasal gruplarının substrat ile reaksiyonunu sağlayan bağlanma alanı olmaktadır [8].

### **1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması**

Enzimler, katalize ettikleri reaksiyon tipine göre; E.C.1 Oksidoredüktazlar, E.C.2 Transferazlar, E.C.3 Hidrolazlar, E.C.4 Liyazlar, E.C.5 İzomerazlar ve E.C.6 Ligazlar E.C.7 Translokazlar olmak üzere yedi kategoriye ayrılmaktadır. Her enzim öncelikle uygun kategori içerisinde sınıflandırılmakta, daha sonra EC (Enzim Komisyonu) kategorisine ilaveten üç basamaklı sınıflandırma numarası ve tanımlayıcı bir sistematik ad atanmaktadır.

### **1.1.3. Enzim Aktivitesi**

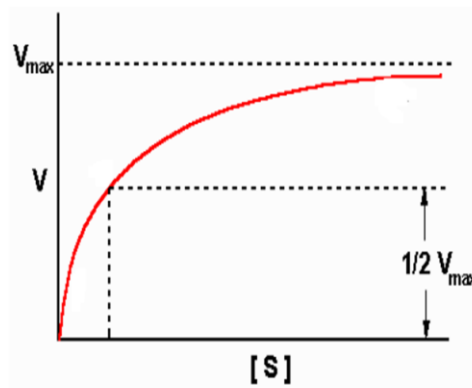
Enzim aktivitesi, birim zaman başına dönüştürülen substratın mol sayısı veya gramı olarak değerlendirilmektedir. Enzimin spesifik bir reaksiyonu katalizleme kapasitesinin bir ölçümünü vermektedir ve enzim aktivite birimi ünitedir. En yaygın kullanılan enzim aktivite birimi, International Unit (IU)'dir. 1 IU enzim aktivitesi, reaksiyon koşullarında, 1 dakikada 1mol (veya g) substratı dönüştüren enzim aktifliğini ifade etmektedir [9].

#### 1.1.4. Enzim Kinetiği

Enzimler tarafınca katalize edilen reaksiyonların hızlarını, bu hızlara etki eden faktörleri (substrat, inhibitör gibi) çalışma alanlarını inceleyen alandır ve kimyasal kinetiğin temel ilkelerini kullanmaktadır. Ancak kimyasal kinetiğin reaksiyon hızlarının kantitatif incelenmesi ile birlikte reaksiyonların yapıları ile de ilgilenmektedir. Enzim kinetiği ise, reaksiyon hızlarının kantitatif incelenmesini ve buna etkileyen faktörleri araştırmaktadır [10].

Enzim kinetiği kapsamında, enzimin reaksiyon hızı (V) ve substrat konsantrasyonu [S] arasındaki ilişki bir grafiğe aktarıldığında hiperbolik eğri oluşturmaktadır. Michaelis ve Maud Menten tarafından 1913 yılında, hiperbolik grafiğinin matematiksel açıdan nasıl yorumlanacağını yeniden formülize edilmiştir.

Reaksiyonun hızı (V) (enzim konsantrasyonunun sabit olması şartıyla), substrat konsantrasyonu [S] ile birlikte artmakta olup maksimum hız ( $V_{max}$ ) değerine ulaşıncaya kadar yükseliş devam etmektedir. Fakat enzim aktivitesi  $V_{max}$  ulaşıldıktan sonra substrat konsantrasyonu arttırılsa dahi reaksiyon hızı etkilenmemektedir. Artan substrat konsantrasyonlarında reaksiyonunun yavaşlaması, enzimdeki substrat bağlama alanlarının doyumluğa eriştiği anlamına gelmektedir [11].



Şekil 1.1. Michaelis-Menten grafiği ve denklemi.

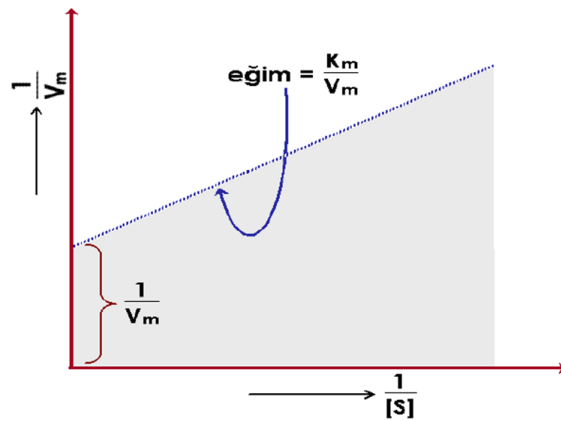
$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1.1)$$

Hız eğrisinden  $V_{max}$ 'ın ulaşıldığı noktayı belirlemek çoğu zaman hatalı verilere sebep olabilmektedir. Bu sebeple  $V_{max}$ 'ın yarı noktasını belirleyen ölçümler yapılmaktadır.

Reaksiyon hızının  $1/2V_{\max}$  ulaştığı zamanki substrat konsantrasyon değerine Michaelis Konstantı olarak ifade edilmekte ve  $K_m$  ile gösterilmektedir. Bu bağlamda, reaksiyon hızı kendi maksimum hızının yarısına eşit olduğu zamanda  $K_m$  substrat konsantrasyonuna denk olarak saptanmaktadır. Bu durumda  $K_m$ ; reaksiyon hızının maksimumum yarısına karşılık gelen substrat konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır.  $K_m$  değeri her enzim ve substratına özeldir ve enzimin substrat ilgisini göstermektedir.  $K_m$  değeri düşük olan enzim, substratına karşı yüksek affinite göstermekte yani enzim düşük bir substrat konsantrasyonunda doygunluğa ulaşmış olup maksimum hız sağlamaktadır.  $K_m$  değeri  $10^{-6}M$  ve daha düşük olan enzimler yüksek affiniteli enzimler olup metabolizmada büyük öneme sahiptirler.  $K_m$  değerinin yüksek olması enzimin substrata karşı düşük bir affiniteye sahip olduğu bu bağlamda enzimin yarı doygunluğa ulaşmak için daha fazla substrat konsantrasyonu ihtiyaç duyduğu anlamındadır. Sonuç olarak  $K_m$  değeri, enzim ile substratın karşılıklı etkileşimini tanımlayan sabit bir sayıdır.

Substratın yapısı, sıcaklık, pH ve iyonik şiddet ile değişebilmektedir. Bir enzimin birden çok substratı var ise her bir substrat için farklı bir  $K_m$  değeri bulunmaktadır. Bu sonuçta  $K_m$ , ES kompleksinin sağlamlık ölçüsü olarak karşımıza çıkmaktadır.  $K_m$  değerinin yüksek olması zayıf bağlanmayı ve düşük olması ise güçlü bağlanmayı göstermektedir.

$V_{\max}$ 'ın değerini Şekil 1.1'de yer alan Michaelis-Menten grafiği ile tam olarak tespit etmenin zorluğu açısından, Michaelis-Menten eşitliğinde taraflar 1'e bölünürerek Lineweaver-Burk doğru denklemi oluşturmaktadır. Bu sayede,  $1/S$ 'ye karşı  $1/V$  grafiğe aktarılarak  $V_{\max}$  ve  $K_m$  değerleri belirlenmektedir [12].



Şekil 1.2. Lineweaver-Burk grafiği ve denklemi.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (1.2)$$

Bu denklemde; V: reaksiyon başlangıç hızı,

$V_{max}$ : maksimum hız,

$K_m$ : Michaelis-Menten sabiti,

S: substrat derişimi olarak belirtilmektedir.

Enzimlerin ayırt edilmesinde  $K_m$  değerlerinden faydalanılmaktadır. Ancak  $K_m$  sabitlerinin belirlenmesinde, çözeltinin sıcaklığı ve pH gibi dış etkiler aşırı derecede hassas olarak sabit tutulmalıdır. Aksi durumda, değişik reaksiyon hızları belirleneceğinden  $K_m$  değerleri de buna bağılı olarak farklı hesaplanacaktır.  $K_m$  değerleri, substratlar ile enzimler arasındaki oluşumları hakkında niteleyici bir fikir vermektedir. Ayrıca reaksiyona ait  $K_m$  değerinin bilinmesi ile gerçekleştirilecek bir reaksiyonda maksimum hıza ulaşmak için alınması gereken enzim konsantrasyonunun hesaplanması mümkün olmaktadır [12].

## 1.2. Mikrobiyal Enzimler

Endüstride önemli yere sahip enzimler, çoğunlukla mikroorganizmalardan üretilmektedir. Mikroorganizmalar tarafından üretilen enzimlerin katalitik aktivitelerinin hayvansal ve bitkisel kaynaklara göre daha yüksek olması, daha az yan ürün oluşturmaları, daha dayanıklı, ucuz ve yüksek saflıkta üretilibilmeleri gibi nedenlerden dolayı daha fazla tercih edilmektedir [3].

Mikrobiyal enzim üretiminde ilk aşama özgün enzim üretme yeteneğine sahip, uygun mikroorganizma suşunu belirlemektir. Bu suşların dayanıklı ve yüksek verimli olmaları yanı sıra patojenik ve toksik özellikte olmayan, biyolojik stabilite gösteren, saf ve uygun koşullarda muhafaza edilmiş, mutasyona uğramamış, aktif ve canlı suşlar olma özelliğinde olması beklenmektedir [13].

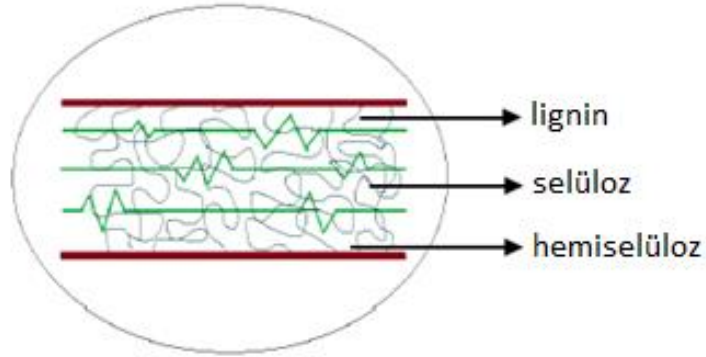
Mikrobiyal endüstriyel enzimlerin çoğu ekstrasellüler olarak bulunmaktadır. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre duvarının dışı ile etkileşim halindeki enzimler olarak tanımlanmaktadır [14].

Endüstride kullanılan enzimler birçok alanda önemli uygulama alanlarına sahiptirlerdir. Gıda sanayi, tekstil sanayi, kimya endüstrisi, ileri tedavi teknikleri ve gen klonlama gibi birçok alanda yaygın kullanım alanı bulmaktadır [15].

### 1.3. Selüloz Enzimi

Lignoselülozik biyokütle, orman ve tarım artıkları olarak toprakta yüksek miktarda bulunmaktadır. Bu biyokütle çeşitli bakteri, böcek ve mantar türleri için yaşamsal enerji kaynağı olmasının yanı sıra onlara yaşam alanı sunmaktadır. Bunun yanında otla baslenen canlılar, selülozik enzim ve diğer yardımcı proteinlerin yardımıyla bu biyokütlenin basit şekerlere parçalanmasıyla besin ihtiyaçlarını karşılamaktadır [16].

Lignoselülozik biyokütle üç önemli bileşeni içermekte olup bunlar; selüloz (%20-50), hemiselüloz (%15-35) ve lignin (%5-30) olarak brlrlenmektedir (Şekil 1.3) [17].

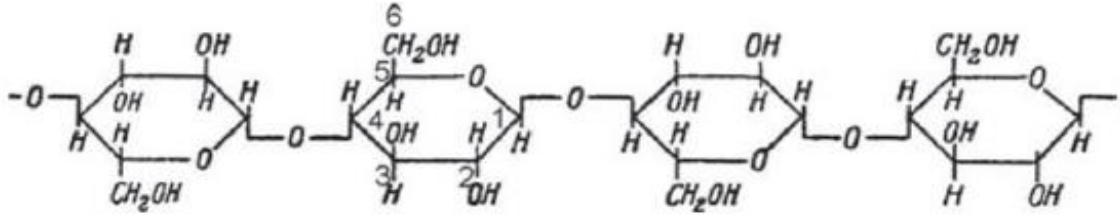


Şekil 1.3. Lignoselüloz.

Bitkinin kök ve gövdesinde odunsu yapıyı oluşturan bileşenlerden lignin, bitkiyi zorlu çevre koşullarına karşı korumaktadır. Karbon-karbon ve ester bağları ile bağlanan fenil-propan birimlerinden oluşan dallanmış polimerlerdir. Lignin içeriğindeki çeşitli fenil-propan monomerlerinin oranı, çeşitli ağaç türleri ve biyokütle arasında değişmektedir [18].

Hemiselülozlar, lignoselulozik biyokütlerde selülozun ardından gelen önemli bileşendir. Bu bileşen, çeşitli şekerler (galaktan, ksilan ve mannan) ve şeker asitleri içeren, kısa zincirli polimerik ve heterojen bir yapıdır. Adlandırılmaları, kendilerini oluşturan şekerlere göre belirlenmektedir. Doğal yapıları gereği şekilsizdirler [19].

Dünya üzerinde en fazla bulunan organik yapıya sahip olan selüloz, bitkisel kaynaklı olup basit bir disakkarit yapıda ve sellobiozun tekrarlanan birimlerinden oluşmaktadır [20]. Fibriler yapıda olan selüloz, sert madde olup, bitkilerin hücre duvarında yer almaktadır ve bitkinin biyokütlesinin yaklaşık %40'ına sahiptir. Yaklaşık 15.000 glikoz ünitesinin  $\beta$ -1,4-glikozidik bağı sayesinde linear şekilde bağlanması ile oluşmakta olup ayrıca suya karşı afinitesi yüksek olsa da, suda çözünmemektedir (Şekil 1.4).



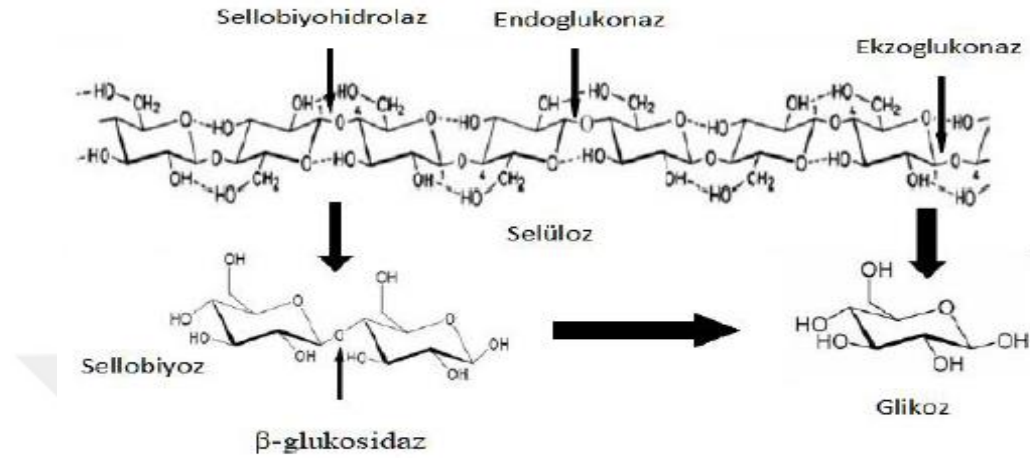
Şekil 1.4. Selülozun genel yapısı.

Selüloz molekülü,  $\beta$ -1,4-D-glikopiranoz birimleri üst üste gelerek, Vander Waals kuvvetleri sayesinde iç ve zincirleri arasındaki hidrojen bağları ile birlikte sıkıca bağlanmaktadır. Hidroksil grupları ile bitişik halkalı moleküllerin oksijenleri arasındaki zincir içi hidrojen bağı,  $\beta$ -1,4-glukozid bağıni sabitleştirmekte ve selüloz zincirinin lineer yapıda olmasını sağlamaktadır. Selüloz molekülleri, suda tamamen çözünmeyen lineer yapısı ile nişastadan, kristal yapıya sahip olmaları ile ise diğer polisakkaritlerden farklı özellik sergilemektedir [21]. Yeryüzünde selüloz lifleri, başta lignin ve hemiselüloz olarak diğer yapısal biyopolimerlerin matrisine gömülü bir biçimde bulunmaktadır. Selülozun bitkilerdeki başlıca görevleri bitkiye dayanıklılık, diklik ve destek sağlamaktır. Yenilenebilir bir polisakkarit olmasının yanı sıra biyokütlenin %20-50'sini oluşturmaktadır. Yeryüzünde saf olarak sadece pamuk yumaklarında bulunmaktadır [22].

Lignoselülozik biyokütlenin ana bileşeni olan selüloz, selülaz enzimleriyle hidroliz edilebilmektedir. Selülaz enzimleri, mikroorganizmalar tarafından doğal olarak üretilen ve selülozun glikoz monomerlerine kadar hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Hidroliz ve substrat ürünlerinin olduğu yere göre selülaz enzimleri, endoglukanaz, ekzoglukanaz ve  $\beta$ -glukozidaz olarak üç sınıfta toplanmaktadır [23]. Selüloz, kendini oluşturan glikoz birimlerine endoglukanaz, ekzoglukanaz ve  $\beta$ -glukosidaz enzimleri sayesinde hidroliz olabilmektedir (Şekil 1.5) [24].

Selülozu parçalayan selülaz enzimleri;

- Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolazlar, CBH) (E.C. 3.2.1.91)
- Endoglukanazlar (endo- $\beta$ -1,4 glukonaz, CMCase) (E.C. 3.2.1.4) ve
- $\beta$ -glukozidazlar (E.C. 3.2.1.21), olmak üzere üç grupta incelenmektedir [17].



Şekil 1.5. Selülozun enzimatik parçalanması.

*Endoglukanazlar (EG)*; selüloz polimerinin ortasından (genellikle amorf bölgeden) parçalamakta ve son ürünleri olarak oligosakkaritleri oluşturmaktadır. Bu grup enzimler, boşlukları sayesinde polimeri kavrayarak parçaladıkları bildirilmektedir. Bazıları ise selüloz bağlayıcı modüller (CBM, Cellulose Binding Modül) sayesinde selüloz polimerine bağlandıktan sonra parçalama işlemini gerçekleştirmektedir. Bu grubun aktivitesi diğerlerine göre daha yüksektir [17].

*Ekzoglukanazlar (Sellobiyohidrolazlar (CelloBioHydrolase, CBH))*; selüloz polimerini tümüyle veya endoglukanazlar sayesinde parçalanan birimlerdeki ara ürünlerin uçlarını parçalamaktadır. Son ürünleri ise sellobiyoz olmaktadır. Bu grup enzimlerin iç kısımlarında tünele benzer bir boşluk olup selüloz polimerinin ucunu bu boşluk içine alıp etkisini göstermektedir [17].

*$\beta$ -glukozidazlar*; ara ürün  $\beta$ -sellobiyoz disakkaritini parçalayarak son ürün olan glukozu üretmektedir [25].

Selüloz yılda  $10^{10}$  ton sentezlenme hızıyla biyo dönüşümlerde en çok kullanılan molekül olarak bilinmektedir. Mantar ve bakteriler, selülaz enzimlerini kullanarak bu makro molekülleri parçalayabilmektedir [26]. Mantarlar ve bakteriler gibi

mikroorganizmaları iyi birer selülag enzim üreticisi oldukları bilinmekle birlikte selülag aktiviteye sahip birçok organizma bulunmaktadır [27]. Araştırmalara göre; yumuşakçalar, nematodlar ve eklembacaklılar dâhil olmak üzere bazı organizmaların endojen selülag üretme yeteğine sahip olduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte, fungal selülagların, mikrobiyal selülaglara göre yüksek verimli ve uygun maliyetli yöntemler ile üretildiğı, bakteriyel selülaglar ise daha termostabil ve kısa zamanda fazla miktarlarda üretiminin olduğu bilinmektedir. Bakteriyel selülaglar, hücreye bağı selülozomlar olduğu bilinen kümelenmiş yapılar halinde bulunmaktayken, fungal sistemlerde ise bu yapıların mevcut olmadığı bilinmektedir [28].

Selülag enzimlerini üreten mikroorganizmalar aerobik veya anaerobik, mezofilik veya termofilik olabilmektedir. *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Trichoderma*, *Thermomonospora* ve *Aspergillus* türleri en fazla araştırılan selülag üreticisi mikroorganizmalar olmakla beraber son zamanlarda *Bacillus* selülaglarının yoğun bir şekilde araştırıldığı görülmektedir [29].

Yeryüzünde en fazla bulunan doğal organik kaynak olarak bilinen selülagın hidrolizini gerçekleştirilmeleri açısından selülag enzimlerine, canlılığın sürdürülmesinde doğal olarak ihtiyaç duyulurken aynı zamanda selülotik ürünlerin dâhil olduğu tüm endüstriyel üretimde yüksek maliyetleri düşürmek açısından, daha verimli prosesler oluşturmak için önem arz etmektedir [23]. Tekstil, kâğıt, gıda, deterjan, yem, biyoyakıt üretimi, meyve suyu ve tarım olmak üzere birçok endüstriyel sektörde kullanım alanına sahip olması nedeniyle mikrobiyal selülagların birçok endüstriyel araştırma grupları ve akademik için önemli bir araştırma konusu olmuştur [30].

Günümüzde, selülag enzimleri büyük oranda bakterilerden ve funguslardan üretilmekte olup çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilmektedir. Alkol üretiminde; iyi bir renk ve sıvı kazancını sağlamak, selülozik biyokütle sayesinde yemlerin besin değeri ve sindirilebilirliğini arttırmak, zirai ve endüstriyel atıkların enzimatik olarak daha kolayca bileşenlerine parçalanmasını sağlamaktadır [24].

Bakteriler, selülag enzimini hücre dışı olarak bol miktarda salgılandığından, kolay ekstrakte edilmekte ve bu sayede saflaştırma işlemleri kolaylaştıran selülag üreticileridir [31]. *Bacillus* cinsi böylesi hidrolitik enzimler için dikkat çekicidir ve endüstriyel işlemlerde sıklıkla kullanılmaktadır [32].

*Bacillus* türlerindeki selülotik enzimler iyi bir şekilde karakterize edilmişlerdir. Yapılan birçok çalışma ile *Bacillus subtilis* JBS250 [32], *Bacillus subtilis* LFS3 [33], *Bacillus subtilis* CBS31 [34], *Bacillus halodurans* IND18 [35], *Bacillus subtilis* BC1 [36], *Bacillus subtilis* BY-4 [37] ve *Bacillus subtilis* CD001 [31], *Bacillus* sp. CH43 ve HR68 [38], *Bacillus halodurans* IND18 [39], *Bacillus* sp. ARO3 [40], *Bacillus vallismortis* RG07 [41] gibi farklı *Bacillus* türlerine ait bakterilerin selülaz üretici oldukları tespit edilmiştir.

#### 1.4. AMAÇ

Selülaz enzimlerinin, gıda endüstrisinden ziraat endüstrisine, tekstil endüstrisinden kâğıt endüstrisine, ilaç endüstrisinden, kimya endüstrisine kadar geniş bir uygulama alanına sahip olduğu yapılan birçok çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma, böylesi geniş bir sektörel kullanıma sahip mevcut selülaz enzimlerine bir yenisini ekleyebilmek amacıyla tasarlanmıştır. Bu çalışmada sırasıyla;

- Düzce ili, Akçakoca ilçesi, Yenice Köyü fındık çancısı atığının bulunduğu (41°01'07.4''N 31°01'04.1''E) yığının altındaki topraktan bakteri izolasyonunun yapılması,
- İzole edilen bakterilerin selülaz üretme yeteneklerinin (Kongo kırmızısı ile boyama metodu ile) kalitatif olarak test edilmesi,
- İzole edilen bakterilerin selülaz üretme yeteneklerinin (DNS metodu ile) kantitatif olarak test edilmesi,
- En yüksek selülaz enzim üretimine sahip bir bakterinin (izolat) seçilmesi,
- Enzim üretici izolatın enzim üretmedeki optimum koşullarının belirlenmesi,
- Üretilen enzimin kısmi saflaştırılması ve karakterize edilmesi hedeflenmiştir.

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETEBEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU

Selülaaz enzimi üreten bakterilerin izolasyonu için öncelikle fındık atığının bulunduğu topraktan (Düzce ili, Akçakoca ilçesi, Yenice Köyü; 41°01'07.4''N 31°01'04.1''E) alınan örnekler steril kaplarla laboratuvara taşınmıştır. Her bir numuneden bir gram toprak örneği tartılıp steril dH<sub>2</sub>O ile seri dilüsyonu yapılmıştır. 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> ve 10<sup>-3</sup> dilüsyon örnekleri Nutrient Agara (NA) yayma ekim yöntemi kullanılarak ekim yapılmıştır. Yapılan ekimlerin olduğu petri kapları 37°C'de 16-18 s inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda farklı morfolojik görüntüye sahip kolonilerin NA besiyeri kullanılarak saf kültürleri (izolat) elde edilmiştir.

### 2.2. İZOLATLARIN SELÜLAZ ÜRETME POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

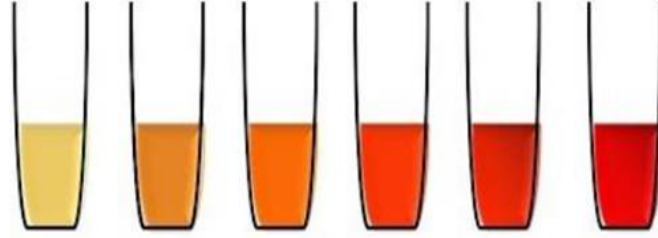
Elde edilen izolatların enzim üretim kapasitesinin belirlenmesinde (kalitatif tayin) Çizelge 2.1.'de yer alan ayırt edici besiyeri kullanılmıştır. İzolatlar enzim üretim besiyerine (CMC Agar) nokta ekim ile 37 °C'de 16-18 s inkübasyona bırakılmıştır. Hedeflenen bakterinin tek koloni şeklinde büyümesi sağlanmıştır. Geliştirilen bakterinin bulunduğu petri kabı inkübasyon sonucunda % 0,1'lik kongo kırmızısı boya ile boyanmış ve ardından 5 dakika süreyle boya ile inkübe edilmiştir. Daha sonrasında petrilere 1M NaCl çözeltisi eklenerek boya uzaklaştırılmıştır [42]. Selülaaz aktivitesi bakteri kolonisi etrafında sarı zon oluşumuna göre saptanmıştır.

Çizelge 2.1. Deneyde kullanılan enzim üretim besiyerleri.

| Besiyeri Bileşimleri         | Enzim Üretim Besiyeri (Katı) (g/L)<br>CMC Agar | Enzim Üretim Besiyeri (Sıvı) (g/L)<br>CMC Broth |
|------------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Tripton                      | 10                                             | 5                                               |
| Maya Ekstrakt                | 5                                              | 5                                               |
| NaCl                         | 5                                              | 5                                               |
| Agar                         | 15                                             | -                                               |
| CMC (Carboxymethylcellulose) | 5                                              | 10                                              |

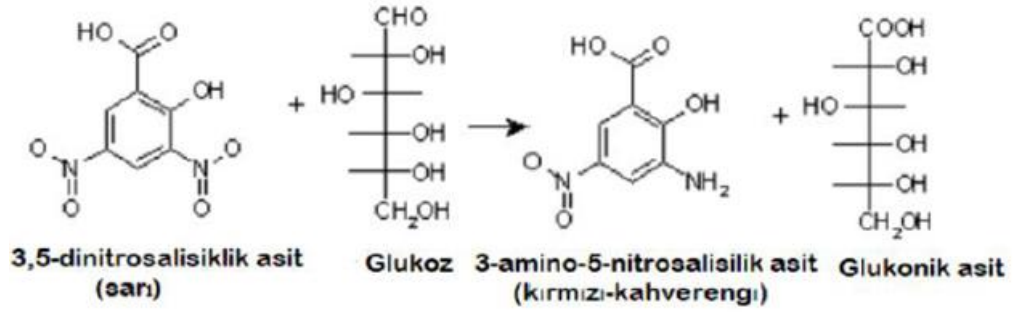
### 2.3. SELÜLAZ ÜRETİMİNİN KANTİTATİF TAYİNİ

Selülaaz üretiminin kantitatif tayini DNS (3,5-Dinitrosalisilik Asit) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS veya DNSA), 3-amino-5-nitrosalisilik asit indirgen şekerler ve diğer indirgeyici moleküller ile reaksiyona giren aromatik bir bileşiktir. İlk olarak James B. Sumner (1921) tarafından idrarda indirgen maddeleri tespit etmek için bir yöntem olarak belirlenmiş ve o zamandan beri karbonhidrat seviyelerini ölçmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [43]. DNS yöntemi bir mol şekerin bir mol 3,5-dinitrosalisilik asit ile arasındaki redoks reaksiyonundan oluşan bir kolorimetrik teknik olup, şekerlerin indirgeme gücü, oksitleyici ajanlar tarafından karboksil grubuna oksitlenen karbonil gruplarından gelmektedir. Sarı olan DNS, kırmızımsı kahverengi bir 3-amino-5-nitrosalisilik aside indirgenir; bu da maksimum absorbansın 540 nm dalga boyunda spektrofotometri ile ölçülebilmektedir [44]. Renk yoğunluğu şeker konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Şeker konsantrasyonu ile renk değişimi.

Farklı indirgeyici şekerler genel olarak farklı renk yoğunlukları verir (Hide & Horrocks, 1994). Glukoz indirgeyici bir şekerdir. İndirgeyici şeker, yapısında diğer atomlardan gelen elektronları kolayca kabul eden serbest keton ( $-\text{CO}-$ ) veya aldehit ( $-\text{CHO}$ ) grupları nedeniyle indirgeyici ajan (elektron kazanır) olarak da kullanılmaktadır. Bu reaksiyonda, glukoz bir tane aldehit içermektedir. Bu indirgeme uç bir reaksiyon başlatarak, DNS'in bir nitro grubun oksidasyonu (elektron kaybı) ile 3-amino-5-nitrosalisilik aside dönüştürülmektedir. Glukozun aldehit grubu ( $-\text{CHO}$ ), bir karboksilik asit grubuna ( $-\text{COOH}$ ) indirgenerek, glukoz şeker molekülünü glukonik aside dönüştürülmektedir (Şekil 2.2) [45].

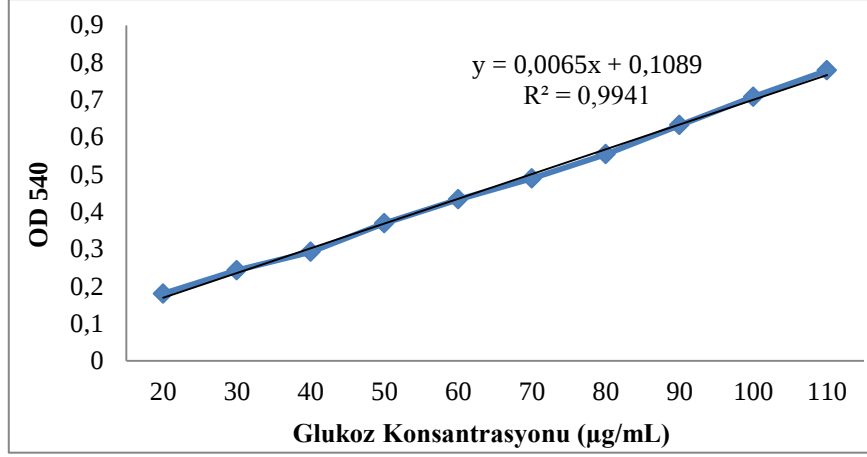


Şekil 2.2. DNS yönteminin etki mekanizması.

Bu çalışmada, kalitatif tayin sonucunda pozitif sonuç veren izolatların enzim üretim kapasiteleri yukarıda anlatılan DNS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Öncelikle seçilen izolatlar 16-18s Nutrient Broth (NB) besiyerinde 37°C’de inkübe edilmiştir. Ardından enzim üretim besisi yerine (CMC Broth) besiyerine %1 oranında inokule edilerek 37°C’de ve 150 rpm’de 16-18 s inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda +4 °C’de, 7000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapılarak süpernatant elde edilmiştir. Aktivite tayini için; elde edilen süpernatantlardan 0,5 mL ve %1’lik CMC (50 mM sodyum fosfat (pH 6.5) tamponuna 1 g CMC eklenerek hazırlanmış) substrat çözeltisinden 0,5 mL bir tüpe alınıp 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyonun durdurulmak için 1mL Dinitrosalisilik asit (DNS) ayırıcı (20 mL 2N NaOH içerisinde 1 g DNS ve 50 mL distile su içerisinde 30 g Na-K-Tartarat çözüldükten sonra, iki çözeltiyi manyetik karıştırıcı üstünde homojen hal alana kadar karıştırılmış ve son hacim 100 mL’ye tamamlanarak hazırlanmış) eklenip 5 dakika süre ile kaynar suda bekletilmiştir ve tüpler soğutulularak 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir. Çalışmada negatif kontrol (kör) olarak; %0,5 CMC çözeltisi, 0,5 mL sodyum fosfat tamponu ve 1 mL DNS den oluşan çözelti kullanılmıştır [46].

### 2.3.1. Glukoz Standart Eğrisi ve Enzim Aktivitesi Hesabı

Kantitatif enzim aktivitesi ile elde edilen absorbans değerleri kullanılarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Bu hesaplamada glukoz standart eğrisi kullanılmıştır. Standart eğri için 0-100 µg/mL konsantrasyonda glukoz çözeltileri hazırlanarak glukoz miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüş olup, konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizilerek elde edilen doğru denkleminin formülünden konsantrasyonu bilinmeyen örneğin glukoz konsantrasyonu hesaplanmıştır. Doğrunun denklemi grafik üzerinde verilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Glukoz standart grafiği.

**1 Unite Enzim Aktivitesi (U/mL):** Reaksiyon koşullarında 1 dakikada 1 gram glukoz oluşturan enzim miktarı olarak tanımlanmış olup aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır;

$$\text{Enzim aktivitesi} \left( \frac{U}{mL} \right) = \text{İndirgen şeker miktarı (g)} \times \frac{1 \text{ mL}}{\text{Alınan örnek miktarı (mL)}} \times \frac{1 \text{ dakika}}{\text{Reaksiyon süresi (dak)}} \quad (2.1)$$

**Spesifik Aktivite (U/mg):** 1 unite değerleri mL'deki protein miktarına bölünerek spesifik aktivite hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik aktivite (U/mg)} = \text{Aktivite (U/mL)} / \text{Protein (mg/mL)} \quad (2.2)$$

## 2.4. SELÜLAZ ENZİMİ ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

### 2.4.1. Enzim Üretimine Azot (N) Kaynağının Etkisi

Selülaaz enziminin üretiminde farklı azot kaynaklarının etkisi belirlenmek için temelde Sambrook ve Russell (2001) kullanıldığı enzim ortamı (10g/L CMC; 5g/L Trypton; 5g/L maya özütü; 5g/L NaCl; 15g/L agar) esas alınarak literatürde tanımlanan azot kaynaklarının etkileri incelenmiştir [47]. Azot kaynağı olarak (5g/L); pepton ve üre sırasıyla değiştirilip buna ek temel olarak kullanılan tripton içeren besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu 3 farklı besiyeri ortamına inkübasyona işlemi gerçekleştirilip 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda besiyeri ortamları +4°C'de 15 dakika süreyle 7000 rpm'de çöktürülerek süpernatant elde edilmiş

ve elde edilmiş enzim içerikli süpernatant kullanılarak DNS yöntemi ile standart enzim aktivite değerleri elde edilmiştir.

#### **2.4.2. Enzim Üretimine pH'nın Etkisi**

CMC Broth enzim üretim besiyeri (Çizelge 2.1) temel alınarak farklı pH (5.0, 7.0 ve 9.0), farklı sıcaklık (30, 45 ve 60 °C) ve değişen sürelerde (24, 48 ve 72 saat) bakterinin selüloz enzimi üretme yeteneğine bakılmıştır. HCl ve NaOH tamponlarıyla hazırlanan 3 farklı pH değerine sahip besiyerleri belirtilen farklı sıcaklıklara sahip su banyolarına bırakılmış ve yine belirtilen sürelerde bu besiyerlerinde 2.4.1.'de anlatılan yöntem kapsamında selüloz enzim çözeltisi elde edilmiş ve elde edilen enzim çözeltisinin aktivitesi DNS yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu şekilde öncelikle enzim üretimin en iyi olduğu pH değeri belirlenmiştir.

#### **2.4.3. Enzim Üretimine Sıcaklık ve Sürenin Etkisi**

CMC Broth enzim üretim besiyeri (Çizelge 2.1) temel alınarak optimum pH değerinde farklı sıcaklık (30, 45 ve 60 °C) ve değişen sürelerde (24, 48 ve 72 saat) bakterinin selüloz enzimi üretme yeteneğine bakılmıştır. Optimum pH değerine sahip besiyerleri belirtilen farklı sıcaklıklara sahip su banyolarına bırakılmış ve yine belirtilen sürelerde bu besiyerlerinde 2.4.1.'de anlatılan yöntem kapsamında selüloz enzim çözeltisi elde edilmiş ve elde edilen enzim çözeltisinin aktivitesi DNS yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu şekilde enzim üretimin en iyi olduğu süre ve sıcaklık değeri belirlenmiştir.

### **2.5. ORTAM KOŞULLARININ SELÜLAZ ENZİMİ AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

#### **2.5.1. Optimum pH Değerinin Belirlenmesi**

Öncelikle seçilen izolatlar 16-18 s Nutrient Broth (NB) besiyerinde 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından enzim üretim besiyeri (CMC Broth) besiyerine %1 oranında inokule edilerek 37°C'de ve 150 rpm'de 16-18 s inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda +4 °C'de, 7000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen bu süpernatant 0.2 µm por çaplı filtre kullanılarak steril edilmiştir. Bu şekilde elde edilen örnek ham enzim çözeltisi (enzim içerikli süpernatant) olarak kullanılmıştır. En yüksek enzim aktivitesinin olduğu pH değerlerinin saptanması amacıyla 0,1 M Glisin-HCl (pH 3, 4, 5 ve 6) ve 0,1 M Tris- NaOH (pH 7,8, 9 ve 10) tamponları kullanılarak pH 3-10 değerlerine sahip ve içerisinde %1 CMC bulunan farklı

substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan substrat çözeltileri ile enzim aktivitesi DNS yöntemi ile ölçülmüştür.

### **2.5.2. Optimum Sıcaklık Değerinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada, 2.5.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan ham enzim çözeltisi (enzim içerikli süpernatant) kullanılarak enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlenmiştir. Bu amaçla farklı sıcaklık değerleri (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C) kullanılmış ve enzim aktivitesi tayini DNS yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla 0,5 mL enzim çözeltisi ve 0,5 mL substrat çözeltisi (optimum aktiviteye sahip pH aralığında hazırlanmış) belirtilen sıcaklıklarda 30 dakika inkübe edilip süre sonunda örnek karışımı üzerlerine toplam hacmi olacak şekilde (1 mL) DNS eklenerek 5 dakika kaynatılmıştır. Soğutulan örnekler 540 nm dalga boyundaki absorbansları spektrofotometrede okunmuştur. En yüksek absorbans değerinin olduğu sıcaklık temel alınarak optimum sıcaklık değeri saptanmıştır.

### **2.5.3. pH Stabilitesinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada, 2.5.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan ham enzim çözeltisi (enzim içerikli süpernatant) kullanılmıştır. Ham enzim çözeltisi ile CMC substratı (pH 6.0) farklı sürelerde (30, 40, 50, 60 ve 120 dakika) inkübasyona bırakılmıştır. Aktivite analizi için enzim ve uygun pH değerinde hazırlanan tampon substrat çözeltisinden 0,5 mL eklenip enzim substrat kompleksi oluşturulmuş ve daha sonra su banyosundan belirtilen sürelerde örnekler alınarak, örneklerin DNS yöntemi ile enzim aktivitesi 540 nm dalga boyunda absorbansları tespit edilmiştir.

### **2.5.4. Sıcaklık Stabilitesinin Belirlenmesi**

Bu çalışmada, 2.5.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan ham enzim çözeltisi (enzim içerikli süpernatant) kullanılmıştır. Sıcaklık stabilitesi için; ham enzim çözeltisi farklı sürelerde (30, 40, 50, 60 ve 120 dakika) en iyi aktivite gösterdikleri sıcaklık değeri olan 50°C'de inkübasyona bırakılıp, belirtilen farklı sürelerde örnekler alınarak, DNS yöntemi ile enzim aktivitesine spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edilmiştir.

## 2.6. SELÜLAZ ENZİM KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmada, 2.5.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanan ham enzim çözeltisinin  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri hesaplanmıştır. Enzim kinetiklerinin belirlenmesi için optimum pH değerinde ve optimum sıcaklık değerinde farklı konsantrasyon aralığında (0,01-2 mM) CMC substrat çözeltileri hazırlanmış ve selülaaz aktivitesine DNS yöntemi ile bakılmıştır. Elde edilen değerler Selülaazın  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerlerinin belirlenmesi için Michaelis-Menten grafiği elde edilmiştir. Michaelis-Menten grafiği zorluğu sebebi ile selülaaz aktivitesi değerleri Lineweaver-Burk grafiği yardımıyla  $[1/v]$  ile  $[1/s]$  arasında çizilen grafikten Lineweaver- Burk eşitliği kullanılarak  $V_{max}$  ve  $K_m$  değerleri belirlenmiştir.

## 2.7. SELÜLAZ ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI

Selülaaz üretici olduğu belirlenen izolat, CMC (tripton 10g/L; CMC 10g/L; maya özütü 5g/L; NaCl 5g/L; agar 15g/L) besiyerinde 37°C'de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 s üretmiştir. Üretilen kültür soğutmalı santrifüj ile +4°C'de 15 dakika süreyle 7000 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant alınmıştır. Elde edilen bu süpernatant 0.2 µm por çaplı filtre kullanılarak steril edilmiştir. Bu şekilde elde edilen örnek ham enzim çözeltisi (enzim içerikli süpernatant) olarak kullanılmıştır [48].

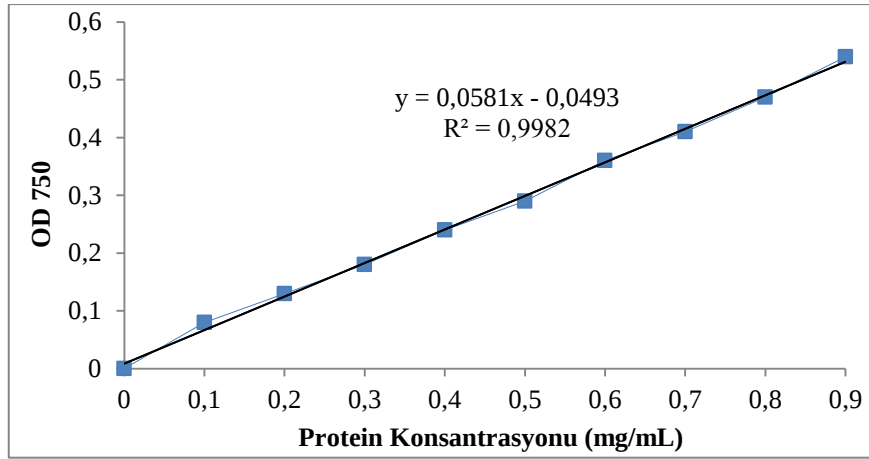
Ardından elde edilen ham enzim çözeltisi amonyum sülfat çöktürmesi yöntemi ile kısmen saflaştırılmıştır. Amonyum sülfat  $[(NH_4)_2SO_4]$  çöktürmesi, genel olarak çözeltinin tuz konsantrasyonunu artırarak, proteinin çözünürlüğünün değişmesi ve sonucunda denatüre olmadan çökmesine dayanan bir çöktürme yöntemidir. Bu çalışmada öncelikle ham enzimin en iyi çöktüğü tuz konsantrasyonu belirlenmesi amacıyla süpernatant farklı konsantrasyonlardaki (%30, %50 ve %80) amonyum sülfat ile aşamalı olarak çöktürülmüştür. Farklı doygunluklar için gerekli miktarda amonyum sülfat, Green ve Hughes (1955) tarafından hazırlanan amonyum sülfat tablosu kullanılarak hesaplanmıştır [49]. İlk önce %30'luk konsantrasyonda amonyum sülfat tuzu ham enzim çözeltisi içeren bir behere aktarılmıştır. Aktarılan enzim çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerine alınarak +4°C'ye bırakılmış ve gereken amonyum tuzu, protein yapıya zarar vermemek için süpernatant çözeltisi üzerine spatula yardımı ile kısım kısım eklenmiştir. Çöktürme işlemine bir gece devam edilmiş olup her bir tuz konsantrasyonu için aynı işlem uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Çöktürme işlemi

sonrası oluşan karışım 10.000 rpm’de 30 dakika süre ile santrifüj edilip pellet ile süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Pellet tamponda çözülerek enzim aktivitesi DNS metodu ile belirlenmiş ve ardından protein tayini yapılmıştır. Bu şekilde elde edilen örnek kısmi saflaştırılmış enzim olarak kullanılmıştır.

## **2.8. PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ**

Saflaştırma proseslerinden sonra elde edilen enzim içerikli çözeltilerin (kısmi saflaştırılmış) protein miktarının belirlenmesi amacı ile Lowry Metodu kullanılmıştır [50]. Öncelikle renk reaktifi hazırlanmıştır. Renk reaktifi; A çözeltisi: (w/v) %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1N NaOH içerisinde çözündürülerek hazırlanmış, B çözeltisi: (w/v) %1 NaK Tartarat içerisinde %0,5 (w/v) CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O ile hazırlanmış ve 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi ile taze olarak hazırlanmıştır. Ardından tüplere 100 µl standart protein, bilinmeyen protein (ham enzim örneği ve kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi) ve kör için saf su eklendikten sonra hacim 2 ml’ ye saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan renk reaktifi bu tüplere 5 µl aktarılıp oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüplere verilen folin reaktifinden (5 hacim Folin- Ciocalteu reaktifi, 6 hacim sudan oluşan) 0,5 ml pipetlenip karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika tekrar inkübasyon yapılmıştır. Örneklerin 750 nm dalga boyunda absorbans değeri elde edilmiştir.

Elde edilen absorbans değerleri albümin standart grafiği kullanılarak toplam protein miktarının hesaplanmasında kullanılmıştır. İnsan serum albümin (1/1) stok çözeltisinden (0–500 µl) değişen protein konsantrasyonu aralığında hazırlanan örnekler 750 nm’de ölçülerek sonuçlar elde edilmiştir. Bu değerler standart protein grafiği kullanılarak grafiğe aktarılmıştır (Şekil 2.4). Böylece elde edilen grafik denklemi sayesinde örnekteki protein miktarı belirlenmiştir.



Şekil 2.4. Protein standart grafiği.

## 2.9. ENZİMİN MOLEKÜLER AĞIRLIĞININ BELİRLENMESİ

### 2.9.1. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

Enzimin, molekül ağırlığının belirlenmesi amacıyla Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır [51]. Poliakrilamid jel, monomerik akrilamidin uzun zincirler oluşturması ve bu zincirlerin bisakrilamid monomerleri (N,N-metilenbisakrilamid) ile çapraz bağlanması sonucunda oluşmaktadır [52]. SDS-PAGE yönteminde kullanılan çözeltiler Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. SDS-PAGE’te kullanılan çözeltiler.

|                                                                                                                                                                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Monomer (akrilamid/bis) çözeltisi (%30 Akrilamid):</i> Polimer matriksi kurmak için 29,2 g akrilamid ve 0,8 g bisakrilamid tartılıp distile su ile toplam hacmi 100 mL’ye tamamlanır ve +4 °C’de muhafaza edilmiştir.          |
| <i>Ayırma Jeli Tamponu (1,5 M Tris-HCl pH 8.8):</i> 18,5 g Tris Base tartılıp bir miktar suda çözüldükten sonra pH’sı saf HCl ile 8.8’e ayarlanmış ve saf su ile hacmi 100 mL’ye tamamlanılmış olup +4 °C’de muhafaza edilmiştir. |
| <i>Yükleme Jeli Tamponu (1M Tris-HCl pH 6.8):</i> 12,11 g Tris Base tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra pH’sı saf HCl ile 6.8’e ayarlanmış ve distile su ile son hacim 100 mL’ye tamamlanmıştır.                         |
| <i>%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS):</i> Polimerizasyon başlatıcı olarak kullanılıp 10 g APS tartılmış ve hacmi distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.                                                                         |

Çizelge 2.2 (devam) SDS-PAGE’te kullanılan çözeltiler.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>%10 (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS):</i> 10 g SDS tartılmış ve 100 mL hacime tamamlanmıştır.                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <i>Örnek Uygulama Tamponu (denatürasyon çözeltisi):</i> <ul style="list-style-type: none"><li>➤ 150 µl 1 M Tris pH 6,8</li><li>➤ 250 µl Gliserol( %87)</li><li>➤ 400 µl % 10’luk SDS</li><li>➤ 100 µl Bromfenol Blue</li><li>➤ 60 µl B- merkapttoetanol</li><li>➤ 40 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek karışım son hacim 1 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.</li></ul>                                         |
| <i>Bromfenol Blue:</i> 5 ml Gliserol (%50 ‘lık) üzerine 0,005 g Bromfenol Blue boyası tartılıp eklenmiş ve 4 ml EDTA (0,2 M pH 8.3) ile 1 ml Saf su eklenerek elde edilmiştir.                                                                                                                                                                                                                            |
| <i>Tank Tamponu:</i> 21,6 g Glisin ve 4,5 g Tris Base (Fw 121,4) tartılıp bir miktar saf suda çözündürüldükten sonra üzerine 15 ml %10 SDS eklenerek son hacim 1500ml’ye tamamlanmıştır.                                                                                                                                                                                                                  |
| <i>Boyama çözeltisi:</i> Yürütme işlemi ardından jellerin boyanması için kullanılmıştır. Çözelti için 0,125 g Coomassie Brilliant Blue R-250 tartılmış üzerine 50 ml saf metanol ve 10 ml saf Asetik asit eklenmiş olup son hacim saf su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır.                                                                                                                                    |
| <i>Arındırma çözeltileri:</i> Boyama işlemi gerçekleştirilen jellerin üzerindeki protein bantlarının görünür hale gelmesi 1. yıkama çözeltisi ve jelin uzun süre muhafazası için 2. yıkama çözeltisi hazırlanmıştır. 1. hızlı yıkama çözeltisi 50 ml metanol ve 10 ml asetik asit, 2. yıkama çözeltisi ise 5 ml Metanol ve 7 ml Asetik asiti son hacimleri 100 ml’ye tamamlanacak şekilde hazırlanmıştır. |

### 2.9.2. SDS-PAGE jelinin hazırlanması

SDS-PAGE yöntemi için çizelge 2.3’de görülen 2 farklı jel (önce ayırma jeli ve ayırma jeli polimerleştikten sonra yükleme jeli) hazırlanmıştır. Ayırma jeli mikro pipet yardımıyla cam plaka arasına yavaşça dökülmüştür ve jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Jel yüzeyinin düzgün olması için üzerine saf su

dökülmüş ve polimerleşme tamamlandıktan sonra uzaklaştırılmıştır. Daha sonra yükleme jelide cam plaka arasına dökülerek elektroforez tavağı yerleştirilip polimerleşmesi beklenmiştir. Süre sonunda tarak kuyucukların bozulmamasına dikkat ederek çıkartılmıştır.

Çizelge 2.3. SDS-PAGE işlemi için hazırlanan jel içerikleri.

| %10 Ayırma Jeli hazırlanış (10 ml); |       |    | % 5 Yükleme Jeli Hazırlanışı(5ml); |       |    |
|-------------------------------------|-------|----|------------------------------------|-------|----|
| H <sub>2</sub> O                    | 4.6   | ml | H <sub>2</sub> O                   | 3.4   | ml |
| %30 Akrilamid                       | 3.3   | ml | %30 Akrilamid                      | 0.83  | ml |
| 1,5 M Tris pH 8.8                   | 2.5   | ml | 1 M Tris pH 6.8                    | 0.63  | ml |
| %10 SDS                             | 0.1   | ml | %10 SDS                            | 0.05  | ml |
| %10 APS                             | 0.1   | ml | %10 APS                            | 0.05  | ml |
| TEMED                               | 0,004 | ml | TEMED                              | 0,005 | ml |

### 2.9.3. Örneklerin hazırlanması ve elektroforez koşulları

Selüloz enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacı ile 10 farklı protein içeren (Thermo Scientific PageRuler Protein Marker, 26616) çözelti standart olarak kullanılmıştır. Ham selüloz enzimi örneği ve %80 oranında Amonyum Sülfat ile çöktürme sonucunda elde edilmiş kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisinden 30µl, ependof tüpüne alınarak üzerine 10 µl örnek uygulama tamponu (Çizelge 2.2) eklenmiştir. Örnekler 5 dakika süre ile kaynar suda bekletilmiştir. Böylece protein yapı denature edilmiştir. Hazırlanmış olan jel elektroforez tankına oturtularak alt ve üst haznelerine tank tamponu (Çizelge 2.2) ile doldurulmuştur.

Jelde hazırlanmış olan kuyucuklara örnekler yüklenmiş ve tanka akım vererek elektroforez işlemi başlatılmıştır. Yürütme boyası jelin 1 cm altında kalacak kadar ilerlediğinde işlem sonlandırılmıştır. Jele, örneklerin düzgün ilerlemesi ve ayırımın düzgünce gerçekleşmesi için 120 V sabit akım verilip, örneklerin kuyudan çıkma süresince ise bu akım 80 V olarak verilmiştir.

### 2.9.4. Boyama ve boyanın uzaklaştırılması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel cam plakalar dikkatlice açılarak çıkarılmıştır. Yükleme jeli kesilip yürütme jelinden ayrıldıktan sonra marker protein olan kuyucuk işaretlenmiştir. Jel içerisinde boyama çözeltisi (Çizelge 2.2) bulunan bir kaba alınıp 30 dakika boyanmıştır. Boyanması gerçekleşen jel, sırası ile 1. ve 2. yıkama

çözeltilerinde (Çizelge 2.2) 30'ar dakika tutulmuştur, böylece fazla boyanın arınması sağlanmıştır. Jelde oluşan bant görüntüleri incelenerek ham selüloz (süpernatant) ve % 80 amonyum sülfat çözeltisi ile kısmi saflaştırılması gerçekleştirilen selüloz enziminin moleküler ağırlığı marker proteinin ağırlığı baz alınarak hesaplanmıştır.

#### **2.9.5. Native-PAGE ve Zimogram Analizi**

SDS-PAGE Elektroforezinde görüntülediğimiz protein bandının doğrulanması amacıyla yapılmıştır. Bu analiz için SDS-PAGE işleminde hazırladığımız yürütme jeline (Çizelge 2.3) ek olarak 1mL CMC (%0.1) eklenerek yürütme jeli (%12), yükleme jeli (%5) olarak hazırlanmıştır. Moleküler ağırlığı bilinen marker (Thermo Scientific PageRuler Protein Marker, 26616) kullanılmış olup yükleme için hazırlanan protein örnekleri hiçbir aşamada denatürasyon ajanına (B-merkaptotanol, SDS ve kaynatma prosesi) maruz bırakılmamıştır.

Denatürasyona işlemine mağruz bırakılmayan 30 µl örnek protein ve 10 µl örnek uygulama tamponu (denatürasyon ajanı içermeyen) ile yüklenip dikey elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminden sonra jel ikiye bölünmüştür. Marker ve örnek (kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisi) içeren jel % 0.1 Coomassie Blue R-250 boyanıp ardından metanol-asit-su (5:1:4) solüsyonunda arındırılmıştır. Kısmi saflaştırılmış enzim çözeltisinin yüklendiği jel ise %0,1 Triton X-100 içeren 0.1M Sodyum asetat (pH 5.2) içeren tampon çözelti içerisinde 30 dakika SDS jelden ayrılması için bekletilmiştir. Ardından triton X-100 içermeyen 0.1M Sodyum asetat (pH 5.2) tampon çözeltisinde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda jel %0,2 Kongo kırmızısı boya içerisinde 1 saat boyanması sağlanmış olup, jel daha sonra 2M NaCl ile muamele edilip fazla boya ortadan kaldırılmış ve protein bandın olduğu yerde oluşan açık renkli aktivite zonu görüntülenmiştir [53].

### **2.10. SELÜLAZ ÜRETİCİ İZOLATIN TANIMLANMASI**

Bu çalışmada selüloz üretici bakterinin tanımlanması amacıyla morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlama teknikleri kullanılmıştır.

#### **2.10.1. Morfolojik Tanımlama**

Bu çalışmada öncelikle, saf kültüre edilen selüloz üretici bakterinin gram özelliği %3'lük KOH (Potasyum hidroksit) kullanılarak oluşturulan bir uygulama tekniği ile

tespiti elde edilmiştir. Taze hazırlanmış olan KOH steril lam üzerine damlatılmıştır. Ardından bakterinin saf kültürü süspanse edilmiştir. 1 dakika beklendikten sonra sonuç değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, süspansiyon öze ile lamdan yukarı doğru kaldırıldığı zaman iplik şeklinde bir uzama görüldüğünde, bakterinin Gram (-) olduğu, herhangi bir uzama görülmediğinde ise bakterinin Gram (+) olduğu belirlenerek gram özellik saptanmıştır [54].

Morfolojik tanımlama kapsamında, selüloz üretici izolat basit boyama tekniği ile boyanmış ve ışık mikroskobu ile hücre morfolojisi tespit edilmiştir. Bununla birlikte koloni morfolojisi değerlendirilmiştir.

Ayrıca kristal boyama ile izolatın kristal üretme yeteneği belirlenmiştir. Kristal boyama için selüloz üretici izolat 5 gün boyunca NA besiyerinde büyütülmüştür. Besiyeri üzerinden kültür alınarak 1 M NaCl'de çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra 13.000 rpm de +4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet dH<sub>2</sub>O da çözülmüş ve ardından Semear hazırlanmıştır. Daha sonra coomassie brilliant blue (%50 etanol ve %7 asetik asit çözeltisi içerisinde %25 CBB) boyası ile boyanmıştır. Işık mikroskobu ile kristal oluşturma yeteneği olup olmadığı değerlendirilmiştir [55].

### **2.10.2. Biyokimyasal Tanımlama**

Saf kültüre edilen selüloz üretici bakteri nutrient agara (NA) ekim yapılarak bir günlük inkübasyon sonrası VITEK 2 sistemi ile biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Karadeniz Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji laboratuvarında analiz edilmiştir. VITEK 2 sisteminde sıvı dilüsyon bazlı Gram (+), Gram (-), maya ve küf gibi organizmaların tanımlanmalarını olanak sağlayan 64 tane kuyucuklu kartlar kullanılmaktadır.

### **2.10.3. Moleküler tanımlama**

#### **2.10.3.1. Bakteri Teşhisi için DNA İzolasyonu**

Bakteri tanımlanması için yapılan DNA izolasyonunda SamBrook (1989) tarafından önerilen yöntem izlenmiştir [56]. Gece kültüründen 9 mL alınıp 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilip elde edilen pellet 500 µl TE tamponunda (0,5M EDTA içerisinde 0,1 mL alınıp üzerine 1M Tris-Base'den 0,5 mL eklenerek son hacmin 50 mL tamamlanmasıyla elde edilmiştir) çözündürülüp üzerine 10 µl lizozim eklenmiş ve homojenize edildikten sonra 37°C'de 1 saat bekletilmiştir. Süre sonunda 50 µl %10'luk SDS eklenmiş ve

tekrar 37°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 3M Sodyum Asetattan 55 µl eklenmiş ve 65°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Sonrasında 500 µl phenol: kloroform: izomil alkol (25:25:1) ilave edilip 13.000 rpm’de 4 dk santrifüj edilmiştir. Ardından tüpte oluşan üst faz başka bir tüpe alınarak üzerine 500 µl kloroform eklenmiş ve tekrar 13.000 rpm’de 4 dk süreyle santrifüj edilmiştir. Tekrar üst faz yeni tüpe aktarılıp 55 µl 3M Sodyum asetat ve 1000 µl %96’lık etanol (-20 °C) ilave edilmiş ardından 45 dakika -20 °C’de bekletilmiştir. Daha sonra 13.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilip sıvı tamamen dökülmüştür. Kalan pellet üzerine 500 µl %70’lik etanol (-20°C) eklenmiş ve tekrar 2 dakika santrifüj edilip sıvı kısım dökülmüştür. Tüp 37°C’de 10 dakika kurutulmuş ve son olarak 100 µl TE tamponu eklenip pelletler çözülerek +4°C muhafaza edilmiştir.

#### 2.10.3.2. Agaroz jel elektroforezi

Elde edilen DNA örneklerinin görüntülenmesi ve doğruluk tespiti için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Öcelikle 0.4 g Agaroz tartılmış 50 mL TAE Tamponu ile tamamlanıp kaynatılma işlemi ile homojenize edilmiş, soğuduktan sonra 5 mL Etidyum Bromür eklenerek jel hazırlanmış ve tanka dökülmüştür. Taraklar yardımıyla jelde kuyular oluşturulmuştur. Kuyulara DNA yüklemesi (5 µl loading dye ve 5 µl DNA örneği) yapılarak yatay elektroforez işlemi gerçekleştirilmiş olup, izolasyonu yapılan DNA’nın doğrulanması yapılmıştır.

#### 2.10.3.3. 16S rRNA Dizisinin Belirlenmesi

Daha sonra saflaştırılan enzim üretici izolata ait DNA örneğindeki 16S rDNA bölgesinin çoğaltılması amacı ile PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gerçekleştirilmiştir. Bakteriyal izolata 16S rDNA gen analizlerinin yapılabilmesi için başta aşağıdaki primerler ve PCR şartları kullanılmak üzere toplam 50 µL hacimde thermal cycler block (Thermo, 5020) cihazı kullanılarak, PZR reaksiyonu yapılmıştır (Çizelge 2.4, 2.5 ve 2.6). Ardından PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen örnekler, 2.10.2.’de anlatıldığı gibi hazırlanan 0,5 µg/ml etidyum bromür ihtiva eden % 0,8’lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntülenmiştir ve marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo) dikkate alınarak molekül büyüklüğü kontrol edilmiştir. PCR örnekleri +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 2.4. Çalışmada kullanılan primerler.

| Adı              | Uzunluğu (bp) | GC İçeriği (%) | Tm (°C) | Dizi                                      |
|------------------|---------------|----------------|---------|-------------------------------------------|
| 16s rDNA Forward | 24            | 38             | 47      | 5'-ATT CTA GAG TTT GAT CAT GGC TCA-3'     |
| 16s rDNA Reverse | 27            | 59             | 59      | 5'-ATG GTA CCG TGT GAC GGG CGG TGT GTA-3' |

Çizelge 2.5. Polimer zincir reaksiyonu içeriği.

| İçerik            | Miktar / Son konsatrasyon |
|-------------------|---------------------------|
| Tamponu 10x       | 5 µl / 1X                 |
| MgCl <sub>2</sub> | 3 µl / 1mM                |
| Forward primer    | 1,5 µl / 100mM            |
| dNTP              | 1 µl / 100mM              |
| Revers primeri    | 1,5 µl / 100mM            |
| Taq DNA polimeraz | 0,5 µl / 5 U / mL         |
| DNA               | 1µl                       |
| dH <sub>2</sub> O | 36,5 µl /                 |
| Toplam            | 50 µl /                   |

Çizelge 2.6. PCR koşulları.

| Segment | Döngü Sayısı | Sıcaklık | Süre     |
|---------|--------------|----------|----------|
| 1       | 1            | 95 °C    | 2 dakika |
| 2       | 36           | 94 °C    | 1 dakika |
|         |              | 50 °C    | 1 dakika |
|         |              | 72 °C    | 2 dakika |
| 3       | 1            | 72 °C    | 5 dakika |

#### 2.10.4. Elde Edilen DNA Baz Dizilimlerinin Analizi

Selüloz üretici bakteriyal izolatın DNA'sı 20 µL'lik hacim içinde 200 mg/µl konsantrasyonda hazırlanmıştır. 16S rDNA bölgelerinin tanımlanması için örnekler Letgen biyoteknoloji (Türkiye) firmasına gönderilmiştir. Sekans sonucunda elde edilen 16S rRNA geninin baz dizilimi FinchTv programı ile düzenli forma getirildikten sonra gen bankasında bulunan diğer 16S rDNA genleri ile NCBI web adresindeki BLAST

(Basic Local Alignment Search Tool) programı kullanılarak karşılaştırması yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### **2.10.5. Filogenetik Ağaç Tasarımı**

Filogenetik analizde bakteri izolatının 16S rDNA gen dizisi ve yakından ilişkili oldukları türler kullanılmıştır. Maksimum Parsimoni yöntemi ile MEGA 5.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir [57].



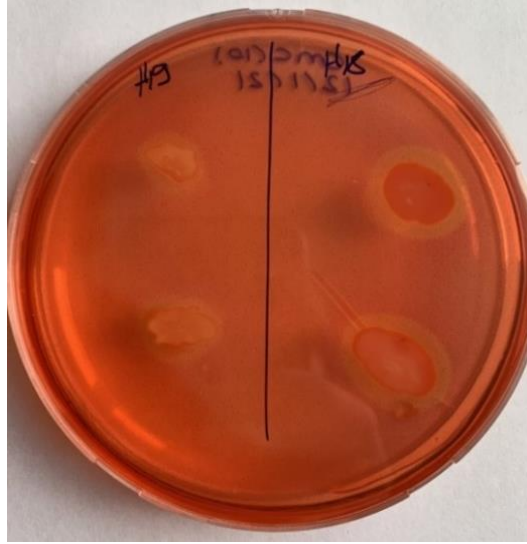
### 3. BULGULAR

#### 3.1. SELÜLAZ ÜRETİCİ BAKTERİLERİN BELİRLENMESİ

Çalışmada toprak örneğinden izole edilmiş toplam 30 adet bakteri izolatının selülaaz enziminin üretme kapasiteleri kalitatif olarak araştırılmıştır (Şekil 3.1.). Bunun için 30 izolat CMC içeren agarlı ortamda 24 saat boyunca 37 °C’de inkübe edilmiş ve kalitatif enzim aktivite tayini ile 7 izolatın koloni çevresinde açık renkli hidrolitik zonlar görülmüştür. Açık renkli zonların varlığı bakterinin selülaaz enzimi ürettiğini göstermiştir (Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Selülaaz üretici bakterilerin kalitatif tayini.

| Bakteri<br>Sıra No | Selülaaz<br>Aktive | Bakteri<br>Sıra No | Selülaaz<br>Aktive | Bakteri<br>Sıra No | Selülaaz<br>Aktive |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1.                 | -                  | 11.                | -                  | 21.                | -                  |
| 2.                 | -                  | 12.                | +                  | 22.                | -                  |
| 3.                 | +                  | 13.                | -                  | 23.                | +                  |
| 4.                 | -                  | 14.                | -                  | 24.                | -                  |
| 5.                 | -                  | 15.                | -                  | 25.                | -                  |
| 6.                 | -                  | 16.                | -                  | 26.                | +                  |
| 7.                 | -                  | 17.                | -                  | 27.                | -                  |
| 8.                 | -                  | 18.                | +                  | 28.                | -                  |
| 9.                 | -                  | 19.                | -                  | 29.                | -                  |
| 10.                | +                  | 20.                | +                  | 30.                | -                  |



Şekil 3.1. Kalitatif selülag aktivite tayininde zon oluşumu.

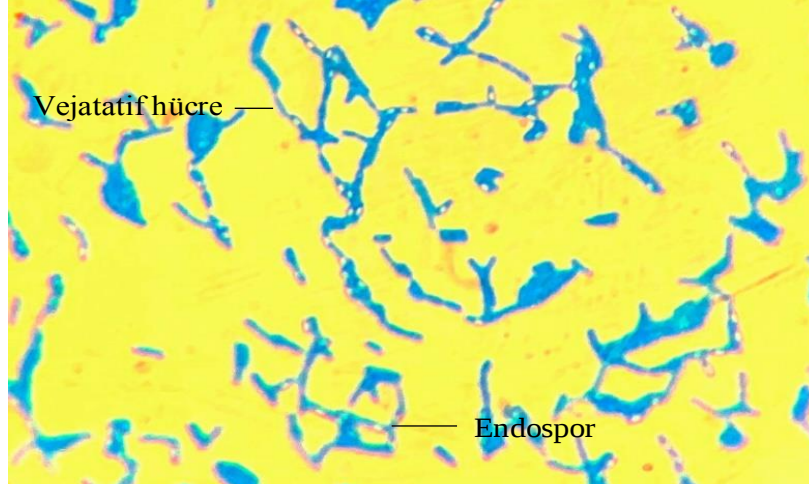
Ardından belirlenen 7 adet selülag üretici izolat CMC içeren sıvı besiyerine 24 saat inkübe edilmiş ve daha sonra DNS yöntemi kullanarak enzim aktiviteleri spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. En yüksek selülag aktivite değeri gösteren bakteri sıra numarası 18 olarak belirlenmiş olup, çalışmaya devam edilmek üzere seçilmiştir. İzolat DU-1 olarak adlandırılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Kantitatif enzim aktivitesi.

| Bakteri Sıra No | OD <sub>540</sub> | Enzim Aktivite (U/ml) |
|-----------------|-------------------|-----------------------|
| 3               | 0,340             | 2,36                  |
| 10              | 0,367             | 2,64                  |
| 12              | 0,336             | 2,32                  |
| <b>18</b>       | <b>0,480</b>      | <b>3,80</b>           |
| 20              | 0,320             | 2,16                  |
| 23              | 0,402             | 2,90                  |
| 26              | 0,410             | 3,10                  |

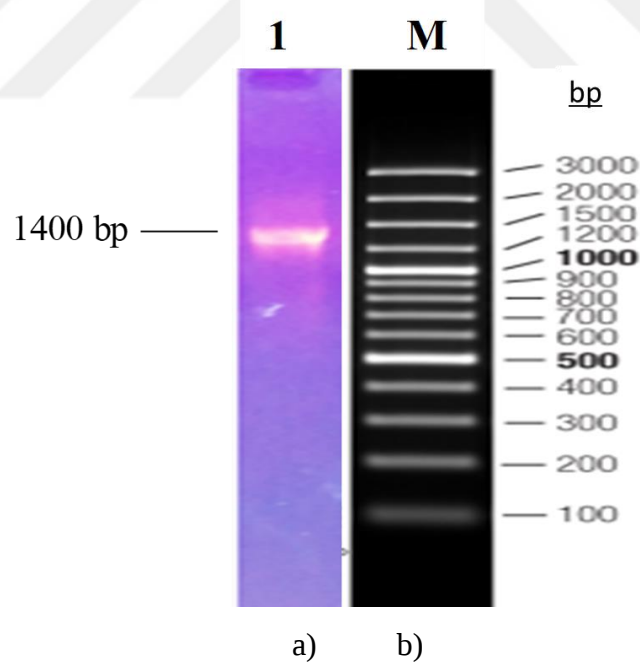
### 3.2. SELÜLAZ ÜRETİCİ BAKTERİYAL İZOLATIN TANIMLANMASI

Yapılan morfolojik analizler neticisinde, selülag üretici bakteri izolat DU-1'in çubuk şekilli hücrelere sahip Gram (+) bir bakteri olduğu tespit edilmiştir. Bakteri kolonisinin kuru, mat, kenarları düzensiz, granüllü yüzeyli olduğu tespit edilmiştir. Kristal boyama ile kristal oluşturmadığı ancak endospor oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bakteriyal izolat DU-1 (*Bacillus cereus*).

Biyokimyasal analiz sonucu neticesinde bakterinin *Bacillus thuringiensis* ya da *Bacillus cereus* olduğu tespit edilmiştir. Ardından moleküler tanımlama ile bakterinin *Bacillus* sp. olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 3.3, Ek 1). Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tanımlama teknikleri ile elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde bakterinin *Bacillus cereus* olduğu tespit edilmiş ve *Bacillus cereus* DU-1 olarak isimlendirilmiştir.

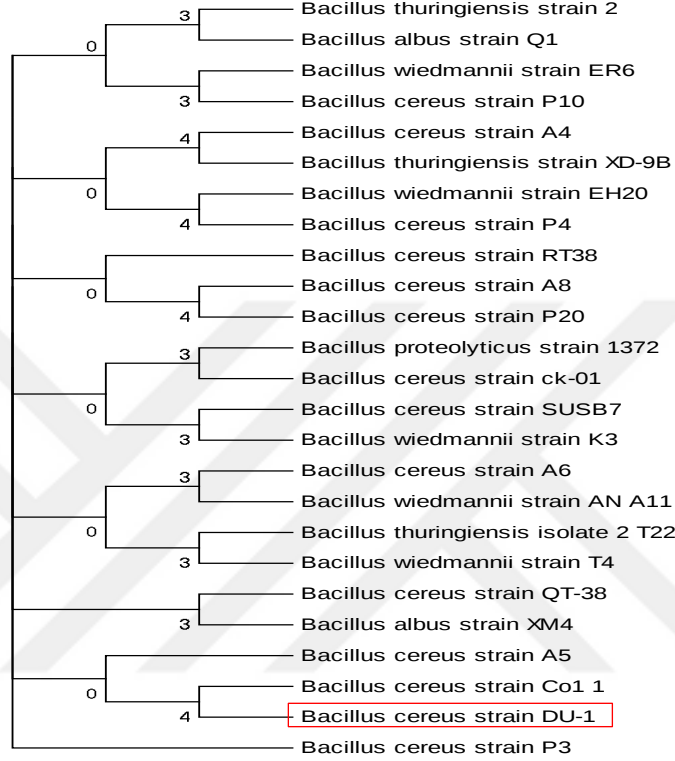


Şekil 3.3. PCR profili.

a) Bakteriyal izolat DU-1 ait 1400bp büyüklüğündeki 16s rDNA dizisinin agaroz jel elektroforez görüntüsü b) Marker.

### 3.3. FİLOGENETİK AĞAÇ OLUŞTURULMASI

Bakteriyel izolatın filogenetik analizi yüksek benzerlik gösterdiği referans türlerle kıyaslanarak yapılmıştır (Şekil 3.4). Tamura-Nei modeline dayalı Maksimum Olabilirlik yöntemini kullanarak Evrimsel tarih çıkarılmıştır [58].



Şekil 3.4. Maksimum parsimoni yöntemiyle moleküler filogenetik analiz.

### 3.4. SELÜLAZ ÜRETİM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Selülaaz enziminin üretim koşullarının optimizasyonu kapsamında azot kaynaklarının, pH'nın, sıcaklığın ve sürenin enzim aktivitesine etkisi belirlenmiştir.

#### 3.4.1. Selülaaz Üretimine Azot (N) Kaynaklarının Etkisi

Azot kaynaklarının enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amacıyla kontrol ortamında birlikte bulunan organik azot kaynakları olan tripton yerine sırasıyla; 5g/L pepton ve üre kullanılmıştır. Belirtilen besiyortamlarına bakterinin % 1 oranında *Bacillus cereus* DU-1 inokulasyonu yapılmış olup, 24 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda alınan örneklerde selülaaz aktivite tayini yapılmıştır (Çizelge 3.3). Maksimum enzim aktivitesinin azot kaynağı olarak tripton varlığında 3,96 U/ml olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. Farklı azot kaynaklarının enzim aktivitesine etkisi.

| Azot Kaynakları | Aktivite (U/ml) |
|-----------------|-----------------|
| Trypton         | 3,96            |
| Pepton          | 3,27            |
| Üre             | 2,91            |

#### 3.4.2. Selüloz Üretimine pH'nın Etkisi

pH'nın *Bacillus cereus* DU-1 bakterisinin enzim üretme yeteneğine olan etkisine bakıldığında 2.4.4.'de belirtilen değişken parametreler sonucunda bakteriden elde edilen enzimin aktivite değerleri belirlenmiş olup, en iyi aktivite değerinin pH 7.0'de olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.4) Bu bağlamda ilerleyen çalışma basamaklarında belirtilen pH 7.0 değeri dikkate alınarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Sıcaklık ve sürenin enzim aktivitesine etkisi.

| Sıcaklık (°C) | pH  | Aktivite (U/mL) |         |         |
|---------------|-----|-----------------|---------|---------|
|               |     | 24 Saat         | 48 Saat | 72 Saat |
| 30            | 5.0 | 2,8             | 2,6     | 2,0     |
|               | 7.0 | 3,3             | 2,8     | 3,0     |
|               | 9.0 | 2,5             | 2,4     | 2,2     |
| 45            | 5.0 | 3,64            | 3,47    | 3,20    |
|               | 7.0 | <b>3,60</b>     | 3,50    | 3,31    |
|               | 9.0 | 2,79            | 2,96    | 3,0     |
| 65            | 5.0 | 1,8             | 1,7     | 1,4     |
|               | 7.0 | 2,0             | 1,8     | 1,5     |
|               | 9.0 | 1,4             | 1,0     | 0,9     |

#### 3.4.3. Selüloz Üretimine Sıcaklık Ve Sürenin Etkisi

Belirlenen optimum pH 7.0'de farklı sıcaklıkların *Bacillus cereus* DU-1 bakterisinin enzim üretme yeteneğine olan etkisine bakıldığında, 2.4.4.'de belirtilen değişken parametreler sonucunda bakteriden elde edilen enzimin aktivite değerleri belirlenmiş olup en iyi aktivite değerinin 37°C'de ve 24 saat inkübasyonun sonucunda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.5). Bu bağlamda ilerleyen çalışma basamaklarında belirtilen süre ve sıcaklık dikkate alınarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Sıcaklık ve sürenin enzim aktivitesine etkisi.

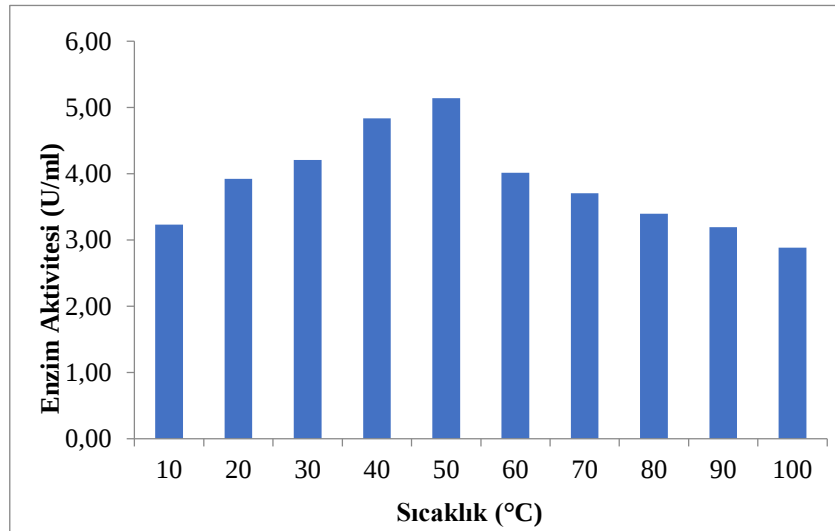
| Sıcaklık<br>(°C) | Aktivite (U/mL) |         |         |
|------------------|-----------------|---------|---------|
|                  | 24 Saat         | 48 Saat | 72 Saat |
| 30               | 3,30            | 2,80    | 3,00    |
| 37               | <b>3,80</b>     | 3,74    | 3,62    |
| 45               | 3,60            | 3,50    | 3,31    |
| 65               | 2,00            | 1,80    | 1,50    |

### 3.5. SELÜLAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

Selülaaz enziminin karakterizasyonu kapsamında enzimin çalıştığı optimum sıcaklık ve pH değeri belirlenmiştir. Ayrıca enzimin belirlenen sıcaklık ve pH değerindeki stabilitesi belirlenmiştir.

#### 3.5.1. Sıcaklık ve Sıcaklık Stabilitesi

Sıcaklığın enzimin katalitik gücüne etkisini belirlemek amacıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 °C gibi farklı sıcaklıklara mağruz bırakılan enzimin aktivite tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusundan glikoz standart eğrisi kullanılarak enzimin her sıcaklık aralığında sahip olduğu aktivite değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, 50 °C’de enzimin maksimum aktivite gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Enzimin 50 °C’de optimum aktivite gösterdiği, 50 °C’nin üzerinde ise artan sıcaklık ile aktivitesinde kaybın yaşandığı tespit edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi.

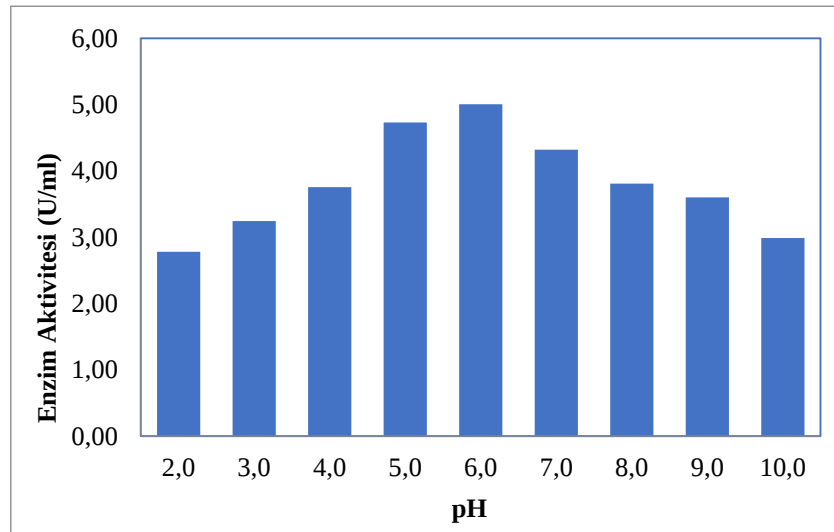
Sıcaklığın enzim stabilitesine etkisine, enzimin maksimum aktivite gösterdiği 50 °C’de bakılmıştır. Enzim çözeltisi (enzim+substrat) su banyosunda 30, 40, 50, 60 ve 120 dakika süre ile tutulmuştur. Kısmi saf enzimin 50.dakikaya kadar aktivitesini koruduğu ancak sürenin artması ile enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Sıcaklığın enzim stabilitesine etkisi.

| Süre<br>(Dakika) | Enzim Aktivitesi<br>(U/mL) |
|------------------|----------------------------|
| 30               | 5,03                       |
| 40               | 5,10                       |
| 50               | 5,14                       |
| 60               | 4,41                       |
| 120              | 3,48                       |

### 3.5.2. pH ve pH Stabilitesi

pH’nın enzimin katalitik gücüne etkisini belirlenmek amacıyla enzimin, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0 gibi farklı pH’larda hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak DNS yöntemi ile aktivite tayini yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda Şekil 3.6’da görüldüğü gibi enzimin optimum aktivite gösterdiği pH değerinin 6.0 olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.6. pH’nın enzim aktivitesi üzerine etkisi.

pH'nın enzim stabilitesine etkisine, enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH 6.0 değerinde bakılmıştır. Enzim pH 6.0 değerinde 30, 40, 50, 60 ve 120 dakika su banyosunda inkübe edilmiştir. Enzim ilk 40 dakikaya kadar aktivitesini korurken süre artmasıyla enzimin aktivitesinde kayıp olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. pH'nın enzim stabilitesine etkisi.

| Süre<br>(Dakika) | Enzim Aktivitesi<br>(U/mL) |
|------------------|----------------------------|
| 30               | 5,04                       |
| 40               | 5,10                       |
| 50               | 4,95                       |
| 60               | 4,21                       |
| 120              | 3,19                       |

### 3.6. SELÜLAZ ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI

Enzimin kısmi saflaştırılmasından önce *Bacillus cereus* DU-1 suşu 24 saat boyunca temel üretim besiyerinde (Çizelge 2.1.) üretilmiştir. Üretim sonrası kültür ortamı +4°C'de 7000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş olup süpernatant ayrılmış ve ham enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır. Elde edilen ham enzim çözeltisi amonyum sülfat çöktürmesi işlemine tabi tutularak kısmi olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma adımı elde edilen fraksiyonun aktivite ve protein tayini standart koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Kısmi saflaştırma işlemi ham enzim çözeltisine sırasıyla %30, %50 ve %80 konsantrasyonlarındaki amonyum sülfat varlığında çöktürmeler yapılmıştır. Enzimin en fazla elde edildiği amonyum sülfat konsantrasyonu %80 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi.

| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi<br>(%) | Enzim Aktivitei<br>(U/mL) |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 30                                                                | 2,53                      |
| 50                                                                | 2,90                      |
| 80*                                                               | 3,44                      |

\*Başarılı amonyum sülfat doyumluk oranı

Buna göre % 80'lık çöktürmeden elde edilen enzimin aktivitesi 3,44 U/mL olarak hesaplanmıştır. Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi için %80 oranında amonyum sülfat ile çöktürmeyle elde edilen pellet 50 mM Sodyum-Fosfat(pH 6.5) tamponunda +4°C'de muhafaza edilmiştir. Süpernatant enzim çözeltisi ve %80 amonyum sülfat çöktürmesi ile elde edilen enzim çözeltisine ait aktivite değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Selüloz enziminin kısmi saflaştırılma özeti.

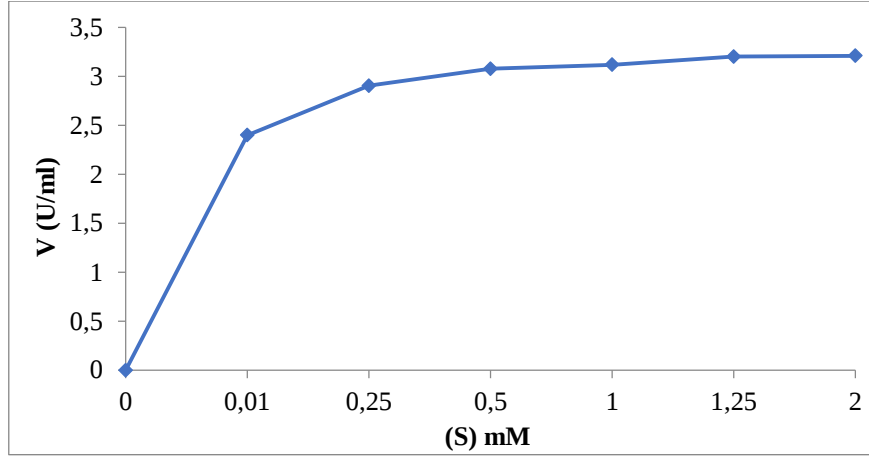
| Saflaştırma Basamağı                                             | Hacim (mL) | Toplam protein (mg) | Toplam Aktivite (U/mL) | Spesifik Aktivite (U/mg) | Verim <sup>1</sup> (%) | Saflık <sup>2</sup> |
|------------------------------------------------------------------|------------|---------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------|
| Ham enzim (Süpernatant)                                          | 200        | 2,31                | 5,16                   | 2,23                     | 1,5                    | 1                   |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çöktürmesi (%80) | 10         | 1,76                | 3,44                   | 1,95                     | 1,95                   | 3                   |

<sup>1</sup>Verim, toplam aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

<sup>2</sup>Saflık, spesifik aktivite üzerinden hesaplanmıştır.

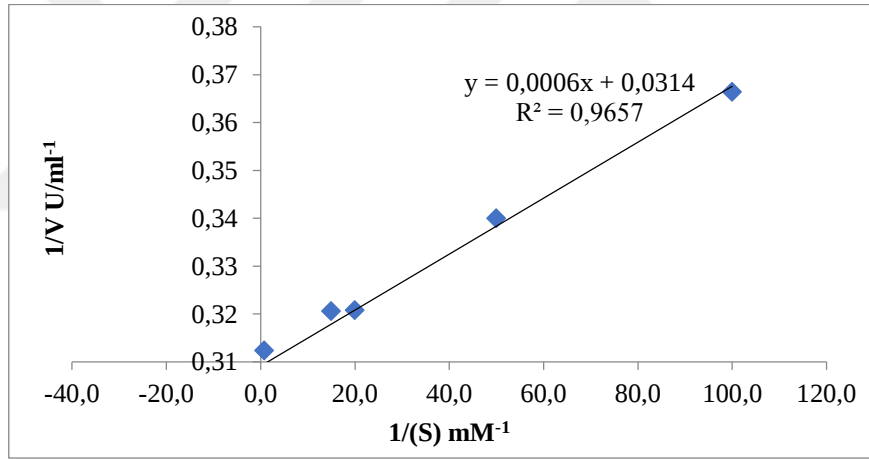
### 3.7. ENZİM KİNETİĞİNİN HESAPLANMASI

Enzim kinetiğinin hesaplanması amacıyla Michaelis-Menten kinetik grafiği oluşturulmuştur (Şekil 3.7). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CMC substratı (0,001-2 mM) ile selüloz enzimi optimum sıcaklık ve pH değerinde (50 °C ve pH 6.0) 30 dakika inkübasyon süresi olmak üzere enzim aktivitesi standart deney koşulları sağlanarak ölçülmüştür.



Şekil 3.7. Michaelis-Menten grafiği.

Michaelis-Menten denklemi hiperbolik bir eğri denklemdir. Hiperbolik eğrinin karakteristik noktalarını belirlemek güç olduğundan, kinetik hesaplaması için  $1/[V]$ 'ye karşı  $1/[S]$  olarak çizilen Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanılmıştır (Şekil 3.7).

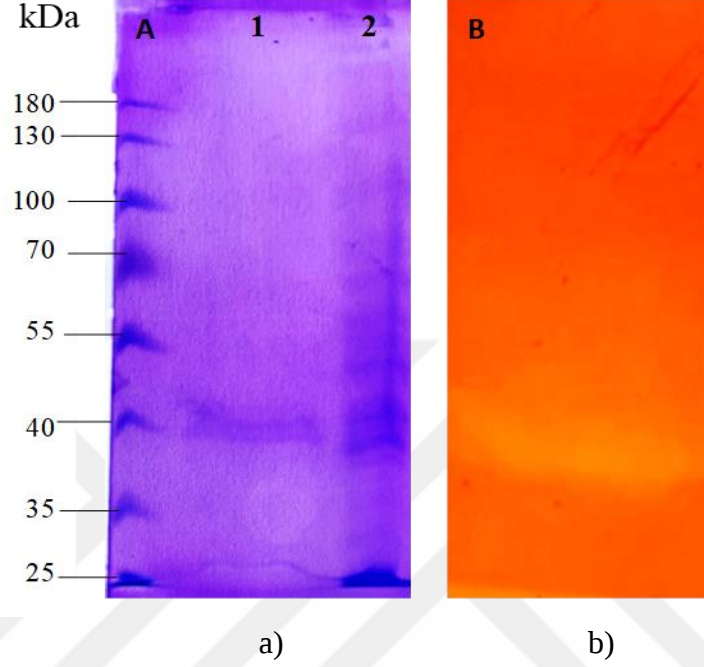


Şekil 3.8. Lineweaver-Burk grafiği.

Lineweaver-Burk grafiğine ile selüloz enzimin CMC varlığında reaksiyon hızının maksimum olduğu ( $V_{\max}$ ) ve reaksiyon hızının, maksimum yarı hızdaki ortamda bulunan substrat konsantrasyonu ( $K_m$ ) değerleri bulunmuştur. Selüloz enzimin şekil 3.8.'den  $V_{\max}$  değeri 3,18 U/ml ve  $K_m$  değeri 0,0019 mM olarak hesaplanmıştır.  $K_m$  değerinin düşük olması enzimin substratına karşı olan afinitesinin yüksek olduğunu göstermiştir.

### 3.8. ENZİMİN MOLEKÜLER AĞIRLIĞININ BELİRLENMESİ

Elektroforez işlemi sonucunda enzimin moleküler ağırlığı yaklaşık 40 kDa olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.9.A). Moleküler ağırlığı belirlenmiş olan enziminin zimogram analizi sayesinde aktivitesi ölçülmüş ve bant doğrulanmıştır (Şekil 3.9.B).



Şekil 3.9. Enzimin moleküler ağırlığının belirlenmesi.

a) A-PAGE görüntüsü 1-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çöktürmesi (%80) 2-Ham enzim (Süpernatant)

b) B-Zimogram analizi sonrası jel görüntüsü.

#### 4. TARTIŞMA

Enzim teknolojisinin günümüzde giderek geliştirilmesi, ürünlerin ekonomik değerinin çok yüksek olması ve kullanım alanlarının çeşitliliği sebebiyle, endüstriyel enzimler ile yapılan bilimsel araştırmalar gün geçtikçe büyük önem arz etmektedir [59].

Endüstriyel uygulamalarda sırasıyla proteaz, amilaz ve selüloz enzimlerine ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir. Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin içerisinde selülozu hidrolize eden selüloz enzimlerinin, proteazlardan ve amilazlardan sonra endüstriyel olarak üçüncü önemli biyoteknolojik enzim olduğu görülmektedir.

Selüloz enzimlerinin, gıda endüstrisinden ziraat endüstrisine, tekstil endüstrisinden kâğıt endüstrisine, ilaç endüstrisinden, kimya endüstrisine kadar geniş bir uygulama alanına sahip olduğu yapılan birçok çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma, böylesi geniş bir sektörel kullanıma sahip mevcut selüloz enzimlerine bir yenisini ekleyebilmek amacıyla tasarlanmış olup çalışmada, selülotik atıkların yeraldığı toprak örneğinden 30 bakteri izolasyonu yapılmış ve DU-1 kodlu izolatin selüloz üretici olduğu tespit edilmiştir. Yapılan tanımlama çalışmaları ile bu izolatin *Bacillus cereus* olduğu tespit edilmiş ve *Bacillus cereus* DU-1 suşu olarak isimlendirilmiştir.

*Bacillus* cinsleri hidrolitik enzimler için dikkat çekicidir ve endüstriyel işlemlerde sıklıkla kullanılmaktadır. *Bacillus polmyxa*'nın selüloz sentezi konusunda yapılan çalışmada, selülozun ekstrasellüler enzim olduğu ve enzimin hücrelerden ekstrate elde edilebileceği bildirilmiştir [60]. Yine yapılan farklı bir çalışmada, *Bacillus brevis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polmyxa* ve *Bacillus cereus*'un selülotik bir aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [61]. *Bacillus* cinsine ait bakterilerin kolaylıkla kültüre edilebilmesi ve *in vitro* ekstrasellüler enzim üretme yeteneklerinden dolayı selüloz üretici bakteriler arasında *Bacillus* cinsi oldukça dikkat çekicidir. Bu bağlamda, bu çalışmada da *Bacillus* cinsi bir bakteriden selüloz elde edilmesi umut vaad etmektedir.

Enzimler genel olarak globüler yapıda bulunmakta ve molekül içi veya arası bağlar ile sekonder ya da tersiyer yapıda tutulmaktadır. Proteinlerin bu yapıları sıcaklık ve pH'da ki değişimler nedeni ile bozulabilmektedir. Bundan dolayı, enzimin katalitik aktivitesi pH ve sıcaklığa karşı duyarlıdır [62]. Optimum sıcaklık ve pH değerlerinde enzimin katalitik aktivitesinin arttığı bilinmektedir. Bu bağlamda, bu çalışmada *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen enziminin üretim ve katalitik aktivitesine sıcaklık ve pH'nın etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, enzimin azot kaynağı olarak triptone varlığında, 24 saatte, pH 7.0 ve 37 °C'de *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından en iyi şekilde üretildiği belirlenmiştir. Aynı zamanda, *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen selüloz enzim optimum aktivitesini; pH 6.0'da ve 50°C'de gösterdiği belirlenmiştir. *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen selüloz enziminin sıcaklık karakterizasyonu analizleri sonucunda termotolerant özellikte olduğu ve yapılan sıcaklık stabilite deneyi sonucunda aktivitesinin 50 dakika boyunca koruduğu ve yine 120 saat boyunca yapılan pH stabilite deneyinde 40 dakika boyunca aktivitesinin koruduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, Tibet domuzu dışkısından izole edilen *Bacillus subtilis* BY-3 suşunun selüloz aktivitesi tespit edilmiş, bakterinin maksimum selüloz üretimini substrat olarak mısır koçanı kullanıldığında ve 24 saatin sonunda gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar optimum enzim aktivitesinin 5.5 pH ve 60 °C sıcaklık değerlerinde gerçekleştiğini, 60 °C'de 60 dk ön inkübasyon sonucunda en iyi stabiliteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [63]. Farklı bir çalışmada, *Bacillus* sp. KSM-S237'den izole edilmiş termostabil alkali selülozın optimum aktivitesini pH 8.6-9.0 ve 45°C'de gösterdiği bildirilmiştir [64]. Kim ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, *Bacillus* sp. HSH-810 suşundan alkali selüloz izolasyonu yapılmış ve enzimin pH 10.0'da ve 50°C'de optimum aktivite gösterdiğini belirtilmiştir [65]. *Bacillus licheniformis*'ten elde ettikleri endoglukanaz enziminin optimum çalışma sıcaklığının 65 °C'de gösterdiği tespit edilmiş, 1 saatlik inkübasyon işleminde 60°C'de daha stabil olduğunu ve % 90'dan fazla aktiviteye sahip olduğunu açıklamıştır. Optimum çalışma pH'sı 6.0 olan enzim pH 10.0'da % 40 aktiviteye sahiptir [66]. Bir diğer çalışmada, termofilik *Bacillus* tarafından selüloz üretiminin en yüksek seviyesine 48. saatte ve 45 °C'de ulaştığı, enzim aktivasyonu için optimum pH aralığının ise 6.5-7.5 olduğunu bildirilmiştir [67]. Farklı bir çalışmada *Bacillus* sp. C1AC5507 tarafından üretilen selüloz enziminin üretimi için optimum sıcaklık ve pH koşullarının sırasıyla 70 °C ve 7.0 olduğu bildirilmiştir [68].

Yine bir çalışmada, *Bacillus subtilis* SU40 tarafından üretilen selüloz enziminin pH 8.0'da maksimum aktivite gösterdiği, enzimin 30 dakika boyunca 7-9 pH aralığında aktivitesinin % 50' sinden fazlasını korumuş olduğu, enzimin 35°C-75°C sıcaklık aralığında aktivitesini koruduğu ve aktivitesinin en yüksek olduğu sıcaklığın 45°C olduğu bildirilmiştir [69]. *Bacillus vallismortis* RG-07 tarafından üretilen selüloz enzimi aktivitesi için ise optimum sıcaklık 65°C ve pH 7.0 olarak belirlenmiştir. 95°C ve pH 9.0'da bile aktivitesinin %95 ve %75'ini koruduğunu gözlenmiştir [41]. İki *Bacillus* suşundan üretilen selüloz enzimlerin optimum aktivitelerini pH 5.0-6.5'de ve 65 ve 70°C'de gösterdikleri tespit edilmiştir [38]. *Bacillus circulans*'dan izole edilen alkalın endoglukanazın pH 8.5'da 55°C'de optimal çalıştığını saptamıştır [70]. *Görüldüğü üzere, bu çalışmada elde edilen selüloz enziminin optimum şartlarına benzer enzimler olduğu gibi oldukça farklı şartlarda aktivite gösteren ve üretilen enzimler mevcuttur* [67], [68].

Enzim kinetiği, enzimle katalizlenen bir reaksiyonun hızını ve mekanizmasının incelenmesidir. Bu çalışmada *Bacillus cereus* DU-1 suşunun selüloz enzim kinetiği incelenmiştir. Lineweaver-Burk garfiginden yararlanılarak *Bacillus cereus* DU-1 tarafından üretilen enzimin substrat ile tam doyumluğa geçtiği  $V_{max}$  ile ortamda bulunan tüm enzim moleküllerinin aktif bölgelerinin yarısını dolduran substrat miktarı  $K_m$  değerleri bulunmuştur. Analizi sonucunda *Bacillus cereus* DU-1 suşunun selüloz enziminin  $V_{max}$  değeri 3,18 U/mL ve  $K_m$  değeri 0,0019 mM olarak bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada, *Bacillus subtilis* SU40 tarafından üretilen selüloz enziminin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri 1.97 mg/mL ve 75.41 mg/mL/s olarak rapor etmişlerdir [69]. *Bacillus vallismortis* RG-07 bakterisi tarafından üretilen selüloz enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$ 'ın sırasıyla 1.923 mg/ml ve 769.230 µg/ml olduğunu rapor etmişlerdir [41]. *Görüldüğü üzere bu çalışmada karakterize edilen selüloz enziminin  $K_m$  değerinin oldukça düşük olduğu substrat afinitisinin çok yüksek olduğu görülmektedir. Yine  $V_{max}$  değerinin oldukça yüksek olduğu enzimin katalitik gücünün yüksek olduğu bilgisini vermektedir.*

Bu çalışmada aktif enzim içerikli süpernatant ve sonrasında %80 oranında  $(NH_4)_2SO_4$  çöktürmesi ile enzim kısmen saflaştırılmıştır. SDS-PAGE ve Zimogram analizi çalışmaları sonucunda *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen selüloz enziminin 40 kDa büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada, *Bacillus vallismortis* RG-07 tarafından üretilen selüloz enzimi  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  çöktürme, iyon değişimi ve jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırılmış ve saflaştırılmış selülozün molekül ağırlığı, SDS-PAGE ve aktivite jeli analizi ile 80 kDa olarak saptanmıştır [41]. *Bacillus licheniformis* bakterisinden saflaştırılmış selülozünün molekül ağırlığı ise yaklaşık 55 kDa olarak rapor edilmiştir [71]. Yine termofilik bir suş olan *Bacillus* sp. C1AC5507 tarafından üretilen selüloz enziminin moleküler ağırlığı 55 kDa olarak bildirilmiştir [68]. *Bacillus subtilis* SU40 tarafından üretilen selüloz enziminin ise SDS-PAGE ile 51.4 kDa'lık molekül ağırlığına sahip olduğu rapor edilmiştir [69]. Yapılan farklı bir çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi iki *Bacillus* suşundan üretilen selüloz enzimlerinin molekül ağırlığı 40 kDa olarak bildirilmiştir [38]. Yine farklı bir çalışmada, *Bacillus circulans*'dan izole edilen alkalik endoglukanazın 43 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu saptamıştır [70]. *Bacillus sphaericus* JS1 suşundan elde edilen alkali selüloz enziminin moleküler ağırlığı 42 kDa olarak saptamıştır [72]. Bu çalışmada, *Bacillus cereus* DU-1 den elde edilen selüloz enziminin bazı *Bacillus* türleri tarafından sentezlenen selülozlar ile benzer moleküler ağırlığa sahip olduğu görülmektedir [38], [72].

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Düzce ili Akçakoca ilçesindeki selülotik atık içeren toprak öğreniğinden selülaz enzimi üretme yeteneği olan bakteri izolasyonu yapılmış ve ürettiği enzimin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir;

- Yapılan tür düzeyi çalışmalar sonucunda bakterinin *Bacillus cereus* suşu olduğu belirlenmiş olup *Bacillus cereus* DU-1 olarak adlandırılmıştır.
- *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen enzimin optimum üretim koşulları; azot kaynağı olarak triptone varlığında, 24 saat, pH 7.0 ve 37 °C olarak belirlenmiştir.
- *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen selülaz enzim optimum aktivitesini; pH 6.0'da ve 50°C'de gösterdiği belirlenmiştir.
- *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen selülaz enziminin spesifik aktivitesi 2,23 U/mg protein olarak belirlenmiştir.
- *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen selülaz enziminin  $V_{max}$  değeri 3,18 U/mL ve  $K_m$  değerleri 0,0019 mM olarak belirlenmiştir.
- Kısmi olarak saflaştırılan *Bacillus cereus* DU-1 suşu tarafından üretilen selülaz enziminin moleküler ağırlığı 40 kDa olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda *Bacillus cereus* izolasyonu yapılmış ve aynı zamanda iyi bir selülaz enzimi üreticisi de olduğu belirlenmiştir. Enzimin sıcaklığa toleranslı olması endüstriyel kullanım açısından önem taşıyabileceği düşünülmektedir. Gelecek çalışmalarda, enzim üretim ortamının selülotik tarım atıkları olarak tasarlanması ve bu sayede yüksek substrat afinitesine sahip olduğu tespit edilen enzimin düşük maliyet ile elde edilerek çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilme potansiyelinin ortaya çıkarılması oldukça önem taşımaktadır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] M. K. Bhat, “Cellulases and related enzymes in biotechnology”, *Biotechnology Advances*, c. 18, sayı 5, ss. 355–383, 2000.
- [2] A. Wiseman, “The Application of Enzyme in Industry,” *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2. baskı, Chichester, United Kingdom: Core Publishing, 1985, ss. 457-460.
- [3] Ö. Kıran, N. Dostbil, ve U. Çömlekçioğlu, “Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları”, *Journal of Science and Engineering*, c. 9, sayı 1, ss. 12–19, 2006.
- [4] J. M. Woodley, “Advances in enzyme technology-UK contributions”, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, c. 70, ss. 93–108, 2000.
- [5] R. Binner, V. Menath, H. Huber, M. Thomm, F. Bischof, D. Schmack, ve M.Reuter, “Comparative study of stability and half-life of enzymes and enzyme aggregates implemented in anaerobic biogas processes”, *Biomass Conversion and Biorefinery*, c. 1, sayı 1, ss. 1–8, 2011.
- [6] A. Cavaco-Paulo ve G. Gübitz, “General Characteristics of Enzymes,” *Textile Processing with Enzymes*, 1. baskı, Cambridge, England: Woodhead Publishing, 2003, ss. 1–228.
- [7] E. L. Casida, “The Enzymes,” *Industrial Microbiology*, 1. baskı, New York, USA: Wiley Publishing, 1968, ss. 366-380.
- [8] K. L. Lerner ve B. W. Lerner, “Enzyme Substrate Relationship,” *World of Microbiology and Immunology*, 2. baskı, England: Gale Publishing, 2003. ss. 1-359.
- [9] I. Herbots, B. Kottwitz, P. J. Reilly, R. L. Antrim, H. Burrows, H. B. M. Lenting, L. Viikari, A. Suurnaki, M. L. N. Paavola, J. Pere, ve J. Buchert., “Enzymes 4. Non-food Application,” *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7.baskı, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Publishing, 2008, ss. 3-97.
- [10] H. Tutar, “Candida rugosa lipaz enziminin sporopollenin üzerine adsorbsiyonu ve karakterizasyonu”, Yüksek lisans tezi, Kimya Mühendisliği, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye, 2009.
- [11] U. E. Zengin ve K. M. Gümüştaş, Enzimler, *Ders Notları*, İstanbul, 2016.
- [12] H. Korkmaz, N. Tinkılıç, T. Özen, ve A. Güder, Enzimlerin Katalizlediği Reaksiyonların Kinetiği, *Biyokimya-1 Ders Notları*, Samsun. 2015.

- [13] Ş. Topal, “Mikrobiyal enzimler ve biyoteknolojik yolla rennin üretimindeki gelişmeler”, *Journal of Food*, c. 13, sayı 3, ss. 183–190, 1988.
- [14] H. Uhlig ve E. M. Linsmaier-Bednar, “Microbial Industrial Enzymes,” *Industrial Enzymes and Their Applications* 1.baskı, New York, USA: IOP Publishing, 1998, ss. 454-455.
- [15] D. R. Lerner ve N. V. Raikhel, “The gene for stinging nettle lectin (*Urtica dioica* agglutinin) encodes both a lectin and a chitinase.”, *Journal of Biological Chemistry*, c. 267, sayı 16, ss. 11085–11091, 1992.
- [16] J. S. Van Dyk ve B. I. Pletschke, “A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy”, *Biotechnology Advances*, c. 30, sayı 6. ss. 1458–1480, 2012.
- [17] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Van Zyl, ve I. S. Pretorius, “Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, c. 66, sayı 3, ss. 506–577, 2002.
- [18] M. Brebu ve C. Vasile, “Thermal degradation of lignin - A review”, *Cellulose Chemistry and Technology*, c. 44, sayı 9. ss. 353–363, 2010.
- [19] L.T. Fan, M.M. Gharpuray, ve Y.H. Lee, Cellulose hydrolysis, *Biotechnology Monographs*, c. 60, sayı 8. 1988.
- [20] R. Lamed ve E. A. Bayer, “The cellulosome concept: exocellular/extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis”, *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, ss. 102–116, 1988.
- [21] R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, ve J. Youngblood, “Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites”, *Chemical Society Reviews*, c. 40, sayı 7, 2011.
- [22] H. Watanabe ve G. Tokuda, “Cellulolytic systems in insects”, *Annual Review of Entomology*, c. 55, sayı 1, ss. 609–632, 2010.
- [23] J. N. Saddler, “Factors limiting the efficiency of cellulase enzymes”, *Microbiological Sciences*, c. 3, sayı 3, ss. 84–87, 1986.
- [24] F. Niehaus, C. Bertoldo, M. Kähler, ve G. Antranikian, “Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, c. 51, sayı 6. ss. 711–729, 1999.
- [25] Y. H. Percival Zhang, M. E. Himmel, ve J. R. Mielenz, “Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies”, *Biotechnology Advances*, c. 24, sayı 5, ss. 452–481, 2006.
- [26] A. T. W. M. Hendriks ve G. Zeeman, “Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology*, c. 100, sayı 1. ss. 10–18, 2009.

- [27] L. J. Yin, P. S. Huang, ve H. H. Lin, "Isolation of cellulase-producing bacteria and characterization of the cellulase from the isolated bacterium cellulomonas Sp. YJ5", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, c. 58, sayı 17, 2010.
- [28] V. K. Gupta, "New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering," *Aspergillus System Properties and Applications*, 1. baskı, Aberdeen, United Kindom: Material Publishing, 2016, ss. 1-300.
- [29] R. Sukumaran, R. R. Singhanian, ve A. Pandey, "Microbial cellulases-production, applications and challenges", *Journal of Scientific and Industrial Research*, c. 64, sayı 11, ss. 832–844, 2005.
- [30] R. C. Kuhad, R. Gupta, ve A. Singh, "Microbial cellulases and their industrial applications", *Enzyme Research*, c. 2011, sayı 1, 2011.
- [31] W. A. Malik ve S. Javed, "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*, c. 9, 2021.
- [32] A. Suhag, V. Kumar, ve B. Singh, "Biochemical characteristics of a novel ethanol-tolerant xylanase from bacillus subtilis subsp. subtilis JJBS250 and its applicability in saccharification of rice straw", *Biomass Conversion and Biorefinery*, c. 9, 2021.
- [33] R. Rawat ve L. Tewari, "Purification and characterization of an acidothermophilic cellulase enzyme produced by bacillus subtilis strain LFS3", *Extremophiles*, c. 16, sayı 4, ss. 637–644, 2012.
- [34] S. Regmi, Y. S. Choi, Y. K. Kim, M. M. Khan, S. H. Lee, S. S. Cho, Y. Y. Jin, D. Y. Lee, J. C. Yoo, ve J. W. Shu, "Endoglucanase produced by bacillus subtilis strain cbs31: biochemical characterization, thermodynamic study, enzymatic hydrolysis, and bio-industrial applications", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, c. 25, sayı 1, ss. 104–116, 2020.
- [35] P. Vijayaraghavan, S. G. Prakash Vincent, ve G. S. Dhillon, "Solid-substrate bioprocessing of cow dung for the production of carboxymethyl cellulase by bacillus halodurans IND18", *Waste Management*, c. 48, ss. 513–520, 2016.
- [36] F. Dehghanikhah, J. Shakarami, ve A. Asoodeh, "Purification and biochemical characterization of alkalophilic cellulase from the symbiotic bacillus subtilis BC1 of the leopard moth, zeuzera pyrina (L.) (Lepidoptera: Cossidae)", *Current Microbiology*, c. 77, sayı 7, ss. 1254–1261, 2020.
- [37] L. Ma, W. Yang, F. Meng, S. Ji, H. Xin, ve B. Cao, "Characterization of an acidic cellulase produced by bacillus subtilis BY-4 isolated from gastrointestinal tract of tibetan pig", *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, c. 56, ss. 67–72, 2015.
- [38] C. Mawadza, R. Hatti-Kaul, R. Zvauya, ve B. Mattiasson, "Purification and characterization of cellulases produced by two bacillus strains", *Journal of Biotechnology*, c. 83, sayı 3, ss. 177–187, 2000.

- [39] L. Yuan, W. Wang, Y. Pei, ve F. Lu, “Screening and identification of cellulase-producing strain of fusarium oxysporum”, *Procedia Environmental Sciences*, c. 12, ss. 1213–1219, 2012.
- [40] A. P. Manfredi, J. H. Pisa, D. H. Valdeón, N. I. Perotti, ve M. A. Martínez, “Synergistic effect of simple sugars and carboxymethyl cellulose on the production of a cellulolytic cocktail from bacillus sp. AR03 and enzyme activity characterization”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, c. 179, sayı 1, ss. 16–32, 2016.
- [41] R. Gaur ve S. Tiwari, “Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from bacillus vallismortis RG-07”, *BMC Biotechnology*, c. 15, sayı 1, ss. 1–12, 2015.
- [42] W. J. Lu vd., “Effect of inoculating flower stalks and vegetable waste with ligno-cellulolytic microorganisms on the composting process”, *Journal of Environmental Science and Health*, c. 39, sayı 5–6, ss. 871–887, 2004.
- [43] N. S. Wang. (2022, May 15) *Experiment no.4a glucose assay by dinitrosalicylic colorimetric method*. [Online]. Available: <https://user.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4a.htm>
- [44] G. L. Miller, “Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar”, *Analytical Chemistry*, c. 31, sayı 6, ss. 426–428, 1959.
- [45] Anonim, (2022, 01 Nisan). [Online]. Erişim: <https://cynthialearnsthings.wordpress.com/2016/07/13/dns-assay/> (Erişim 01 Nisan 2022).
- [46] M. Garriga, A. Melisa, ve A. Marchiaro, “Determination of reducing sugars in extracts of undaria pinnatifida (harvey) algae by uv-visible spectrophotometry (DNS method)”, *Development and Innovation in Engineering*, c. 3, sayı 7, ss. 173–179, 2017.
- [47] J. Sambrook ve D. W. Russell, “Molecular cloning: a laboratory manual”, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, c. 39, sayı 5, ss. 871–887, 2001.
- [48] C. Florencio, S. Couri, ve C. S. Farinas, “Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by trichoderma strains”, *Enzyme Research*, c. 2012, sayı 8, 2012.
- [49] A. A. Green ve W. L. Hughes, “Ammonium Sulfate Precipitation,” *Methods in Enzymology*, 1. baskı, Cambridge, England: Academic Press Publishing, 1955, ss. 3-197
- [50] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, ve R. J. Randall, “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *The Journal of Biological Chemistry*, c. 193, sayı 1, ss. 265–275, 1951.
- [51] U. K. Laemmli, “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, c. 227, sayı 5259, ss. 680–685, 1970.

- [52] S. Gallagher ve E. Wiley, "Current Protocols Essential Laboratory Techniques," *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 1. baskı, New York, USA: Wiley-Blackwell Publishing, 2008, ss. 23–43.
- [53] C. Champasri, T. Champasri, ve K. Woranam, "Purification, biochemical characterization of a macrotermes gilvus cellulase and zymogram analysis", *Asian Journal of Biochemistry*, c. 10, sayı 5, 2015.
- [54] K. Arthi, B. Appalaraju, ve S. Parvathi, "Vancomycin sensitivity and KOH string test as an alternative to gram staining of bacteria", *Indian Journal of Medical Microbiology*, c. 21, sayı 2, ss. 121–123, 2003.
- [55] F. A. Sharif ve N. G. Alaeddinoglu, "A rapid and simple method for staining of the crystal protein of bacillus thuringiensis", *Journal of Industrial Microbiology*, c. 3, sayı 4, ss. 227–229, 1988.
- [56] J. Sambrook, E. R. Fritsch, ve T. Maniatis, "Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed.", *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, c. 61, sayı 1, ss. 17–18, 1989.
- [57] K. Tamura, M. Nei, ve S. Kumar, "Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method", *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, c. 101, sayı 30, ss. 11030–11035, 2004.
- [58] K. Tamura ve M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees", *Molecular Biology and Evolution*, c. 10, sayı 3, ss. 512–526, 1993.
- [59] L. L. Lin, C. C. Chyau, ve W. H. Hsu, "Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic bacillus sp. TS-23", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, c. 28, sayı 1, ss. 61–68, 1998.
- [60] Greaves H., "The effeced of sustrate avallability on cellulolytic enzyme production by selected woodrotting microorganisms", *Australian Journal of Biological Sciences*, c. 24, sayı 2, ss. 1169–1180, 1971.
- [61] D. Knosel, "Continued investigations for pectolytic and cellulolytic activity of different Bacillus-species", *Article in German*, c. 12, sayı 46, 1971.
- [62] Aygan A, "Haloalkalofil bacillus sp. izolasyonu, amilaz, selülaz ve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği", Doktora tezi, Biyoloji, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye, 2008.
- [63] F. Meng, L. Ma, S. Ji, W. Yang, ve B. Cao, "Isolation and characterization of bacillus subtilis strain BY-3, a thermophilic and efficient cellulase-producing bacterium on untreated plant biomass", *Letters In Applied Microbiology*, c. 59, sayı 3, ss. 306–312, 2014.
- [64] Y. Hakamada, K. Koike, T. Yoshimatsu, H. Mori, T. Kobayashi, ve S. Ito, "Thermostable alkaline cellulase from an alkaliphilic isolate, bacillus sp. KSM-S237", *Extremophiles*, c. 1, sayı 3, ss. 151–156, 1997.

- [65] J. Y. Kim, S. H. Hur, ve J. H. Hong, “Purification and characterization of an alkaline cellulase from a newly isolated alkalophilic bacillus sp. HSH-810”, *Biotechnology Letters*, c. 27, sayı 5, ss. 313–316, 2005.
- [66] K. M. Bischoff, A. P. Rooney, X. L. Li, S. Liu, ve S. R. Hughes, “Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of bacillus licheniformis”, *Biotechnology Letters*, c. 28, sayı 21, ss. 1761–1765, 2006.
- [67] V. Verma, A. Verma, ve A. Kushwaha, “Isolation and production of cellulase enzyme from bacteria isolated from agricultural fields in district Hardoi, Uttar Pradesh, India”, *Advances in Applied Science Research*, c. 3, sayı 1, ss. 171–174, 2012.
- [68] I. Q. M. Padilha, L. C. T. Carvalho, P. V. S. Dias, T. C. S. L. Grisi, F. L. Honorato da Silva, S. F. M. Santos, ve D. A. M. Araujo, “Production and characterization of thermophilic carboxymethyl cellulase synthesized by bacillus sp. growing on sugarcane bagasse in submerged fermentation”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, c. 32, sayı 1, ss. 35–42, 2015.
- [69] B. M. Asha ve N. Sakthivel, “Production, purification and characterization of a new cellulase from bacillus subtilis that exhibit halophilic, alkalophilic and solvent-tolerant properties”, *Annals of Microbiology*, c. 64, sayı 4, ss. 1839–1848, 2014.
- [70] Y. Hakamada, K. Endo, S. Takizawa, T. Kobayashi, T. Shirai, T. Yamane, ve S. Ito “Enzymatic properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from bacillus circulans”, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, c. 1570, sayı 3, ss. 174–180, 2002.
- [71] M. Afzal, M. Qureshi, S. Khan, M. I. Khan, A. Ashraf, ve A. Iqbal “Production, purification and optimization of cellulase by bacillus licheniformis HI-08 isolated from the hindgut of wood-feeding termite”, *International Journal of Agriculture and Biology*, c. 21, sayı 1, ss. 125–134, 2018.
- [72] J. Singh, N. Batra, ve R. C. Sobti, “Purification and characterisation of alkaline cellulase produced by a novel isolate, bacillus sphaericus JS1”, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, c. 31, sayı 2, ss. 51–56, 2004.

## 7. EKLER

### 7.1. EK 1: *Bacillus cereus* DU-1 İZOLATINA AİT 16S RDNA'NIN KİSMİ SEKANS DİZİSİ

GCANTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGAC  
GGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGA  
AACCGGGGCTAATACCGGATAAYATTTTGAAGTGCATGGTTCGAAATTGAA  
AGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTG  
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG  
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGA  
GTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTG  
CTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA  
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC  
CCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA  
AGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAG  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA  
ACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAAC  
GCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGG  
AATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA  
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCTAGAGATAG  
GGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTA  
GTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG  
AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTAC  
ACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAG  
CTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC  
ATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCANCA

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hatice Elif IŞIK BİÇEN

Yabancı Dili : İngilizce

### ÖĞRENİM DURUMU

| Derece | Alan              | Okul/Üniversite      | Mezuniyet Yılı |
|--------|-------------------|----------------------|----------------|
| Lisans | Gıda Mühendisliği | Sakarya Üniversitesi | 2016           |
| Lise   | Matematik – Fen   | Akçakoca Lisesi      | 2011           |

### YAYINLAR

H. E. Işık Biçen ve S. Uğraş, “Selülitik Bakteri İzolasyonu ve Selülaz Enzimin Kısmi Karakterizasyonu”, Bursa Uludağ Üniversitesi 12. Gıda Mühendisliği Öğrenci Kongresi, 2022.